

Université de Montréal

VACCINS AUTOGÈNES ET PROFILS SÉROLOGIQUES POUR
ACTINOBACILLUS SUIIS ET *STREPTOCOCCUS SUIIS* SÉROTYPE 1/2

Par

LISE LAPOINTE

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade

Maître ès science (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Octobre, 1999

© Lise Lapointe, 1999



E 1170-103

SF
607
U54
2000
V.001

UNIVERSITY OF MICHIGAN

THE LIBRARY

Department of Business Administration
Faculty of Business Administration

Administrative Services & Facilities Department

Library Administration

Library Administration

Library Administration

Library Administration



1997

1997

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

VACCINS AUTOGÈNES ET PROFILS SÉROLOGIQUES POUR
ACTINOBACILLUS SUIIS ET *STREPTOCOCCUS SUIIS* SÉROTYPE 1/2

Présenté par:

LISE LAPOINTE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dre Martine Boulianne,	présidente du jury
Dre Sylvie D'Allaire,	directrice de recherche
Dr Marcelo Gottschalk,	codirecteur de recherche
Dr Robert Higgins,	membre du jury

Mémoire accepté le 99.12.22.....

SOMMAIRE

Actinobacillus suis, généralement considéré comme un organisme commensal chez le porc, peut dans certaines circonstances s'avérer un agent pathogène opportuniste. Il entraîne alors des septicémies fatales et des mortalités subites en bas âge, et de la fièvre, de l'anorexie, des pneumonies, des lésions cutanées et parfois des mortalités subites chez les sujets plus âgés. Cet agent est présentement en émergence au Canada et aucun vaccin commercial n'est actuellement disponible. *Streptococcus suis* est reconnu pour entraîner entre autres, des méningites, des mortalités subites et des septicémies. Parmi les 35 sérotypes répertoriés jusqu'à présent, les sérotypes 2, 1/2 et 3 sont respectivement les plus souvent associés à la maladie au Canada. Bien qu'il existe des vaccins commerciaux pour *S. suis*, ils peuvent être non représentatifs des sérotypes isolées au sein d'un troupeau.

Pour le contrôle de ces deux agents, on a donc parfois recours à des vaccins autogènes qui sont élaborés à partir de souches bactériennes isolées de cas cliniques. Ces vaccins ne sont utilisés qu'au sein des troupeaux d'où proviennent ces souches. Lors de l'utilisation de ce type de vaccin, la stratégie de vaccination, souvent établie à l'aveugle, et l'efficacité du vaccin ne sont habituellement pas évaluées. Dans le cadre de ce projet, deux vaccins autogènes, soit un contre *A. suis* et un contre *S. suis* sérotype 1/2, ont été évalués pour leur efficacité à augmenter le niveau d'anticorps. La dynamique de l'infection au sein de troupeaux ayant des signes cliniques reliés à ces micro-organismes a été étudiée à l'aide de profils sérologiques. Afin de réaliser ces objectifs, la mise au point de tests sérologiques spécifiques aux souches vaccinales a été nécessaire.

Pour la première partie du projet portant sur *A. suis*, un ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay ») utilisant comme antigène un extrait salin chauffé de bactéries

entières d'une des souches vaccinales a été mis au point. Au sein d'un troupeau présentant des signes cliniques entre la seizième et dix-neuvième semaine d'âge, une baisse d'immunité maternelle entre la huitième et douzième semaine d'âge et une séroconversion à la seizième semaine ont été observées. L'évaluation de la réponse humorale chez les truies a permis de constater un niveau élevé d'anticorps avant même la vaccination. Suite à l'administration du vaccin, une augmentation de la réponse humorale a été observée, particulièrement chez les truies qui possédaient les niveaux les plus faibles d'anticorps avant la vaccination, permettant ainsi une uniformisation au sein de la population. Compte tenu de ces résultats, une stratégie privilégiant la vaccination des porcelets a été suggérée.

La seconde partie du projet portait sur *S. suis*. Un vaccin autogène de type sous-unitaire a été élaboré à partir d'une souche de *S. suis* sérotype 1/2. Un ELISA spécifique utilisant la solution antigénique du vaccin comme antigène a été développé. Suite à l'administration du vaccin, aucun effet secondaire n'a été observé. Une augmentation du niveau d'anticorps a été notée, pour un minimum de dix semaines après la vaccination. Des anticorps contre des protéines du vaccin ont été trouvés par immunoblot, entre autres contre la MRPs (« muramidase released proteins »). Un profil sérologique au sein d'un troupeau ayant des signes cliniques entre la sixième et huitième semaine d'âge a révélé une baisse d'immunité entre la sixième et huitième semaine d'âge avec un pic de séroconversion vers la dixième semaine d'âge. Cette partie du projet a permis de démontrer l'absence d'effet secondaire du vaccin et son potentiel à stimuler l'immunité humorale, ainsi que de déterminer la période la plus appropriée pour l'administration du vaccin. Ces résultats permettront d'élaborer les conditions d'essais pour une étude ultérieure à plus grande échelle sur l'efficacité du vaccin à stimuler l'immunité humorale et à diminuer l'apparition des signes cliniques.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xii
ABRÉVIATIONS.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xviii
I- INTRODUCTION.....	1
II- REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1. IMMUNITÉ ACQUISE PASSIVEMENT	5
1.1. TRANSFERT MATERNEL.....	5
1.2. COLOSTRUM ET LAIT	6
1.3. INTERFÉRENCE NÉGATIVE	8
2. IMMUNITÉ ACQUISE ACTIVEMENT	8
2.1. VACCINATION.....	9
2.1.1. Vaccins composés d'organismes vivants	9
2.1.2. Vaccins composés d'organismes tués.....	10
2.1.3. Vaccins sous-unitaires	10
2.1.4. Vaccins autogènes ou auto-vaccins	10
2.1.5. Adjuvants.....	10
3. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE PAR ELISA	12

3.1. ELISA INDIRECT	12
3.2. ELISA SANDWICH	13
3.3. ELISA DOUBLE-SANDWICH	13
4. <i>ACTINOBACILLUS SUIS</i>	15
4.1. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES	15
4.2. SIGNES CLINIQUES	16
4.3. FACTEURS DE VIRULENCE	17
4.3.1. Toxines RTX	17
4.3.2. LPS et capsule	21
4.4. FRÉQUENCE	22
4.5. CONTRÔLE	24
4.5.1. Antibiothérapie	24
4.5.2. Vaccination	25
4.5.3. Régie et environnement	25
4.6. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE	26
5. <i>STREPTOCOCCUS SUIS</i>	28
5.1. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES	28
5.2. SIGNES CLINIQUES	28
5.3. FACTEURS DE VIRULENCE	30
5.3.1. Capsule	30
5.3.2. Adhésine	30
5.3.3. Protéines de la paroi cellulaire	31
5.3.3.1. MRP	32

5.3.3.2 Protéine liant les IgG.....	32
5.3.4. Protéines extracellulaires	32
5.3.4.1. EF	32
5.3.4.2. Hémolysine.....	33
5.3.5. Profil des souches européennes vs canadiennes	34
5.4. FRÉQUENCE	34
5.5. ÉPIDÉMIOLOGIE	34
5.6. CONTRÔLE	36
5.6.1. Antibiothérapie	36
5.6.2. Vaccination	37
5.6.3. Régie et environnement	39
5.7. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE.....	41
III - MATÉRIEL ET MÉTHODES, RÉSULTATS ET DISCUSSION	
<i>ACTINOBACILLUS SUIIS</i> :	
Serologic profile of a cohort of pigs and antibody response to an autogenous vaccine for Actinobacillus suis.....	45
IV - MATÉRIEL ET MÉTHODES, RÉSULTATS ET DISCUSSION	
<i>STREPTOCOCCUS SUIIS</i> :	
Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for <i>Streptococcus suis</i> capsular type 1/2.....	64
V – DISCUSSION ET CONCLUSIONS	93
VI - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I

Nombre de cas d'infections dues à *Actinobacillus suis* diagnostiqués par rapport au nombre d'autopsies réalisées entre 1985 et 1988 dans le sud-ouest ontarien (adapté de Sanford *et al.*, 1990)..... 23

Tableau II

Nombre de cas d'infections dues à *Actinobacillus suis* diagnostiqués par rapport au nombre d'autopsies réalisées entre 1991 et 1993 au Québec (adapté de Odin, 1994).....24

LISTE DES FIGURES

Actinobacillus suis

Fig. 1: Average ELISA S/P ratios for *Actinobacillus suis* obtained at 5, 8, 12 and 16 weeks of age for a cohort of pigs (n=20) (A). Average S/P ratios for pigs with a S/P ratio at 5 weeks of age ≤ 0.35 (n=7, gray band) and > 0.35 (n=13, black band) (B).....61

Fig. 2: Average ELISA S/P ratios obtained before vaccination and 2 weeks (second injection) and 5 weeks later. Control group (gray band) received a placebo (n=29) and vaccinated group (black band) were injected with an *Actinobacillus suis* autogenous vaccine (n=36).....62

Fig. 3: Relationship between the ELISA S/P ratio for *Actinobacillus suis* before the vaccination and the magnitude of the response to the vaccination (S/P ratio 5 weeks later - S/P ratio before vaccination) for the control group (n=29, \times) ($y = 0.9 - 0.57x$) and vaccinated group (n=36, \blacksquare) ($y = 0.096 - 0.1x$).....63

Streptococcus suis

Figure 1: RAPD patterns generated with primers OPB17, OPB10 and OPB07 as described by Chatellier *et al* (1999). All strains shown were *Streptococcus suis* capsular type 1/2 isolated from diseased pigs in herds belonging to the same owner.....87

Figure 2: (A) Western blots for the presence of MRP on the strain used in the vaccine and the antigen solution of the autogenous vaccine. (B) Comassie blue staining of proteins present in the antigen solution of the autogenous vaccine for *Streptococcus suis* capsular type 1/2 on 7.5% SDS-polyacrylamide gel.....88

Figure 3: Antibody response of pigs to a *Streptococcus suis* capsular type 1/2 autogenous vaccine measured by ELISA S/P ratio.....89

Figure 4: (A) Western blots of proteins contained in the antigen solution of the autogenous vaccine for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. Proteins profiles were revealed using sera of a control pig (C2). (B) Western blots revealed using sera of a vaccinated pig (5V2).....91

Figure 5: Average S/P ratios for *Streptococcus suis* capsular type 1/2 obtained from sows and pigs of 2, 4, 6, 8 and 10 weeks of age (30 animals per group).....92

ABRÉVIATIONS

ABTS: solution de révélation pour ELISA composée de 2.2` azino-bis (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid).

ADN (DNA): acide désoxyribonucléique.

Al: aluminium.

APX: toxine RTX d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

°C: degrés Celsius.

EF: «extracellular factor», protéine qui se retrouve dans le surnageant de culture de *Streptococcus suis*.

ELISA: «enzyme-linked immunosorbent assay», test sérologique.

H: hydrogène.

Ig: immunoglobuline.

IMBs: «immunomagnetic beads», billes immunomagnétiques

kDa: kiloDalton.

LPS: lipopolysaccharide.

mg: milligramme.

mL: millilitre.

MRP: «muramidase released protein», protéine associée à la paroi cellulaire de *Streptococcus suis*.

MRPs et MRP*: variantes de la MRP qui diffèrent par leur poids moléculaire.

nm: nanomètre.

O: oxygène.

OD: «optical density», densité optique.

PBS: «phosphate buffer saline», tampon phosphate.

PBS-T20: «phosphate buffer saline» avec 0,05% de tween 20.

RAPD: «randomly amplified polymorphic DNA».

RIA: radioimmunoassay.

RTX: «repeats in the structural toxin», toxine présente chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Actinobacillus suis*.

S/P ratio: ratio calculé en divisant la densité optique des sérums obtenue sur une plaque ELISA par celle du contrôle positif sur la même plaque ELISA.

SPF: «specific pathogen free».

SRRP: syndrome reproducteur et respiratoire porcin.

THB: «Todd-Hewitt broth», milieu de culture Todd Hewitt.

μL: microlitre.

v/v: volume/volume.

wt/v: weight/volume

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce projet de maîtrise. Ces personnes, grâce à leur expérience et leur support, ont contribué à la réussite de ce travail. Je tiens tout particulièrement à remercier les personnes suivantes:

Dre Sylvie D'Allaire, professeur titulaire au département de sciences cliniques de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour avoir accepté de diriger ce projet de maîtrise et pour avoir rendu cette expérience enrichissante et agréable. Merci pour l'intérêt, la disponibilité et la confiance témoignés tout au long de ces études.

Dr Marcelo Gottschalk, professeur agrégé au département de pathologie et microbiologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour avoir accepté de collaborer à la direction de ces études avec intérêt et disponibilité. Il a également contribué à la réussite du projet en permettant la réalisation de la partie expérimentale à l'intérieur de son laboratoire.

Sonia Lacouture, agente de recherche, et Annie Lebrun, assistante de recherche, pour leur contribution respective au sein des différentes parties du projet, ainsi que pour leur aide et leurs conseils grandement appréciés tout au cours de ce projet de maîtrise.

Dr Richard Drolet, professeur titulaire au département de pathologie et microbiologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour avoir contribué au projet en réalisant les expertises en pathologie.

Dr Martin Thibeault, étudiant à l'internat de perfectionnement en sciences appliquées vétérinaires (IPSAV), pour son aide grandement appréciée sur le terrain.

Dre Gabriela Martinez, étudiante au post-doctorat, pour son expertise et sa contribution à la partie touchant à l'analyse par RAPD de *Streptococcus suis* et pour la patience manifestée lors de la réalisation des différentes figures.

Et finalement, à Jocelyn, ma famille et mes amis pour leur support et leurs encouragements tout au cours de cette aventure.

I- INTRODUCTION

De nombreuses maladies infectieuses peuvent être contrôlées à l'aide de vaccins commerciaux. Toutefois, pour plusieurs autres infections, aucun vaccin commercial n'est actuellement disponible ou ceux-ci ne sont pas représentatifs des souches présentes au sein d'un troupeau. On peut avoir recours, pour certaines de ces conditions, à des vaccins autogènes qui sont des vaccins élaborés à partir de souches isolées de cas cliniques, mais qui ne peuvent être utilisés qu'au sein des troupeaux d'où proviennent ces souches. Par contre, lorsque ce type de vaccin est privilégié, la stratégie de vaccination, souvent établie à l'aveugle, et l'efficacité du vaccin ne sont habituellement pas évaluées.

Dans le cadre de ce projet, deux vaccins autogènes, élaborés contre deux agents pathogènes porcins, *Actinobacillus suis* et *Streptococcus suis* sérotype 1/2, ont été étudiés. *Actinobacillus suis* est un organisme commensal chez le porc qui peut s'avérer parfois un agent pathogène opportuniste. Les signes cliniques varient selon l'âge des sujets atteints. On rapporte notamment des septicémies fatales et des mortalités subites en bas âge. Chez les sujets plus âgés, on observe entre autres de la fièvre, de l'anorexie, des pneumonies, des lésions cutanées et parfois des mortalités subites. Cet agent pathogène semble en émergence au Canada et ce, particulièrement dans les troupeaux à haut niveau sanitaire. Présentement, aucun vaccin commercial n'est disponible afin d'aider au contrôle de la maladie, le recours aux vaccins autogènes est donc nécessaire lors de pertes importantes. Dans la seconde partie du projet, le vaccin autogène impliquait une souche de *S. suis* sérotype 1/2. *S. suis* est un micro-organisme qui est responsable de lourdes pertes économiques dans l'industrie porcine. Il existe présentement 35 sérotypes officiellement décrits. Au Canada, les

sérotypes les plus souvent associés à des cas cliniques sont les sérotypes 2, 1/2 et 3. Les principaux signes cliniques associés à *S. suis* sont des méningites, des mortalités subites ou des septicémies. Bien qu'il existe présentement des vaccins commerciaux contre *S. suis*, aucun n'est spécifique au sérotype 1/2. On connaît d'ailleurs peu de choses sur ce sérotype, bien qu'il soit, tel que mentionné plus haut, le deuxième plus important par sa virulence et sa fréquence d'isolement chez les animaux malades. De plus, le contrôle par la vaccination des infections causées par *S. suis* n'a donné jusqu'à présent que des résultats équivoques.

Un des objectifs de l'étude était d'évaluer l'efficacité à augmenter le niveau d'anticorps de deux vaccins autogènes, soit un contre *A. suis* et *S. suis* sérotype 1/2. Pour *A. suis* un vaccin commercialement disponible a été utilisé, tandis que pour *S. suis* le vaccin a du être développé. La dynamique de l'infection a également été évaluée grâce à un profil sérologique au sein de troupeaux porcins ayant des problèmes reliés à ces agents pathogènes, ceci permettant de déterminer la meilleure stratégie de vaccination au sein de ces troupeaux. Afin de réaliser ces objectifs, la mise au point de tests sérologiques spécifiques a été nécessaire.

II- REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. IMMUNITÉ ACQUISE PASSIVEMENT

L'immunité acquise est spécifique à un agent infectieux. Elle peut être acquise par l'animal de façon active ou passive. Dans le cas de l'immunité acquise passivement, il y a transfert d'anticorps d'un animal préalablement exposé à un autre animal. Cette immunité est appelée passive chez un animal qui n'a pas activement synthétisé d'anticorps, ceux-ci proviennent d'une source extérieure. La protection qui en résulte permet à l'animal d'obtenir une protection immédiate, mais temporaire. En effet, elle est d'une durée maximum équivalente au temps pendant lequel les anticorps sont présents chez l'animal, soit une période pouvant aller de quelques semaines à quelques mois, dépendamment du micro-organisme impliqué. L'immunité passive peut être acquise naturellement par le transfert d'anticorps de la mère au nouveau-né. La mère possède des anticorps spécifiques contre certains agents infectieux et elle en transfère en partie au nouveau-né, ce qui permet d'obtenir une protection temporaire contre ces micro-organismes. Ce transfert assure au nouveau-né une défense immunitaire jusqu'à ce que son système immunitaire soit suffisamment mature pour répondre de lui-même. L'immunité passive peut également être acquise artificiellement par l'injection, chez un animal, d'un sérum contenant des anticorps obtenus d'un autre sujet préalablement immunisé.

1.1. TRANSFERT MATERNEL

Les composantes du système immunitaire des porcelets sont fonctionnelles dès la naissance bien qu'elles soient habituellement moins efficaces qu'à l'âge adulte

(Hammerberg *et al.*, 1989). En fait, le porcelet est peu exposé avant sa naissance à des antigènes, il n'a donc pas à développer de réponse immunitaire. Suite à une exposition à un agent infectieux, un délai de 7 à 10 jours est généralement nécessaire au développement des premiers anticorps spécifiques (Roth, 1999). Au cours de cette période, une protection contre les agents infectieux dépend, en autres, des mécanismes de défense naturelle, mais aussi du transfert passif d'anticorps de la mère. La voie utilisée pour le transfert d'anticorps maternels est influencée par la structure du placenta. Chez le porc, le placenta est de type épithéliochorial et le passage transplacentaire des anticorps est impossible en raison du trop grand nombre de couches de cellules épithéliales présentes (Roth, 1999). L'immunité maternelle est alors transmise par le colostrum dans les premières heures après la naissance et ensuite par le lait.

1.2. COLOSTRUM ET LAIT

Le colostrum des truies est riche en IgG et en IgA et on retrouve également en plus faible quantité des IgM. La classe des IgG est prédominante et représente plus de 60% des anticorps présents dans le sérum et le colostrum. Quant aux IgM, elles représentent une proportion de 5 à 10 % (Roth, 1999). Lors des derniers jours de la gestation, il y a concentration des anticorps dans le colostrum. Le taux d'anticorps retrouvé dans le colostrum des truies est supérieur à celui présent dans leur sérum (Porter, 1969). D'ailleurs, la majorité des anticorps retrouvés sont dérivés du sérum de la truie (Stokes et Bourne, 1989). Par la suite, la concentration d'anticorps dans le lait diminue graduellement. Avec le temps, il se produit un changement dans les proportions des différentes classes d'immunoglobulines présentes. En effet, à partir

du troisième jours post-partum et ce, jusqu'à la fin de la lactation, les IgA prédominent. Contrairement à ceux présent dans le colostrum, les anticorps retrouvés dans le lait dérivent très peu des anticorps du sérum de la truie; ils sont généralement synthétisés directement dans les glandes mammaires (Stokes et Bourne, 1989).

Les nouveau-nés absorbent les trois classes d'immunoglobulines (IgG, IgA et IgM), présentes dans le colostrum et le lait, par le petit intestin (Porter, 1969; Curtis et Bourne, 1971). Les anticorps maternels vont se fixer sur des récepteurs Fc spécialisés situés au niveau des cellules épithéliales de l'intestin pour ensuite se rendre dans le système circulatoire du porcelet. L'absorption se fait de façon sélective. En effet, les IgG et les IgM sont préférentiellement absorbés, tandis que les IgA sont absorbés de façon moins efficace et restent en majorité au niveau du mucus intestinal et assurent une protection locale (Porter, 1973; Hill et Porter, 1974). L'absorption intestinale des immunoglobulines cesse habituellement entre 24 et 36 heures après la naissance. Chez un porcelet qui boit de façon normale, l'absorption d'anticorps décroît avec une demi-vie de 3 heures (Speer *et al.*, 1959). Par contre, l'intestin peut absorber des anticorps sur une période pouvant s'étendre jusqu'à 5 jours. De cette façon, les porcelets qui n'ont pas la possibilité de boire dans les premières 24 ou 36 heures peuvent tout de même bénéficier de l'ingestion de colostrum ou de lait (Lecce *et al.*, 1961).

Une faible immunité d'origine maternelle chez le porcelet peut entre autres, dépendre d'un faible taux d'anticorps chez la truie au moment de la production du colostrum. Des problèmes de lactation peuvent également survenir chez la truie et ainsi

empêcher un bon transfert d'anticorps maternels. Les problèmes peuvent également se situer dans l'absorption intestinale des anticorps chez le porcelet.

1.3. INTERFÉRENCE NÉGATIVE

Il est reconnu que la présence d'anticorps maternels peut empêcher la synthèse d'anticorps chez le nouveau-né. En effet, les anticorps maternels retardent le moment de la synthèse des anticorps chez le nouveau-né par un processus nommé interférence négative. Ce phénomène est important car la présence d'anticorps maternels peut diminuer l'efficacité d'une vaccination, en limitant la synthèse d'anticorps chez un sujet nouvellement vacciné. Cette période réfractaire peut être d'une durée variable et dépend de la quantité d'anticorps transférés et de la demi-vie de ces anticorps.

