

2ml. 2592.7

Université de Montréal

Caractérisation sérologique des souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 2 à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Par

Kane Cheikh Saad Bouh

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Décembre 1997

© Kane Cheikh Saad Bouh, 1997



2011 27 19 7

SF
607
U54
1998
V.008

L'Université de Montréal

Caractérisation sérologique des souches d'*Escherichia coli* O157:H7
et O157:H7 à l'aide d'anticorps polyclonaux et
monoclonaux.

1997

Jean-Charles Saub-Bonn

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
Maîtrise en sciences vétérinaires
en sciences vétérinaires et en microbiologie

Montréal, 1997

© Jean-Charles Saub-Bonn 1997



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

"Caractérisation sérologique des souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 2 à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux."

Présenté par:

Kane Cheikh Saad Bouh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Robert Higgins	Président-rapporteur
Dr Khyali R. Mittal	Directeur
Dr Marcelo Gottschalk	Co-directeur
Dr Serge Messier	Membre

Mémoire accepté le:.....9.03.12.....

SOMMAIRE

Actinobacillus pleuropneumoniae est responsable de pertes économiques importantes pour l'industrie porcine par le biais des cas aigus et chroniques qu'elle cause chez les porcs infectés. Vu l'impact de la chronicité de cette pathologie sur les élevages, la détermination des relations antigéniques entre les différents sérotypes et la caractérisation des souches de champs sont d'une importance capitale aux points de vue épidémiologique et diagnostique. Dans cette étude, à l'aide de différentes techniques sérologiques, notamment la coagglutination, l'immunodiffusion, la contreimmunoélectrophorèse et l'hémagglutination indirecte, la relation antigénique entre les souches de sérotype 2 des biotypes I et II a été étudiée. En effet, les souches de biotype I partagent des déterminants antigéniques avec les souches 4226 et S1536 (sérotype 2 biotype I) et avec la souche N-282 (sérotype 2 biotype II) mais pas avec la souche N-273 (sérotype 1 biotype II). Par contre, les souches de biotype II partagent seulement des déterminants antigéniques avec les souches S1536 (sérotype 2 biotype I) et N-282 (sérotype 2 biotype II) mais pas avec les souches 4226 (sérotype 2 biotype I) et N-273 (sérotype 1 biotype II).

Également, deux anticorps monoclonaux (AcMox) MK-7 et MK-10 ont été produits et caractérisés par des techniques ELISA, Dot-ELISA, ELISA-Inhibition, SDS-PAGE et immunobuvardage, traitements chimique et enzymatique en utilisant des antigènes comme les cellules entières (WC), les lipopolysaccharides (LPS) et les protéines de la membrane externe (PME). Ces AcMox sont spécifiques au sérotype 2 biotype I et sont dirigés contre le LPS et plus exactement contre les constituants des hydrates de carbone. Par un test ELISA, les AcMox reconnaissent toutes les souches de champs de sérotype 2 biotype I, d'où leur intérêt comme complément aux méthodes de sérotypie utilisant des anticorps polyclonaux.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	II
SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
REMERCIEMENTS.....	VIII
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1-Taxonomie.....	4
2-Sérotypie.....	5
2.1. Les différents sérotypes et leur distribution.....	5
2.2. Méthodes utilisées en sérotypie.....	6
2.3. Parenté antigénique.....	7
3-Facteurs de virulence.....	8
3.1. Polysaccharides capsulaires.....	8
3.2. Lipopolysaccharides.....	9
3.3. Protéines de la membrane externe.....	10
3.4. Exotoxines.....	11
3.5. Fimbriae ou Pili.....	13
4-Pathogénie et diagnostic.....	13
4.1. Pathogénie.....	13

4.2. Diagnostic.....	14
4.2.1. Diagnostic Bactériologique.....	14
4.2.2. Diagnostic Sérologique.....	14
5-Prévention et contrôle de la pleuropneumonie porcine.....	16
III. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	18
Cheikh Saad Bouh, K. and Mittal, K.R. Serological characterization of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 2 strains by using polyclonal and monoclonal antibodies.(Soumis au journal Veterinary Microbiology)	
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	47
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	52

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I: Reference and fields strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other Gram-negative bacteria used.

TABLEAU II: Antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains as detected by various serological tests.

TABLEAU III: Effect of absorption of rabbit antiserum against S1536 strain (serotype 2 biotype I) with homologous and heterologous antigens.

TABLEAU IV: ELISA-Inhibition test of Mabs with Whole Cell antigen of serotype 2 (biotype I and II) and sodium periodate and proteinase K treated antigen.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: SDS-PAGE and WESTERN-BLOT of Whole Cell of different serotypes of *Actinobacillus. pleuropneumoniae*: serotype 1A (lane 1), serotype 1B (lane 2), serotype 2 (S1536) (lane3), serotype 3 (lane4), serotype 4 (lane5), serotype 5a (lane 6), serotype 6 (lane7), serotype 7 (lane 8), serotype 8 (lane 9), serotype 9 (lane 10), serotype 10 (lane 11), serotype 2 (4226) (lane 12), serotype 11 (lane 13), serotype 12 (lane 14), serotype 5b (lane 15), serotype 2 biotype II (N-282)(lane 16). Molecular mass markers are indicated on the left.

Figure 2: SDS-PAGE and WESTERN-BLOT of Lipopolysaccharides (LPS) and Outer Membrane Proteins (OMP) of serotype 2 (S1536): LPS (lane 1), Sodium periodate treated LPS (lane 2) and OMP (lane 3). Molecular mass markers are indicated on the left.

Figure 3: Effect of Sodium periodate treatment of Whole Cell of *Actinobacillus. pleuropneumoniae* serotype 2 (S1536) on binding with Mabs MK-7 and MK-10 in ELISA.

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux et toutes celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce projet et également à ceux qui ont eu à le juger, plus particulièrement:

- Le Dr Khyali R. Mittal directeur de mon projet de maîtrise, par sa rigueur, ses qualités scientifiques et son soutien sans faille.
 - Le Dr Marcelo Gottschalk d'avoir co-dirigé ce travail, pour ses conseils judicieux et sa disponibilité.
 - Le Dr Robert Higgins d'avoir accepté de présider ce jury et en mémoire à son soutien durant ma formation de maîtrise.
 - Le Dr Serge Messier de l'honneur accordé en siégeant dans ce jury.
 - Le Dr Réal Lallier de son soutien et sa disponibilité.
 - Madame Suzanne Bourdon pour son aide technique précieuse durant cette maîtrise.
 - Madame Sonia Lacouture d'avoir participé à mon initiation à la recherche.
 - Tous les membres du GREMIP et en particulier Madame Thérèse Gendron-Bernard pour les services rendus et sa jovialité.
 - Madame Micheline St-Germain pour sa disponibilité.
 - Le Programme des Bourses d'Excellence de la Francophonie.
-

I. INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae est une bactérie Gram-négative responsable de la pleuropneumonie porcine, une maladie caractérisée par une pneumonie aiguë fibrino-hémorragique ou nécrosante. L'infection peut se développer à tout âge mais les porcs de plus de 12 semaines sont les plus vulnérables. Deux biotypes sont définis sur la base de la dépendance ou la non-dépendance à la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD): des souches de biotype I (NAD dépendant) et des souches de biotype II (NAD indépendant). Douze sérotypes de biotype I sont répertoriés en fonction des antigènes capsulaires, avec les sérotypes 5 et 1 qui sont subdivisés en 5A et 5B; 1A et 1B respectivement.

À ce jour, deux sérotypes de biotype II sont connus. Des réactions croisées sont observées entre les différents sérotypes, notamment entre les sérotypes de biotype I: 1, 9 et 11; 3, 6 et 8; 4 et 7. Ces réactions croisées sont attribuées aux antigènes "O" des lipopolysaccharides (LPS), alors que les épitopes spécifiques de sérotype sont reliés aux polysaccharides capsulaires (PSC). Par contre, les souches de sérotypes 6 et 8 partagent des déterminants antigéniques polysaccharidiques au niveau de la capsule (Nielsen et O'Connor., 1984). Le problème des animaux infectés chroniquement et le manque d'efficacité du contrôle de cette infection par la prophylaxie canalisent sur l'importance de la sérologie. D'où l'intérêt sur le plan épidémiologique et prophylactique de la détermination des différentes relations antigéniques entre les sérotypes d'un même biotype et entre ceux des biotypes différents. D'autre part, considérant les différentes réactions croisées entre les souches du même biotype lors de l'utilisation des anticorps polyclonaux, il est d'un grand intérêt d'utiliser des anticorps monoclonaux spécifiques de sérotype et pouvant reconnaître les souches de champs. D'un autre côté, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans les tests sérologiques offre l'avantage de la grande spécificité et de la production continue. De ce fait les objectifs suivants ont été fixés pour ce projet:

- L'étude de la relation antigénique entre les différentes souches de biotype I et II.
- La production d'anticorps monoclonaux spécifiques au sérotype 2 biotype I et l'étude de leurs réactions avec les souches de champs.

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Taxonomie

En remarquant que les souches d'*Haemophilus* responsables de la pleuropneumonie porcine étaient différentes de celles d'*Haemophilus parahaemolyticus* d'origine humaine, Kilian et coll. (1978) officialise le nom d'*Haemophilus pleuropneumoniae*, nom qui avait été attribué précédemment à ces souches par Shope (1964). Kilian et coll. (1978) décrivent les bactéries de cette espèce comme des bâtonnets pléomorphes à tendance coccobacille, Gram-négatif et non mobiles. Sur gélose au sang, ces bactéries produisent une zone d'hémolyse qui est accentuée par la β -lysine de *Staphylococcus aureus* d'où la réaction de CAMP positive. L'espèce requiert le facteur V (nicotinamide adénine dinucléotide ou NAD) pour sa croissance mais non le facteur X (protohème).

L'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine avait souvent été confondu avec *Haemophilus parahaemolyticus* car il y avait une ressemblance entre les isolats porcins et les souches hémolytiques d'*Haemophilus* d'origine humaine (Lewis et Schwartz., 1987). En 1983 Pohl et coll. proposent de transférer *H. pleuropneumoniae* au genre *Actinobacillus* et lui donnent le nom d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, ceci après avoir démontré qu'*Haemophilus pleuropneumoniae* était plus près d'*A. lignieresii* que d'*Haemophilus influenzae*. Par la même occasion, par des techniques d'homologie génomique, ils démontrent une association étroite entre les genres *Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella*

En fonction du besoin en NAD on désigne 2 biotypes: biotype I (NAD dépendant) et biotype II (NAD indépendant). Plus tard, Niven et Lévesque (1988) montrent que les souches du biotype II peuvent être aussi dépendantes du NAD. Ainsi, il a été admis que les 2 biotypes étaient dépendants du facteur V. D'où l'élargissement de la définition du facteur V (source de pyridine nucléotide) en y incluant: la nicotinamide (NAM), la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD),

la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), la nicotinamide adénine mononucléotide (NMN) et la nicotinamide riboside (NR). L'isolement sporadique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype II associée à une pneumonie nécrotique et une pleurésie a été rapporté pour la première fois par Bertschinger et Seifert (1978).

2. Sérotypie

2.1 Les différents sérotypes et leur distribution

À ce jour, 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* biotype I ont été décrits (Nielsen, 1986b). Nicolet et coll. (1971) décrivent les sérotypes 1, 2 et 3 par des épreuves de précipitation, d'agglutination, d'immunofluorescence et du test de Neufeld (gonflement de la capsule).