2. IMMUNITÉ ACQUISE ACTIVEMENT

L'immunité active fait suite à une exposition à un antigène. Contrairement à l'immunité acquise passivement, elle implique le système immunitaire de l'hôte par des réactions spécifiques. Elle possède certains avantages, car la durée de la protection est plus longue et lors d'une seconde exposition au même antigène, il y a augmentation de la rapidité et de l'efficacité de la réponse immunitaire. L'induction de ce type d'immunité peut se faire de façon naturelle par exposition à un antigène (infection) ou artificiellement par la vaccination.

2.1. VACCINATION

La vaccination stimule une immunité active par exposition de l'animal à un agent infectieux. Le but est d'obtenir une protection avant que cet animal ne s'infecte de façon naturelle. Un vaccin est une suspension d'antigènes sous une forme qui, tout en étant devenue inoffensive, peut induire une immunité chez l'hôte. Les effets secondaires associés à la vaccination ne doivent jamais être plus importants que les manifestations observées si l'animal contractait naturellement la maladie. De plus, un bon vaccin doit être économique, stable et facile à administrer. Il doit également stimuler les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire, soit les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T et B, de même que les interleukines qui sont associées à ces cellules. Un grand nombre de cellules mémoires doivent aussi être produites. Il est également important d'assurer une persistance de l'antigène dans les tissus lymphoïdes pour permettre une protection prolongée.

2.1.1. Vaccins composés d'organismes vivants

Ce type de vaccin permet d'induire une immunité spécifique et active par la production d'une infection asymptomatique ou sous-clinique. Une des méthodes de production de ce type de vaccin consiste à affaiblir ou atténuer, par différents processus, une souche virulente de façon à ce qu'elle n'engendre pas la maladie, tout en conservant ses propriétés antigéniques. Une autre méthode consiste à injecter une souche peu ou pas virulente du même organisme. Cette souche possède souvent les mêmes propriétés antigéniques mais elle est incapable de causer la maladie.

2.1.2. Vaccins composés d'organismes tués

Une réaction immunitaire peut être induite en injectant des organismes tués ou inactivés. Ces vaccins sont inoffensifs, car les traitements physiques ou chimiques utilisés empêchent les micro-organismes de causer la maladie et de se multiplier au sein de l'organisme. Les bactéries peuvent être inactivées par la chaleur ou par la formaldéhyde. On doit cependant s'assurer que ces vaccins conservent leurs caractéristiques antigéniques.

2.1.3. Vaccins sous-unitaires

Un tel type de vaccin présente seulement une ou plusieurs des composantes antigéniques, des épitopes, d'un micro-organisme. Ces épitopes doivent être capables de stimuler le plus possible une forte réaction immunitaire chez l'hôte.

2.1.4. Vaccins autogènes ou auto-vaccins

Un vaccin autogène est préparé à partir d'un ou de plusieurs isolats provenant de cas cliniques au sein d'un troupeau, ou d'une ou plusieurs parties antigéniques de ces isolats. Ce vaccin ne peut par la suite qu'être utilisé au sein du troupeau d'où provient l'antigène. Il s'agit le plus souvent de vaccins inactivés.

2.1.5. Adjuvants

Les adjuvants sont des substances ajoutées aux vaccins afin de les rendre plus efficaces et d'induire une mémoire immunitaire. Ils sont habituellement ajoutés aux vaccins dans lesquels des organismes inactivés, ou certaines de leurs composantes, sont utilisés. Ils permettent l'acheminement des antigènes solubles vers les sites où il

Il y a possibilité de contact avec des lymphocytes, stimulant ainsi l'expression de co-signaux responsables d'une réponse immunitaire. Les adjuvants permettent, en emprisonnant les antigènes à des sites propices au contact avec des lymphocytes, d'assurer une distribution sur de plus longues périodes de temps, et donc une stimulation prolongée.

Par exemple, lorsqu'un animal est injecté avec des antigènes solubles mélangés à un adjuvant insoluble, comme l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium, il y a formation de dépôt au niveau des tissus entraînant la formation de granulomes riches en macrophages. Ceci permet une stimulation antigénique sur une longue période (Tizard, 1996). L'adjuvant incomplet de Freund est composé d'une émulsion d'eau et d'huile et entraîne une inflammation au site d'injection avec la formation de granulomes. Si on ajoute à cet adjuvant incomplet des composantes de la paroi de *Mycobacterium tuberculosis*, on obtient l'adjuvant complet de Freund. La présence de la paroi de mycobactérie, composée principalement de N-acétylmuramyl-L-alanyl-di-isoglutamine, stimule la production d'interleukine 1 de la part des macrophages, ce qui permet l'augmentation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Tizard, 1996).

Par contre, l'utilisation d'adjuvants causant la formation de granulomes est interdite chez les animaux destinés à la consommation. En effet, ces adjuvants peuvent entraîner une détérioration de la qualité de la viande et induire dans certains cas une réaction immunitaire néfaste chez le consommateur (Tizard, 1996).

3. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE PAR ELISA

L'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) est un test diagnostique sérologique primaire, car il mesure la quantité directe de combinaison d'antigène et d'anticorps. L'identification des complexes immuns formés est possible au moyen d'anticorps marqués par des enzymes. Cette méthode sérologique révèle la présence de complexes, en mettant en évidence l'activité enzymatique du marqueur sur un substrat particulier. L'activité enzymatique est alors facile à mesurer par un changement de couleur, et permet d'effectuer des mesures quantitatives très précises. Les enzymes les plus fréquemment utilisées sont la peroxydase, la phosphatase acide, la bêta galactosidase et la glucose-oxydase.

On distingue deux types particuliers d'ELISA; l'ELISA indirect avec lequel il est possible de détecter dans un sérum un anticorps spécifique, et l'ELISA sandwich qui permet de détecter la présence d'un antigène spécifique. Il existe une variante à ce dernier type d'ELISA, soit l'ELISA double sandwich, qui permet de détecter des anticorps spécifiques dans un sérum lorsqu'il est impossible de fixer un antigène directement sur le support donc impossible d'avoir recours à l'ELISA indirect.

3.1. ELISA INDIRECT

La recherche dans un sérum de la présence d'anticorps particuliers par l'ELISA indirect, doit d'abord débiter par la fixation de l'antigène spécifique à une plaque de polystyrène. Le sérum est ensuite incubé, et s'il y a présence d'anticorps spécifiques à

cet antigène, il y a formation de complexes immuns. Ces complexes nouvellement formés persistent même après des lavages qui éliminent les autres anticorps non-spécifiques présents dans le sérum. Afin de mettre en évidence les complexes immuns, un antisérum contenant des anti-anticorps marqués avec une enzyme est ajouté. Ces anti-anticorps se fixent aux anticorps impliqués dans la formation des complexes immuns lors de l'étape précédente. La présence des anti-anticorps fixés est ensuite révélée par l'ajout du substrat de l'enzyme, ce qui entraîne un changement de couleur. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le sérum.

3.2. ELISA SANDWICH

La variante sandwich du test ELISA permet de détecter un antigène particulier présent dans un sérum. Dans ce cas, c'est un anticorps spécifique à un antigène qui est fixé au support et le sérum à tester est ensuite incubé. L'antigène spécifique, s'il est présent, forme des complexes anticorps-antigènes qui persistent après les lavages. Finalement, un anticorps spécifique contre l'antigène, et marqué par une enzyme, est ajouté. Une autre série de lavage permet d'enlever l'excès d'anticorps non-fixés. L'ajout du substrat spécifique à l'enzyme utilisée permet par la suite de mesurer la quantité d'antigènes présents dans le sérum en mesurant le changement de couleur.

3.3. ELISA DOUBLE-SANDWICH

L'ELISA double-sandwich permet quant à lui de détecter la présence d'anticorps dans un sérum. En effet, il est parfois impossible de fixer un antigène directement sur le support choisi. À ce moment, la fixation au support d'anticorps spécifiques à

l'antigène permet de contrer ce problème. Par la suite, l'antigène est mis en contact avec les anticorps préalablement fixés et il y a formation de complexe anticorps-antigène. L'antigène se trouve alors fixé au support et est exposé. Par la suite, le sérum est incubé et les anticorps présents spécifiques à l'antigène se fixent à l'antigène. Des anti-anticorps marqués d'une enzyme sont par la suite mis en contact et, de la même façon que les autres ELISA, la présence de ces anti-anticorps fixés aux complexes immuns est révélée en ajoutant le substrat approprié de l'enzyme.

4. *ACTINOBACILLUS SUIS*

4.1. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

La bactérie nommée *A. suis* en 1962 par Van Dorsen et Jaartsveld est une bactérie coccoïde, à Gram négatif, non-mobile, appartenant à la famille des *Pasteurellaceae*. Mair et collaborateurs (1974) ont identifié des caractéristiques distinctives permettant de séparer *A. suis* d'*Actinobacillus lignieresii* et d'*Actinobacillus equuli*. Les principales distinctions sont la production d'hémolyse β sur gélose au sang de mouton, l'incapacité à fermenter le mannitol, la capacité à produire de l'acide à partir des sucres arabinose et cellbiose, l'hydrolyse de l'esculine et la capacité à induire la maladie chez la souris.

A. suis est un organisme commensal chez le porc, mais il peut parfois être un agent pathogène opportuniste chez cette même espèce. Il est plus fréquemment rapporté au sein de troupeaux de haut niveau sanitaire (Van Ostaaijen *et al.*, 1997). Ce micro-organisme peut être présent au niveau des amygdales de porcs cliniquement sains. En effet, on rapporte qu'après une épidémie due à *A. suis*, l'isolement à partir des amygdales de porcs cliniquement sains a été réalisé à quelques reprises (Miniats *et al.*, 1989). Ce micro-organisme a également été isolé du vagin de truies cliniquement saines. L'habitat naturel de cet agent semble être le vagin, ce qui est supporté par l'absence de ce micro-organisme dans des prélèvements rectaux de truies infectées et par la persistance au niveau des sécrétions vaginales pendant au moins 40 jours après inoculation intravaginale (Ross *et al.*, 1972). Au cours de cette dernière étude, la

bactérie fut isolée des sécrétions vaginales chez 89 des 164 truies (54,3%) au sein d'un troupeau. Dans une autre étude, l'isolement d'*A. suis* des sécrétions vaginales chez des truies, après la parturition, était corrélé avec une portée de poids inférieur à la naissance et à 21 jours d'âge (Ross *et al.*, 1969). Par contre, ces auteurs mentionnent qu'il n'y a pas d'évidence directe que cet organisme soit la cause de portées de poids inférieur, ou soit impliqué dans tout autre type de désordres urogénitaux ou reproductifs.

4.2. SIGNES CLINIQUES

Les signes cliniques associés à une infection due à *A. suis* dépendent principalement de l'âge des sujets atteints. Généralement, ce sont les porcelets qui sont affectés. On note le plus souvent des mortalités subites, des septicémies ou des infections localisées comme des endocardites, des polyarthrites, des problèmes respiratoires ou des désordres neurologiques (Van Ostaaijen *et al.*, 1997). Le diagnostic clinique chez les porcelets à la mamelle peut être difficile puisque les mortalités subites peuvent être confondues par l'éleveur avec des écrasements par la truie (Sanford *et al.*, 1990). Les autres causes de septicémie doivent être incluses dans le diagnostic différentiel à cet âge, particulièrement la septicémie à *Escherichia coli* qui peut se traduire par une polysérosite sérofibrineuse, qui peut être fatale chez le porcelet en maternité ou en pouponnière (Odin, 1994).

Les infections causées par *A. suis* chez les sujets plus âgés sont beaucoup moins fréquentes et généralement moins sévères. Elles sont principalement caractérisées par l'apparition de fièvre, d'anorexie, de lésions cutanées souvent similaires à celles du

rouget (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) ou de mortalités subites sans aucun signe clinique (Miniats *et al.*, 1989). On rapporte également de la toux et des pneumonies. Dans ce dernier cas, l'apparence des lésions est comparable à celles rencontrées dans la pleuropneumonie porcine causée par *Actinobacillus pleuropneumoniae*. On a aussi observé des méningites, mais dans ce cas il s'agissait d'une infection mixte avec *S. suis* où les lésions n'étaient peut-être pas uniquement causées par à *A. suis* (Odin, 1994). Des lésions macroscopiques et microscopiques sont observées aux poumons, aux articulations, au cœur ou au péritoine. On peut également retrouver des lésions microscopiques au foie, aux reins ou à la rate (Odin, 1994).

La transmission rapide de la maladie suggère qu'*A. suis* pourrait être transmis par les humains et/ou des porcs porteurs asymptomatiques (Miniats *et al.*, 1989). La transmission serait possible par aérosol, par contact direct avec la peau à la faveur de lésions cutanées (Van Ostaaijen *et al.*, 1997).

4.3. FACTEURS DE VIRULENCE

4.3.1. Toxines RTX

Un des facteurs de virulence importants d'*A. suis* est la production de toxines RTX ("repeats in the structural toxin") qui sont des exotoxines protéiques avec activité hémolytique et/ou cytotoxique. Elles sont dépendantes du calcium et formatrices de pores, et sont retrouvées chez une variété de bactéries à Gram négatif. Elles sont principalement caractérisées par une région unique, riche en glycines répétées, impliquée dans l'attachement du calcium, lui-même requis pour l'attachement cellulaire ou l'activité cytotoxique (Burrows et Lo, 1992). Ce facteur de virulence est

également rapporté et important dans la pathogénie des infections à *A. pleuropneumoniae*. L'opéron RTX est habituellement composé de quatre gènes: le gène A qui code pour la toxine avec activité hémolytique et/ou cytotoxique, le gène C codant pour une protéine requise pour la modification et l'activation de la structure de la protéine A, et les gènes B et D requis pour une protéine nécessaire au signal permettant la sécrétion de la toxine.

Il existe cependant une différence dans la cartographie des gènes de la toxine RTX d'*A. suis* par rapport à celle établie pour *A. pleuropneumoniae*. De façon générale, chez *A. pleuropneumoniae*, ces quatre gènes sont répartis un à la suite des autres sur un même brin d'ADN. Par contre, dans le cas d'*A. suis*, les quatre gènes requis pour la production et la sécrétion de toxines RTX actives sont discontinus, les gènes C et A étant localisés sur une région du chromosome séparée des gènes B et D (Burrows et Lo, 1992). Toutefois, une interruption similaire des déterminants génétiques a été notée au niveau des toxines RTX d'*A. pleuropneumoniae* de sérotypes 5, 7 et 9 (Anderson *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1991; Smits *et al.*, 1991). Burrows et Lo (1992) ont également noté une divergence quant à la terminaison du gène B chez *A. suis*. En effet, le gène B d'*A. suis* ne contient que 17 codons suivis d'une multitude de codons "stop"; ces gènes B sont plus courts et sont nommés pseudogènes B. Certains sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* présentent également des pseudogènes B. Par exemple, le pseudogène B d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 9 contient les 167 premiers codons sur les 700 présumés d'un gène B complet (Chang *et al.*, 1991).

Par contre, la similarité entre le gène A de la toxine RTX des organismes *A. suis* et *A. pleuropneumoniae* suggère une divergence récente à partir d'un ancêtre commun. D'ailleurs, des recherches sur l'acquisition des déterminants cytolytiques pourraient aider à interpréter la relation évolutive entre *A. suis* et *A. pleuropneumoniae*. De plus, l'échange potentiel de matériel génétique entre ces deux espèces microbiennes relativement proches n'est pas improbable puisqu'ils partagent le même hôte, soit le porc. Il a également été établi qu'il existait une relation antigénique entre l'hémolyse produite par *A. suis* et celle produite par *A. pleuropneumoniae*. Ces deux toxines, en plus de montrer un haut degré d'homologie au niveau des acides aminés, engendrent une réaction croisée au point de vue immunologique (Fenwick *et al.*, 1996).

Devenish et ses collaborateurs (1989) ont démontré qu'un sérum de porc convalescent, possédait des anticorps anti-*A. suis* capables de neutraliser et de se fixer fortement avec une hémolysine de poids moléculaire de 104 kDa produite par *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Inversement, un antisérum contre l'hémolysine d'*A. pleuropneumoniae* présentait une réaction croisée avec une protéine de haut poids moléculaire présente dans le surnageant d'une culture d'*A. suis*. Par immunoblot, il est également possible de démontrer la similarité antigénique entre les toxines RTX produites par ces deux organismes. Ainsi, la détection d'une protéine de 105 kDa chez *A. suis* est possible avec un antisérum polyclonal de lapin dirigé spécifiquement contre la protéine de 104 kDa d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (Burrows et Lo, 1992). Ces auteurs suggèrent que ces toxines agissent comme facteurs de virulence importants, mais de façon différente dans leur capacité à causer la maladie. En effet, *A. pleuropneumoniae*, plus virulent, cause chez le porc des pneumonies

hémorragiques tandis qu'*A. suis*, agent pathogène opportuniste, cause le plus fréquemment des morts subites en bas âge. Ces différences suggèrent qu'il y aurait d'autres facteurs de virulence impliqués dans la localisation et la progression des lésions causées par ces deux agents pathogènes. Il a été démontré qu'*A. suis* présente des protéines similaires à ApxI et ApxII (Kamp *et al.*, 1994). Ainsi, des anticorps monoclonaux dirigés contre les toxines ApxI et ApxII (toxines RTX d'*A. pleuropneumoniae*) réagissaient fortement par dot blot avec une culture filtrée d'*A. suis*. De même, la présence de deux protéines chez *A. suis* ayant co-migré avec les protéines ApxI et ApxII a été détectée par Southern blot. Fenwick et collaborateurs (1995, 1996) ont également fourni une preuve de l'existence d'une immunité croisée entre ces deux micro-organismes. Ils ont infecté, avec *A. pleuropneumoniae*, un groupe de porcs préalablement exposés à *A. suis* et un groupe contrôle de porcs non exposés à *A. suis*. Dans le premier groupe, les auteurs ont noté, avant l'infection à *A. pleuropneumoniae*, une réaction positive par ELISA à la présence d'anticorps dirigés contre la toxine ApxI mais l'absence d'*A. pleuropneumoniae* par un autre type d'ELISA et par la fixation du complément. Les porcs préalablement exposés à *A. suis* n'ont pas développé de signe clinique ni de lésion notable, tandis que le groupe contrôle non préalablement exposé à *A. suis* a développé des signes cliniques ainsi que des lésions pulmonaires typiques à *A. pleuropneumoniae*. Ces études démontrent ainsi l'existence d'une immunité croisée engendrée par les toxines de ces deux organismes, mais aussi de façon indirecte, l'influence de la neutralisation par des anticorps des toxines RTX produites par *A. suis* et *A. pleuropneumoniae* sur la capacité à produire la maladie. Fenwick et collaborateurs (1996) suggèrent la possibilité de contrôler l'infection à *A. pleuropneumoniae* par l'élaboration d'un

vaccin utilisant *A. suis*, en raison de la similarité des toxines RTX et de l'immunité croisée qui en résulte, avec l'avantage d'une virulence moins importante. Il semble également possible de cloner les toxines RTX d'*A. suis* pour la composante éventuelle d'un vaccin contre *A. pleuropneumoniae* (Burrows et Lo, 1992).

4.3.2. LPS et capsule

Il a été démontré que, sur les bases de leurs caractéristiques biochimiques et antigéniques, les souches porcines d'*A. suis* présentent une homogénéité entre elles (Bada *et al.*, 1996). De même, une homogénéité a été rapportée entre les différentes souches d'*A. suis* provenant de cas cliniques ou de porteurs sains. Ces souches possédaient un biotype et un profil de fragments d'enzymes de restriction similaires, et partageaient les mêmes antigènes majeurs de surface sur les bases de tests d'agglutination. Ces résultats suggéraient soit un pouvoir pathogène semblable entre les souches provenant de sujets malades ou sains, soit la nécessité de développer d'autres tests permettant de les différencier (Van Ostaaijen *et al.*, 1997). Par ailleurs, une étude récente utilisant une technique d'immunoblot a permis l'étude d'échantillons provenant de sujets sains et malades afin de détecter certaines différences au niveau de deux des antigènes majeurs de surface; les lipopolysaccharides (LPS) et la capsule (Slavic *et al.*, 1998). Ces auteurs ont noté que chez 47 des 65 isolats provenant de cas cliniques, les 11 échantillons provenant de sujets sains et les 4 souches de référence ont réagi avec l'antisérum dirigé contre *A. suis* SO4, une souche qui contient le 1→6 β-D glucan, l'un des polymères majeurs du LPS et de la capsule. D'ailleurs, des anticorps contre ce polymère ont été détectés

dans des sérums de porcs. Par contre, ces anticorps ont pu être développés suite à l'exposition à un organisme ubiquitaire, par exemple un champignon, présent dans l'environnement et possédant ce même polymère ou un domaine antigénique similaire. Seulement deux souches sur 19 soumises pour la production de bactérines ont réagi avec les anticorps dirigés contre 1→6 β-D glucan suggérant que les souches les plus virulentes d'*A. suis* ne posséderaient pas à leur surface ce polymère. Par contre, d'autres analyses seront requises pour permettre de corrélérer la virulence et certaines autres particularités du LPS et de la capsule.

4.4. FRÉQUENCE

A. suis est occasionnellement reconnu comme agent pathogène primaire entraînant des signes cliniques. On remarque depuis quelques années au Canada, une émergence des infections causées par *A. suis* selon certaines études rétrospectives. Tout d'abord, une étude réalisée par MacDonald et collaborateurs (1976) en Alberta, entre 1973 et 1975, montre qu'au laboratoire de diagnostic vétérinaire d'Edmonton, l'isolement d'*A. suis* avait eu lieu dans seulement sept cas. On mentionne qu'à cette époque, on ne connaissait pas l'étendue de cette infection ni son importance économique chez les porcs de cette province et ce, en raison du peu d'isollements par année.

Une étude rétrospective réalisée entre 1985 et 1988 au Huron Park Diagnostic Laboratory dans le sud-ouest ontarien, répertorie 42 cas provenant de 24 fermes différentes (Sanford *et al.*, 1990). De ces cas soumis, 87% étaient des porcelets âgés entre 2 et 28 jours. Ces cas étaient principalement associés à des septicémies

entraînant des mortalités subites des sujets. Il est à noter qu'avant 1985, ce micro-organisme n'avait jamais été isolé dans ce laboratoire. Au tableau I, on retrouve le nombre de cas d'*A. suis* rapportés pour les années de l'étude et le nombre total d'autopsies. Il y a eu dans le sud-ouest ontarien une incidence accrue de cas dus à *A. suis*, le nombre d'isolements a plus que doublé pour ces années bien que le nombre de cas soumis pour autopsie soit resté sensiblement le même.

Tableau I: Nombre de cas d'infections dues à *Actinobacillus suis* diagnostiqués par rapport au nombre d'autopsies réalisées entre 1985 et 1988 dans le sud-ouest ontarien (adapté de Sanford *et al.*, 1990).

Année	Nombre de cas d'infection à <i>A. suis</i>	Nombre d'autopsies réalisées	Pourcentage (%)
1985	1	1239	0,08
1986	9	1055	0,85
1987	10	1284	0,78
1988	22	1241	1,77

Une autre étude rétrospective, réalisée au Québec par Odin (1994), rapporte les cas dénombrés à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal en 1991, 1992 et pour les trois premiers mois de 1993. Au cours de cette période de 27 mois, on a diagnostiqué 22 cas provenant en tout de 14 élevages assainis différents. Sur ces 22 cas, on comptait 13 porcelets non-sevrés, 7 en pouponnière et 2 sujets en engraissement et il s'agissait le plus souvent de cas de morts subites. Dans le tableau

II, figure le nombre de cas d'*A. suis* diagnostiqué sur le nombre d'autopsies réalisées pour chacune de ces années. On remarque également au Québec une augmentation de cas d'*A. suis* diagnostiqués au cours de ces années et ce, particulièrement lors des trois premiers mois de 1993 où le pourcentage s'élevait à près de 4%.

Tableau II: Nombre de cas d'infections dues à *Actinobacillus suis* diagnostiqués par rapport au nombre d'autopsies réalisées entre 1991 et 1993 au Québec (adapté de Odin, 1994).

Année	Nombre de cas d'infection à <i>A. suis</i>	Nombre d'autopsies réalisées	Pourcentage (%)
1991	1	1307	0,08
1992	15	1209	1,24
1993 ¹	6	155	3,87

¹ Janvier à mars inclusivement.

4.5. CONTRÔLE

4.5.1. Antibiothérapie

Le contrôle des infections à *A. suis* peut sembler assez simple puisque cette bactérie est sensible à de nombreux antibiotiques tels que pénicilline G, ampicilline, carbénicilline, gentamicine, kanamicine, polymyxine B, céphalothine, triméthoprime-sulfaméthoxazole, sulfisoxazole, néomycine, chloramphénicol, nitrofurazone, cefoxitine, streptomycine, oxytétracycline, et tétracycline (Miniats *et al.*, 1989; Sanford *et al.*, 1990). D'autres études rapportent une résistance modérée dans le cas de la pénicilline, la tétracycline et le sulfisoxazole (Bada *et al.*, 1995; Laperle *et al.*,

1996). Toutefois, la rapidité avec laquelle se manifeste l'apparition des signes cliniques rend souvent le traitement difficile.

4.5.2. Vaccination

Présentement aucun vaccin commercial contre *A. suis* n'est disponible commercialement, et son utilisation est habituellement jugée non nécessaire ou non justifiée puisqu'on ne rapporte que rarement des épidémies. Par contre, des vaccins autogènes sont parfois utilisés dans certains troupeaux, mais leur efficacité a rarement été évaluée. Dans un troupeau d'engraissement où une toux chronique accompagnée de mortalités subites dues à *A. suis* étaient apparues, des antibiotiques avaient été utilisés et la mortalité n'avait été que de 2,5%; par contre, le coût encouru était considérable soit d'environ 1,80\$ par tête (Christenson, 1990). On a par la suite opté pour la préparation d'un vaccin autogène, et son utilisation dans ce troupeau s'est avérée avantageuse, puisque la mortalité et les coûts encourus ont diminué. La vaccination a pu être arrêtée subséquemment grâce à la modification des méthodes de production telle que la multiplication interne de cochettes, limitant ainsi l'introduction de nouveaux animaux souvent plus sensibles à cet agent pathogène.

4.5.3. Régie et environnement

L'augmentation de la fréquence d'*A. suis* au cours des dernières années peut être associée à l'adoption de nouvelles techniques de production telles le sevrage précoce et l'établissement d'un système d'élevage sur trois sites différents (Sanford, 1995). Pijoan (1995) mentionne d'ailleurs que bien que le sevrage hâtif favorise l'élimination de certaines maladies comme par exemple, la pleuropneumonie ou la

dysenterie. Cependant, sa capacité à réduire ou éliminer complètement les bactéries colonisatrices en bas âge, comme *S. suis*, *Haemophilus parasuis* et *A. suis*, est discutable. On rapporte aussi que les troupeaux à haut niveau sanitaire ou de type SPF (specific pathogen free) sont plus susceptibles aux infections par des agents mineurs ou opportunistes comme *A. suis* en raison du faible degré d'immunité des animaux.

Il est possible, en intervenant au niveau de certains facteurs de risque, de réduire l'incidence de la maladie. À ce propos, Yaeger (1996) fait état d'une épidémie à *A. suis* dans un groupe de porcs à l'engrais qui était le premier à être logé dans un nouveau bâtiment. Certains facteurs de stress pourraient être reliés à cette épidémie: les problèmes de fonctionnement encourus lors de la première utilisation d'un bâtiment, une période où les changements climatiques très importants résultèrent en des fluctuations dramatiques de température à l'intérieur du bâtiment, et un mauvais fonctionnement du système de distribution des aliments. Il est également rapporté qu'une diminution de la densité animale et qu'une amélioration du contrôle de la ventilation des bâtiments peut aider à réduire les problèmes dus à *A. suis*.

4.6. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

Il n'existe actuellement aucun test commercial disponible pour le diagnostic sérologique spécifique d'*A. suis*. Il est cependant important de mentionner que les tests commerciaux conçus pour diagnostiquer *A. pleuropneumoniae* utilisant les toxines RTX et permettent de détecter indistinctement la présence d'anticorps dirigés contre les toxines RTX d'*A. pleuropneumoniae* et d'*A. suis*. Par exemple, suite à une épidémie due à *A. suis* dans un troupeau exempt de pleuropneumonie, tous les sérums

avaient été déclarés positifs pour *A. pleuropneumoniae* en utilisant un test détectant les anticorps contre les toxines. Ce troupeau avait été par la suite confirmé exempt d'*A. pleuropneumoniae* par un autre test diagnostique et *A. suis* avait été isolé des amygdales (Miniats *et al.*, 1989). Une autre étude sur la prévalence de séroréacteurs à l'hémolysine de 104 kDa d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 met ce même phénomène en relief. En utilisant un ELISA dirigé contre l'hémolysine d'*A. pleuropneumoniae*, 100% des sérums collectés dans un troupeau avec des problèmes reliés à *A. suis* étaient positifs (Devenish *et al.*, 1990). Ces tests sérologiques pour *A. pleuropneumoniae* sont donc très sensibles, mais très peu spécifiques en raison des réactions croisées existantes avec *A. suis*. Ce dernier étant, pour sa part, un agent pathogène de plus en plus présent au sein des troupeaux porcins, entraînant des problèmes d'interprétation. Par contre, ce test diagnostique pourrait être initialement employé pour faire un dépistage au sein d'un troupeau, car il est sensible et peut détecter les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, et est rapide, peu cher et facile à exécuter. Par la suite, un autre test plus spécifique pourrait être utilisé pour confirmer les vrais positifs à *A. suis*.

5. STREPTOCOCCUS SUIS

5.1. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

Streptococcus suis est une bactérie ovoïde, Gram positif, alpha-hémolytique, anaérobie facultative (Staats *et al.*, 1997) et appartenant au groupe D de Lancefield (Elliott, 1966). Cette espèce de streptocoque est apparue génétiquement distincte, n'a montré aucune relation spécifique avec d'autres espèces de streptocoques (Bentley *et al.*, 1991) et a été reconnue comme une espèce distincte par Kilpper-Bälz and Schleifer en 1987. Les souches de *S. suis* sont répertoriées par sérotype selon le type d'antigènes polysaccharidiques présents sur leur capsule. La sérotypie est importante et le plus souvent effectuée au moyen de la co-agglutination (Higgins *et al.*, 1995). On a répertorié jusqu'à présent 35 sérotypes différents soit de 1 à 34 et 1/2 (Gottschalk *et al.*, 1989, 1991a, b; Higgins *et al.*, 1995). Au cours de l'année 1998, au Canada, la majorité des souches provenant de cas cliniques appartenaient aux sérotypes capsulaires 2, 1/2, 3, 1, 7, 8 et 4, tandis que les sérotypes 10, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 24, 26 et 33 n'ont été détectés chez aucun animal malade (Higgins et Gottschalk, 1999a).

5.2. SIGNES CLINIQUES

On rapporte que près de 100% des porcs seraient porteurs de *S. suis*. Par contre, l'incidence des maladies associées à cet agent pathogène serait de moins de 5% (Touil *et al.*, 1988). Les animaux atteints sont généralement âgés entre 1 à 16 semaines (Clifton-Hadley, 1984; Reams *et al.*, 1996). Les signes cliniques associés à

l'infection sont variables. Ils peuvent être caractérisés par de la fièvre, de l'anorexie, de la boiterie ou de la dépression dans les cas les moins sévères (Clifton-Hadley *et al.*, 1984a). Chez les sujets touchés plus sévèrement, on rapporte des mortalités subites et des signes nerveux tels que de l'incoordination, de l'incapacité à se tenir debout, du pédallement ou des convulsions qui sont le reflet d'une méningite. On rapporte aussi des septicémies, des arthrites, des endocardites et des pneumonies.

Streptococcus suis peut agir comme agent pathogène primaire (Brown, 1971; Koehne *et al.*, 1979), mais également en tant qu'agent secondaire (Sanford, 1987). Chez le porc, les agents primaires reconnus pour favoriser l'infection à *S. suis*, sont le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) (Galina *et al.*, 1994; Done et Paton, 1995), *Bordetella bronchiseptica* (Koehne *et al.*, 1979; Vecht *et al.*, 1989) et le virus de la pseudorage porcine (Iglesias *et al.*, 1992). Il est également fréquent d'isoler *S. suis* simultanément avec d'autres bactéries comme *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* et *A. pleuropneumoniae* (Higgins *et al.*, 1990; Hoie *et al.*, 1991; Reams *et al.*, 1994).

Streptococcus suis est également reconnu comme un agent de zoonose. Les manifestations cliniques chez l'humain sont rares et se traduisent principalement par l'apparition d'une méningite parfois accompagnée d'une septicémie ou d'une d'endocardite (Shnerrson *et al.*, 1980; Peetermans *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1990; Trottier *et al.*, 1991). Les personnes à risque sont principalement les travailleurs en contact avec des porcs ou leurs sous-produits, tels les bouchers, les producteurs porcins et les employés d'abattoirs (Michaud *et al.*, 1996). La transmission se ferait

par contact direct avec un animal contaminé ou ses produits à la faveur de lésions cutanées.

5.3. FACTEURS DE VIRULENCE

Différentes composantes bactériennes ont été présumées comme étant des facteurs de virulence, mais elles ont été principalement étudiées pour *S. suis* sérotype 2. Entre autres, on mentionne la capsule, des adhésines et des protéines extracellulaires et enfin, des protéines de la paroi cellulaire.

5.3.1. Capsule

La capsule, formée de polysaccharides, a été proposée comme facteur de virulence, mais son rôle dans la pathogénie demeure controversé puisque les souches virulentes et avirulentes sont toutes deux capsulées. Il a été démontré qu'un mutant non-capsulé, obtenu d'une souche virulente, devenait avirulent chez la souris et que cette souche se trouvait hautement phagocytée (Charland *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). La capsule pourrait donc permettre la persistance de la bactérie dans le sang et ainsi, permettre l'expression d'autres facteurs de virulence. L'acide sialique retrouvé au niveau de la capsule de *S. suis* ne semble pas jouer un rôle critique dans la virulence, puisque la virulence, ainsi que le taux de phagocytose, ne sont pas modifiés lors de l'élimination de l'acide sialique chez une souche de *S. suis* sérotype 2 (Charland *et al.*, 1996).

5.3.2. Adhésine

Les adhésines peuvent être considérées comme un facteur de virulence, puisqu'elles jouent un rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte, ce qui est un pré-requis pour la

pathogénie (Ofek et Beachey, 1980). Une adhésine protéique, nommée adhésine P, a été mise en évidence chez *S. suis* sérotype 2 lors d'une étude sur l'activité hémagglutinante des érythrocytes (Kurl *et al.*, 1989). Elle est de poids moléculaire de 18 kDa (Tikkanen *et al.*, 1996). Cette adhésine lie de façon spécifique un disaccharide galactosyl- α 1-4-galactose, lequel fait partie des glycolipides de la surface des cellules eucaryotes (Haataja *et al.*, 1994). Cette adhésine est reconnue comme hautement immunogène et représenterait un candidat potentiel pour l'élaboration d'un vaccin qui pourrait prévenir la colonisation des tissus par *S. suis* (Tikkanen *et al.*, 1996).

5.3.3. Protéines de la paroi cellulaire

Au cours d'une étude, cinq protéines respectivement de poids moléculaire de 44, 54, 78, 86 et 94 kDa ont été mises en évidence au niveau de la paroi cellulaire de *S. suis* (Holt *et al.*, 1990a). Ces auteurs ont démontré que l'injection d'un sérum de lapin immunisé avec la protéine de 94 kDa offrait une protection chez la souris lorsque celle-ci est infectée expérimentalement. Par contre, les autres protéines ont offert des résultats décevants lors d'essais de protection passive. Une autre étude sur une protéine de 44 kDa a permis d'établir qu'elle était hautement immunogène et qu'elle agissait comme facteur de virulence, puisqu'un mutant d'une souche virulente pour cette protéine montrait une perte de virulence (Gottschalk *et al.*, 1992). Un autre groupe de chercheurs a déterminé, au moyen de profils protéiques, la présence d'autres protéines associées uniquement à des souches reconnues comme virulentes. Ces protéines étaient respectivement de poids moléculaire de 28, 69, 72 et 210 kDa

(Kataoka *et al.*, 1991). D'ailleurs au cours de cette étude, un mutant d'une souche virulente et déficiente pour la production de la protéine de 210 kDa devenait avirulent.

5.3.3.1. MRP

La protéine MRP (« murimidase-released protein »), de poids moléculaire de 136 kDa, se situe au niveau de la paroi cellulaire mais elle peut également être retrouvée à l'intérieur du surnageant de culture (Vecht *et al.*, 1991). Deux variantes de la protéine MRP ont été trouvées, la MRP₁ qui possède un poids moléculaire inférieur à 136 kDa et la MRP* avec un poids moléculaire supérieur à 136 kDa (Vecht *et al.*, 1996). La protéine MRP n'est cependant pas présente chez toutes les souches virulentes de *S. suis*, signifiant que ces souches possèdent d'autres facteurs de virulence (Quessy *et al.*, 1995; Galina *et al.*, 1996; Gottschalk *et al.*, 1998)

5.3.3.2 Protéine liant les IgG

Une protéine de 52 kDa isolée au niveau de la paroi et capable de lier les IgG et les IgA a également été démontrée comme jouant un rôle dans la virulence de *S. suis*. Elle préviendrait l'opsonisation et la phagocytose permettant ainsi à *S. suis* d'échapper aux défenses naturelles de l'hôte (Serhir *et al.*, 1993, 1995).

5.3.4. Protéines extracellulaires

5.3.4.1. EF

Une protéine extracellulaire chez *S. suis* sérotype 2 a été identifiée, le EF (« extracellular factor ») (Vecht *et al.*, 1991). Il a été rapporté comme étant un

marqueur de virulence pour cet agent pathogène (Vecht *et al.*, 1991). La protéine EF est de poids moléculaire de 110 kDa et se retrouve uniquement au niveau du surnageant de culture (Vecht *et al.*, 1991). Tout comme la MRP, ce facteur n'est cependant pas présent chez toutes les souches virulentes de *S. suis* (Quessy *et al.*, 1995; Galina *et al.*, 1996; Gottschalk *et al.*, 1998). D'ailleurs un mutant MRP- EF- était toujours aussi virulent chez le porc que la souche mère MRP+ EF+. Ces protéines ne contribueraient donc pas directement à la pathogénie mais leur présence serait associée à celle-ci (Smith *et al.*, 1996).

5.3.4.2. Hémolysine

Une protéine extracellulaire thermolabile (54 kDa) de type hémolysine, a également été associée à la virulence chez *S. suis* type 2 (Feder *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1994; Gottschalk *et al.*, 1995). Cette protéine, appelée suilysine, appartient à la famille des toxines cytolytiques antigéniquement reliées à celles qui se lient au cholestérol ("antigenically related cholesterol-binding cytolytic toxins"). Ce type de toxine est reconnu sensible aux agents oxydants et est activé par des agents réducteurs. De plus, la présence de cholestérol agit comme inhibiteur de l'activité cytolytique (Boulnois *et al.*, 1991). Des anticorps dirigés contre cette protéine ont permis d'obtenir une protection chez la souris et le porc (Jacobs *et al.*, 1996). Par contre, ce facteur n'est pas présent chez toutes les souches virulentes. En effet, il est rapporté en Europe que la majorité des souches appartenant au sérotype 2 posséderait l'hémolysine (Jacobs *et al.*, 1995), tandis qu'au Canada très peu d'isolats virulents de ce sérotype en produiraient (Gottschalk *et al.*, 1998).

5.3.5. Profil des souches européennes vs canadiennes

Les souches de *S. suis* sérotype 2 isolées au Canada présentent un profil différent des souches européennes quant à la production de certains facteurs ou marqueurs de virulence, tels que les protéines MRP et EF, ainsi que l'hémolysine. En effet, la plupart des souches isolées en Europe sont reconnues comme possédant ces trois facteurs, tandis qu'au Canada une minorité d'entre elles présente ce profil de virulence (Gottschalk *et al.*, 1998). À ce jour, il n'existe aucune explication pour ces différences de profil, et aucun marqueur de virulence n'a encore été proposé pour les souches de type 2 en provenance du Canada (Gottschalk *et al.*, 1998).

5.4. FRÉQUENCE

Une augmentation du nombre de cas d'infections associées à *S. suis* a été notée à partir de 1973. À cette époque, les infections dues à cet agent pathogène apparaissaient en émergence dans de nombreux pays industrialisés (Kobish *et al.*, 1982). Cette augmentation d'incidence est probablement reliée à la modernisation au sein de l'industrie porcine, où il y a eu, entre autres, une augmentation de la densité animale. *S. suis* est d'ailleurs maintenant reconnu comme étant responsable de pertes économiques importantes au niveau mondial, surtout dans les pays où l'industrie porcine est pratiquée de façon intensive (Lamont *et al.*, 1980; Foccoli *et al.*, 1992; Staats *et al.*, 1997).

5.5. ÉPIDÉMIOLOGIE

Chez les porcs cliniquement sains, l'habitat naturel de *S. suis* est le tractus respiratoire supérieur, particulièrement les amygdales et les cavités nasales et il est également

isolé du tractus digestif ou urogénital (Clifton-Hadley *et al.*, 1984a, 1986a; Devriese *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1991; Hogg *et al.*, 1996). L'infection serait transmise des truies aux porcelets par la voie respiratoire (Clifton-Hadley *et al.*, 1986a), par le tractus génital lors de la parturition ou par le tractus digestif lors de la période d'allaitement (Robertson et Blackmore, 1989; Robertson *et al.*, 1991; Dee *et al.*, 1993).

L'infection au sein d'un troupeau peut faire suite à l'introduction d'animaux porteurs d'une souche nouvelle ou d'un sérotype différent, ce qui entraînerait la contamination des autres animaux du troupeau (Mogollon *et al.*, 1991). La transmission est également possible lorsque des porcs sains, sous l'effet de stress, sont introduits à l'intérieur d'un troupeau et sont exposés à des porcs porteurs (Dee *et al.*, 1993). Ces auteurs mentionnent que le sevrage, le regroupement de porcs de différents âges et provenances, et les combats sont des sources potentielles de stress pour les animaux.

On rapporte que ce sont en majorité les porcs porteurs cliniquement sains, plutôt qu'un environnement infecté, qui seraient responsables de la dissémination de *S. suis* (Touil *et al.*, 1988). Par contre, la contamination peut également résulter d'un contact avec l'environnement. *S. suis* est en effet reconnu comme pouvant y survivre pour un certain temps et ce, dans différentes conditions. Par exemple, il peut survivre 8 jours à l'intérieur des fèces et moins de 24 heures dans la poussière, à des températures entre 22 et 25°C (Clifton-Hadley et Enright, 1984). On a également suggéré une contamination par des objets inanimés, comme les mangeoires (Robertson *et al.*,

1991). Une transmission indirecte est aussi possible par les humains (Sala *et al.*, 1989) ou par d'autres animaux que les porcs présents sur la ferme, tels que chiens, chats, oiseaux ou insectes (Keymer *et al.*, 1983; Enright *et al.*, 1987; Devriese et Haesebrouck, 1992). *S. suis* peut aussi survivre à l'intérieur de carcasses de porcs pendant 12 jours à des températures de 22 à 25°C, représentant une source de contamination pour les animaux vecteurs et favorisant la dispersion de l'infection (Clifton-Hadley *et al.*, 1986b).

5.6. CONTRÔLE

5.6.1. Antibiothérapie

Lors d'antibiothérapie, la pénicilline est le traitement de choix puisqu'entre 80 et 90% des souches de *S. suis* seraient sensibles à la pénicilline (Clifton-Hadley *et al.*, 1986a; Sanford et Tilker, 1989; Dee *et al.*, 1993). Le traitement doit être administré rapidement suite à l'apparition des premiers signes cliniques, car l'infection est souvent fatale et rapide (Blackburn, 1982). Malheureusement, les premiers symptômes sont parfois difficiles à détecter (Amass *et al.*, 1997). Une sensibilité de cette bactérie a également été rapportée envers l'amoxicilline, l'ampicilline, la gentamicine, le chloramphénicol, l'enrofloxacin, la triméthoprim-sulfaméthoxazole et le ceftiofur (Tarradas *et al.*, 1994; Kay *et al.*, 1995; Salmon *et al.*, 1995). D'autres auteurs rapportent cependant une résistance de certaines souches envers la tétracycline, la chlortétracycline, l'oxytétracycline, l'érythromycine, la kanamycine, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, la tylosine et la streptomycine (Azuma *et al.*, 1983; Hoffman et Hendersen, 1985; Touil *et al.*, 1988; Sanford et Tilker, 1989;

✓ Amano *et al.*, 1993; Salmon *et al.*, 1995). Une combinaison d'antibiotique et d'un anti-inflammatoire est recommandé par certains auteurs (Amass *et al.*, 1997).