Les sérotypes 4 et 5 sont caractérisés par agglutination en tube et immunodiffusion par Gunnarson et coll. (1977). Le sérotype 6 est décrit par Nielsen (1982) tandis que le sérotype 7 est proposé par Rosendal et Boyd (1982) par le biais de l'immunofluorescence indirecte. Par les techniques d'immunodiffusion en gel et d'hémagglutination, Nielsen et O'Connor (1984) caractérisent le sérotype 8. Nielsen (1985a, 1985b) caractérise également, par les mêmes techniques, les sérotypes 9 et 10. Quant au sérotype 11 il a été identifié par Kamp et coll. (1987) par agglutination sur lame. Finalement Nielsen (1986b) décrit le sérotype 12 par immunodiffusion.

Les 12 sérotypes de biotype I ont été définis sur la base des antigènes capsulaires avec les sérotypes 5 et 1, lesquels sont respectivement subdivisés en sous-groupes 5A et 5B (Nielsen, 1986a) puis en 1A et 1B (Rika et coll., 1994).

Au Canada, Mittal et coll. (1989) rapportent la présence des sérotypes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 et 12. Quant au Québec, durant de nombreuses années, les sérotypes les plus prévalents étaient le 1, 5 (5a et 5b) et ensuite les sérotypes 2, 3, 6, 7, 8, 10 et 12 avec des prévalences moyennes respectives de 68%, 25% et 9% pour le dernier groupe.

Alors qu'actuellement les sérotypes les plus rencontrés au Québec sont dans l'ordre le 5, 1, 7 et le groupe 2, 3, 6, 7, 8, 10 et 12 avec des prévalences moyennes respectives de 39%, 36%, 20% et 5% pour le dernier groupe (Mittal, K.R. Communication personnelle 1997). Le sérotype 4 a récemment été isolé au Québec (Gottschalk. Communication personnelle). Deux sérotypes de biotype II (sérotypes 1 et 2) ont été proposés par Fodor et coll. (1989).

Nielsen et coll. (1997) en considérant les biotypes I et II et en fonction d'une homogénéité antigénique et une différence sérologique de huit souches par rapport aux sérotypes connus de ces deux biotypes, proposent ces souches comme étant des membres du sérotype 3 du biotype II de *A. pleuropneumoniae*. Également, selon ces auteurs, le sérotype 1 biotype II pourrait être considéré comme sérotype 13 et les souches proposées lors de cette étude, comme sérotype 14.

2.2 Méthodes utilisées en sérotypie

Il existe une grande hétérogénéité sérologique chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* et par conséquent, la sérotypie est importante pour les études épizootiques et immunologiques des infections à *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Veary, 1989). La détermination du ou des sérotypes impliqués dans une région donnée permet de confirmer l'identification bactériologique et également un meilleur contrôle de la maladie et une bonne surveillance épidémiologique. Parmi les méthodes de sérotypie développées on peut citer:

- a) L'agglutination lente en tube (Gunnarson et coll., 1977) et l'agglutination rapide sur lame (Mittal et coll., 1981, 1982 et 1987a). Cependant ces deux épreuves ne permettent pas de sérotyper les souches autoagglutinantes (Hunter et coll., 1983; Mittal et coll., 1982 et 1987a; Rapp et coll., 1985).
- b) L'immunodiffusion en gel est également utilisée (Nicolet et coll., 1971; Gunnarson, 1979; Rosendal et coll., 1981), bien que donnant de bons résultats sur

le plan de la spécificité elle reste longue et coûteuse.

- c) Le test de précipitation en anneau (Ring precipitation) (Mittal et coll., 1982) est préconisé comme alternative au problème des isolats autoagglutinants.
- d) L'hémagglutination indirecte (Mittal et coll., 1983a) est une méthode utilisant des érythrocytes de mouton mis en présence d'un extrait salin d'une culture de 18 heures.
- e) L'immunofluorescence indirecte (Nicolet et coll., 1971; Rosendal et coll., 1981; Hunter et Livingstone, 1986) est une technique dans laquelle des frottis sont directement fixés sur une lame à l'aide d'une solution de formol. Après réaction avec des sérums de lapin anti-*A. pleuropneumoniae*, la révélation se fait par l'addition d'un sérum anti-IgG de lapin couplé à l'isothiocyanate de fluoresceine. C'est une épreuve qui ne détecte que les antigènes de surface.
- f) Le test de coagglutination (Mittal et coll., 1983b), technique qui présente un avantage dans la détection des antigènes solubles et particulaires (Hunter et Livingstone, 1986; Mittal et coll., 1987a et 1987b).
- g) La contre-immunoelectrophorèse a été utilisée par Piffer et coll. (1986). Ce test par sa sensibilité est sa commodité peut s'avérer une solution de choix pour le sérotypage des souches autoagglutinantes. Mittal et coll. (1993) rapportent que les techniques d'immunodiffusion et d'hémagglutination indirecte restent les tests standards dans l'identification des nouveaux sérotypes. Enfin, les tests de contre-immunoelectrophorèse et de coagglutination sont simples et rapides à réaliser et sont d'une grande importance dans le diagnostic des cas aigus de pleuropneumonie mais ne seraient pas capables de détecter les cas chroniques.

2.3 Parenté antigénique

Nicolet et coll. (1971) suggèrent qu'il existe au moins trois groupes d'antigènes, ceci à l'aide des tests d'agglutination en tube ou sur lame utilisant des antigènes de cellules entières chauffées ou non ou d'extraits aqueux de cellules. Ces antigènes se répartissent comme suit:

un groupe d'antigènes thermostables, capsulaires et spécifiques du sérotype, un groupe d'antigènes thermolabiles, capsulaires et spécifiques de sérotype et un groupe d'antigènes thermostables, somatiques et communs à toutes les souches de l'espèce. Malgré la méthode de sérotypage utilisée des réactions croisées subsistent et ce en particulier entre les sérotypes 1, 9 et 11; 3, 6, et 8; 4 et 7 (Mittal, 1990; Nielsen, 1985a, b). Les épitopes communs existent entre les antigènes O des LPS et comme exemple la chaîne O du LPS des sérotypes 1 et 11. Il a été suggéré que la classification des isolats d'*A. pleuropneumoniae* soit faite en fonction des antigènes spécifiques de sérotype, par exemple les sérotypes 1, 9 et 11 seront désignés comme K1:O1, K9:O1 et K11:O1 respectivement (Perry et coll. 1990; Rodriguez-Barbosa et coll. 1996).

Fodor et coll. (1989) rapportent des réactions croisées entre la souche N-282 de sérotype 2 biotype II et la souche S1536 de sérotype 2 biotype I. D'autre part, Nielsen et coll. (1996) démontrent que neuf souches danoises d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype I partagent des épitopes polysaccharidiques capsulaires avec le sérotype 2 biotype I (S1536 et 4226) et des épitopes au niveau de la chaîne O du LPS avec le sérotype 7 de biotype I (WF 83).

3. Facteurs de virulence

3.1 Polysaccharides capsulaires (PSC)

Une étude de la structure chimique du polysaccharide capsulaire d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (ATCC 27088) par Altman et coll. (1986) démontre que la structure est de type acide teïchoïque formé par la répétition d'une unité disaccharidique composée d'une unité D-galactose et d'un groupement O-acétyl présent à 85% des unités répétitives. *A. pleuropneumoniae* est en général capsulé mais l'épaisseur du matériel capsulaire varie selon l'isolat et l'âge de la culture (Jacques et coll., 1988a).

Jacques et coll. (1988b) montrent que les différences de virulence entre les sérotypes pourraient être expliqués par des différences dans la structure du matériel capsulaire entre les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Inzana (1990) rapporte qu'un isolat capsulé d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 était résistant à la lyse par des anticorps contre la capsule ou contre des antigènes somatiques en présence du complément. Par contre, un mutant non-capsulé de cet isolat était fortement sensible à la lyse par le complément. Le mécanisme de résistance de l'isolat capsulé d'*A. pleuropneumoniae* n'est pas bien défini, mais tout semble indiquer que la capsule interfère avec la déposition du complexe d'attaque membranaire par le complément (Inzana, 1990). Udeze et Kadis (1992) montrent que des anticorps non spécifiques présents avant immunisation et reconnaissant des épitopes polypeptidiques exposés à la surface, pourraient inhiber l'action bactéricide des anticorps anti-capsulaires et ceci dans le cadre de la résistance de la souche 4074 du sérotype 1 au système du complément.

3.2 Lipopolysaccharides (LPS)

Les lipopolysaccharides sont retrouvés au niveau de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Ils sont constitués de trois parties: 1) l'antigène "O" polysaccharidique, 2) le core oligosaccharidique et 3) le lipide A (Fenwick, 1990). Chaque sérotype est associé à un LPS possédant une structure unique de la chaîne "O"; Cependant la longueur de la chaîne "O" peut varier au niveau d'un même sérotype (Altman et coll., 1990). La plupart des souches lisses (S) contiennent une longue chaîne "O" alors que les souches rugueuses (R) ne possèdent pas de chaîne "O". Le LPS des souches rugueuses possède une activité toxique supérieure à celle causée par le LPS de type lisse (Fenwick et Osburn, 1986). Chez *A. pleuropneumoniae*, il existe des LPS de type lisse et semi-rugueux (Bélanger et coll., 1990; Byrd et Kadis, 1989).

Fenwick et Osburn (1986) de même que Radacovici et coll. (1992) montrent que les LPS de type lisse contiendraient des déterminants antigéniques spécifiques de sérotype et de souche, tandis que les LPS de type rugueux ne contiendraient que des antigènes spécifiques d'espèce ou inter-espèces et également seraient responsables des réactions non spécifiques des sérotypes. La membrane externe traverse la couche capsulaire par le biais de vésicules (ou "blebs") et de ce fait, expose des LPS à la surface cellulaire d'*A. pleuropneumoniae* (Jacques et coll., 1988b).

Selon Altman et coll. (1987), les LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 2 est de type lisse et par clivage on obtient un lipide A et une chaîne O-polysaccharidique identifiée comme un polymère linéaire non ramifié formé d'unités pentasaccharidiques. Perry et coll., (1990) rapportent que les antigènes "O" du LPS spécifiques sont toujours associés aux polysaccharides capsulaires spécifiques chez *A. pleuropneumoniae*.

Stenbaek et Hovind-Haugen (1996) montrent l'existence de deux types d'isolats d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 2 sur la base du LPS et plus exactement un isolat APP-2 et un isolat APP-2X qui pourrait être un mutant de la souche 4226.

3.3 Protéines de la membrane externe (PME)

Nicolet et coll. (1980) par SDS PAGE analysent les protéines totales des souches du genre *Haemophilus* présentes chez le porc et font observer que le patron des protéines chez *H. pleuropneumoniae* est très homogène et spécifique d'espèce. D'autre part, le patron des protéines n'est pas affecté ni par les conditions de croissance ni par les méthodes d'extraction.