5.6.2. Vaccination

Afin d'aider au contrôle des infections associées à *S. suis*, plusieurs essais de vaccination ont été tentés, particulièrement avec le sérotype 2 et ce, sous différents types de vaccins. Les résultats obtenus lors de ces essais ont cependant été inconsistants. Des échecs ont été rapportés lors de vaccination avec la bactérie entière avec le sérotype 2 (Clifton-Hadley, 1983; Blouin *et al.*, 1994). Holt et ses collaborateurs (1988) mentionnent que l'utilisation de bactéries traitées à la chaleur ne permet pas d'induire une réaction immunitaire. Des vaccins utilisant des bactéries tuées et formolées ont également donné des résultats très équivoques (Ripley, 1983). L'utilisation de bactéries entières ne semble donc pas donner de bons résultats (Reams *et al.*, 1996).

Le pouvoir immunogène de la capsule de *S. suis* a également été évalué. Certains auteurs ont mentionné que des anticorps dirigés contre les antigènes capsulaires protégeaient la souris lors d'infection par *S. suis* (Elliott *et al.*, 1980; Kebede *et al.*, 1990). Par contre, l'immunisation avec la capsule purifiée n'a entraîné qu'une faible protection chez le porc (Elliott *et al.*, 1980). L'administration de polysaccharides de la capsule entraînait une très faible production d'anticorps (del Campo Sepulveda *et al.*, 1996). De plus, des anticorps monoclonaux dirigés contre la capsule n'ont pas induit de protection chez la souris (Charland *et al.*, 1996).

Certains éléments ont été proposés pour expliquer les échecs encourus lors de ces essais de vaccination: la perte d'antigénicité de la bactérie ou la dégradation de certains antigènes par le traitement à la chaleur ou à la formaline (Holt *et al.*, 1990b), le peu d'immunogénicité de la capsule (del Campo Sepulveda *et al.*, 1996) ou la formation d'anticorps contre des antigènes qui ne seraient pas associés à des facteurs de virulence (Holt *et al.*, 1988). L'antigène idéal devrait être de nature protéique et être exposé à la surface de la bactérie, en plus d'être commun à plusieurs souches et sérotypes (Holt *et al.*, 1988).

D'autres types de vaccins ont été tentés tels que des souches vivantes et atténuées. Par exemple, utilisant comme vaccin un mutant thermosensible de souches de sérotype 1, 2, 3 et 1/2, une protection a été obtenue lors d'infections expérimentales avec des souches de sérotypes homologues. Par contre, la protection contre des souches hétérologues n'a pas été observée, sauf dans le cas du sérotype 1/2 où une protection a été rapportée contre les sérotypes hétérologues 1 et 2 (Kebede *et al.*, 1990). Un mutant streptomycine dépendant d'une souche de sérotype 1/2 a induit une protection complète lors d'infections expérimentales avec des souches de sérotypes 1 et 1/2 et une protection partielle avec le sérotype 2 (Foster *et al.*, 1994). Par contre, bien que minime, ce type de vaccin peut représenter un risque de réversion à la souche sauvage qui est difficile à évaluer.

Des souches de *S. suis* avirulentes appartenant au sérotype 2 ont été utilisées lors d'essai de vaccination et une protection a été obtenue dans certains cas (Holt *et al.*, 1988; Quessy *et al.*, 1994a; Kobisch *et al.*, 1995; del Campo Sepulveda *et al.*, 1996;

Busque *et al.*, 1997). Ce type de vaccin suppose la présence d'importants antigènes présents à la fois chez les souches avirulentes et virulentes, et qui ne sont pas nécessairement des facteurs de virulence.

D'autres protéines peuvent induire une protection. Par exemple, la protéine MRP (136 kDa) semble avoir un bon pouvoir immunogène, bien que cette protéine ne soit pas présente chez toutes les souches virulentes (Quessy *et al.*, 1994b; Galina *et al.*, 1996). Jacobs et ses collaborateurs (1996) rapportent l'induction d'une protection complète avec un vaccin à partir de l'hémolysine et une protection partielle avec la protéine EF. Par contre, tout comme pour la protéine MRP, ces deux facteurs de virulence ne sont pas présents chez toutes les souches virulentes.

Un bon programme de vaccination doit être adéquat et le vaccin doit être représentatif des souches retrouvées au sein du troupeau (Dee *et al.*, 1993). Les vaccins commerciaux contre *S. suis*, ne possèdent généralement que les sérotypes 1 et 2. Il est donc important d'établir les sérotypes présents au sein d'un troupeau pour déterminer s'il est préférable d'avoir recours à l'utilisation d'un vaccin commercial ou d'un vaccin autogène.

5.6.3. Régie et environnement

D'autres facteurs peuvent avoir une influence sur la prévalence ou la sévérité des infections à *S. suis* tels que, la présence d'infections concomitantes, l'immunosuppression, le degré de virulence de la souche de *S. suis* et la qualité générale de l'environnement et de la régie (Higgins et Gottschalk, 1999b). Certains

paramètres extérieurs peuvent donc intervenir au niveau du contrôle de *S. suis*. Ces facteurs environnementaux peuvent rendre les porcs plus susceptibles aux infections. On mentionne par exemple que la surpopulation, une ventilation inadéquate, des fluctuations importantes de la température et du taux d'humidité, le regroupement de porcs de provenances et d'âges différents, peuvent contribuer à augmenter les risques d'infections associées à *S. suis* (Dee *et al.*, 1993).

Par contre, certaines autres pratiques peuvent contribuer à réduire l'incidence des maladies par une diminution de la charge microbienne. Des pratiques telles que la réduction de la taille des groupes d'animaux, le tout plein/tout vide, ainsi que le lavage et la désinfection des chambres entre chacun des lots, permettent une augmentation du niveau de santé (Dee *et al.*, 1993).

Le sevrage hâtif est également reconnu comme une pratique permettant d'augmenter le niveau de santé et l'élimination de certains organismes pathogènes (Alexander *et al.*, 1980). Le contrôle de certaines maladies, comme la pleuropneumonie ou la dysenterie, a été facilité par le sevrage précoce. Par contre, la réduction ou l'élimination des bactéries colonisatrices en bas âge comme *S. suis* ne semble pas réalisable (Clark *et al.*, 1994; Amass *et al.*, 1995; Pijoan, 1995). En effet, Pijoan (1995) mentionne que dans le cas particulier de *S. suis*, la protection maternelle est de courte durée ou inefficace. La colonisation des porcelets surviendrait dans les premières semaines d'âge, et les truies représenteraient la source première d'infection. Une étude rapporte même que les amygdales de porcelets peuvent être colonisées aussi tôt que 24 heures après la naissance (Amass *et al.*, 1995), ce qui

signifie que le sevrage hâtif et la ségrégation des porcelets ne permettraient pas de prévenir la colonisation par *S. suis*.

5.7. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

Afin de diagnostiquer les infections à *S. suis*, certaines méthodes sérologiques ont été évaluées, mais peu d'entre elles sont apparues satisfaisantes. Entre autres, la spécificité du test bactéricide *in vitro* a été mise en doute par plusieurs chercheurs (Elliott *et al.*, 1980; Clifton-Hadley et Alexander 1981; Clifton-Hadley *et al.*, 1984b, 1986a). On a également testé l'hémagglutination passive mixte inversée et l'hémagglutination indirecte, mais bien que ce soit des techniques simples et économiques, elles présentaient également un manque de spécificité (Schiffmann, 1980; Clifton-Hadley *et al.*, 1985, 1986a). Pour leur part, des techniques comme l'immunofluorescence indirecte (Volgel *et al.*, 1979) et la radioimmunoassay (RIA) (Schiffmann, 1980) sont des techniques coûteuses et très spécialisées, pour lesquelles l'interprétation des résultats n'est pas facile (Clifton-Hadley *et al.*, 1986a).

Clifton-Hadley et collaborateurs (1984b) rapportent qu'un ELISA utilisant des bactéries entières et formolées de *S. suis* a montré peu de sensibilité en ce qui concerne le sérotype 2. Les titres obtenus des sérums de porcs infectés et non-infectés étaient très faibles et la distinction sérologique entre les deux groupes était difficile.

Robertson et Blackmore (1989) ont également mis au point un ELISA qui utilisait la bactérie formolée comme antigène. Cet ELISA a été développé dans le cadre d'une étude qui avait pour but de mesurer les titres d'anticorps spécifiques à *S. suis* sérotype

2 chez les humains. Par contre, la validité de ce test a été mise en doute, car la spécificité de cet ELISA n'a jamais été évaluée. La mesure de la présence d'anticorps chez les personnes atteintes était difficile, car la production d'anticorps contre *S. suis* sérotype 2 est reconnue comme étant de courte durée chez les humains. Néanmoins, on retrouvait plusieurs personnes séropositives parmi les travailleurs qui sont en contact direct avec des animaux infectés.

Paterson et collaborateurs (1993) ont quant à eux développé un ELISA qui avait pour but la détection d'anticorps contre *S. suis* sérotype 2 chez les porcs. L'antigène brut utilisé était un extrait de culture de 18 heures de *S. suis* sérotype 2 selon la méthode d'extraction décrite par Clifton-Hadley et Alexander (1988). Une limite d'absorbance de 0,6 a alors été fixée à l'aide d'une valeur d'absorbance, établie à partir d'un groupe de porcs considérés négatifs, à laquelle on a additionné trois fois la valeur de l'écart-type. Les porcs qui présentaient une valeur d'absorbance inférieure à cette limite étaient considérés séronégatifs, tandis que ceux dont la valeur était supérieure, étaient considérés séropositifs. Les résultats obtenus lors de cette étude montraient que 87% des sérums en provenance de fermes qui pratiquaient l'élevage intensif étaient positifs. Par contre, il n'a pas été établi si cet ELISA montrait des réactions croisées avec des sérotypes différents ou d'autres bactéries.

Les polysaccharides, par leur caractère hydrophilique, montrent peu d'absorption sur les plaques d'ELISA en polystyrène (Van Oss et Singer, 1966). On peut contrer ce problème en utilisant un ELISA de type double sandwich (Blouin *et al.*, 1994). Blouin et collaborateurs (1994) ont développé un tel type d'ELISA, où la plaque est

tout d'abord mise en contact avec un anticorps spécifique, ce qui permet d'éliminer les contraintes d'adhérence de l'antigène. Cet ELISA a été mis au point afin de détecter la présence d'anticorps suite à la vaccination de porcs avec des bactéries formolées de *S. suis* sérotype 2. Dans cette étude, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les titres obtenus des porcs vaccinés et non vaccinés. De plus, les titres d'anticorps retrouvés chez les truies vaccinées étaient très faibles, et par la suite aucune trace de ces anticorps n'a été retrouvée chez leurs porcelets. Ces auteurs ont rapporté que ce test de diagnostic sérologique aurait besoin de raffinement pour améliorer sa spécificité.

Del Campo Sepulveda et collaborateurs (1996) ont testé pour leur part deux types d'ELISA indirects avec des antigènes différents, soit la bactérie entière formolée et les polysaccharides capsulaires de *S. suis* sérotype 2. Les résultats obtenus dans le cas de l'ELISA utilisant la bactérie entière montraient une faible spécificité et plusieurs réactions croisées ont été observées avec les sérotypes 1/2, 6, 7, 12 à 14, 17, 20 à 23, 25, 26, 28 et 32, de même qu'avec les bactéries *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus bovis*. D'autres auteurs ont également obtenu des réactions croisées semblables avec des ELISA utilisant la bactérie entière ou des extraits de la bactérie entière (Clifton-Hadley *et al.*, 1984b; Paterson *et al.*, 1993; Blouin *et al.*, 1994; Blecha *et al.*, 1995). Toujours dans le cadre de cette étude, le second ELISA testé, qui utilisait les polysaccharides capsulaires, a démontré moins de réactions croisées que le premier ELISA lorsque les mêmes sérums ont été testés. En effet, les réactions croisées ont été éliminées contre les sérotypes 6, 7, 13, 14, 20, 21, 23, 25, 26 et 28, ainsi que contre *E. faecalis*. Par contre, les sérotypes 1/2, 12, 17, 22 et 32 montraient

toujours une réaction croisée. L'utilisation des polysaccharides capsulaires de *S. suis* permettrait donc de réduire significativement, mais pas totalement, les réactions croisées par rapport à l'utilisation de la bactérie entière lors de test ELISA indirect.

Kataoka et ses collaborateurs (1996) ont également mis au point un ELISA utilisant comme antigène des polysaccharides purifiés du sérotype 2. Cet ELISA a démontré une bonne sensibilité et une bonne spécificité. En effet, aucune réaction croisée avec *S. suis* sérotypes 1 à 8 ou d'autres agents pathogènes n'a été notée. Cet ELISA a été par la suite utilisé pour faire l'analyse de sérums récoltés au sein de 20 fermes différentes. Au sein des fermes présentant des signes cliniques associés à *S. suis* sérotype 2, 17% des sérums de porcs testés ont été trouvés positifs, tandis que seulement 3,4% des sérums prélevés de fermes sans signe clinique à *S. suis* sérotype 2 ont été trouvés positifs.

Il existe donc actuellement peu de méthodes sérologiques fiables qui permettraient d'avoir des informations sur le niveau d'infection au sein des troupeaux, sur l'immunité maternelle ou sur la réponse immunitaire suite à une vaccination (Higgins et Gottschalk, 1999b).

III - MATÉRIEL ET MÉTHODES, RÉSULTATS ET DISCUSSION

ACTINOBACILLUS SUIS

**Serologic profile of a cohort of pigs and antibody response
to an autogenous vaccine for *Actinobacillus suis*.**

**Serologic profile of a cohort of pigs and antibody response
to an autogenous vaccine for *Actinobacillus suis*.**

L. Lapointe, S. D'Allaire, S. Lacouture and M. Gottschalk

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP)

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe,
Québec, Canada, J2S 7C6.

Paper to be submitted to Veterinary Microbiology

Running title: Antibody response to *Actinobacillus suis*

Key words: *A. suis* - Autogenous vaccine - ELISA - Serologic profile

Corresponding author: Dr. S. D'Allaire

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
C. P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Phone: (450) 773-8521 ext. 8473

Fax: (450) 778-8120

Electronic-mail: dallairs@medvet.umontreal.ca

ABSTRACT

Actinobacillus suis is a commensal opportunistic pathogen in swine. However, in recent years, an increasing prevalence of clinical signs associated with *A. suis* has been observed in high health status herds in North America. The objectives of the study were to assess the kinetics of antibodies in pigs from a herd showing clinical signs of *A. suis* and, to evaluate the antibody response in gilts following vaccination with an autogenous vaccine. Since no serodiagnostic test was commercially available for *A. suis*, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a saline extract of boiled-formalinized whole cells of a field strain as the coating antigen, was developed and standardized. The selected herd for the serologic profile was negative for *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and was showing clinical signs of *A. suis* in 16 to 19-week-old pigs. A cohort of 20 pigs was blood sampled at 5, 8, 12, and 16 weeks of age. The lowest level of antibodies was observed between weeks 8 and 12, this probably corresponding to a decrease in passive maternal immunity. A marked increase in the antibody response was seen at 16-week of age, at the approximate time of onset of *A. suis* clinical signs in the herd. The evaluation of antibody response to an autogenous vaccine revealed that the humoral immunity of gilts further increased following vaccination although the level of antibodies was high prior to vaccination. The magnitude of the response to vaccination was higher when the level of antibodies was low prior to the first injection.

INTRODUCTION

Actinobacillus suis is considered as a commensal opportunistic pathogen in pigs (Mair *et al.*, 1974; Sanford and Miniats, 1988; Sanford *et al.*, 1990). In recent years, the prevalence of problems associated with *A. suis* infection has increased in North America, specially in high-health-status herds (Sanford *et al.*, 1990; Odin, 1994). In young animals, *A. suis* is responsible for acute and rapidly fatal septicemia or localized infection such as endocarditis, polyarthritis, respiratory distress or neurological disturbances (Miniats *et al.*, 1989; Sanford *et al.*, 1990; Odin, 1994). In older animals, fever, anorexia, abortion, cough, pneumonia, erysipelas-like lesions, and acute death are reported (Sanford and Miniats, 1988; Miniats *et al.*, 1989; Sanford *et al.*, 1990).

Little is known about the pathogenesis, immune response and control of *A. suis* infection. Pore-forming protein toxins belonging to the RTX (repeats in the structural toxin), very similar to APXI and APXII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Devenish *et al.*, 1989; Burrows and Lo, 1992; Kamp *et al.*, 1994), have been suggested as potential virulence factors. *A. suis* isolates from healthy and diseased pigs are similar (Van Ostaaijen *et al.*, 1997). However, a recent study has demonstrated differences among strains in two of the major surface antigens, the capsule and the LPS, with more than one type of LPS O chain with common core being found (Slavic *et al.*, 1998).

Despite the fact that *A. suis* is sensitive to a wide range of antibiotics (Miniats *et al.*, 1989; Sanford *et al.*, 1990), the rapid onset of clinical signs makes effective treatment difficult (Van Ostaaijen *et al.*, 1997). Currently, no serodiagnostic test or vaccine are commercially available to help controlling *A. suis* infections. Autogenous vaccines are sometimes used in herds with clinical problems, but their efficacy has not been evaluated so far (Sanford, 1992).

The purpose of this study was to develop and standardize an experimental ELISA for the detection of antibodies against *A. suis*, and to evaluate the serologic profile in pigs from a herd showing clinical signs, as well as the antibody response to an autogenous vaccine against *A. suis* in gilts.

MATERIALS AND METHODS

Serologic profile

A cohort of 20 pigs was selected from a herd having clinical problems associated with *A. suis*. In the selected herd, respiratory problems and sudden death had occurring in 16 to 19-week-old pigs. The herd was known to be serologically negative for all serotypes of *A. pleuropneumoniae*. Blood samples were collected from each pig at 5, 8, 12 and 16 weeks of age. Sera were frozen at -20°C until analysis by ELISA.

Antibody response to an autogenous vaccine

An autogenous vaccine was prepared, by a commercial laboratory, with two different *A. suis* isolates and one *Haemophilus parasuis* strain. A placebo solution was prepared with only the *Haemophilus parasuis* strain. Superfos alhydrogel with [Al₂O₃ - 2% and Al [OH₃] - 3%] was used as the adjuvant and added to a final concentration of 25% for both solutions. Gilts newly introduced into a breeding herd were randomly divided into two groups. The treatment group was injected intramuscularly in the neck with 2 mL of the autogenous vaccine (n=36), whereas the controls were inoculated with 2 mL of the placebo solution (n=29). Each animal received a second injection two weeks later. Blood samples were collected from each animal before the first injection and 2 and 5 weeks after the first injection. Blood samples were centrifuged 30 minutes at 3.000 X g, and sera were frozen at -20°C until analysis by ELISA.

ELISA

An indirect ELISA was adapted and standardized for this study from a method described by Gottschalk *et al.* (1994). Each well of styrene U-bottomed plates (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) was coated with 50 μ L of a saline extract of boiled-formalinized whole cells of an *A. suis* field strain diluted 1/100 in carbonate buffer (pH 9.6). The strain used was one of the two contained in the autogenous vaccine. Plates were incubated overnight at 4°C, drained and washed three times with phosphate buffer saline (PBS) containing 0.05% of Tween 20 (Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) (PBS-T20). Sera were diluted 1/800 in PBS-T20 and 50 μ L of this dilution were added to each well. Serum of a specific free pathogen (SPF) pig and serum from a pig hyperimmunized with the autogenous vaccine were used as the negative and positive controls, respectively, and added to each plate. After a 30 minute incubation of sera at room temperature, the plates were washed three times with PBS-T20. A volume of 50 μ L of commercial horseradish peroxidase conjugated goat anti-swine IgG heavy and light chains (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, USA), diluted 1/3000 in PBS-T20, was added to each well for 1 hour at room temperature. Plates were then washed three times with PBS-T20 and 100 μ L per well of 2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma Chemical) dissolved in 0.05 M citrate buffer (pH 4) with 0.5 M H₂O₂ were added. The absorbance was measured at 414 nm on a kinetic microplate reader (Molecular Device, Menlo Park, CA, USA) after 15 minutes of incubation at room temperature. Results were reported as S/P ratios which were the optical density obtained for each serum divided by the optical density of the positive control.

All sera from an animal in the vaccination trial or serologic profile were tested on the same plate. Each serum was tested at least three different times and the average of ELISA S/P ratios was accepted only when the coefficient of variation within the plates was below 15%.

Statistical analyses

The effects of age on S/P ratios of the animals in the serologic profile were evaluated with a repeated measure ANOVA with age as a within-subject factor (SAS v. 6.12, Cary, NC, USA). Animals were then divided into two groups according to their S/P ratio at 5 weeks of age; the level of antibodies were compared using a repeated measure ANOVA with age as within-subject factor and group as a between-subject factor. A similar repeated-measure ANOVA was used to examine the effect of vaccination. Tukey's post-hoc tests were used to examine differences between pairs of means. Finally, differences in the magnitude of the response to the vaccination were analyzed using a linear regression model. Level for statistical significance was set at 0.05 for all tests.

RESULTS

Serologic profile

A significant effect of age was found on S/P ratios ($p < 0.001$). Animals in the cohort of 20 pigs had an average ELISA S/P ratio of 0.4 at 5 weeks of age. The S/P ratios subsequently decreased at week 8 and 12 ($p < 0.005$) to attain the lowest S/P ratios and increased significantly ($p < 0.0001$) at 16 weeks of age (Fig. 1A).

A significant effect of age and group on S/P ratios was found when animals were divided into two groups according to their S/P ratio at 5 weeks of age ($p < 0.001$). A significant interaction between age and group was also found ($p < 0.02$) suggesting that the effect of age on S/P ratios was different in the two groups. A total of 7 animals presented a S/P ratio lower than 0.35 at 5 week-old. These pigs did not show a decrease in the level of antibodies at week 8 or 12 ($p > 0.9$) (Fig. 1B) and the S/P ratio stayed stable at approximately 0.2. For the 13 other pigs, a significant decrease ($p < 0.001$) in the antibody level was observed at 8 or 12 weeks of age, reaching a level of 0.2 similar to the one of pigs having a S/P ratio lower than 0.35 at 5 weeks of age (Fig. 1B). Later, at 16 weeks of age, the two groups present a marked and significant ($p < 0.0001$) increase in the antibody response.

Antibodies response to an autogenous vaccine

A significant effect of treatment and time on S/P ratios was found in the vaccination study ($p < 0.001$). A significant interaction between the treatment and time was also found ($p < 0.001$) suggesting that the effect of treatment was different in time for the

control and vaccinated groups. In both groups of gilts, the antibody level was already high prior to the vaccination, with S/P ratios often greater than 1. During the experiment, the average S/P ratios in the control group remained stable ($p>0.8$) (Fig. 2), whereas those of the vaccinated gilts increased significantly ($p<0.0001$) after the first vaccination and stayed high until the end of the experiment (Fig. 2).

In the vaccinated group, the magnitude of the response to the vaccination was smaller for the gilts showing a higher S/P ratio prior to the administration of the first dose of the autogenous vaccine ($p<0.0001$). This phenomenon was not observed in the control group ($p>0.3$) (Fig. 3).

DISCUSSION

Pijoan (1995) reported that early weaning can help controlling certain infections, but the elimination of early colonizers such as *Streptococcus suis*, *H. parasuis* and *A. suis* remains questionable with this technique. Colonization by *A. suis* may occur in the first three weeks of age but vary between animals, so not all animals in a population of piglets will be colonized (Pijoan, 1995). In such a situation, a vaccination program may be justified. Profile of the immune response would then be required to determine the duration of passive immunity in a specific herd in order to help implementing the best vaccination strategy. The serologic profile of a cohort of 20 pigs revealed that the lowest S/P ratios were observed at weeks 8 to 12, corresponding to a decrease in passive maternal immunity. A marked increase in the antibody response was seen at week 16, at the approximate time of onset of *A. suis* clinical signs in this herd, which generally occurred between 16 to 19 weeks of age.

In 35% of the pigs of this cohort, the S/P ratio was low at 5 weeks of age and no further decrease in the level of antibodies was observed, suggesting that the level of passive maternal immunity was already low for these pigs at that age. In contrast, 65% of the pigs had S/P ratio greater than 0.35 at 5-week-old and a decrease in maternal passive immunity was subsequently observed, reaching at week 8 or 12 a level similar to the pigs having the lowest S/P ratio at 5 weeks of age. Possible explanations for lower or higher level of passive immunity in piglets are differences in level of immunity in sows or in absorption of antibodies by piglets. These results

indicated that subpopulations of 5 week-old pigs with high and low maternal immunity were present in the infected herd.

The antibody response to an autogenous vaccine in gilts was assessed in a herd where the control strategy for *A. suis* was to vaccinate gilts and sows. The level of antibodies was already high in the control and treatment groups prior to the first injection, but varied considerably among animals, indicating that subpopulations were also present in that breeding herd. The use of the autogenous vaccine for *A. suis* increased the specific humoral immunity of gilts, specially when the level of antibodies was low prior to vaccination. This suggests a possible interference between the natural active immunity present in herd and the vaccine. However, the use of an autogenous vaccine in a herd could help stabilizing antibodies levels in the whole population by increasing humoral immunity of animals with lower levels.

Results of serologic profile and vaccination trial revealed that subpopulations were present in the two herds involved. The presence of subpopulations is a factor in the maintenance of bacterial transmission in herds with problems. Exposing all members of a population to the agent by an effective and strategically applied vaccination program may help producing more consistent immunity among animals and controlling transmission (Dee, 1996).

Different vaccination strategies could be adopted depending on the age of onset of clinical signs in herds involved. In this particular case, the vaccination strategy was, at the time implemented to control clinical signs in young pigs. When problems

occur in piglets, vaccination of sows may be a strategy because maternal immunity will then protect the pigs at the expected time of clinical signs. When clinical signs appear at a later stage, passive immunity may not protect and vaccination of piglets should then be considered.

Until more is known about the pathogenesis and the immune response against *A. suis* in swine, a farm-specific ELISA, such as the one developed in this study, may represent a good alternative for the detection of antibodies against *A. suis*. Serologic test for a specific pathogen on a farm is most useful to evaluate the serologic profile of animals in a herd and thus can help implementing a rational vaccination strategy.

REFERENCES

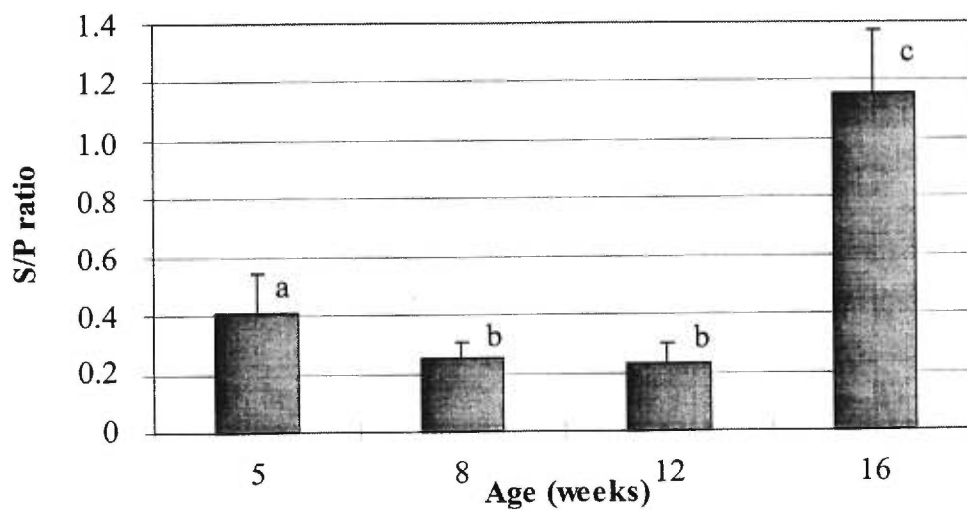
- Burrows, L.L., Lo, R.Y.C., 1992. Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.* 60, 2166-2173.
- Dee, S.A., 1996. The porcine respiratory disease complex: are subpopulations important? *Swine Health Prod.* 4, 147-149.
- Devenish, J., Rosendal, S., Johnson, R., Hubler, S., 1989. Immunoserological comparison of 104-kilodalton proteins associated with hemolysis and cytolysis in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica*, and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57, 3210-3213.
- Gottschalk, M., Altman, E., Charland, N., De Lasalle, F., Dubreuil, J.D., 1994. Evaluation of a 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.
- Kamp, E.M., Vermeulen, T.M.M., Smits, M.A., Haagsma, J., 1994. Production of APX toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.* 62, 4063-4065.

- Mair, N.S., Randall, G.J., Thomas, G.W., Harbourne J.F., McCrea, C.T., Crowl, K.P., 1974. *Actinobacillus suis* infection in pigs. A report of four outbreaks and two sporadic cases. J. Comp. Pathol. 84, 113-119.
- Miniats, O.P., Spinato, M.T., Sanford, S.E., 1989. *Actinobacillus suis* septicemia in mature swine: two outbreaks resembling erysipelas. Can. Vet. J. 30, 943-947.
- Odin, M., 1994. Les infections à *Actinobacillus suis* au Québec: une étude rétrospective de 22 cas. Méd. Vét. Québec 24, 61-65.
- Pijoan, C. 1995. Disease of high-health pigs: Some ideas on pathogenesis. Proc. Lemman Conf., 16-17.
- Sanford, S.E., 1992. *Actinobacillus suis*. In: A.D. Lemman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire and D.J. Taylor (Editors), Diseases of Swine, 7th edition, Iowa State University Press, Ames, pp. 433-437.
- Sanford, S.E., Miniats, O.P., 1988. *Actinobacillus suis* septicemia mimicking erysipelas in sows. Can. Vet. J. 29, 595.
- Sanford, S.E., Josephson, G.K.A., Rehmtulla, A.J., Tilker, A.M.E., 1990. *Actinobacillus suis* infection in pigs in southwestern Ontario. Can. Vet. J. 31, 443-447.

Slavic, D., Toffner, T.L., Monteiro, M.A., Perry, M.B., MacInnes, J.I., 1998. Preliminary characterization of *Actinobacillus suis* cell-surface saccharides. *Ont. Swine Res. Rev.*, 56-57.

Van Ostaaijen, J., Frey, J., Rosendal, S., MacInnes, J.I., 1997. *Actinobacillus suis* strains isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry *apxICABD*_{var. suis} and *apxIIICA*_{var. suis} toxin genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1131-1137.

A



B

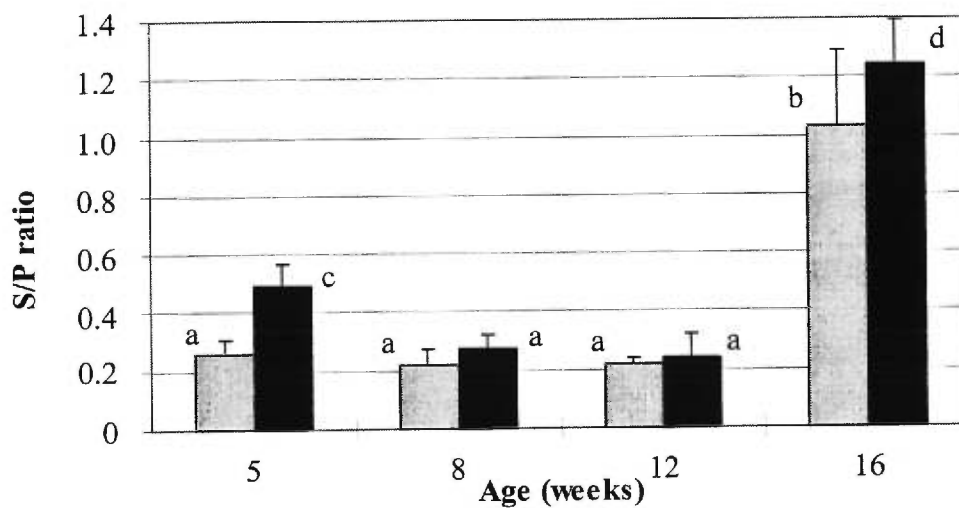


Fig. 1: Average ELISA S/P ratios for *Actinobacillus suis* obtained at 5, 8, 12 and 16 weeks of age for a cohort of pigs (n=20) (A). Average S/P ratios for pigs with a S/P ratio at 5 weeks of age ≤ 0.35 (n=7, gray band) and > 0.35 (n=13, black band) (B). S/P ratio = optical density obtained for serum by ELISA divided by the optical density of the positive control. The standard deviation was calculated for each animal using the different ELISA ratios obtained by at least three repetitions. Different superscripts are statistically significant at $p < 0.05$.

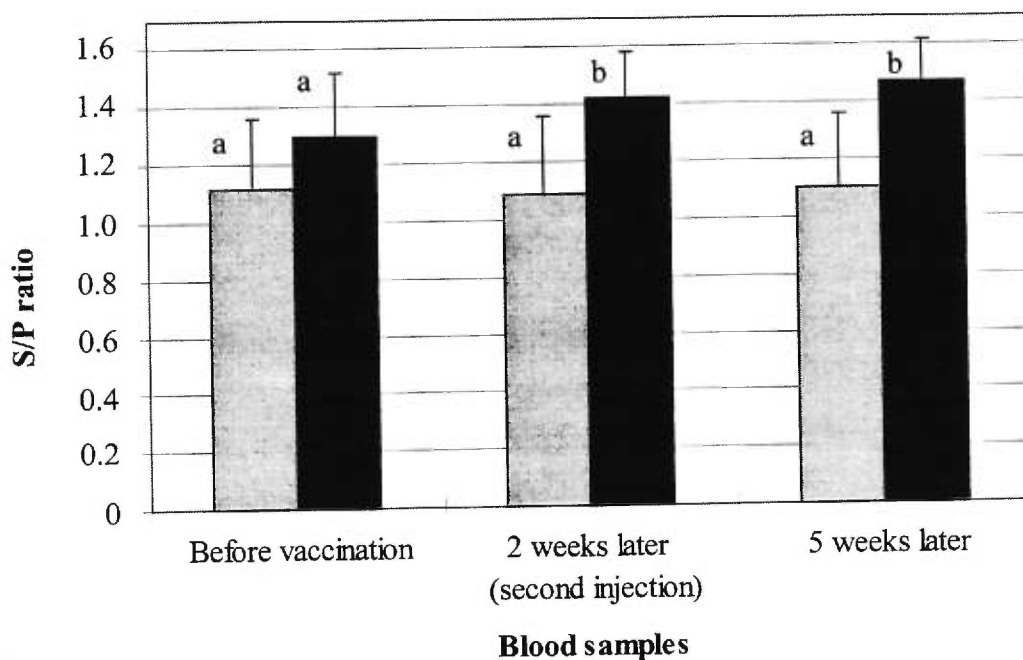


Fig. 2: Average ELISA S/P ratios obtained before vaccination and 2 weeks (second injection) and 5 weeks later. Control group (gray band) received a placebo (n=29) and vaccinated group (black band) were injected with an *Actinobacillus suis* autogenous vaccine (n=36). S/P ratio = optical density obtained for serum by ELISA divided by the optical density of the positive control. The standard deviation was calculated for each animal using the different ELISA ratios obtained by at least three repetitions. Different superscripts within a group are statistically significant at $p < 0.05$.

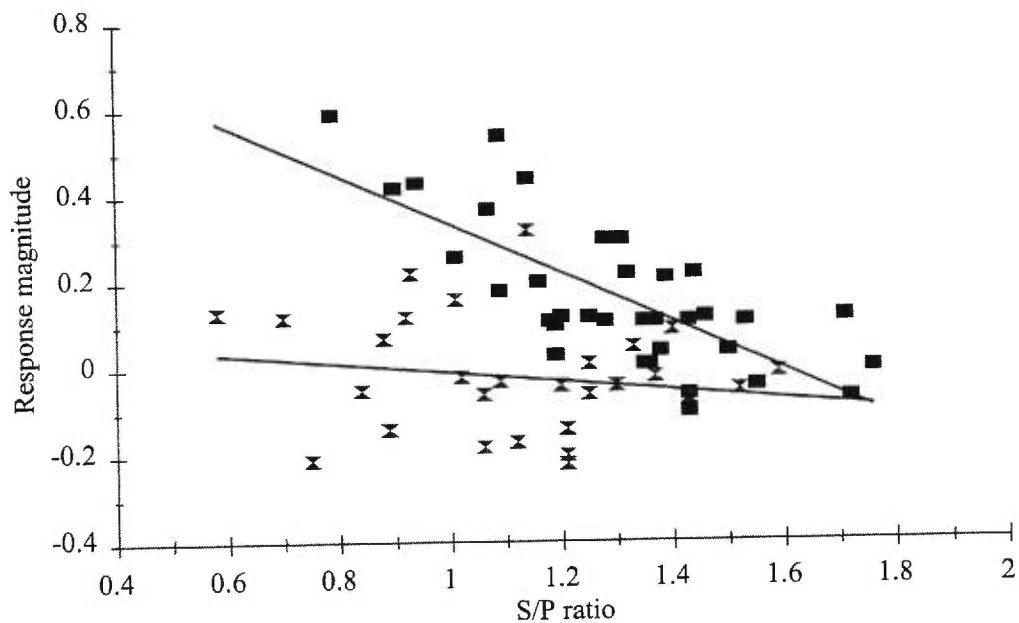


Fig. 3: Relationship between the ELISA S/P ratio for *Actinobacillus suis* before the vaccination and the magnitude of the response to the vaccination (S/P ratio 5 weeks later - S/P ratio before vaccination) for the control group (n=29, X) ($y = 0.9 - 0.57x$) and vaccinated group (n=36, ■) ($y = 0.096 - 0.1x$). S/P ratio = optical density obtained for serum by ELISA divided by the optical density of the positive control.

IV - MATÉRIEL ET MÉTHODES, RÉSULTATS ET DISCUSSION

STREPTOCOCCUS SUIS

Antibody response to an autogenous vaccine and serologic

profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2

Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2

L. Lapointe, S. D'Allaire, A. Lebrun, S. Lacouture and M. Gottschalk

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP)

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe,

Québec, Canada, J2S 7C6

Paper to be submitted to the Canadian Journal of Veterinary Research

Running title: Antibody response to *Streptococcus suis*

Key words: *S. suis* - Autogenous vaccine - ELISA - Serologic profile

Corresponding author: Dr. S. D'Allaire

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,

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

Phone: (450) 773-8521 ext. 8473

Fax: (450) 778-8120

Electronic-mail: dallairs@medvet.umontreal.ca

ABSTRACT

An autogenous vaccine, using sonicated bacteria, was developed with a strain of *Streptococcus suis* capsular type 1/2, which produced the virulence-related muramidase-released protein (MRP). The objectives of the study were to evaluate the specific antibody response following vaccination and to assess the kinetics of antibodies in pigs from a herd showing clinical signs due to *S. suis* capsular type 1/2 in 9-week-old pigs. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the vaccine antigen for coating the plates was standardized. Following the use of the autogenous vaccine, no side effects were observed and antibody levels increased and persisted for a minimum of 10 weeks postvaccination. Vaccinated pigs produced an antibody response, following vaccination, against proteins of different molecular weights as revealed by Western blot. Antibodies against the 117 kDa MRPs were also produced. For the kinetic study, groups of 30 pigs from an infected herd were blood sampled at 2, 4, 6, 8, and 10 weeks of age. The lowest antibody level was observed between weeks 6 and 8, corresponding to a decrease in passive maternal immunity. A marked increase in the antibody response was seen at 10 weeks of age, at the approximate time of onset of *S. suis* clinical signs in the herd. A knowledge of antibody kinetics is important to implement a rational vaccination program when using an autogenous vaccine.

INTRODUCTION

Streptococcus suis is a causative agent of a wide range of infections in pig including meningitis, arthritis, pneumonia, septicemia, endocarditis, encephalitis, polyserositis, and abscesses (Staats *et al.*, 1997). Until now, 35 *S. suis* capsular types have been described (Gottschalk *et al.*, 1989, 1991a, 1991b; Higgins *et al.*, 1995), with capsular type 2 being the most prevalent in diseased animals, followed by capsular types 1/2 and 3 (Higgins and Gottschalk, 1999a). Because important economic losses are associated with *S. suis* and because antibiotic therapy gives unsatisfactory results, research into vaccination has been stimulated.

In attempting to control the disease due to *S. suis*, equivocal results have been obtained with vaccine using formalin killed bacteria (Ripley, 1983). Possible explanations for failure of these types of vaccine are degradation of protective antigens, loss of antigenicity of the strain caused by heat or formalin (Holt *et al.*, 1990b), the weak immunogenicity of the capsulated bacteria (del Campo Sepulveda *et al.*, 1996), or production of antibodies against antigens not associated with virulence factors (Holt *et al.*, 1988). In addition, since no reliable serological tool is available, it is difficult to evaluate the possible interference of autogenous or commercial vaccines with circulating antibodies. Several *S. suis* capsular type 2 proteins have been suggested to induce protection in pigs (Holt *et al.*, 1990a; Quessy *et al.*, 1994). Among them, are a 136 kDa protein known as the muramidase-released protein (MRP) (Quessy *et al.*, 1994) and a hemolysin (suilysine) (Jacobs *et al.*, 1996), but these two proteins are not present in all virulent strains (Gottschalk *et al.*, 1998).

The MRP has also been observed in capsular types 1, 1/2 and 14 (Luque *et al.*, 1999). Some strains of *S. suis* produce MRP with lower (MRPs) or higher (MRP*) molecular weights (Vecht *et al.*, 1996). Virulence factors and protective antigens for other important capsular types, such as capsular type 1/2, are so far unknown.

The purpose of this study was to develop and standardize an ELISA to evaluate the antibody response to an autogenous vaccine composed of a protein extract obtained from a field strain of *S. suis* capsular type 1/2 and to evaluate the serologic profile in a herd having problems associated with this same strain.

MATERIALS AND METHODS

Vaccination trial

Characteristics of the bacterial strain used for the autogenous vaccine

The strain of *S. suis* capsular type 1/2 # 97-4114, which was used for the autogenous vaccine, originated from a pig that had suddenly died in a herd presenting clinical signs of *S. suis* in 9-week-old pigs. Culture conditions were those previously described (Higgins and Gottschalk, 1990). This strain, along with several other strains of *S. suis* type 1/2 isolated from pigs in the same herd as well as from other herds belonging to the same owner, were compared by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) with primers OPB07, OPB10 and OBP17, as described by Chatellier *et al.* (1999). Presence of MRP in the strain used for the vaccine was tested by Western blot as previously described (Gottschalk *et al.*, 1998). Briefly, supernatant of the strain concentrated 100 times was mixed with an equal volume of solubilization buffer and separated in 7.5% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, the supernatant material was transferred from gel to nitrocellulose membranes in methanol-Tris-glycine buffer. After blocking unreacted sites with casein (2%, wt/vol), the membranes were incubated with monospecific antibodies anti-MRP (kindly supplied by Dr. U. Vecht, ID-DLO, Lelystad, The Netherlands). After washing with Tris-saline, peroxidase-labeled immunoglobulin G fraction of goat anti-rabbit IgGs (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, West Grove, PA, USA) was added. Reaction was visualized following incubation of nitrocellulose membrane with

0.06% 4-chloro-1-naphthol (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, USA) in cold methanol mixed with H₂O₂ in Tris-HCl. Molecular weights were calculated by comparison with standards of known molecular mass (high range) (Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, ON, Canada).

Autogenous vaccine

The strain 97-4114 of *S. suis* capsular type 1/2 was streaked on sheep blood agar, incubated for 24 h at 37°C, then inoculated into 10 mL of Todd-Hewith broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated at 37°C for 18 h. Subsequently, bacteria were lysed by sonication, by 3-pulse cycles of 5 minutes each, at 80% duty cycle (Sonics & Materials Inc, New Town, CT, USA). After sonication, unlysed cells were removed by centrifugation at 3,000 X g for 30 minutes and the supernatant was collected and dialyzed for 24 hours in filtered water with a porous regenerated cellulose membrane with a molecular weight cut-off from 12,000 to 14,000 (Spectrum Medical Industries Inc, Houston, TX, USA). The solution was then lyophilized and stored until use. The proteins present in the vaccine antigen solution were separated in 7.5% SDS- polyacrylamide gel and stained with Comassie blue. Presence of MRP proteins in the antigen solution of the autogenous vaccine (concentrated 10 times) was verified by Western blot as described above.