Rapp et coll. (1986) en analysant les profils électrophorétiques (SDS-PAGE) des souches de référence des sérotypes 1 à 9 d'*A. pleuropneumoniae*, distinguent 7 patrons de profils protéiniques:

deux protéines de 16 KDa à 16,5 KDa et de 39 KDa à 44 KDa et une troisième bande thermo-modifiable de 29 KDa. Les sérotypes 1 et 9 partagent un patron similaire ainsi que les sérotypes 2 et 6. Les sérotypes 3, 4, 5, 7 et 8 possèdent leur patron distinctif. MacInnes et Rosendal (1987) rapportent que 3 à 5 PME majeures peuvent être détectées pour les souches des sérotypes 1 à 8 d'*A. pleuropneumoniae*. Toutes les souches contiennent 3 PME majeures de poids moléculaires approximatifs de 17-18 KDa, 32 KDa et 42-43 KDa. D'autre part les mêmes auteurs rapportent que les PME majeures de 17 KDa, 32 KDa et 42 KDa sont aussi reconnues par les antisérums préparés contre *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis*, différentes souches du "minor group" et *Pasteurella haemolytica*. De même, *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus equuli*, *Pasteurella haemolytica* et *Actinobacillus lignieresii* partagent des épitopes communs au niveau des PME majeures.

Les sérotypes 1 à 5 et le sérotype 7 produisent des PME de 105 KDa et 76 KDa dans les conditions réduites en fer (Deneer et Potter, 1989a). Deneer et Potter (1989b) rapportent la présence d'une PME de 42 KDa induite par le maltose chez *A. pleuropneumoniae* et suggèrent que cette protéine jouerait le rôle de porine dans le transport du maltose à travers la membrane externe. Toutefois cette protéine ne peut fonctionner comme récepteur du phage lambda. Wilmot et coll. (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 Gram-négatifs du porc.

3.4 Exotoxines

A. pleuropneumoniae sécrète des exotoxines labiles à la chaleur, qui possèdent différentes activités biologiques. Ces toxines font partie du groupe des RTX (Repeats in the Structural Toxin). Les déterminants génétiques pour les toxines RTX consistent

en quatre gènes: A, gène de la protéine structurale; C, gène codant pour une protéine activatrice qui est impliquée dans la conversion de la protoxine en toxine active; B et D, gènes codant pour des protéines associées à la membrane, lesquelles sont essentielles dans le processus de la sécrétion des toxines. Les quatre gènes RTX sont typiquement retrouvés dans une seule unité transcriptionnelle, CABD et sont exprimés à partir d'un promoteur commun situé en amont du gène C (Welch et Pellet, 1988).

Une désignation uniforme des hémolysines, cytolysines, pleurotoxines et de leurs gènes a été proposée par Frey et coll. (1993) pour *A. pleuropneumoniae*. Ainsi "*A. pleuropneumoniae* RTX-toxin" sera désignée sous l'appellation de Apx. On distingue 3 types d'Apx:

- a) ApxI (*A. pleuropneumoniae* RTX toxin I), est une toxine fortement hémolytique et cytolitique; également hémolysine I (HLYI) ou cytolysine I (CLYI) (Frey et Nicolet, 1988). Elle est sécrétée par les souches de référence des sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11; la masse moléculaire apparente de la toxine est de 105 à 110 KDa. Les gènes de l'opéron ApxI sont désignés *ApxIC*, *ApxIA*, *ApxIB* et *ApxID*.
- b) ApxII, elle est retrouvée chez tous les sérotypes sauf le sérotype 10 et possède une activité faiblement hémolytique et modérément cytotoxique. La masse moléculaire apparente est de 103 à 105 KDa. Les gènes de l'opéron ApxII sont désignés par *ApxIIC* et *ApxIIA*.
- c) ApxIII qui est une toxine non hémolytique mais fortement cytotoxique, retrouvée chez les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8 avec une masse moléculaire apparente de 120 KDa.

Nagai et coll. (1993) démontrent que toutes les souches possédant une séquence Lha (*hlyIA*) ont une forte activité hémolytique et sont très virulentes chez la souris. Également la distribution de la séquence LhA (*hlyIA*) parmi les souches de référence des 12 sérotypes est la même que pour la protéine ApxI, suggérant ainsi que

l'hémolysine ApXI soit associée au phénotype de virulence chez *A. pleuropneumoniae*.

3.5 Fimbriae ou Pili

Utrera et Pijoan (1990) démontrent, par microscopie électronique, la présence de fimbriae chez des souches de champs de sérotype 1 et chez celles isolées de la trachée de porc infectés expérimentalement. En effet 45% des bactéries isolées de cas provenant du terrain possèdent des fimbriae, toutefois les fimbriae ne sont présents que chez les isolats obtenus sur gélose au sang. Cependant ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Rapp et coll. (1986) et par Jacques et coll. (1988b) qui n'avaient pas réussi à observer des structures semblables aux pili.

4. Pathogénie et diagnostic

4.1 Pathogénie

A. pleuropneumoniae biotype I est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine qui se traduit par une pneumonie aiguë fibrino-hémorragique ou nécrosante. La pleuropneumonie porcine est associée aux conditions de stress des systèmes d'élevage intensif. Les porcs de tout âge peuvent être infectés mais avec une plus grande vulnérabilité chez ceux de plus de 12 semaines (Sebunya et coll., 1982). La virulence serait attribuée à la présence de la capsule, d'une ou plusieurs exotoxines et de l'endotoxine (Bertram, 1990; Fenwick, 1990; Inzana, 1990; Nicolet, 1992). En effet, l'évolution de l'infection avec ses foyers hémorragiques pulmonaires, une pleurésie fibrineuse et une coagulopathie, suggère l'action d'une ou plusieurs toxines potentialisée par des médiateurs de l'inflammation (Nicolet, 1994).

"In vitro" les toxines Apx causent une lyse des macrophages. Cependant, il faut considérer une pathogénie multifactorielle durant laquelle les polysaccharides capsulaires avec leur action antiphagocytaire et les lipopolysaccharides en stimulant les médiateurs de l'inflammation participent au complexe d'attaque

bactérien (Nicolet, 1994).

D'autre part, des porteurs asymptomatiques se rencontrent durant des mois après un rétablissement d'une infection (Sebunya et coll., 1983). Quant aux souches de biotype II, elles sont isolées sporadiquement de cas de pneumonie nécrotique et de pleurésie (Bertschinger et Seifert, 1978). Également, elles sont isolées de pneumonie en Allemagne (Kielstein et coll., 1981), en Hongrie (Fodor et coll., 1989), aux États-Unis (Frank et coll., 1992), en Belgique et en Hollande (Kamp et coll., 1994).

4.2 Diagnostic

En plus des signes cliniques observables dans les cas aigus, notamment l'hyperthermie, une détresse respiratoire sévère avec cyanose, la dyspnée, l'anorexie et l'épistaxis (Nielsen, 1970a; Nielsen, 1973; Perrin et coll., 1979), il est nécessaire d'effectuer des analyses bactériologiques et sérologiques pour confirmer le diagnostic.

4.2.1 Diagnostic bactériologique

À la vue des signes cliniques et des lésions macroscopiques dans les cas aigus, un diagnostic présomptif peut être établi (Vaillancourt et coll., 1988). Cependant, l'isolement et l'identification d'*A. pleuropneumoniae* sont nécessaires pour la confirmation du diagnostic et il est également recommandé de faire un typage sérologique de chaque isolat. Le micro-organisme est retrouvé dans les cas aigus au niveau des tissus pulmonaires et dans les exsudats des plèvres et des narines.

Le recours à la recherche des anticorps sériques est nécessaire dans les cas des élevages infectés subcliniquement, car la culture ne permet pas généralement d'isoler l'agent causal (Nielsen, 1970b). Considérant la source de transmission que représente des porcs infectés subcliniquement lors de leur introduction dans un élevage sain, il est d'une grande importance d'identifier les élevages infectés subcliniquement.

4.2.2 Diagnostic sérologique

La sérologie est un outil important de diagnostic dans la détermination du statut sanitaire des troupeaux infectés chroniquement. Les tests sérologiques pour la détection des anticorps anti-*A. pleuropneumoniae* sont entre autres le test de fixation du complément (CFT) (Nicolet et coll., 1971), le test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) (Nicolet et coll., 1981; Goyette, 1986; Bossé et coll., 1990) et l'agglutination en tube en présence de 2-ME (Mittal et coll., 1984). Le CFT demeure à ce jour le test de référence, cependant certains inconvénients accompagnent son utilisation: faible sensibilité et complexité d'exécution (Nicolet et coll., 1971). L'épreuve d'agglutination en tube en présence de 2-mercaptoéthanol se présentait comme alternative au CFT. En effet, l'addition de 2-mercaptoéthanol élimine l'activité agglutinante des IgM qui sont souvent impliquées dans les réactions croisées. L'épreuve semble être très spécifique et aussi sensible que le CFT (Mittal et coll., 1984). Le test d'agglutination en tube en présence de 2-mercaptoéthanol est capable de détecter une infection active avant le test de fixation du complément et il est facile d'utilisation (Nielsen, 1990). Cependant ces deux épreuves ne permettent pas l'analyse rapide d'un grand nombre de sérums.

L'ELISA est l'épreuve qui offre probablement les plus grands avantages, tout en étant relativement facile d'utilisation, elle permet l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. Parmi les épreuves utilisées, l'ELISA est celle qui allie le plus sensibilité et spécificité tant au niveau immunologique qu'épidémiologique (Art, 1984). Dans un bon nombre de laboratoires, l'antigène utilisé en diagnostic sérologique pour le test ELISA est la bactérie entière ou les extraits bruts de bactéries entières d'*A. pleuropneumoniae* (Goyette, 1986; Nielsen et coll., 1991; Trottier et coll., 1992). Radacovici et coll. (1992) suggèrent l'utilisation du LPS comme antigène, ce qui pourrait améliorer la spécificité du test ELISA et faciliter sa standardisation.

Gottschalk et coll. (1994) évaluent en ELISA l'extrait brut, le PSC et le LPS-LC (LPS longue chaîne) d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 en vue de leur utilisation dans le diagnostic de la pleuropneumonie porcine. Ils rapportent des différences non significatives des valeurs de densités optiques (D.O) obtenues avec les trois antigènes et les sérums provenant d'animaux sains ou d'animaux exposés naturellement ou expérimentalement à *A. pleuropneumoniae* sérotypes 1, 9 ou 11; alors que des D.O plus faibles ont été obtenues pour des sérums provenant d'animaux exposés à *A. pleuropneumoniae* sérotype 3 et à *A. suis* testés avec le LPS-LC du sérotype 1. Ils concluent sur l'importance du LPS-LC dans un test de diagnostic en permettant une meilleure spécificité et minimisant les pertes de sensibilité.

5. Prévention et contrôle de la pleuropneumonie porcine

La vaccination avec une bactérine ne protège que contre l'infection avec une souche homologue (Higgins et coll., 1985). Rosendal et coll. (1986) observent qu'un vaccin contenant les antigènes capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* réduit la mortalité chez les porcs infectés avec la souche homologue.

Bhatia et coll. (1991) démontrent qu'une immunisation sous-cutanée utilisant soit des cellules entières formolées, des polysaccharides capsulaires, des LPS ou l'hémolysine de 105 KDa purifiée n'induisait qu'une protection partielle chez les souris infectées par voie intra-nasale avec les sérotypes homologues ou hétérologues d'*A. pleuropneumoniae*. L'incidence de la maladie peut être réduite par l'achat de porcs séro-négatifs et en instaurant le système de quarantaine (Nicolet, 1992).

Oishi et coll. (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. L'infection naturelle ou l'immunisation avec des bactéries vivantes confèrent une protection hétérologue alors qu'un vaccin constitué de bactéries entières inactivées

n'induisait qu'une immunité spécifique au sérotype. Une injection de cellules formolées avec l'hémolysine confère une protection complète. La mortalité et la morbidité peuvent être diminuées par la vaccination mais sans pour autant prévenir l'infection ou le développement de la maladie chronique.

Les antibiotiques ne sont efficaces que durant la phase initiale de la maladie, d'autre part cette thérapie n'élimine pas la maladie au sein d'un troupeau et le danger que constitue les cas chroniques persistera (Nicolet, 1992).

Des anticorps monoclonaux spécifiques à *A. pleuropneumoniae* sérotype 2 ont été produits par Nakai et coll. (1990), Stenbaek et Shirmer (1994) et par Rodriguez-Barbosa et coll. (1995), sont dirigés contre la chaîne O du LPS. Par contre, les Ac.Mox produits par Korvuo et coll. (1988) sont dirigés contre les polysaccharides capsulaires. Néanmoins la réactivité de ces AcMox par rapport aux souches de biotype II n'a pas été rapporté.

III. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains by using polyclonal and monoclonal antibodies.

CHEIKH SAAD BOUH, K. and MITTAL, K.R.*

Département de Pathologie et Microbiologie- Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

* To whom correspondance and reprint request should be addressed.

Tel: 514-773-8521, ext: 8296. Fax: 514-778-8108.

Article soumis au journal Veterinary Microbiology

Abstract

The antigenic differences between strains of serotype 2 of both biotypes I and II of *Actinobacillus pleuropneumoniae* were studied by using several serological techniques. Monoclonal antibodies (MAbs) against *A. pleuropneumoniae* biotype I serotype 2 were produced by fusion of spleen cells of BALb/c mice immunized with whole-cell suspension (WC) with SP2/O-Ag14 murine myeloma cells. Desirable MAbs were selected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using WC as antigen. MAbs MK-7 and MK-10 identified multiple bands of lipopolysaccharide in Western-blot. Treatment of WC with proteinase K and sodium periodate indicated that both MAb binding sites were carbohydrates in nature. In both ELISA and Western-blot, MAbs MK-7 and MK-10 recognized only biotype I serotype 2 isolates. Neither MAb MK-7 nor MK-10 reacted neither with reference strains of remaining serotypes of *A. pleuropneumoniae* nor with other Gram-negative bacteria tested. The results obtained with various serological tests showed that strains of serotype 2 biotype I shared antigenic determinants with strain N-282 of serotype 2 biotype II, but not with strain N-273 of serotype 1 biotype II. We reported in this study the use of these MAbs for routine serotyping of *A. pleuropneumoniae* strains.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Serotyping; Monoclonal antibody; Lipopolysaccharides;.

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae is a Gram-negative bacteria which causes porcine pleuropneumonia characterized by active fibrino-hemorrhagic or chronic localized necrotizing pneumonia with pleuritis. On the basis of capsular and lipopolysaccharide antigens, there are 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae*; however cross-reactions are common (Nicolet, 1988). The tests currently being used for serotyping are: agglutination (Gunnarson *et al.*, 1977), slide agglutination (Mittal *et al.*, 1982), immunodiffusion (Nicolet, 1971), ring precipitation (Mittal *et al.*, 1982), indirect hemagglutination (IHA) (Mittal *et al.*, 1983a), immunofluorescence (Rosendal and Boyd, 1982), coagglutination (CoA) (Mittal *et al.*, 1983b), counter-immunoelectrophoresis (CIE) (Piffer *et al.*, 1986), and slide precipitation (Hommeze *et al.*, 1990). Cross reactivity has been reported to occur between serotypes 1, 9 and 11; 3, 6 and 8; 4 and 7 (Nielsen, 1985; Mittal, 1990; Mittal *et al.*, 1993a). Two biotypes of *A. pleuropneumoniae* have been distinguished: biotype I (NAD dependent) and biotype II (NAD independent) (Nicolet, 1988). Perry *et al.* (1990) reported that serological cross-reactions among different serotypes coincide with the structural similarity of O-antigens. Fodor *et al.* (1989) reported cross-reactions between strain N-282 of serotype 2 biotype II and strain S1536 of serotype 2 biotype I. Nielsen *et al.* (1996) have demonstrated that nine danish *A. pleuropneumoniae* biotype I strains shared capsular polysaccharide epitopes with serotype 2 biotype I (S1536 and 4226) and LPS O-side chain epitopes with serotype 7 (WF83). Monoclonal antibodies against *A. pleuropneumoniae* serotype 2 have been produced by Korvuo *et al.* (1988) and Nakai *et al.* (1990). However, they have not been used for routine serotyping of field isolates. In this paper we examined antigenic relationships between strains of both biotypes I and II of *A. pleuropneumoniae* using several serological techniques and reported the production of monoclonal antibodies against *A. pleuropneumoniae* biotype I serotype 2, and their reactivity with field isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterials strains and culture conditions:

Reference strains representing serotypes 1 through 12 of *A. pleuropneumoniae* biotype I, reference strains representing serotypes 1 and 2 of biotype II, 30 field isolates of serotype 2 received from different diagnostic laboratories (20 isolates of biotype I from Québec, 6 and 4 isolates of biotype II from France and the Netherlands respectively), 13 field isolates of serotype 7 and 12 isolates of other Gram-negative bacteria as listed in table 1 were used. Identification of isolates was based on cultural and biochemical characteristics. The strains were identified as *A. pleuropneumoniae* if they were Gram-negative, V-factor (NAD) dependent or independent, and positive for CAMP and urease reactions. *A. pleuropneumoniae* strains were grown on pleuropneumonia-like organisms (PPLO) agar (Difco: Detroit, MI) at 37°C. *Campylobacter jejuni* was cultured on blood agar plates in a microaerophilic (5% O₂) environment. All the other bacteria were cultured aerobically on blood agar plates at 37°C.

Preparation of antigens:

For the production of whole-cell (WC) suspension, the strains were grown on agar plates for 10h and washed by phosphate-buffured saline (PBS pH 7.4). Bacterial suspensions were allowed to stand overnight at room temperature in PBS containing 0.5% formalin and the final dilution was made in PBS to an optical density (O.D) of 1.0 at 540 nm. Boiled cell suspension (BC) was obtained when WC was heated at 100°C for 1h in a water bath, whereas soluble antigens were prepared after centrifugation of WC and BC at 800×g for 30min and referred to as WC-SE and BC-SE respectively. Lipopolysaccharide (LPS) was extracted

from *A. pleuropneumoniae* serotype 2 by using a hot phenol-water procedure described by Rebers *et al.* (1980). Outer membrane proteins (OMP) were extracted by following the method of Thomson *et al.* (1990) with some modifications. WC was disrupted in a French press at 20,000 b/in² in 1mM EDTA-20mM Tris Hcl (pH 7.8). After centrifugation at 10,000 × g for 20min, 1% Sarkosyl (N-lauroylsarcosine; Sigma, St-Louis, MO) was added to the supernatant, and the mixture was incubated at 4°C overnight. After centrifugation, the pellet was resuspended in distilled water and was stored at -20°C. The protein concentration was determined by a modified Lowry technique (Bradford *et al.*, 1976).

Preparation of antisera in rabbits:

Antisera were prepared in rabbits by intravenous inoculations of formalinized whole cell suspension (F-WC) of 10h-old culture on PPLO agar medium. Two young adult New Zealand male rabbits weighing about 3 kg were injected twice a week with an antigen preparation of each of reference strains of the 12 different serotypes of biotype I and two reference strains representing biotype II (Mittal *et al.*, 1983b). A total of seven injections were given in increasing doses. The rabbits were bled 7 days after the last injection. The sera were separated and stored at -20°C until used.

Coagglutination (CoA) test:

The coagglutination test was performed by the method of Mittal *et al.* (1983b). Briefly, one drop (0.05ml) of the staphylococcal coagglutination reagent was mixed on a glass slide with an equal volume of bacterial suspension or its saline extract. The mixture was stirred thoroughly with a wooden applicator stick. The slide was rotated by hand, examined against a dark background, and considered negative if macroscopic agglutination did not occur within 2 min. A positive reaction was characterized by a distinct agglutination usually occurring within a few seconds.

Reaction strength was quantitated as 0, +, 2+, 3+, or 4+, based on the degree of agglutination and the size of the aggregates formed. Antigen giving a 2+ reaction was considered positive. Controls consisting of unlabeled staphylococcal cell suspensions coated with normal rabbit serum were used. When bacterial cell suspensions were used for serotyping, they were always checked for possible autoagglutination.

Immunodiffusion (ID) test:

Two dimensional immunodiffusion method of Ouchterlony was carried out in small plastic petri plates in 1% agar buffered with PBS (pH 7.2). The reagent wells were 2mm deep and 5mm in diameter. Plates were incubated at room temperature in a water-saturated atmosphere and plates were read daily for 2 days (Nicolet, 1971).

Counterimmunoelectrophoresis (CIE):

CIE test was carried out as described by Mittal *et al.* (1993). The plates were prepared by precoating glass plates (50×75mm) with 6 ml of 0.75 % agarose (Difco) in 0.05M veronal buffer pH 8.6. Wells, 4 mm in diameter were prepared with a template. The distance between the edges of the wells was 2 mm and the distance between the edges of wells containing either antigen or antibody was 4 mm.

Cathodal wells were filled with undiluted supernatant antigen and the anodal wells were filled with antisera. The tank for electrophoresis contained 0.05M veronal buffer pH 8.6. Four juxtaposed sheets of filter paper were used as connecting wicks to the buffer compartments. The wicks overlapped by 10 mm the edge of the glass plate layered with agarose. The antigen and antisera were electrophoresed for 60 min at 70V.

The plate were then flooded with saline and left for 15 min at 4°C after which they were examined for precipitation lines.

Indirect hemagglutination (IHA) test:

IHA test was performed with microtiter system (Dynatech Lab. Inc.) as described by Mittal *et al.* (1983a) with slight modification. Briefly, the overnight growth of the strain on a plate (9 cm diameter) of PPLO agar medium was washed in 3 ml of PBS containing 0.5% formalin. The bacterial suspension was boiled for 1h and centrifuged at 1500g for 30 min. The clean supernatant was used directly to coat the sheep red blood cells.

Absorption of rabbit antisera:

Rabbit hyperimmune sera against the WC antigens of strain S1536 (biotype I serotype 2) were absorbed with an equal volume of WC antigens of homologous and heterologous serotypes. The mixtures were kept at 37°C for 30min and were centrifuged at 8000 rpm for 20min. The second absorption was carried out in the same way.

Production of monoclonal antibodies:

Six week-old female Balb/c mice were immunised subcutaneously with WC of *A. pleuropneumoniae* strain S1536 of serotype 2 mixed with Freund's incomplete adjuvant (Difco) followed by 2 injections of WC only on day 10 and 20. Blood was taken from each mouse, and the antibody response was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mouse with the highest antibody titer in its serum was selected as the spleen donor and was given a booster injection of 0.3ml of WC in PBS intraperitoneally, 3 days before fusion. Sp2/O-Ag14 murine myeloma cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Gibco laboratories; Grand Island, New York 14072, USA) supplemented with 10% bovine fetal serum (FBS), 100U of gentamicine per ml and

2mM L-glutamine (Gibco). The spleen cells from the immunized mouse were fused with SP2/O-Ag14 myeloma cell as described by Kohler and Milstein (1975) by using 50% (wt/vol) polyethylene glycol (molecular weight 3000 to 3700; Sigma).