Lyophilized antigen solution was rehydrated with sterile phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and filtrated with disposable filter unit, first with pore size 0.45 and subsequently with pore size 0.22 (Nalge Company, Rochester, NY, USA). Protein

concentration in the vaccine antigen solution was evaluated by a modified method of Lowry (Markwell *et al.*, 1978). Vaccines were prepared by the addition of adjuvant to obtain two different final concentrations, 1 mg/mL (1X) and 5 mg/mL (5X). Solutions were mixed for 1 hour with Rehydragel adjuvant (Reheis Chemical Company, Berkeley Heights, NJ, USA) at 5% v/v and then for another hour with Emulsigen adjuvant (MPV Laboratory, Ralston, NE, USA) at 20% v/v. A placebo vaccine was prepared as described above except that the antigen solution was replaced by PBS (pH 7.4).

Experimental design

Six four-week-old specific pathogen free (SPF) pigs were randomly divided into three groups: two pigs in the 1X vaccine group (V1 and V2), two pigs in the 5X vaccine group (5V1 and 5V2) and two pigs in the control group which received a placebo (C1 and C2). Pigs were injected twice, at two weeks interval, intramuscularly in the neck with 1 mL of their respective solution.

Blood samples were collected from each pig before the first injection and subsequently at two-week intervals until the pigs were 14-week-old. Blood samples were centrifuged at 3,000 X g for 30 minutes and sera were collected and frozen at -20°C until being tested by ELISA.

The rectal temperature was recorded daily and animals were observed for any side effects for the week following injections. At the end of the experiment, pigs were

ethanized. Tonsils, skin at the injection site and the two dorsal superficial cervical lymph nodes were collected from each animal. Lymph nodes and skin were examined macroscopically and histologically. Tonsils were tested for the presence of *S. suis* capsular type 1/2 by the method of immunomagnetic beads (IMB) as described by Gottschalk *et al.* (1999).

Western blot with pig sera

Western blotting was performed as described above except that vaccine antigen solution was concentrated 16 times and mixed with equal volume of solubilization buffer and separated in 7.5 % SDS-polyacrylamide gel. Nitrocellulose membrane was separated in different parts which were incubated with 1/100 dilution of swine sera obtained before vaccination, 2 weeks after the first dose and 2 weeks after the second dose of the vaccine. For revelation, peroxidase labeled immunoglobulin G fraction of goat anti-swine IgGs (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc) was added.

Serologic profile

Animals

A serologic cross-sectional profile was taken from sows and from pigs that were 2, 4, 6, 8 and 10 weeks of age. Thirty pigs in each age group were sampled. The animals were selected in the herd from which the strain used in the autogenous vaccine originated.

ELISA

An indirect ELISA test was developed and standardized for this study. The protein antigen used for the vaccine (as described in a previous section) was suspended in carbonate buffer (pH 9.6) at a final concentration of 10 µg/mL. Each well of flat-bottomed PolySorb plates (Nunc-Immunoplates, Rochester, NY, USA) was coated with 100 µL of the antigen solution to give a final concentration of 1 µg/well. The plates were incubated overnight at 4°C, drained and then washed three times with PBS containing 0.05% of Tween 20 (Sigma Chemical) (PBS-T20). Sera from the vaccination trial were tested at different dilutions from 1/50 to 1/800. It was established that the best dilution which allowed differentiation between vaccinated and non-vaccinated animals was 1/400 (data not shown). All other sera were tested 1/400 and added in 100 µL amounts to appropriate wells (in duplicate on the same plate). The negative and positive controls used were sera from a non-vaccinated pig and a vaccinated pig, respectively, and were added to each plate. These two pigs were 14-week-old at blood sampling, and originated from the vaccination trial, one from the control group (pig C1) and one from the 1X-vaccine group (pig V2). After a 1-hour incubation of sera at room temperature, plates were washed three times with PBS-T20 and 100 µL of commercial horseradish peroxidase conjugated goat anti-swine IgG heavy and light chains (Jackson ImmunoResearch Laboratories), diluted 1/3,000 in PBS-T20, were added to each well for 1 hour at room temperature. Plates were then washed and a volume of 100 µL of 0.4 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma Chemical) dissolved in 0.05 M citrate

buffer (pH 4) with 0.5 M H₂O₂ was added to each well. After 25 minute incubation at room temperature, absorbance was measured at 414 nm on a kinetic microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). Results were reported as S/P ratios which were the optical density obtained for each serum divided by the optical density of the positive control.

All sera from pigs in the vaccination trial were tested on the same plate. Sera from pigs of different age group in the serologic profile were tested randomly on plates. Sera were tested at least three different times, the average obtained was only accepted when the coefficient of variation within the plate was below 15%.

Statistical analyses

For the study on serologic profile, the effect of age on S/P ratios was evaluated with a one-way ANOVA (SAS v. 6.12, Cary, NC, USA). Tukey's post-hoc tests were used to examine differences between pairs of means. Level of statistical significance was set at 0.05 for all tests.

RESULTS

Vaccination trial

Characteristics of the bacterial strain used for the autogenous vaccine

Of the six isolates recovered from diseased pigs, five were found to be genetically homogenous and one presented a different RAPD pattern. The arbitrarily selected strain for the autogenous vaccine (strain # 97-4114) was one genetically representative of other strains from the herds (Figure 1). The strain was MRPs+ as revealed by Western blot (Figure 2A). This protein presented a molecular weight of 117 kDa.

Autogenous vaccine

The antigen solution of the autogenous vaccine contained different proteins of *S. suis* (Figure 2B). Among them, the MRPs was found by Western blot (Figure 2A).

Vaccination

At the beginning of the experiment, pigs showed different ELISA S/P ratios (Figure 3). All pigs in the two vaccinated groups (1X and 5X) showed an increased ELISA S/P ratio two weeks after the first injection, whereas only pig 5V2 showed a further increase two weeks after the second injection. From weeks 6 to 10, the ELISA S/P ratios were lower than at week 4, but still higher than at the beginning of the experiment.

In comparison, the two pigs in the control group did not show any increase in ELISA S/P ratios following the injections until week 10. At that moment, pig C2 presented a marked increase in the antibody level.

Clinical examination

None of the injected pigs showed lameness or nervous signs for the duration of the experiment. Rectal temperatures of all pigs recorded during every weeks following injections were within normal range. No detectable lesions were observed from the skin at the injection site. At histological examination no significant difference was noted between the lymph nodes near the vaccination site and the one on the other side and no granulomatous lesions were observed. *S. suis* capsular type 1/2 was isolated from tonsils of pigs C2, V1, V2 and 5V2, using the IMB technique.

Western blot with pig sera

All pigs of control and vaccinated groups presented, before vaccination, antibodies against three different proteins of around 58, 62 and 66 kDa. In most pigs, reactions against the latter two proteins decreased following injection of the vaccine or placebo (Figure 4A), whereas antibodies against the 58 kDa protein increased in vaccinated animals. All vaccinated pigs presented post-vaccination a reaction against proteins of around 34 and 43 kDa. Responses against a protein of around 117 kDa (Figure 4B) were found in three vaccinated pigs whereas those against proteins of around 78 and 101 kDa were observed in two and three pigs, respectively (data not shown). One pig showed a reaction against a protein of around 130 kDa (Figure 4B).

Serologic profile

Sera collected from sows had an average ELISA S/P ratio of 0.90, with a median of 0.85 and a range of 0.65 to 1.35 (Figure 5). In this study, a significant effect of age was found on S/P ratios ($p < 0.001$). At 2-week-old, piglets in this herd showed an average ELISA S/P ratio of 0.5. However, a marked variation was observed in this age group with ELISA S/P ratios ranging from 0.02 to 1.17. The S/P ratios subsequently decreased significantly ($p < 0.0001$) to attain the lowest value, 0.2, between 6 and 8 weeks of age. Then, a marked and significant increase ($p < 0.0001$) in the average ELISA S/P ratio was observed in pigs of 10 weeks of age, with a level of 0.8, which was similar to the S/P ratios obtained in the group of sows ($p < 0.2$) (Figure 5).

DISCUSSION

The antibody level following vaccination increased in vaccinated pigs compared to control pigs and persisted during the vaccination trial for a minimum of 10 weeks post-vaccination. The importance of humoral immunity in the protection against *S. suis* infections was already confirmed by Holt *et al.* (1989), who reported that protective response was serum-mediated and associated with the presence of IgM and IgG to surface components of the bacteria. The presence of antibodies, particularly IgG, to surface structures would increase the recognition of the bacteria by the immune system and stimulate phagocytosis (Wessman, 1986). The administration of 5 times as much *S. suis* proteins extract did not result in higher antibody response in pigs. No side effect was observed following vaccination, even in pigs which received the 5X vaccine.

Previous attempts to protect pigs against *S. suis* infections by vaccination have given equivocal results. Quessy *et al.* (1994) suggested that bacterial protein fractions could generate protection against *S. suis* capsular type 2 infections and proposed that the use of a combination of different proteins should be considered as a perspective for vaccination. In our study, the vaccine was prepared with a protein extract from a field strain of *S. suis* capsular type 1/2 and was shown to contain several proteins. Among them, a 117 kDa protein which corresponds to a MRPs (Vecht *et al.*, 1996) was present.

All pigs presented an antibody reaction against three proteins of around 58, 62 and 66 kDa before vaccination. Antibodies against these proteins could be the result of previous infection with *S. suis*. The decreased response against two of these proteins in most pigs and the increase of antibodies against the 58 kDa protein in some animals following the injection of placebo or vaccine, suggest that reactions against these proteins were independent (and probably not related) from vaccination. It has already been reported that several cross-reacting antigens, mainly proteins, are present among different serotypes of *S. suis* (del Campo Sepulveda *et al.*, 1996). In general, the antibody response among vaccinated animals against cell wall proteins of *S. suis* was heterogeneous. All vaccinated pigs demonstrated an antibody response following the vaccination against proteins present in the vaccine of around 34 and 43 kDa. Gottschalk *et al.* (1992) demonstrated that a 44 kDa cell wall protein could be a virulence factor as well as an important immunogen of *S. suis* capsular type 2. Quessy *et al.* (1994) indicated that vaccination with proteins of 33 and 44 kDa resulted in protection in mice against challenge with homologous strain of capsular type 2. It is not known if proteins of these molecular weights of serotypes 2 and 1/2 are, in fact, related. An antibody response against proteins of different molecular weight was also obtained, but only in some vaccinated animals. For example, antibodies against the MRPs protein of 117 kDa was obtained in three of four vaccinated animals. Quessy *et al.* (1994) demonstrated that antibodies against MRP were responsible for protection in mice against homologous strain. Results obtained in this study seem to indicate that, although a relatively high antibody level against the cell wall proteins of *S. suis* was obtained, the reactive protein profile after vaccination was relatively heterogeneous.

With modern production technologies, such as medicated early weaning, many diseases can be controlled. However, the capacity to reduce or eliminate early colonizers such as *S. suis* is questionable with these techniques (Clark *et al.*, 1994; Amass *et al.*, 1995; Pijoan, 1995). Pijoan (1995) proposed that to better control problems associated with this kind of pathogens, new diagnostic techniques such as serum profiling should be used. In the herd studied, piglets were weaned at 2 weeks of age and clinical signs due to *S. suis* capsular type 1/2 were mostly observed in 6 to 8 week-old animals. The serologic profile revealed that antibody levels against the *S. suis* serotype 1/2 strain varied considerably among 2 and 4 week-old pigs. Differences in antibody levels among piglets in these age groups could be attributed to differences in maternal antibody levels and/or in the rate of absorption of maternal antibodies by the piglets. In our study, the ELISA S/P ratios of sows varied from 0.65 to 1.35. Torremorell *et al.* (1998) suggested that most of the colonization of pigs by *S. suis* virulent strains generally occur in animal after weaning, when maternal antibodies are at the lowest level. The lowest antibody levels in this herd were observed in pigs at weeks 6 to 8, but animals were probably highly infected at this time because clinical signs of disease were then observed. A marked increase in antibody response was noted at 10 weeks of age, this probably corresponding to an active immunity after the break out of *S. suis* clinical cases in this herd. At that age, the average S/P ratio was similar to the one observed for sows in this herd.

In the present study, the development of an ELISA using a protein extract of *S. suis* as coating antigen showed good and repetitive results. It has been reported that serology for *S. suis* is more useful in vaccination studies or as a surveillance tool in

high health status herds than as a diagnostic tool (Higgins and Gottschalk, 1999b). The development of a strain-specific ELISA allowed the evaluation of the serologic profile of animals. A knowledge of antibody kinetics is useful to implement a rational vaccination program. The strategy adopted should allow minimal interference between active and passive maternal immunity in piglets and maximal protection for pigs at the approximate time of onset of clinical signs. The experimental *S. suis* autogenous vaccine developed for capsular type 1/2 seemed to be effective for increasing the antibody level in animals. However, subsequent tests will be necessary to evaluate the efficacy of this vaccine for controlling the disease in field conditions.

REFERENCES

AMASS SF, CLARK LK, WU CC. Source and timing of *Streptococcus suis* infection in neonatal pigs: Implications for early weaning procedures. Swine Health Prod 1995; 3: 189-193.

CHATELLIER S, GOTTSCHALK M, HIGGINS R, BROUSSEAU R, HAREL J. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. J Clin Microbiol 1999; 37: 362-366.

CLARK LK, HILL MA, KNIFFEN TS, VANALSTINE W, STEVENSON G, MEYER KB, WU CC, SCHEIDT AB, KNOX K, ALBREGTS S. An evaluation of the components of medicated early weaning. Swine Health Prod 1994; 2: 5-11.

DEL CAMPO SEPULVEDA EM, ALTMAN E, KOBISCH M, D'ALLAIRE S, GOTTSCHALK M. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet Microbiol 1996; 52: 113-125.

GOTTSCHALK M, HIGGINS R, JACQUES M, MITTAL KR, HENRICHSEN J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 1989; 27: 2633-2636.

GOTTSCHALK M, HIGGINS R, JACQUES M, BEAUDOIN M, HENRICHSEN J. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. J Vet Diagn Invest 1991a; 3: 60-65.

GOTTSCHALK M, HIGGINS R, JACQUES M, BEAUDOIN M, HENRICHSEN J. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 1991b; 29: 2590-2594.

GOTTSCHALK M, HIGGINS R, JACQUES M, DUBREUIL JD. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. Vet Microbiol 1992; 30: 59-71.

GOTTSCHALK M, LEBRUN A, WISSELINK H, DUBREUIL JD, SMITH H, VECHT U. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. Can J Vet Res 1998; 62: 75-79.

GOTTSCHALK M, LACOUTURE S, ODIERNO L. Immunomagnetic isolation of *Streptococcus suis* serotype 2 and 1/2 from swine tonsils. J Clin Microbiol 1999; 37: 2877-2881.

HIGGINS R, GOTTSCHALK M. An update on *Streptococcus suis* identification. J Vet Diagn Invest 1990; 2: 249-252.

HIGGINS R, GOTTSCHALK M. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1998. Can Vet J 1999a; 40: 277.

HIGGINS R, GOTTSCHALK M. Streptococcal diseases. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, eds. Diseases of Swine, 8th edition. Ames: Iowa State University Press, 1999b: 563-578.

HIGGINS R, GOTTSCHALK M, BOUDREAU M, LEBRUN A, HENRICHSEN J. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. J Vet Diagn Invest 1995; 7: 405-406.

HOLT ME, ENRIGHT MR, ALEXANDER TJL. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res Vet Sci 1988; 45: 349-352.

HOLT ME, ENRIGHT MR, ALEXANDER TJL. Studies of the protective effect of different fractions of sera from pigs immune to *Streptococcus suis* type 2 infection. J Comp Pathol 1989; 100: 435-442.

HOLT ME, ENRIGHT MR, ALEXANDER TJL. Protective effect of sera raised against different fractions of *Streptococcus suis* type 2. J Comp Pathol 1990a; 103: 85-94.

HOLT ME, ENRIGHT MR, ALEXANDER TJL. Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res Vet Sci 1990b; 48: 23-27.

JACOBS AAC, VAN DEN BERG AJG, LOEFFEN PLW. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec* 1996; 139: 225-228.

LUQUE I, TARRADAS C, ASTORGA R, PEREA A, WISSELINK HJ, VECHT U. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. *Res Vet Sci* 1999; 66: 69-72.

MARKWELL MAK, HAAS SM, BIEBER LL, TOLBERT NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 206-210.

PIJOAN C. Disease of high-health pigs: Some ideas on pathogenesis. *Proc Lemman Conf* 1995: 16-17.

QUESSY S, DUBREUIL JD, CAYA M, LETOURNEAU R, HIGGINS R. Comparison of pig, rabbit and mouse IgG response to *Streptococcus suis* serotype 2 proteins and active immunization of mice against the infection. *Can J Vet Res* 1994; 58: 220-223.

RIPLEY PH. Vaccines against streptococcal meningitis. *Pig Vet Soc Proc* 1983: 25-39.

STAATS JJ, FEDER I, OKWUMABUA O, CHENGAPPA MM. *Streptococcus suis*: past and present. Vet Res Commun 1997; 21: 381-407.

TORREMORELL M, CALSAMIGLIA M, PIJOAN C. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. Can J Vet Res 1998; 62: 21-26.

VECHT U, WISSELINK HJ, REEK FH, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, SMITH HE. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. Proc Int Pig Vet Soc 1996; 14: 298.

WESSMAN GE. Biology of the group E streptococci: a review. Vet Microbiol 1986; 12: 297-328.

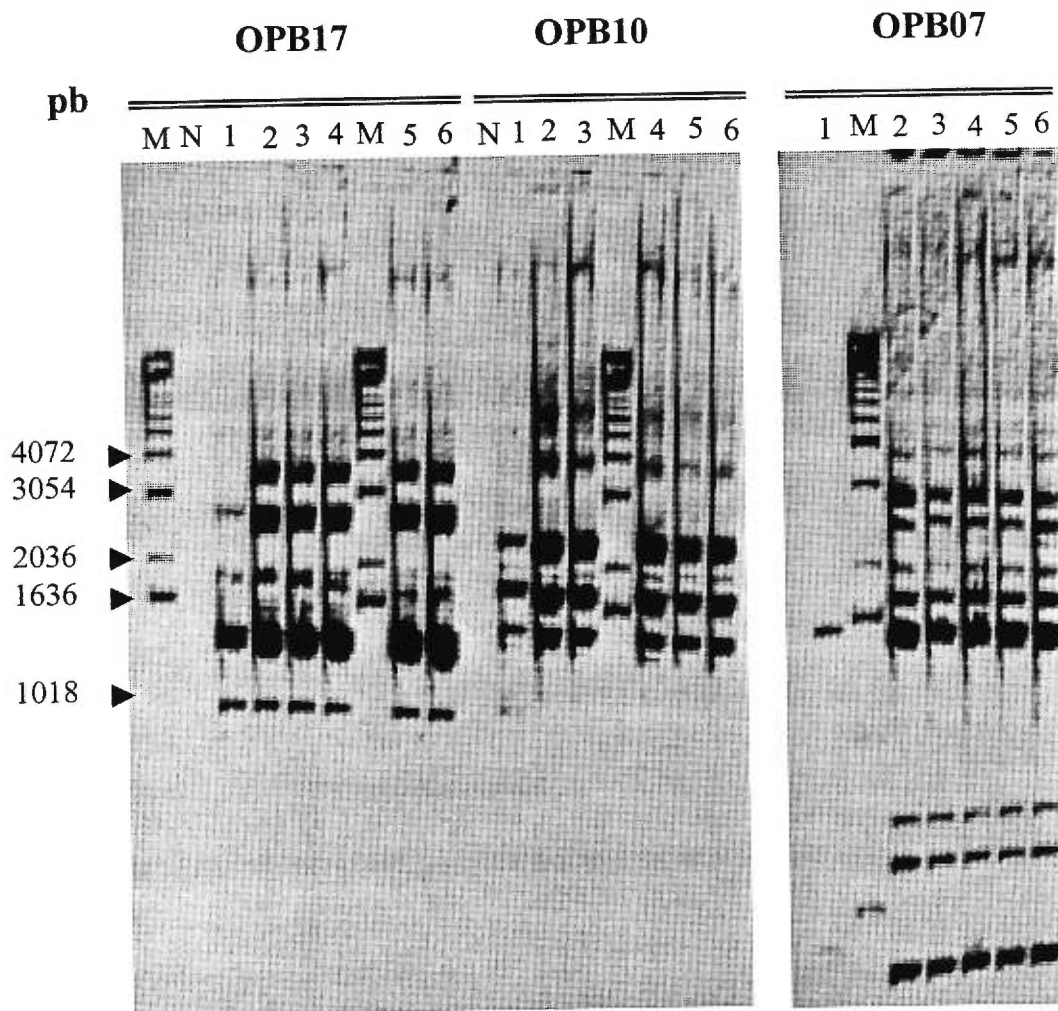


Figure 1: RAPD patterns generated with primers OPB17, OPB10 and OPB07 as described by Chatellier *et al.* (1999). Lane 1: strain 97-4028; Lane 2: strain 97-4114 (vaccine strain); Lane 3: strain 96-5150; Lane 4: 97-9993; Lane 5: 96-5429; Lane 6: 98-0425; N: negative control; M: 1 Kb DNA ladder (DNA molecular size marker). All strains shown were *Streptococcus suis* capsular type 1/2 isolated from diseased pigs in herds belonging to the same owner.