The fused cells were cultured in microtiter plates in the presence of hypoxanthine, aminopterin and thymidine (Sigma) and the plates were incubated at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂. Hybridoma culture supernatants were examined for the presence of antibody by ELISA using the WC of *A. pleuropneumoniae* strain S1536 as the antigen. Hybridoma cells producing the desired antibodies were cloned by limiting dilution (Goding, 1983).

ELISA:

Hybridoma culture supernatants were screened for antibodies by ELISA using WC as the antigen. A 96-well microtiter plate (Linbro; Flow laboratories Inc, Mclean, Virginia 22102, USA) was coated with 50 µl of WC per well in carbonate buffer (pH:9,6) and was kept overnight at 4°C. The wells were washed three times with PBS containing 0,05% tween20 (PBS-T). Optimally diluted hybridoma culture supernatants and sera from immunized and unimmunized mice were added in 100µl volumes. The plate was incubated at 37°C for 1h and washed. The goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxydase (Sigma) optimally diluted in PBS was added to each well, and the plate was incubated at 37°C for 1h and washed. O-phenylenediamine color development reagent was added thereafter. The absorbance of the peroxidase reaction product in the Elisa was read on an automated microplate reader (EAR 400AT;SLA-Labinstruments).

DOT-ELISA:

The technique described by Achacha and Mittal (1995) was performed. Briefly, a 10µl volume of optimally diluted cell suspension was spotted on to a

nitrocellulose membrane and allowed to dry at room temperature. The membrane was incubated with 5% skim milk in PBS-T before incubation with MAb supernates for 1h at room temperature. The blots were washed and incubated with goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) for 1h at room temperature and washed. Membranes were developed in 4-chloro-1-naphthol substrate (Bio-Rad) for 5-10min, and the color reaction was terminated by flooding the membrane with distilled water.

ENZYMATIC AND CHEMICAL TREATMENTS OF ANTIGENS:

The periodate oxidation was performed by incubation of WC with 0 to 20mM of sodium periodate (NaIO₄); however, LPS was treated with only 20mM of sodium periodate (Woodward *et al.*, 1985). The whole cell antigens were treated with 100mg/ml of proteinase K (Sigma) in PBS at 55°C for 1h as described by Hamel *et al.* (1987).

SDS-PAGE and WESTERN BLOTTING:

WC of 12 reference strains, LPS and OMP of strain S 1536 (biotype I serotype 2) and WC of strain N-282 of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 biotype II were separated by SDS-PAGE by the method of Laemmli (1970). The antigens were solubilized in sample buffer containing 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1M Trisbase (pH8.3) and 0.025% bromophenol blue, and the solution was heated at 100°C for 10min. Antigens were separated on a 4% polyacrylamide stacking gel and a 7.5% separating gel.

For western blotting, samples were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) in a Trans-Blot apparatus (Bio-Rad) by the method of Towbin *et al.* (1979). Non specific binding was blocked with 3% BSA in PBS-T. The nitrocellulose membrane was washed three times by PBS-T. MAbs optimally diluted in PBS-T-BSA

were added and incubated at room temperature for 2h with gentle rocking. The nitrocellulose membrane was washed three times by PBS-T and was incubated for 2h with goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (Sigma). The membrane was washed and developed in 4-chloro-1-naphtol substrate for 1-5min and the color reaction was stopped by flooding the membrane with distilled water.

ELISA-Inhibition test:

Aliquots of monoclonal antibodies against *A. pleuropneumoniae* biotype I serotype 2 were absorbed with an equal volume of washed WC antigens of biotype I and biotype II of *A. pleuropneumoniae* serotype 2. Mixtures were kept at 37°C for 30min and were centrifuged at 8000 rpm for 20min. The second absorption was carried out in the same way. ELISA was performed before and after absorption.

Isotyping of monoclonal antibody:

The isotypes were determined by an ELISA with mouse monoclonal subisotyping kit containing rabbit anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 , IgM and IgA by following the manufacturer's instructions (Bio-Rad).

RESULTS

Antigenic heterogeneity among serotype 2 strains:

All the biotype I strains reacted equally well in CoA, ID, CIE and IHA with rabbit antisera against both serotype 2 strains (S1536 and 4226) of biotype I and serotype 2 strain N-282 of biotype II. However, biotype II strains reacted with antiserum produced against strain S-1536 (serotype 2 biotype I) but not with antiserum produced against strain 4226 (serotype 2 of biotype I). Similar to biotype I strains, all the biotype II strains tested reacted equally well with antiserum against serotype 2 strain N-282 of biotype II (Table 2).

None of the serotype 2 biotype I and II strains tested reacted with antiserum against strain N-273 of serotype 1 biotype II (Table 2).

Effect of absorption of rabbit antiserum:

Antibodies reactive with biotype I strains in rabbit hyperimmune serum against S1536 (serotype 2 biotype I) in ID and CIE tests were removed on absorption with homologous strain only. However, antibodies reactive with biotype II strains were removed on absorption with strain N-282 (serotype 2 biotype II) and strain S1536 (Biotype I serotype 2 (Table 3)

Production of serotype 2 specific hybridoma cultures:

Of 96 hybridomas producing serotype 2 specific antibodies tested by ELISA only 15 were cloned by limiting dilution and 2 monoclonal antibodies designated as MK-7 and MK-10 were produced. The immunoglobulin class of both MAbs was IgG2a. In western blot with 7.5% separating gel, both MAbs gave positive

reactions with serotype 2: S1536 and 4226, but reactions were negative with other serotypes of biotype I and biotype II (fig. 1). Both monoclonal antibodies gave positive reactions with LPS and negative reactions with OMP of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 (S1536) (fig. 2).

Periodate oxidation of *A. pleuropneumoniae* WC and LPS:

Seventy - eighty percent binding of MAbs MK-7 and MK-10 to WC in ELISA was affected at a concentration of 1mM of sodium periodate with a complete loss at 20mM (fig. 3). The reaction of the monoclonal antibodies was negative with sodium periodate treated LPS of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 (S1536) (fig. 2).

ELISA-Inhibition test:

Untreated and proteinase K treated WC of serotype 2 biotype I antigens inhibited the binding of MAbs, however serotype 2 biotype II did not inhibit the MAb binding. Results with sodium periodate treated WC antigens suggested that epitopes reacting with these MAbs were located on or close to carbohydrate structure (Table 4).

Serological specificities of MAbs:

Twenty of 30 field isolates of *A. pleuropneumoniae* belonging to serotype 2 biotype I, as confirmed by coagglutination and immunodiffusion tests by using rabbit polyclonal antibodies also reacted positively in ELISA using MAbs.

Cross-reactions were observed between serotype 2 strains of both biotypes I and II by using polyclonal antisera. However, there were no cross-reactions when MAbs were used for serotyping serotype 2 strains of biotype I.

DISCUSSION

Pleuropneumonia in swine is a disease of worldwide distribution which is of great concern to the modern swine industry. In North America, the most common serotypes are serotypes 1, 5, 7 and 2 (Mittal *et al.*, 1982; Rapp *et al.*, 1985). In Europe serotype 2 is most significant (Nicolet, 1971; Nielsen, 1982; Kamp *et al.*, 1987; and Kobisch, 1990 : Personal communication). Serotype determination is useful to understand the epidemiology of an outbreak, for preparing vaccines, for control of the disease, for serological monitoring of infected herds and also to find out the cause of vaccine failure in a vaccinated herd in the face of an outbreak. Each procedure used for serotyping has merits but none has been free from problems mainly due to cross-reactivity. Monoclonal antibodies directed to specific epitopes have been evaluated to conduct a more accurate serological classification (Korvuo *et al.*, 1988; Lida *et al.*, 1990 and Nakai *et al.*, 1990).

A panel of 96 hybridomas secreting MAbs against biotype I serotype 2 of *A. pleuropneumoniae* was obtained; 15 hybridomas were cloned twice by limiting dilution, only two of them with an O.D value of >1.0 in ELISA were characterized. None of the MAbs reacted in ELISA, Dot-ELISA or Western blot with other serotypes of *A. pleuropneumoniae* or any Gram-negative bacteria used in this study. Capsular polysaccharide and somatic LPS of *A. pleuropneumoniae* are considered serotype specific antigens (Perry *et al.*, 1990). The epitopes reacting with the two MAbs were sensitive to sodium periodate oxidation, indicating that they are located at non reducing terminal carbohydrate antigenic sites (Woodward *et al.*, 1985). The ELISA-Inhibition test confirmed that the epitopes reacting with these MAbs were present only on biotype I serotype 2.

Fenwick *et al.* (1986) showed that smooth type LPS of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 was sharing both serotype-specific and cross-reacting antigens, but a rough type LPS did contain both species-specific and non species-specific antigens.

Stenbaek *et al.* (1996) suggested two types of serotype 2 isolates on the basis of LPS: App-2 isolate and App-2X variants which may be a mutation from a App-2 strain 4226.

In the present study the results obtained with various serological tests using polyclonal antisera showed that strains of serotype 2 biotype I shared antigenic determinants with strain N-282 of serotype 2 biotype II (Table 2). The results obtained in the present study regarding cross-reactivity between strain N-282 (serotype 2 biotype II) and strain S1536 (serotype 2 biotype I) are in conformity with those of Fodor *et al.* (1989). The results in Table 2 showed that all the strains of biotype I serotype 2 tested reacted with antiserum against strain N-282 of serotype 2 biotype II.

Both MAbs recognized the epitope(s) located on O-chains of LPS of reference and field strains of biotype I serotype 2 only. Nielsen *et al.* (1996) demonstrated by latex agglutination and IHA tests the presence of identical capsular polysaccharide epitopes between strain 7317 (representing nine danish *A. pleuropneumoniae* biotype I isolates) and strains S1536 and 4226 representing serotype 2 biotype I. Immunodiffusion test showed antigenic relationship between serotype 7 (WF83) and strain 7317. Whereas in SDS-PAGE the LPS from S1536, 4226, WF83 strains and 7317 strain showed identical smooth ladder pattern between strains WF83 and 7317, they proposed the strain 7317 to be designated as K2:O7.

To assess the potential of these MAbs for serotyping, MAbs were tested against 30 field isolates of serotype 2 belonging to both biotypes I and II and 13 field isolates of serotype 7. Both MAbs recognized the biotype I serotype 2 field strains but none of strains of biotype II and serotype 7 were recognized. Both MAbs recognized equally well reference and field strains of serotype 2 biotype I when WC was used as the antigen in ELISA.

In Denmark, Nielsen *et al.* (1997) showed that eight *A. pleuropneumoniae* biotype II strains isolated in pure cultures from lungs were homogeneous antigenically and distinct serologically from the known biotype I and II serotypes and

proposed them to be referred as a serotype 3 of biotype II. In our study, none of the serotype 2 strains of biotypes I and II tested reacted with antiserum against strain N-273 (biotype II serotype 1) in CoA, ID, CIE and IHA tests (table 2). All the strains of biotype II reacted with antiserum against strain N-282 (biotype II serotype 2) and strain S1536 (biotype I serotype 2), but not with antiserum against strain N-273 (biotype II serotype 1) and strain 4226 (biotype I serotype 2). These results showed that all the strains of biotype II received from France and the Netherlands belonged to serotype 2 only. MAbs MK-7 and MK-10 proved to be useful as complementary to polyclonal sera for serotyping of field isolates belonging to *A pleuropneumoniae* biotype I serotype 2.

Acknowledgements

We gratefully thank Suzanne Bourdon for her kind help. We thank Professors: R. Higgins, E.M. Kamp and M. Kobisch for providing us with some of field isolates. The award of a scholarship to C.S.B.K by le Programme des Bourses d'Excellence de la Francophonie, is thankfully acknowledged.

References

- Achacha, M. and Mittal, K.R., 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* and *Serpulina innocens* and their use in serotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2519-2521.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Fenwick, B. and Osburn, B., 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.*, 54: 575-582.
- Fodor, L., Varga, J., Molnar, E. and Hajtos, I. 1989. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype II strains isolated from swine. *Vet. Microbiol.*, 20: 173-180.
- Goding, J.W., 1983. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. p 85. Academic. Press. Inc. New York.
- Gunnarson, A., Biberstein, E.L. and Hurvell, B., 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 1111-1114.
- Hamel, J., Brodeur, B.R., Larose, Y., Tsang, P.S, Belmaaza, A. and Montplaisir, S., 1987. Monoclonal antibody directed against a serotype-specific, outer-membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Med. Microbiol.*, 23: 163-170.
- Hommez, J., Devriese, L.A., Castryck, F. and Cassimon, P., 1990. Slide precipitation, a simple method to type *Actinobacillus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 24: 123-126.

- Kamp, E.M., Popma, J.K. and Van leengoed, L.A.M.G., 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: with emphasis on heterogeneity within serotype 1 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.*, 13: 249-257.
- Köhler, G. and Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)*., 256: 495-497.
- Korvuo, A., Lindberg, L.A and Schroder, J., 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to serotype specific antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 2. *Acta. Vet. Scand.*, 29: 225-230.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*., 227: 68-685.
- Lida, J., Smith, I.M. and Nicolet, J., 1990. Use of monoclonal antibodies for classifying *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.*, 49:8-13.
- Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S., 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 15: 1019-1023.
- Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S., 1983a. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 16: 840-843.
- Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S., 1983b. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 1351-1354.
- Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S., 1988.
Serologic studies of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotype-3 and their antigenic relationships with other *A. pleuropneumoniae* serotypes in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 49: 152-155.

- Mittal, K.R., 1990. Cross-reactions between *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains of serotype 1 and 9. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 535-539.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Larivière, S. and Nadeau, M., 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.*, 32: 135-148.
- Mittal, K.R., Kamp, E.M and Kobisch, M., 1993a. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 1, 9 and 11. *Res. Vet. Sci.*, 55: 179-184.
- Mittal, K.R., Bourdon, S. and Berrouard, M., 1993b. 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.
- Nakai, T., Horiguchi, Y. and Kume, K., 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* serotype 2. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 52: 533-542.
- Nicolet, J., 1971. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation sérologique de l'hémophilose parahaemolyticus. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektions Kr.Hyg. Abt. Iorig.*, 216: 487-495.
- Nicolet, J., 1988. Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.*, 29: 578-580.
- Nielsen, R., 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in pigs. Ph.D. thesis, University of Copenhagen, Denmark.
- Nielsen, R., 1985. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. *Acta Vet. Scand.*, 26: 501-512.
- Nielsen, R., Andresen, L. and Planbeck, T., 1996. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1 strains antigenically related to both serotype 2 and 7. *Acta Vet Scand.*, 37: 327-336.

- Nielsen, R., Andresen, L., Plambeck, T., Nielsen, J.P., Krarup, L.T. and Jorsal, S.E., 1997. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet. Microbiol.*, 54: 35-46.
- Perry, M.B., Altman, E., Brisson, J.R., Beynon, L.M. and Richards, J.C., 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.
- Piffer, I.A., Carter, G.R. and Botovchenco, A.A.F., 1986. Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet. Res.*, 118: 292-294.
- Rapp, V.J., Ross, R.F. and Zimmerman, E.B., 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 185-192.
- Rebers, P.A., Phillips, M., Rimler, R., Boykins, R.A. and Rhodes, K.R., 1980. Immunizing properties of Westphal lipopolysaccharide from a avian strain of *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1650-1654.
- Rosendal, S. and Boyd, A., 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 16: 840-843.
- Stenbæk, E.I. and Hovind-Haugen, K., 1996. Detection of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 lipopolysaccharide (LPS) variant. *Vet. Microbiol.*, 52: 285-292.
- Thomson, M.S., Lauerman, L.H. and Wilt, G.R., 1990. Monoclonal antibody in the identification of *Haemophilus somnus*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2: 116-119.
- Towbin, H.T., Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74: 4350-4354.

Woodward, M.P., Young, W.W. and Bloodgood, R.A., 1985. Detection of monoclonal antibody specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods.*,78:143-152.

Table 1. Reference and field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other Gram-negative bacteria used.

STRAINS	DESCRIPTION
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biotype I reference strains	
Shope 4074	serotype 1
Shope 1536	serotype 2
Shope 1421	serotype 3
M-62	serotype 4
K-17	serotype 5a
L-20	serotype 5b
Femo	serotype 6
WF 83	serotype 7
405	serotype 8
CVJ13261	serotype 9
D 13039	serotype 10
56153	serotype 11
8329	serotype 12
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biotype I field isolates	
20 isolates	serotype 2 (Québec)
13 isolates	serotype 7
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biotype II reference strains	
N-273	serotype 1
N-282	serotype 2
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biotype II field isolates	
6 isolates	serotype 2 (France)
4 isolates	serotype 2 (Nether)
<i>Actinobacillus porcicus</i>	collection
<i>Actinobacillus minor</i>	collection
<i>Actinobacillus suis</i>	collection
<i>Escherichia coli</i> K12 (RNA, HFR, 143)	collection
<i>Salmonella arizona</i> ATCC 13314	collection
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	collection
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	collection
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930	collection
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	collection
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	collection
<i>Campylobacter jejuni</i>	collection
<i>Moraxella bovis</i>	collection

Table 2. Antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains as detected by various serological tests.

STRAINS	TESTS USED	Rabbit antisera against			
		Biotype I		Biotype II	
		<u>serotype 2</u>	<u>serotypes 1 and 2</u>	<u>serotypes 1 and 2</u>	<u>serotypes 1 and 2</u>
		4226	1536	N-273	N-282
Biotype I	CoA	4+	4+	-	4+
	ID	+	+	-	+
	CIE	+	+	-	+
	IHA	=1280	=1280	0	=1280
Biotype II	CoA	-	4+	-	4+
	ID	-	+	-	+
	CIE	-	+	-	+
	IHA	0	=1280	0	=1280

Biotype I strains: S1536,4226, 2661, 2524, 3888, 4543, 4652, 3112, 79, 186, 296, CVI1547, 87-6238, 3350, CVI-77-167, CVI-3619, 4111, 639, 33780, 1103, 91-1551 and 48638

Biotype II strains: N-282, SW2008/76, 2653, 193, 2063, 419, 388, 4600, 5418, 44627 and 19937.

CoA : Coagglutination test.

ID : Immunodiffusion test.

CIE : Counterimmunoelectrophoresis test.

IHA : indirect hemagglutination test.

Table 3. Effect of absorption of rabbit antiserum against S1536 strain (serotype 2 biotype I) with homologous and heterologous antigens.

Antigen origin	Tests used	Rabbit antiserum against strain S 1536 absorbed with				
		NIL	4226	1536	N-273	N-282
Biotype I	ID	+	+	-	+	+
	CIE	+	+	-	+	+
Biotype II	ID	+	+	-	+	-
	CIE	+	+	-	+	-

Biotype I strains: S1536, 2661, 2524, 3888, 4543, 4652, 3112, 79, 186, 296, CVII1547, 87-6238, 3350, CVI-77-167, CVI-3619, 4111, 639, 33780, 1103, 91-1551 and 48638

Biotype II strains: N-282, SW2008/76, 2653, 193, 2063, 419, 388, 4600, 5418, 44627 and 19937.

ID : Immunodiffusion test.

CIE : Counterimmunoelectrophoresis test.

Table 4. ELISA-Inhibition test of Monoclonal Antibodies with Whole Cell antigen of serotype 2 (biotype I and II) and sodium periodate and proteinase K treated antigen.

INHIBITOR	% inhibition
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	
serotype 2(biotype II)	0
S1536	96,5
4226	90
Sodium periodate treated Ag	
of serotype 2 (biotype I)	0
Proteinase K treated WC of	
serotype 2 (biotype I) (S1536)	95
Control	0

The inhibition percentage was calculated by the formula: $100 (1-A/B)$ where A and B are O.D in the presence and absence of inhibitor respectively.

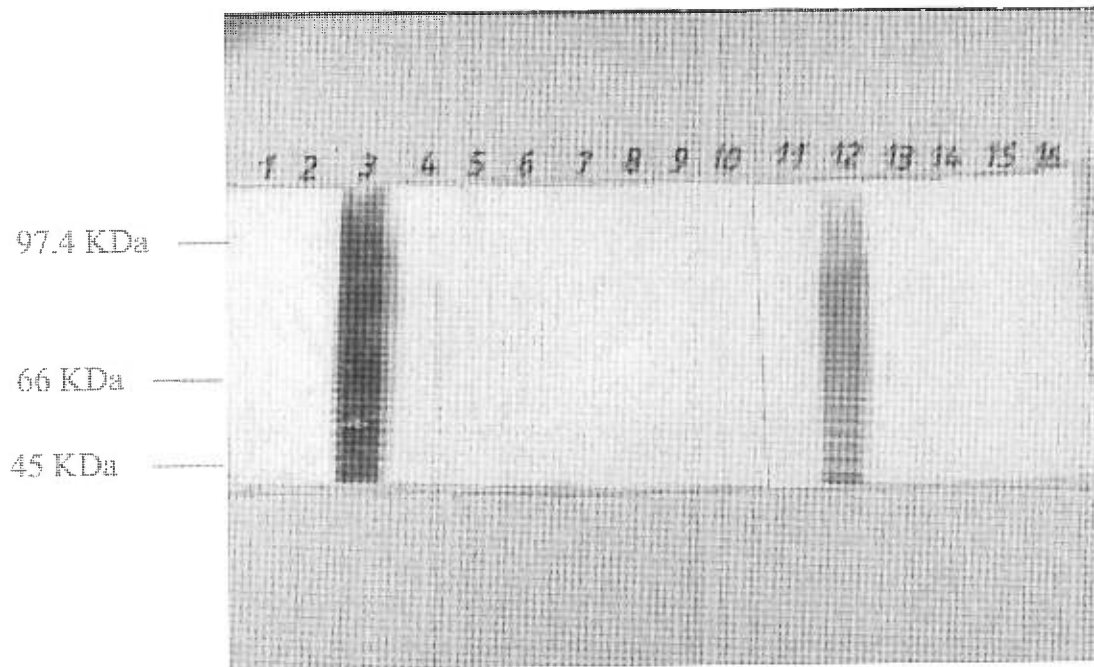


Figure 1. SDS-PAGE and WESTERN-BLOT of Whole Cell of different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serotype 1A (lane 1), serotype 1B (lane 2), serotype 2 (S1536) (lane 3), serotype 3 (lane 4), serotype 4 (lane 5), serotype 5a (lane 6), serotype 6 (lane 7), serotype 7 (lane 8), serotype 8 (lane 9), serotype 9 (lane 10), serotype 10 (lane 11), serotype 2 (4226) (lane 12), serotype 11 (lane 13), serotype 12 (lane 14), serotype 5b (lane 15), serotype 2 biotype II (N-282) (lane 16). Molecular mass markers are indicated on the left.