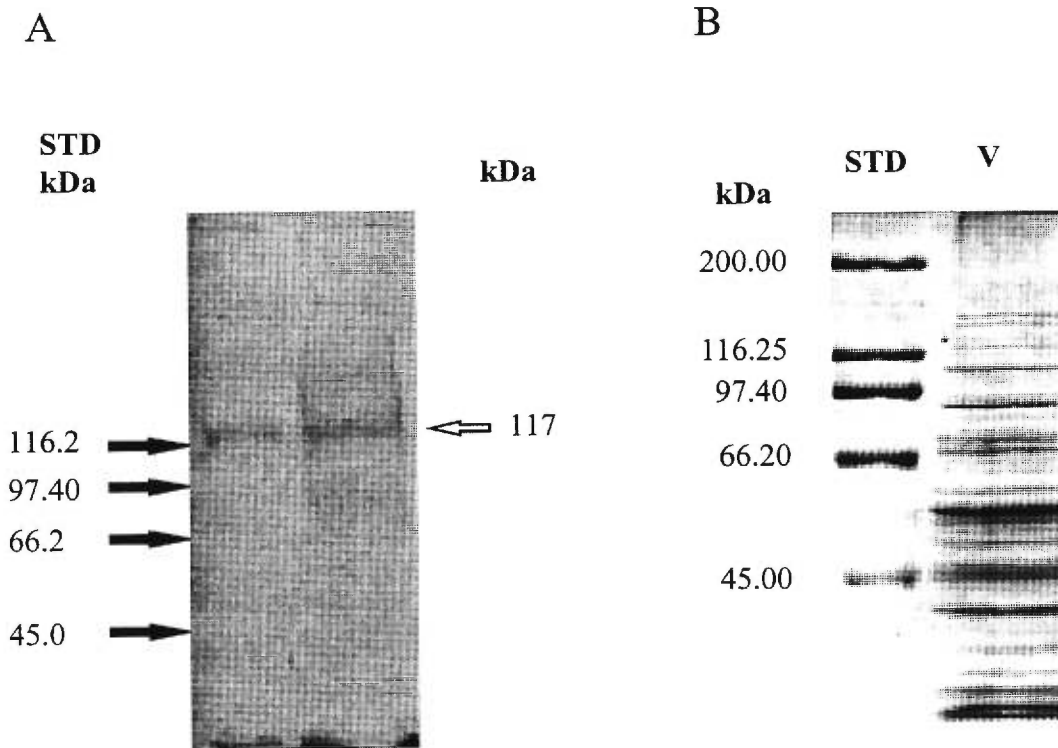
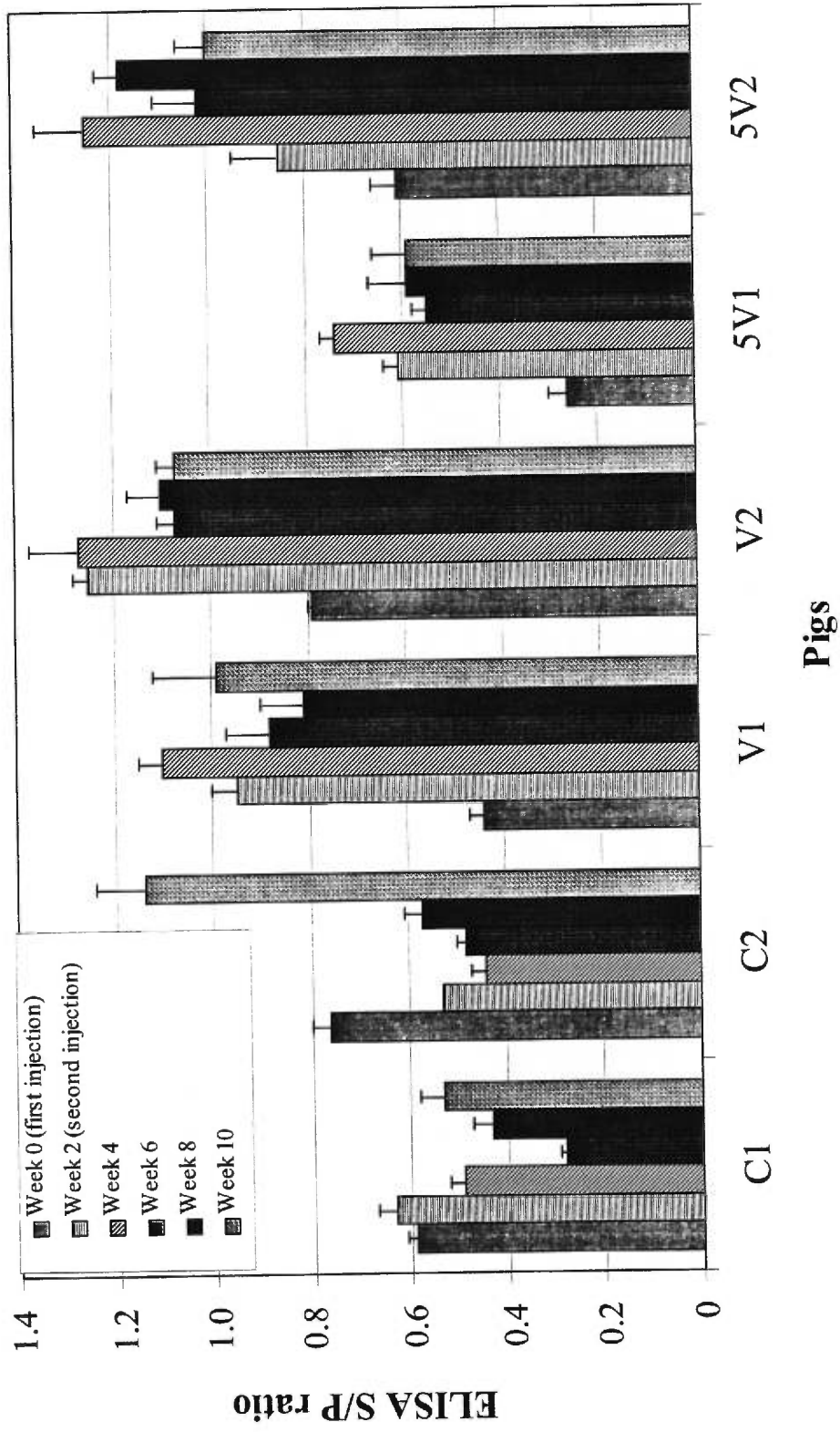


Figure 2:

(A) Western blots for the presence of MRP on the strain used in the vaccine and the antigen solution of the autogenous vaccine. Lane 1: supernatant of the strain *Streptococcus suis* capsular type 1/2 # 97-4114 concentrated 100 times; Lane 2: antigen solution of autogenous vaccine concentrated 10 times.

(B) Coomassie blue staining of proteins present in the antigen solution of the autogenous vaccine for *Streptococcus suis* capsular type 1/2 on 7.5% SDS-polyacrylamide gel. Lane 1: standards high range molecular masses (Bio-Rad Laboratories Ltd); Lane 2: antigen solution of autogenous vaccine.

Figure 3: Antibody response of pigs to a *Streptococcus suis* capsular type 1/2 autogenous vaccine measured by ELISA S/P ratio (optical density for each serum divided by the optical density of the positive control). Two pigs were injected with 1X vaccine (pigs V1 and V2), two with 5X vaccine (pigs 5V1 and 5V2) and two with the adjuvant only (control pigs C1 and C2). The standard deviation was calculated for each animal using the different ELISA ratios obtained by at least three repetitions.



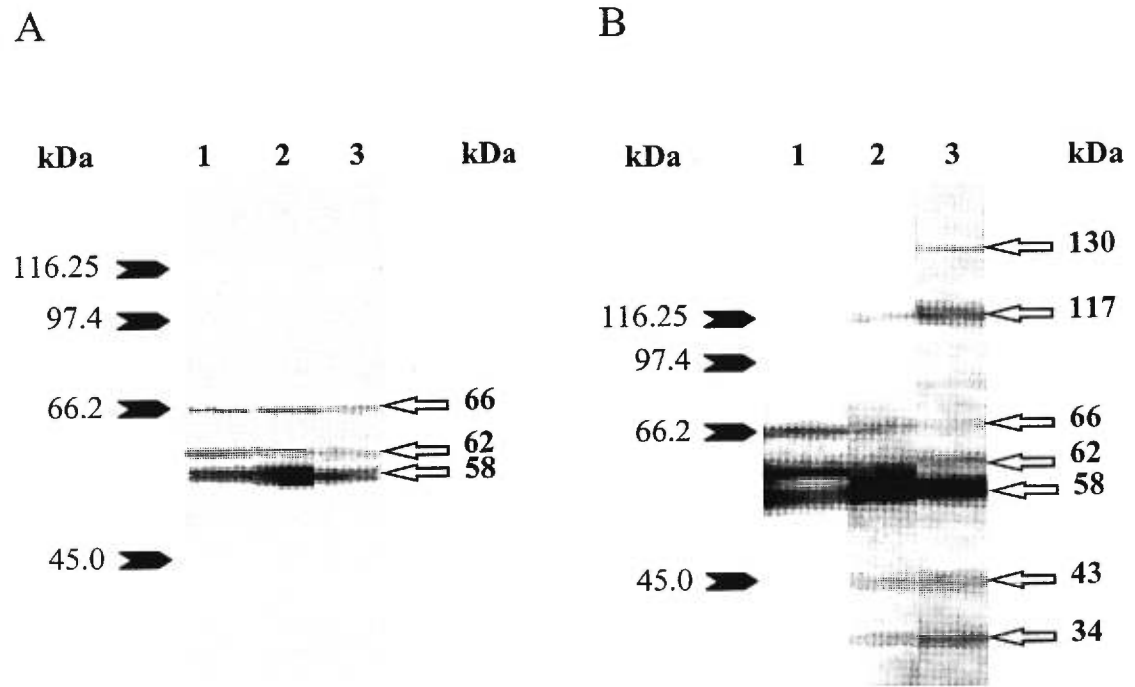


Figure 4:

(A) Western blots of proteins contained in the antigen solution of the autogenous vaccine for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. Proteins profiles were revealed using sera of a control pig (C2). Lane 1: before first injection; Lane 2: 2 weeks after first injection (second injection); Lane 3: 4 weeks after first injection; Numbers on the left indicate molecular weight standards in kDa.

(B) Western blots revealed using sera of a vaccinated pig (5V2). Lane 1: before first injection; Lane 2: 2 weeks after first injection (second injection); Lane 3: 4 weeks after first injection; Numbers on the left indicate molecular weight standards in kDa.

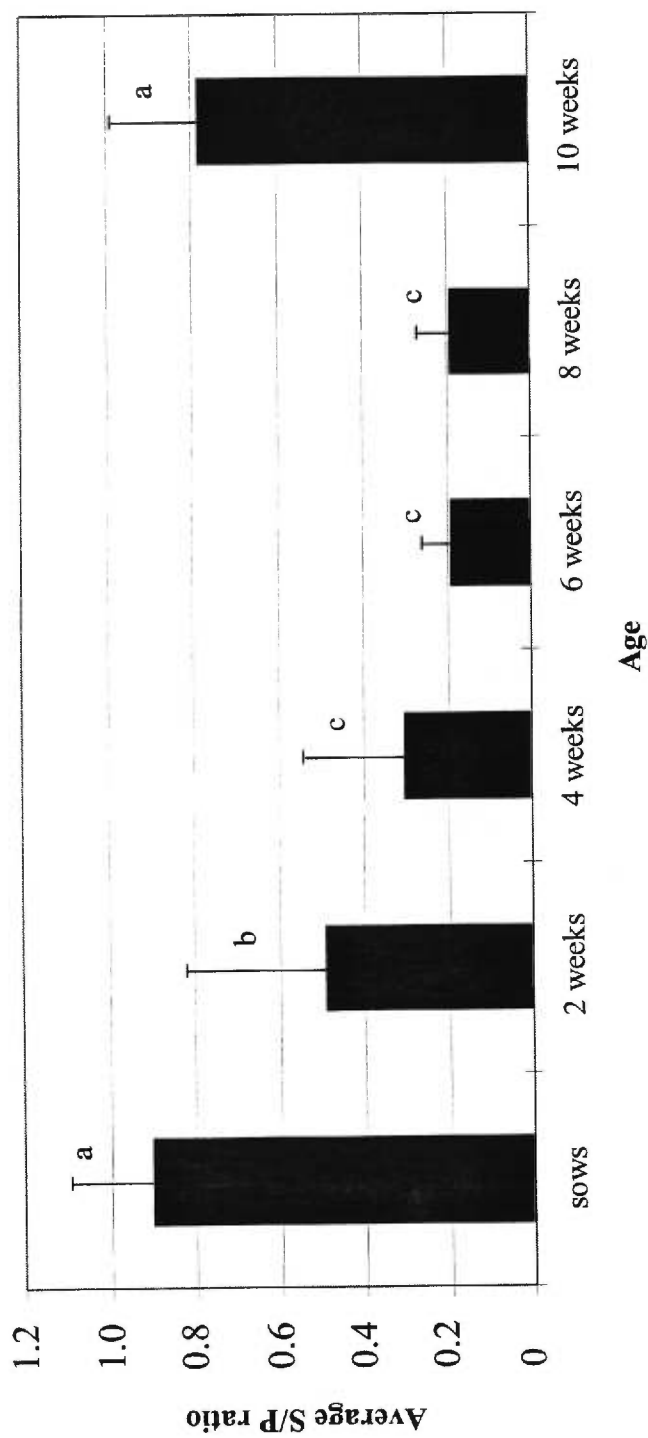


Figure 5: Average S/P ratios for *Streptococcus suis* capsular type 1/2 obtained from sows and pigs of 2, 4, 6, 8 and 10 weeks of age (30 animals per group). The standard deviation was calculated using the ELISA S/P ratios of animals within the same group of age. Results were reported as S/P ratios which were the optical density obtained by ELISA for each serum divided by the optical density of the positive control. Different superscripts are statistically significant at $p < 0.05$.

V – DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les vaccins autogènes peuvent avoir leur utilité dans l'industrie porcine, particulièrement lorsqu'aucun vaccin commercial n'est disponible. C'est notamment le cas pour des agents pathogènes porcins comme *A. suis*, qui est actuellement en émergence, et *S. suis*, qui pour sa part entraîne depuis quelques années des pertes économiques importantes au niveau mondial. Il est également reconnu que les vaccins autogènes peuvent avoir leur utilité dans le cas d'un agent pathogène pour lequel il existe sur le marché des vaccins commerciaux mais qui peuvent ne pas être représentatifs des souches isolées au sein d'un troupeau.

Dans un premier temps, l'efficacité d'un vaccin autogène pour *A. suis* a été testée chez les truies. Pour ce faire, un test ELISA utilisant pour antigène une des souches d'*A. suis* vaccinale a été mis au point. La première constatation a été qu'avant la vaccination le niveau d'anticorps contre cet agent bactérien, au sein de la population de truies testée, était élevé. En effet, souvent les ratios ELISA calculés dépassaient la valeur de 1, ce qui signifie que le niveau d'anticorps observé chez les truies était plus élevé que celui chez un animal hyperimmunisé avec le vaccin autogène (sérum utilisé comme contrôle positif dans l'ELISA).

Par ailleurs, une augmentation du niveau d'anticorps chez les truies a été notée suite à la vaccination et ce, particulièrement chez les animaux qui possédaient avant la vaccination les niveaux d'anticorps les plus faibles. Ceci a donc permis une uniformisation du niveau d'anticorps au sein de la population de truies. En effet, la vaccination permet d'augmenter les niveaux d'anticorps chez les animaux qui possèdent les niveaux les plus bas avant la

vaccination et ce, à un niveau comparable à celui des animaux ayant les plus hauts taux d'anticorps.

À l'aide du même test ELISA, un profil sérologique a également été réalisé dans un troupeau reconnu comme ayant des problèmes associés à *A. suis* entre la seizième et la dix-neuvième semaine d'âge. Au sein de ce troupeau, l'immunité maternelle était toujours présente chez la majorité des porcelets à la cinquième semaine d'âge. Par la suite, une baisse de l'immunité maternelle entre les semaines 8 et 12 a été observée chez les porcelets testés. Une séroconversion a été par la suite notée à la seizième semaine d'âge, ce qui correspondrait avec l'apparition des premiers signes cliniques dans ce troupeau.

Dans ces troupeaux, compte tenu du niveau élevé d'anticorps au sein de la population de truies et de l'âge de l'apparition des premiers signes cliniques, soit aux environs de la seizième semaine d'âge, le programme de vaccination devrait être réévalué. Celui-ci avait été mis en place afin de contrôler la maladie qui sévissait alors chez les porcelets sous la mère. Suite à l'évolution de la maladie au sein des troupeaux, une stratégie privilégiant la vaccination des porcelets serait peut-être plus bénéfique. Par contre, celle-ci devrait être réalisée de façon à minimiser l'interférence avec l'immunité maternelle et assurer une protection au moment de l'apparition des signes cliniques. Par exemple à l'aide du profil sérologique particulier réalisé dans le troupeau à l'étude, la vaccination pourrait être réalisée chez les porcelets âgés d'environ huit semaines, avec un rappel vers la dixième semaine d'âge.

Dans la seconde partie du projet, un vaccin autogène a été élaboré à partir d'une souche particulière de *S. suis* sérotype 1/2 qui entraînait des pertes importantes vers les sixième et huitième semaines d'âge au sein de plusieurs troupeaux. Ce vaccin a été réalisé à l'aide d'une souche MRPs+ trouvée génétiquement représentative d'autres souches isolées de porcs malades au sein de différents troupeaux appartenant à la même organisation et obtenues à différents temps.

Compte tenu que les essais de vaccination pour *S. suis* ont donné des résultats équivoques, la méthodologie choisie lors de ce projet a été un vaccin de type sous-unitaire. En effet, nous avons opté pour l'élaboration d'un vaccin à base de protéines par la lyse des bactéries via la sonication, plutôt qu'une bactérine. Lors de l'essai préliminaire de vaccination, aucun effet secondaire n'a été noté chez les porcelets qui ont reçu le vaccin et aucune lésion granulomateuse n'a été observée aux nœuds lymphatiques près du site d'injection. Nous avons également constaté que l'administration de deux doses de vaccins avec une concentration en protéines de 1 mg/mL, à deux semaines d'intervalle, permettait l'augmentation du niveau d'anticorps chez des porcelets âgés de quatre semaines. Lors de cet essai, l'administration de cinq fois plus de protéines par dose n'a cependant pas entraîné une réponse humorale plus forte.

Cette augmentation de l'immunité humorale a été mesurée à l'aide d'un ELISA mis au point en utilisant la solution antigénique du vaccin comme antigène. Par immunoblot, nous avons constaté qu'il y avait eu, chez les porcs vaccinés, une réponse en anticorps contre des protéines de poids moléculaires différents retrouvée dans la solution

antigénique du vaccin autogène dont entre autres une protéine de 117 kDa, correspondant au poids moléculaire calculé pour la MRPs de la souche vaccinale.

Basé sur les résultats de l'essai préliminaire, le vaccin autogène développé semblait présenter un certain potentiel. Évidemment, avant de poursuivre, le vaccin autogène devrait être testé à grande échelle au sein d'un troupeau. Pour ce faire, la réalisation d'un profil sérologique devenait donc essentielle afin d'évaluer la dynamique de l'infection au sein d'un troupeau et ainsi établir la meilleure stratégie de vaccination possible. Nous avons réalisé cet objectif au moyen du même ELISA mis au point lors de l'essai de vaccination. Une baisse d'immunité a été observée entre les sixième et huitième semaines d'âge avec un pic de séroconversion vers la dixième semaine d'âge, correspondant à l'apparition des premiers signes cliniques au sein du troupeau à l'étude.

Une étude présentement en cours au sein d'un troupeau commercial permettra d'évaluer la sérologie chez un plus grand nombre d'animaux et d'évaluer l'impact direct de la vaccination sur l'apparition des signes cliniques associés à *S. suis*. Le moment de la vaccination a été établi suite aux résultats du profil sérologique, soit la première injection à la troisième semaine d'âge et le rappel à la cinquième semaine d'âge. Des études de protection passive et active permettront pour leur part d'établir si les anticorps générés lors de la vaccination sont protecteurs.

En conclusion, nous avons pu établir que les vaccins autogènes peuvent avoir leur utilité dans l'industrie porcine dans le cas, entre autres, de certains agents pathogènes ou de

certaines souches particulières rencontrées au sein de troupeaux. Par contre, ces vaccins sont présentement utilisés à l'aveugle et souvent aucune évaluation n'a été faite quant à leur efficacité. Ces pratiques peuvent entraîner de lourdes pertes économiques si le vaccin et/ou la stratégie de vaccination utilisés ne sont pas efficaces. À ce moment, le recours à un test sérologique spécifique à une ou plusieurs souches utilisées dans le vaccin autogène peuvent aider à améliorer les pratiques vaccinales. En effet, ce test permet l'évaluation de la réponse humorale suite à la vaccination. On peut ainsi mesurer l'efficacité du vaccin à augmenter le niveau d'anticorps. À l'aide d'un tel test, on peut également évaluer la dynamique de l'infection et ce, en réalisant le profil sérologique particulier du troupeau où l'on veut implanter la stratégie de vaccination. On tentera alors d'établir une stratégie permettant de minimiser l'interférence avec l'immunité maternelle tout en assurant une protection au moment où surviennent les signes cliniques.

VI - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexander, T. J. L., K. Thornton, G. Boon, R. J. Lysons, and A. F. Gusn. 1980. Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet. Rec.* 106 : 114-119.
- Amano, H., T. Mizoguchi, M. Shibata, M. Tsuchiya, S. Sano, and T. Suzuki. 1993. Outbreaks of *Streptococcus suis* infection in pigs in the period 1988-1990 and some properties of the isolates. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 46 : 367-370.
- Amass, S. F., L. K. Clark, and C. C. Wu. 1995. Source and timing of *Streptococcus suis* infection in neonatal pigs: Implications for early weaning procedures. *Swine Health Prod.* 3 : 189-193.
- Amass, S. F., P. Sanmiguel, and L. K. Clark. 1997. Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* in swine by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 1595-1596.
- Anderson, C., G. F. Gerlach, A. A. Potter, S. Klashinsky, and P. J. Willson. 1991. Molecular characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 cytolysin gene. *Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* p. 33.
- Azuma, R., F. Hara, Y. Donuma, and C. Sugimoto. 1983. *Streptococcus* R (*Streptococcus suis* type II) infection in pigs in Japan. *Nat. Inst. Anim. Health Q.* 23 : 117-126.

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

Bada, R., K. R. Mittal, and R. Higgins. 1996. Biochemical and antigenic relationships between porcine and equine isolates of *Actinobacillus suis*. Vet. Microbiol. 51 : 393-396.

Bentley, R. W., J. A. Leigh, and M. D. Collins. 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequence. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 : 487-494.

Blackburn, P. W. 1982. Treatment of pigs affected with streptococcal meningitis. Int. Pig Vet. Soc. 10 : 23-24.

Blecha, F., D. N. Reddy, C. G. Chitko-McKown, D. S. McVey, M. M. Chengappa, R. D. Goodband, and J. L. Nelssen. 1995. Influence of recombinant bovine interleukin-1 β and interleukin-2 in pigs vaccinated and challenged with *Streptococcus suis*. Vet. Immun. Immunopathol. 44 : 329-346.

Blouin, C., R. Higgins, M. Gottschalk, and J. Simard. 1994. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Can. J. Vet. Res. 58 : 49-54.

Boulnois, G. J., J. C. Paton, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew. 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 5 : 2611-2616.

Brown, L. N. 1971. Alpha-hemolytic streptococci isolated from acute pneumonia and septicemia of Iowa swine. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.* p. 52.

Burrows, L. L., and R. Y. C. Lo. 1992. Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.* 60 : 2166-2173.