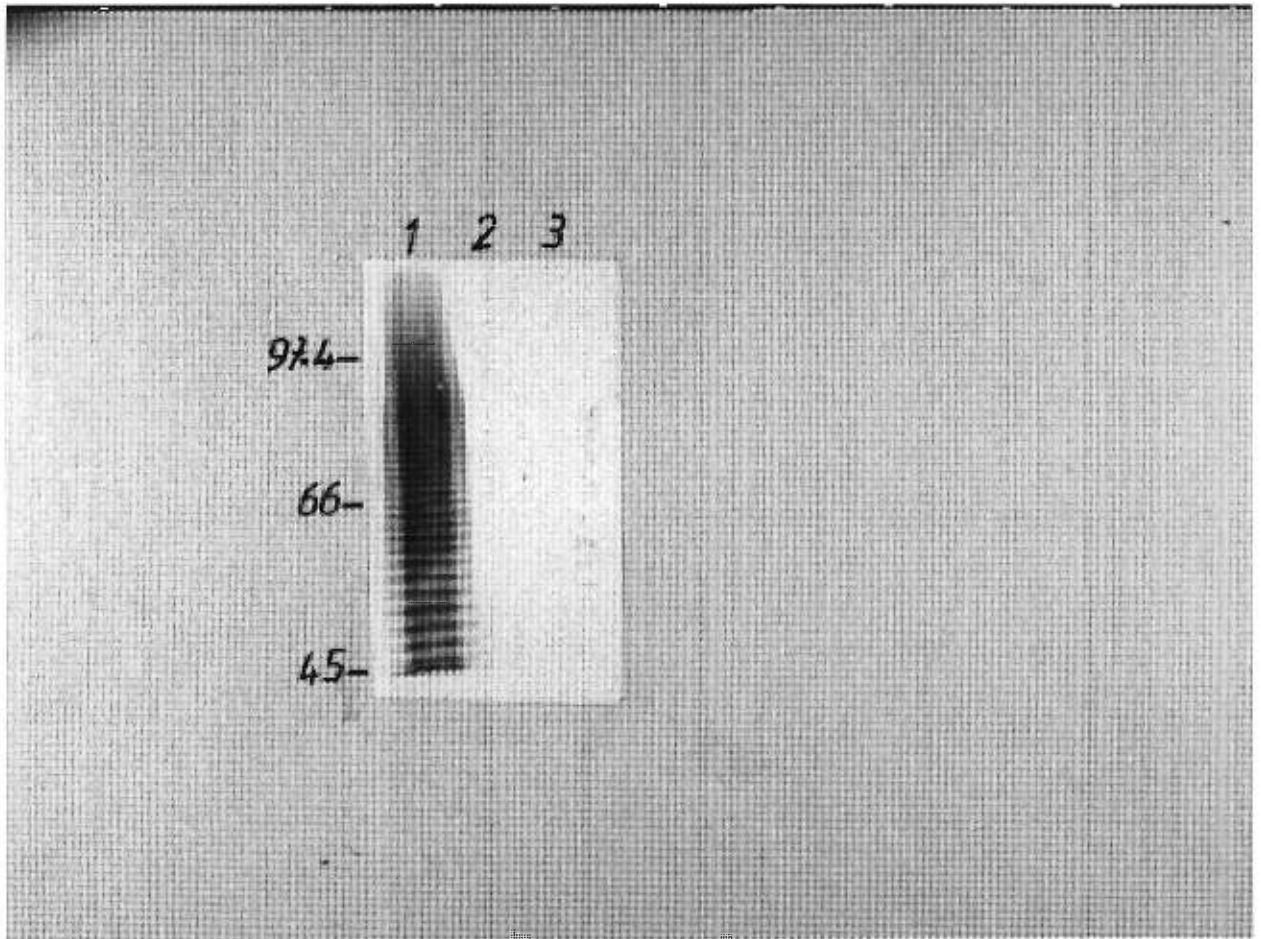


Figure 2. SDS-PAGE and WESTERN-BLOT of Lipopolysaccharides (LPS) and Outer Membrane Proteins (OMP) of serotype 2 (S1536): LPS (lane 1), Sodium periodate treated LPS (lane 2) and OMP (lane 3). Molecular mass markers are indicated on the left.

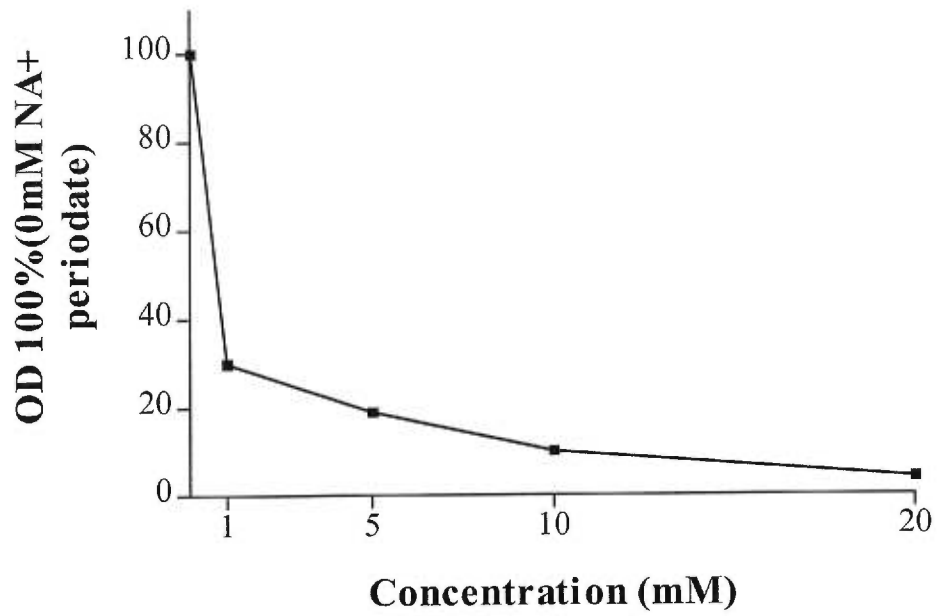


Figure 3. Effect of sodium periodate treatment of Whole Cell of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 (S1536) on binding with MAbs MK-7 and MK-10 in ELISA.

IV. DISCUSSION et CONCLUSIONS

Actinobacillus pleuropneumoniae est responsable d'importantes pertes économiques dans l'industrie porcine, où a part dans les cas aigus, la sérologie demeure le moyen le plus efficace de détection des animaux porteurs de ce germe. Les souches d'*A. pleuropneumoniae* NAD-indépendantes sont généralement considérées moins virulentes que les souches NAD-dépendantes (Nicolet, 1985). L'importance de la sérologie est augmentée par le fait que la vaccination, l'antibiothérapie et/ou l'antibioprophylaxie ne peuvent éradiquer la maladie. À cet effet l'identification spécifique d'un sérotype demeure capitale sur le plan épidémiologique et immunologique. Des différentes techniques utilisées pour le sérotypage d'*A. pleuropneumoniae*, aucune n'est à l'abri du problème des réactions croisées.

Le but de ce travail était d'étudier les relations antigéniques entre les différentes souches de sérotype 2 biotype I et II, dans l'objectif de comprendre la parenté antigénique entre les différentes souches. D'autre part, il a été démontré que les anticorps monoclonaux (Ac.Mox) dirigés contre des épitopes spécifiques sont très utiles dans la classification sérologique (Korvuo et coll., 1988; Lida et coll., 1990 et Nakai et coll., 1990). D'où le deuxième objectif qui était de produire des Ac.Mox spécifiques au sérotype 2 biotype I. Pour atteindre notre premier objectif différentes techniques sérologiques ont été exécutées pour l'étude des souches de sérotype 2 biotype I et II.

De cette étude il ressort que les souches de biotype I partagent des déterminants antigéniques avec les souches S1536, 4226 (sérotype 2 biotype I) et N-282 (sérotype 2 biotype II) mais pas avec la souche N-273 (sérotype 1 biotype II). Quant aux souches de biotype II, elles partagent des épitopes antigéniques avec les souches S1536 (sérotype 2 biotype I) et N-282 (sérotype 2 biotype II) mais pas avec les souches 4226 (sérotype 2 biotype I) et N-273 (sérotype 1 biotype II). L'absorption d'un antiserum de lapin dirigé contre la souche S1536 et utilisé pour

tester les souches de biotype I indique que les épitopes au niveau des souches de biotype I réagissant avec les antisérums contre S1536, 4226 et N-282 pourraient être identiques. Concernant la réaction croisée entre la souche S1536 et la souche N-282, c'est en conformité avec les résultats de Fodor et coll. (1989).

En effet dans le cas des infections subcliniques, l'analyse sérologique d'un nombre de sérums statistiquement représentatif permet de comprendre si oui ou non il y a eu une exposition à la bactérie (Nielsen, 1988). En regard aux réactions croisées observées entre les souches de biotypes I et II avec les Ac polyclonaux, la spécificité des Ac.Mox est importante dans la détermination sérologique de la souche responsable d'une infection et du biotype impliqué pour un intérêt épidémiologique. D'où l'objet de notre deuxième partie durant laquelle nous avons produit deux AcMox (MK-7 et MK-10), qui ont été sélectionnés en fonction de leur spécificité pour *A. pleuropneumoniae* sérotype 2 biotype I par ELISA et ils sont de type IgG2a. Cette spécificité pour *A. pleuropneumoniae* biotype I sérotype 2 a été confirmée par Dot-ELISA et Western Blot. En effet, des Ac.Mox spécifiques à *A. pleuropneumoniae* sérotype 2 ont été produits par Nakai et coll. (1990), Stenbaek et Shirmer (1994) et par Rodriguez-Barbosa et coll. (1995) et sont dirigés contre la chaîne O du LPS. Par contre, les AcMox produits par Korvuo et coll. (1988) sont dirigés contre les polysaccharides capsulaires. Néanmoins la réactivité de ces AcMox par rapport aux souches de biotype II n'a pas été rapportée. Dans cette étude les AcMox MK-7 et MK-10 testés à l'ELISA en présence de bactéries entières réagissent de la même manière avec les souches de référence et de champs de sérotype 2 biotype I. Par contre, aucune souche de référence des autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* biotype I et II ni des différentes bactéries Gram-négatives testées dans cette étude ne réagissent avec les AcMox.

Des réactions croisées ont été observées par Nielsen et coll. (1996) entre les souches de biotype I et celles de sérotype 7 en utilisant des anticorps polyclonaux. Ces auteurs proposent que ces souches soient désignées K2:O7. Par contre, dans la présente étude aucune réaction croisée n'est observée entre les souches de sérotype 2 et celles de sérotype 7 en utilisant des AcMox. Fenwick et coll. (1986) ont montré que le LPS de type lisse d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 contenait aussi bien des antigènes spécifiques de sérotype que ceux responsables des réactions croisées. Par contre le LPS de type rugueux contiendrait des antigènes spécifiques de l'espèce et ceux non spécifiques de l'espèce.

Les AcMox MK-7 et MK-10 sont dirigés contre le LPS des souches de sérotype 2 biotype I, du fait que la réaction soit sensible à l'oxydation au périodate de sodium et résistante au traitement à la protéinase K dénote de la nature carbohydrate des épitopes réagissant avec ces AcMox. D'autre part, la spécificité au sérotype 2 biotype I et la réactivité avec des épitopes carbohydrates sont confirmées par le test ELISA-inhibition.

Les AcMox (MK-7 et MK-10) présentent l'avantage d'avoir été testés contre les souches de référence des biotypes I et II. Également ils ont été testés contre les souches de champs des sérotypes 2 et 7 de biotype I et celles de biotype II. On a montré le potentiel de ces AcMox dans la sérotypie des souches d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 2 biotype I. D'autre part, les AcMox MK-7 et MK-10 sont de type IgG2a qui est un isotype reconnu pour sa grande affinité et son potentiel dans le développement de techniques immunodiagnostiques (Rodriguez-Barbosa et coll., 1995).

Nielsen et coll. (1997) rapportent que huit souches d'*A. pleuropneumoniae* biotype II isolées en culture pure à partir des poumons étaient homogènes

antigéniquement et distincts sérologiquement des sérotypes connus de biotype I et II, ils proposent ces souches comme sérotype 3 de biotype II.

Dans notre étude, toutes les souches de biotype II testées appartiennent au sérotype 2, car avec les anticorps polyclonaux aucune souche ne réagit avec l'antisérum dirigé contre la souche N-273 (sérotype 1 biotype II) mais toutes réagissent avec l'antisérum contre la souche N-282 (sérotype 2 biotype II). D'autre part, aucune souche de biotype II ne réagit avec les Ac.Mox. En conclusion nous pouvons dire que par le test ELISA, les AcMox MK-7 et MK-10 seraient un bon complément aux méthodes de sérotypie des souches de sérotype 2 biotype I. De même il serait possible d'utiliser ces AcMox dans des trousse de diagnostic pour la détection d'antigènes dans les liquides biologiques, exsudats et spécimens pathologiques.

En perspective, il serait nécessaire d'effectuer une caractérisation et une étude structurale des polysaccharides capsulaires et lipopolysaccharides des souches de biotype II.

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Altman, E., J.R. Brisson et M.B. Perry. 1986. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem. Cell Biol.* 64: 707-716.

Altman, E., J.-R. Brisson, D.R. Brundle et M.B. Perry. 1987. Structural studies of the O-chain of the phenol-phase soluble lipopolysaccharide from *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 2. *Biochem. Cell Biol.* 65: 876-889.

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

Art, D. 1984. *Haemophilus pleuropneumoniae* chez le porc: dépistage des porteurs chroniques. *Ann. Méd. Vét.* 128: 527-536.

Belanger, M., D. Dubreuil, J. Harel, C. Girard et M. Jacques. 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* 58: 3523-3530.

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

Bertschinger, H.U. et P. Seifert. 1978. Isolation of *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pleuropneumonia. *Proc. 5th Int. Pig Vet. Soc. Congress, Zagreb, Yugoslavia, Abstr. M 19.*

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

Bossé, J.T., R.P. Johnson et S. Rosendal. 1990. Serodiagnosis of pleuropneumonia using enzyme-linked immunosorbent assay with capsular polysaccharide of serotypes 1, 2, 5 and 7. *Can. J. Vet. Res.* 54: 427-431.

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

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

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

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

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

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

Frey, J. et J. Nicolet. 1988. Regulation of haemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 strain by Ca^{2+} . *Infect. Immun.* 57: 2570-2575.

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. Stuck, J.F. van den Bosch, P.J. Wilson et R. Young. 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1723-1728.

Gunnarson, A., E.L Biberstein et B. Hurvell. 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus* agglutination reactions. *Am. J. Vet.Res.* 38: 1111-1114.

Gunnarson, A. 1979. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Extraction of type-specific antigens. *Am. J. Vet. Res.* 40: 469-472.

Goyette, G. 1986. Evaluation de l'ELISA pour la séro-détection des porcs exposés à *Haemophilus pleuropneumoniae*. Mémoire de maîtrise. Université de Montréal. Montréal. Canada. 154pp.

Gottschalk, M., E. Altman, N. Charland, F. De Lasalle and J.D. Dubreuil. 1994. Evaluation of saline boiled extract, capsular polysaccharides and long-chain lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 as antigens for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* 42 : 91-104.

- Higgins, R., S. Larivière, K.R. Mittal, G.P. Martineau, P. Rousseau et 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 et T. Mckendry.** 1983. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates using ring precipitation tests. Vet. Rec. 113: 158.
- Hunter, D. et J. Livingstone.** 1986. Detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* antigens using the coagglutination test. Vet. Rec. 118: 129.
- Inzana, T.J.** 1990. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. Can. J. Vet. Res. 54: S22-S27.
- Jacques, M., B. Foiry, R. Higgins et 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 et K.R. Mittal.** 1988b. Hemagglutinating properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. J. Microbiol. 34: 1046-1049.
- Kamp, E.M., J.K. Popma et L.A.M.G. Van Leegoed.** 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., T.M.M. Vermeulen, M.A. Smits et J. Haagsma.** 1994. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. Infect. Immun. 62: 4063-4065.

Kielstein, P., H. Bocklisch et V. Zepezauer. 1981. Hamorrhagisch-necrotisierende pleuropneumonien beim Schwein durch aktinobazillen. Arch. Exp. Vet. Med. 35: 879-902.

Kilian, M, J. Nicolet et E. Biberstein. 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Mathews and Pattison 1961) Shope 1964. and proposal of a new type strain. Int. J. Syst. Bact. 28: 20-26.

Korvuo, A., L.A. Lindberg et J. Schroder. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to serotype specific antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 2. Acta. Vet. Scand. 29: 225-230.

Lewis, D.H et W.L. Schwartz. 1987. Haemophilus pleuropneumonia in swine. Comprehension on continuing education for the practicing veterinarian. 9: F7-F12.

Lida, J., I.M. Smith et J. Nicolet. 1990. Use of monoclonal antibodies for classifying *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Res. Vet. Sci. 49: 8-13.

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

Mittal, K.R., R. Higgins et S. Larivière. 1981. Capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. in: 24th annual Proceedings Am. Ass. Vet. Lab. Diagn. pp. 237-280.

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

Mittal, K.R., R. Higgins, S. Larivière et L. 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 et S. Larivière. 1987a. 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, S. Larivière and G.P. Martineau. 1987b. Effect of heat treatment on the surface antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Rec. 120: 62-65.

Mittal, K.R., R. Higgins et S. Larivière. 1989. Prevalence of different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs in Quebec. Can. Soc. Microbiol. Proc. 39: 78.

Mittal, K.R. 1990. Cross-reactions between *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotype 1 and 9. J. Clin. Microbiol. 28: 535-539.

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

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

Nagai, S., K. Takahashi, T. Mitsu et T. Yagihashi. 1993. Hly1-A sequence present in a genetic locus with low homology to appA in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 813-819.

Nakai, T., Y. Horiguchi et K. Kume. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 2. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52(3): 533-542.

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

Nicolet, J., P. Paroz et M. Krawinkler. 1980. Polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins of porcine strains of *Haemophilus*. *Int. J. Syst. Bact.* 30: 69-76.

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

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

Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae* dans: Leman, A.D., B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire et D.J. Taylor (éds). Diseases of swine. 7^{ième} édition. Iowa State University Press, Ames, IA, p 401-408.

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

Nielsen, R. 1970a. Pleuropneumoni hos svin, Fremkaldt af *Haemophilus parahaemolyticus*. Nor. Vet. Med. 22: 240-245.

Nielsen, R. 1970b. *Haemophilus parahaemolyticus* as the cause of pleuropneumonia in swine 2. Studies on the identity and pathogenicity of the organism isolated. Nord. Vet. Med. 22: 246-325.

Nielsen, R. 1973. An outbreak of pleuropneumonia among a group of Baconers. Nor. Vet. Med. 25: 492-496.

Nielsen, R. 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Thèse, Copenhagen, Danemark. 129pp.

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

Nielsen, R. 1985a. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. Acta Vet. Scand. 26: 581-585.

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. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. Vet. J. 29: 580-582.

Nielsen, R. 1990. New Diagnostic techniques: A review of the HAP Group of bacteria. Can. J. Vet. Res. 54: S68-S72.

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

Nielsen, R., L. Andresen, T. Planbeck, J.P. Nielsen, L.T. Krarup et 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 et M. Lévesque. 1988. V-factor dependant growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 319-320.

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

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

Perrin, G.G., Lorant, J.M., J.Y. Brun et M.M.C, LE MENEZ. 1979. Isolement et identification de *Haemophilus pleuropneumoniae* dans plusieurs élevages porcins de Bretagne. *Rec. Méd. Vét.* 155(6): 571-575.

Piffer, I.A., G.R. Carter et A.A.F. Botovchenco. 1986. Identification of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet. Rec.* 118: 292-294.

Pohl, S., H.U. Berstschinger, W. Frederiksen et 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 the phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bacteriol. 33(3): 510-514.

Radacovici, S., R. Lallier, S. Larivière et J.D. Dubreuil. 1992. Biochemical characterization of antigenic saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. Vet. Microbiol. 30: 369-385.

Rapp, V.J., R.F. Ross et B.E. Zimmerman. 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine. Am. J. Vet. Res. 46: 185-192.

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

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

Rodriguez-Barbosa, J.I., C.B. Gutierrez, R.I. Tascon, J. Suarez, F. De Noronha et E.F. Rodriguez-ferri. 1995. Characterization of monoclonal antibodies to O-antigen of lipopolysaccharide of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and their use in the classification of field isolates. FEMS Immun. and Med. Microbiol. 11: 35-44.

Rodriguez-Barbosa, J.I., C.B. Gutierrez Martin, R.I. Tascon, O.R. Gonzalez, K.R. Mittal et 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. 00: 000-000.

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

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

Rosendal, S., O.P. Miniats et P. Sinclair. 1986. Protective efficacy of capsule extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs and mice. Vet. Microbiol. 12: 229-240.

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

Sebunya, T.N.K., J.R. Saunders et A.D. Osburne. 1983. A model aerosol exposure system for induction of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 47: 48-53.

Shope, R.E. 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.* 119: 357-368.

Stenbaek, E.I et A.-L. schirmer. 1994. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in pig sera by an inhibition enzyme immunoassay (EIA). *Vet. Microbiol.* 39: 231-244.

Stenbaek, E.I. et K, Hovind-Haugen. 1996. Detection of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 lipopolysaccharide (LPS) variant. *Vet. Microbiol.* 52: 285-292.

Trottier, Y.L., P.F. Wright et 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. et S. Kadis. 1992. Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by non specific antibodies reactive with surface exposed antigenic determinants on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 60: 3852-3860.

Utrera, V. et C. Pijoan. 1990. Presence of fimbriae on *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from respiratory tract of pigs. *Proc. Int. Pig Vet. Soc.* 11: 25.

Vaillancourt, J., G.P. Martineau, R. Higgins et S. Larivière. 1988. Pleuropneumonie porcine à *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Partie 3: Du diagnostic à l'éradication. *Méd. Vét. Québec.* 18: 15-23.

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

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

Wilmat. C., Yuri A. Nedialkov, Brad J. Thacker et Martha H. Mulks. 1996. Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. 64: 83-90.