Busque, P., R. Higgins, F. Caya, and S. Quessy. 1997. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Can. J. Vet. Res.* 61 : 275-279.

Chang, Y. F., R. Young, and D. K. Struck. 1991. The *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin determinant: unlinked *appCA* and *appBD* loci flanked by pseudogenes. *J. Bacteriol.* 173 : 5151-5158.

Charland, N., M. Kobisch, B. Martineau-Doizé, M. Jacques, and M. Gottschalk. 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14 : 195-203.

Charland, N., J. Harel, M. Kobish, S. Lacasse, and M. Gottschalk. 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144 : 325-332.

Chatellier S., M. Gottschalk, R. Higgins, R. Brousseau, and J. Harel. 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 362-366.

Christenson, C. 1990. Clinical significance of *Actinobacillus suis*. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 21 : 267-270.

Clark, L. K., M. A. Hill, T. S. Kniffen, W. VanAlstine, G. Stevenson, K. B. Meyer, C. C. Wu, A. B. Scheidt, K. Knox, and S. Albrechts. 1994. An evaluation of the components of medicated early weaning. *Swine Health Prod.* 2 : 5-11.

Clifton-Hadley, F. A. 1983. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br. Vet. J.* 139 : 1-5.

Clifton-Hadley, F. A. 1984. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Vet. Res. Comm.* 8 : 217-227.

Clifton-Hadley, F. A., and T. J. L. Alexander. 1981. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Int. Pig Vet. Soc.* 8 : 8-17.

- Clifton-Hadley, F. A., and T. J. L. Alexander. 1988. Diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. In Pract. 10 : 185-187.
- Clifton-Hadley, F. A., and M. R. Enright. 1984. Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. Vet. Rec. 114 : 584-586.
- Clifton-Hadley, F. A., T. J. L. Alexander, M. R. Enright, and J. Guise. 1984a. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs. Vet. Rec. 115 : 562-564.
- Clifton-Hadley, F. A., T. J. L. Alexander, I. Upton, and W. P. H. Duffus. 1984b. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. Vet. Rec. 114 : 513-518.
- Clifton-Hadley, F. A., T. J. L. Alexander, and M. R. Enright. 1985. Diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. Proc. Pig Vet. Soc. 14 : 27-34.
- Clifton-Hadley, F. A., T. J. L. Alexander, and M. R. Enright. 1986a. The epidemiology, diagnosis, treatment and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. Pp. 471-491.
- Clifton-Hadley, F. A., M. R. Enright, and T. J. L. Alexander. 1986b. Survival of *Streptococcus suis* type 2 in pig carcasses. Vet. Rec. 118 : 275.

Curtis, J., and F. J. Bourne. 1971. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochem. Biophys. Acta* 236 : 319-332.

Dee, S. A. 1996. The porcine respiratory disease complex: Are subpopulations important? *Swine Health Prod.* 4 : 147-149.

Dee, S. A., A. R. Carlson, N. L. Winkelman, and M. M. Corey. 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203 : 295-299.

del Campo Sepulveda, E. M., E. Altman, M. Kobisch, S. D'Allaire, and M. Gottschalk. 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet. Microbiol.* 52 : 113-125.

Devenish, J., S. Rosendal, R. Johnson, and S. Hubler. 1989. Immunoserological comparison of 104-kilodalton proteins associated with hemolysis and cytolysis in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica*, and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57 : 3210-3213.

Devenish, J., S. Rosendal, and J. T. Bossé. 1990. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 58 : 3829-3832.

Devriese, L. A., and F. Haesebrouck. 1992. *Streptococcus suis* infections in horses and cats. Vet. Rec. 130 : 380.

Devriese, L. A., K. Ceysens, J. Homme, R. Kilpper-Balz, and K. H. Schleifer. 1991. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. Vet. Microbiol. 26 : 141-150.

Done, S. H., and D. J. Paton. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. Vet. Rec. 136 : 32-35.

Elliott, S. D. 1966. Streptococcal infection in young pigs. I. An immunological study of the causing agent (PM *Streptococcus*). J. Hyg. Camb. 64 : 205-212.

Elliott, S. D., F. A. Clifton-Hadley, and J. Tai. 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against the streptococcal meningitis in pigs. J. Hyg. Camb. 85 : 275-285.

Enright, M. R., T. J. L. Alexander, and F. A. Clifton-Hadley. 1987. Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. Vet. Rec. 121 : 132-133.

Feder, I., M. M. Chenpappa, B. Fenwick, M. Rider, and J. Staats. 1994. Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. J. Clin. Microbiol. 32 : 1256-1260.

Fenwick, B. 1995. Protection against porcine pleuropneumonia (App) provided by previous infection with *Actinobacillus suis*. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 26 : 365-366.

Fenwick, B., M. Rider, M. Chengappa, and J. Montaraz. 1996. Cross protective immunity between *Actinobacillus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Int. Pig Vet. Soc. 14 : 373.

Foccoli, E., V. Sala, D. Vigo and F. Persico. 1992. Localisation of *Streptococcus suis* type 2 in pigs with retarded growth. Tti de XIX Meeting Annuale Della Societa Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Parma, 1993. Pp. 291-300.

Foster, N., J. J. Staats, and M. M. Chengappa. 1994. Isolation, characterization and protection studies in mice of a streptomycin-dependent mutant of *Streptococcus suis* type 1/2. Vet. Res. Comm. 18 : 155-163.

Galina, L., C. Pijoan, M. Sitjar, W. T. Christianson, K. Rossow, and J. E. Collins. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. Vet. Rec. 134 : 60-64.

Galina, L., U. Vecht, H. J. Wisselink, and C. Pijoan. 1996. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can. J. Vet. Res.* 60 : 72-74.

Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal, and J. Henrichsen. 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 2633-2636.

Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, and J. Henrichsen. 1991a. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3 : 60-65.

Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, and J. Henrichsen. 1991b. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 2590-2594.

Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, and J. D. Dubreuil. 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet. Microbiol.* 30 : 59-71.

Gottschalk, M., E. Altman, N. Charland, F. De Lasalle, and J. D. Dubreuil. 1994. Evaluation of a 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.

Gottschalk, M., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* 141 : 189-195.

Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith, and U. Vecht. 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* 62 : 75-79.

Gottschalk, M., S. Lacouture, and L. Odierno. 1999. Immunomagnetic isolation of *Streptococcus suis* serotype 2 and 1/2 from swine tonsils. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 2877-2881.

Haataja, S., K. Tikkanen, U. Nilsson, G. Magnusson, K. A. Karlsson, and J. Finne. 1994. Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal α 1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*. Combining site architecture and characterization of two variant adhesin specificities. *J. Biol. Chem.* 269 : 27466-27472.

Hammerberg, C., G. G. Schurig, and D. L. Ochs. 1989. Immunodeficiency in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50 : 868-874.

- Higgins, R., and M. Gottschalk. 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. J. Vet. Diagn. Invest. 2 : 249-252.
- Higgins, R., and M. Gottschalk. 1999a. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1998. Can. Vet. J. 40 : 277.
- Higgins, R., and M. Gottschalk. 1999b. Streptococcal diseases. In Diseases of Swine, 8th edition. B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor (eds.). Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. Pp. 563-578.
- Higgins, R., M. Gottschalk, K. R. Mittal, and M. Beaudoin. 1990. *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. Can. J. Vet. Res. 54 : 170-173.
- Higgins, R., M. Gottschalk, M. Boudreau, A. Lebrun, and J. Henrichsen. 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. J. Vet. Diagn. Invest. 7 : 405-406.
- Hill, I. R., and P. Porter. 1974. Studies of bactericidal activity to *Escherichia coli* of porcine serum and colostral immunoglobulins and the role of lysozyme with secretory IgA. Immunology 26 : 1239-1250.
- Ho, A. K., K. S. Woo, K. K. Tse, and G. L. French. 1990. Infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. J. Infect. 21 : 209-211.

Hoffman, L. J., and L. M. Hendersen. 1985. The significance of *Streptococcus suis* swine disease: Clinical, pathologic and bacteriologic data from two-year study. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Pp. 201-210.

Hogg, A., S. F. Amass, L. J. Hoffman, C. C. Wu, and L. K. Clark. 1996. A survey of *Streptococcus suis* isolations by serotype and tissue of origin. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 27 : 79-81.

Hoie, S., K. Falk, and B. M. Lium. 1991. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. Acta Vet. Scand. 32 : 395-402.

Holt, M. E., M. R. Enright, and T. J. L. Alexander. 1988. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res. Vet. Sci. 45 : 349-352.

Holt, M. E., M. R. Enright, and T. J. L. Alexander. 1989. Studies of the protective effect of different fractions of sera from pigs immune to *Streptococcus suis* type 2 infection. J. Comp. Pathol. 100 : 435-442.

Holt, M. E., M. R. Enright, and T. J. L. Alexander. 1990a. Protective effect of sera raised against different fractions of *Streptococcus suis* type 2. J. Comp. Pathol. 103 : 85-94.

Holt, M. E., M. R. Enright, and T. J. L. Alexander. 1990b. Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res. Vet. Sci. 48 : 23-27.

Iglesias, J. G., M. Trujano, and J. Xu. 1992. Inoculation of pigs with *Streptococcus suis* type 2 alone or in combination with pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res. 53 : 364-367.

Jacobs, A. A. C., P. L. W. Loeffen, A. J. G. van den Berg, and P. K. Storm. 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 62 : 1742-1748.

Jacobs, A. A. C., A. J. G. van den Berg, J. C. Baars, B. Nielsen, and L. W. Johannsen. 1995. Production of suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*, by field isolates from diseased pigs. Vet. Rec. 137 : 295-296.

Jacobs, A. A. C., A. J. G. van den Berg, and P. L. W. Loeffen. 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. Vet. Rec. 139 : 225-228.

Kamp, E. M., T. M. M. Vermeulen, M. A. Smits and J. Haagsma. 1994. Production of APX toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. Infect. Immun. 62 : 4063-4065.

Kataoka, Y., M. Haritani, M. Mori, M. Kishima, C. Sugimoto, M. Nakazawa, and K. Yamamoto. 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. J. Vet. Med. Sci. 53 : 1043-1049.

Kataoka, Y., T. Yamashita, S. Sunaga, Y. Imada, H. Ishikawa, M. Kishima, and M. Nakazawa. 1996. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against *Streptococcus suis* type 2 in infected pigs. J. Vet. Med. Sci. 58 : 369-372.

Kay, R., A. F. Cheng, and C. Y. Tse. 1995. *Streptococcus suis* infection in Hong Kong. Quarterly J. Med. 88 : 39-47.

Kebede, M., M. M. Chengappa, and J. G. Stuart. 1990. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Streptococcus suis*: efficacy trial of the mutant vaccine in mice. Vet. Microbiol. 22 : 249-257.

Keymer, I. F., S. E. Heath, and J. G. P. Wood. 1983. *Streptococcus suis* type II infection in a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) family *Canidae*. Vet. Rec. 113 : 624.

Kilpper-Bälz, R., and K. H. Schleifer. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 37 : 160-162.

Kobisch, M., M. Lagadic, M. Le Menec, and J. Vaissaire. 1982. Les infections à *Streptococcus suis* (Groupe R), connaissances actuelles. Bull. Lab. Vet. 12 : 5-9.

Kobisch, M., M. Gottschalk, P. Morvan, R. Cariolet, G. Bénévent, and J. P. Joly. 1995. Infection expérimentale de porcelets par *Streptococcus suis*, sérovar 2. Journées Rech. Porcine en France 27 : 97-102.

Koehne, G., R. L. Maddux, and W. D. Cornell. 1979. Lancefield group R streptococci associated with pneumonia in swine. Am. J. Vet. Res. 40 : 1640-1641.

Kurl, N., S. Haataja, and J. Finne. 1989. Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 57 : 384-389.

Lamont, M. H., P. T. Edwards, and R. S. Windsor. 1980. Streptococcal meningitis in pigs: Results of a five-year survey. Vet. Rec. 107 : 467-469.

Laperle, A., M. Nadeau, and M. Cantin. 1996. Profil de sensibilité de bactéries d'origine bovine, porcine et aviaire envers certains agents antibactériens. Méd. Vét. Québec 26 : 26-29.

Lecce, J. G., G. Matrone, and D. O. Morgan. 1961. Porcine neonatal nutrition: Absorption of unaltered porcine proteins and polyvinyl pyrrolidone from the gut of piglets. *J. Nutr.* 73 : 158.

Luque, I., C. Tarradas, R. Astorga, A. Perea, H. J. Wisselink and U. Vecht. 1999. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. *Res. Vet. Sci.* 66 : 69-72.

MacDonald, D. W., M. P. Hewitt, G. S. Wilton, S. Rawluk, and L. Childs. 1976. *Actinobacillus suis* infections in Alberta swine, 1973-75: pathology and bacteriology. *Can. Vet. J.* 17 : 251-254.

Mair, N. S., G. J. Randall, G. W. Thomas, J. F. Harbourne, C. T. McCrea, and K. P. Crowl. 1974. *Actinobacillus suis* infection in pigs. A report of four outbreaks and two sporadic cases. *J. Comp. Pathol.* 84 : 113-119.

Markwell, M. A. K., S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87 : 206-210.

Michaud S., R. Duperval, and R. Higgins. 1996. *Streptococcus suis* meningitis: first case reported in Quebec. *Can. J. Infect. Dis.* 7 : 329-331.

Miniats, O. P., M. T. Spinato, and S. E. Sanford. 1989. *Actinobacillus suis* septicemia in mature swine: two outbreaks resembling erysipelas. *Can. Vet. J.* 30 : 943-947.

Mogollon, J. D., C. Pijoan, M. P. Murtaugh, J. E. Collins, and P. P. Cleary. 1991. Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 782-787.

Odin, M. 1994. Les infections à *Actinobacillus suis* au Québec: une étude rétrospective de 22 cas. *Méd. Vét. Québec* 24 : 61-65.

Ofek, I., and E. H. Beachey. 1980. General concepts and principles of bacterial adhesion. *In* Bacterial Adherence. Receptors and Recognition, ser. A. Vol. 6. E. H. Beachey (ed.). Chapman and Hall. London, England. Pp. 1-29.

Paterson, R. A., I. D. Roberson, R. C. Sanders, P. M. Siba, A. Clegg, and D. J. Hampson. 1993. The carriage of *Streptococcus suis* type 2 by pigs in Papua New Guinea. *Epidemiol. Infect.* 110 : 71-78.

Peetermans, W. E., B. G. Moffie, and J. Thompson. 1989. Bacterial endocarditis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* 159 : 595-596.

Pijoan, C. 1995. Disease of high-health pigs: Some ideas on pathogenesis. *Proc. Leman Conf.* Pp.6-17.

Porter, P. 1969. Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet. *Biochem. Biophys. Acta.* 181 : 381-392.

Porter, P. 1973. Studies of porcine secretory IgA and its component chains in relation to intestinal absorption of colostral immunoglobulins by the neonatal pig. *Immunology* 24 : 163-176.

Quessy, S., J. D. Dubreuil, and R. Higgins. 1994a. Immunization of mice against *Streptococcus suis* serotype 2 infections using a live avirulent strain. *Can. J. Vet. Res.* 58 : 299-301.

Quessy, S., J. D. Dubreuil, M. Caya, R. Letourneau, and R. Higgins. 1994b. Comparison of pig, rabbit and mouse IgG response to *Streptococcus suis* serotype 2 proteins and active immunization of mice against the infection. *Can. J. Vet. Res.* 58 : 220-223.

Quessy, S., J. D. Dubreuil, M. Caya, and R. Higgins. 1995. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect. Immun.* 63 : 1975-1979.

Reams, R. Y., L. T. Glickman, D. D. Harrington, H. L. Thacker, and T. L. Bowersock. 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II.

Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. J. Vet. Diagn. Invest. 6 : 326-334.

Reams, R. Y., D. D. Harrington, L. T. Glickman, H. L. Thacker, and T. L. Bowersock. 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 8 : 119-121.

Ripley, P. H. 1983. Vaccines against streptococcal meningitis. Pig Vet. Soc. 10 : 25-39.

Robertson, I. D., and D. K. Blackmore. 1989. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. Epidemiol. Infect. 103 : 157-164.

Robertson, I. D., D. K. Blackmore, D. J. Hampson, and Z. F. Fu. 1991. A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. Epidemiol. Infect. 107 : 119-126.

Ross, R. F., L. L. Christian, and M. L. Spear. 1969. Role of certain bacteria in mastitis-metritis-agalactia of sows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 155 : 1844-1852.

Ross, R.F., J. E. Hall, A. P. Orning, and S. E. Dale. 1972. Characterization of an *Actinobacillus* isolated from the sow vagina. Int. J. Syst. Bacteriol. 22 : 39-46.

Roth, J. A. 1999. The immune system. *In* Diseases of Swine, 8th edition. B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor (eds.). Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. Pp. 799-820.

Sala, V., A. Colombo, and L. Gerola. 1989. Infection risks of *Streptococcus suis* type 2 localizations in slaughtered swine. *Arch. Vet. Italiano* 40 : 180-184.

Salmon, S. A., J. L. Watts, C. A. Case, L. J. Hoffman, H. C. Wegener, and R. J. Yancey. 1995. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 33 : 2435-2444.

Sanford, S. E. 1987. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. I. Cardiac lesions. *Can. J. Vet. Res.* 51 : 481-485.

Sanford, S.E. 1992. *Actinobacillus suis*. *In* Diseases of Swine, 7th edition. A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, D. J. Taylor (eds.). Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. Pp: 433-437.

Sanford, S. E. 1995. *Actinobacillus suis*: An overview of an emerging disease. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 26 : 425-428.

Sanford, S. E., and O. P. Miniats. 1988. *Actinobacillus suis* septicemia mimicking erysipelas in sows. *Can. Vet. J.* 29 : 595.

Sanford, S. E., and A. M. E. Tilker. 1989. *Streptococcus suis* antimicrobial susceptibility. *Can. Vet. J.* 30 : 679.

Sanford, S. E., G. K. A. Josephson, A. J. Rehmtulla, and A. M. E. Tilker. 1990. *Actinobacillus suis* infection in pigs in southwestern Ontario. *Can. Vet. J.* 31 : 443-447.

Schiffmann, G. 1980. Immune response to *Streptococcus pneumoniae*. In *Manual of Clinical Immunology*, 2nd edition. N. R. Rose and H. Friedman (eds). Am. Soc. Microbiol. Washington D.C., USA. Pp. 441-445.

Serhir, B., R. Higgins, D. Dubreuil, M. Gottschalk, and R. Lallier. 1993. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Streptococcus suis*. *Can. J. Vet. Res.* 57 : 19-24.

Serhir, B., D. Dubreuil, R. Higgins, and M. Jacques. 1995. Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *J. Bacteriol.* 177 : 3830-3836.

Shnerrson, J. M., B. Chattopadhyay, M. F. G. Murphy, and I. W. Fawcett. 1980. Permanent perceptive deafness due to *Streptococcus suis* type II infection. J. Laryngol. Octol. 94 : 425-427.

Slavic, D., T. L. Toffner, M. A. Monteiro, M. B. Perry, and J. I. MacInnes. 1998. Preliminary characterization of *Actinobacillus suis* cell-surface saccharides. Ont. Swine Res. Rev. Pp. 56-57.

Smith, H. E., U. Vecht, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, Y. Biermann, and M. A. Smits. 1996. Mutants of *Streptococcus suis* type 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. Infect. Immun. 64 : 4409-4412.

Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits. 1999. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. Infect. Immun. 67 : 1750-1756.

Smits, M. A., J. Briaire, R. Jansen, H. E. Smith, E. M. Kamp, and A. L. J. Gielkens. 1991. Cytolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9. Infect. Immun. 59 : 4497-4504.

Speer, V. C., H. Brown, L. Quinn, and D. V. Catron. 1959. The cessation of antibody absorption in the young pig. *Immunology* 83 : 632.

Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa. 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Commun.* 21 : 381-407.

Stokes, C., and J. F. Bourne. 1989. Mucosal immunity. *In* *Veterinary Immunology*. R. E. W. Halliwell and N. T. Gorman (eds.). W. B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, USA. P. 164.

Tarradas, M. C., A. Arenas, A. Maldonado, I. Luque, A. Miranda, and A. Perea. 1994. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 578-580.

Tikkanen, K., S. Haataja, and J. Finne. 1996. The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect. Immun.* 64 : 3659-3665.

Tizard, I. R. 1996. Vaccination and vaccines. *In* *Veterinary Immunology*. An Introduction. Fifth edition. Tizard, I. R. (ed.). W. B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, USA. Pp. 265-283.

Torremorell, M., M. Calsamiglia, and C. Pijoan. 1998. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can. J. Vet. Res.* 62 : 21-26.

Touil, F., R. Higgins, and M. Nadeau. 1988. Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. *Vet. Microbiol.* 17 : 171-177.

Trottier, S., R. Higgins, G. Brochu, and M. Gottschalk. 1991. A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. *Rev. Infect. Dis.* 13 : 1251-1252.

Van Dorsen, C. A., and F. H. J. Jaartsveld. 1962. *Actinobacillus suis* (novo species), a bacterium occurring in swine. *Tijdschr. Diergeneesk.* 87 : 450-458.

Van Oss, C. J., and J. M. Singer. 1966. The binding of immune globulins and other proteins by polystyrene latex particules. *J. Reticulo-endoth. Soc.* 3 : 29-40.

Van Ostaaijen, J., J. Frey, S. Rosendal, and J. I. MacInnes. 1997. *Actinobacillus suis* strains isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry *apxICABD*_{var. suis} and *apxIICA* _{var. suis} toxin genes. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 1131-1137.

Vecht, U., J. P. Arends, E. J. van der Molen, and L. A. M. G. van Leengoed. 1989. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after

experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50 : 1037-1043.

Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, and H. E. Smith. 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* 59 : 3156-3162.

Vecht, U., H. J. Wisselink, F. H. Reek, N. Stockhofe-Zurwieden, and H. E. Smith. 1996. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. *Int. Pig Vet. Soc.* 14 : 298.

Volgel, L. C., R. Kretschmer, M. Boyer, D. Padnos, C. Gadzala, and S. Gotoff. 1979. Human immunity to group B streptococci measured by indirect immunofluorescence: correlation with protection in chick embryos. *J. Infect. Dis.* 140 : 682-689.

Wessman, G. E. 1986. Biology of the group E streptococci: a review. *Vet. Microbiol.* 12 : 297-328.

Yaeger, M. J. 1996. An outbreak of *Actinobacillus suis* septicemia in grow/finish pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8 : 381-383.