

2M11.2571.11

Université de Montréal

Amélioration du diagnostic des infections sous-cliniques à *Actinobacillus*
pleuropneumoniae sérotype 1

par

Annie Gagné

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 1997

© Annie Gagné, 1997



11-1728-11M2

SF

607

U54

1998

V.003

Université de Montréal

Amélioration du diagnostic des infections sous-cliniques à

pharyngomyxococci atypique

par

Amie Gagné

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en science (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

Année 1998



Université de Montréal

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

“Amélioration du diagnostic des infections sous-cliniques à *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 1”

présenté par:

Annie Gagné

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Serge Messier	Président-rapporteur
Dr Marcelo Gottschalk	Directeur
Dr André Broes	Co-directeur
Dre Josée Harel	Membre

Mémoire accepté le:.....16.02.1998.....

SOMMAIRE

L'isolement d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* à partir des voies respiratoires supérieures du porc, en complément à la sérologie, s'avère utile pour détecter les animaux infectés sous-cliniquement. Cependant, le niveau élevé de germes retrouvés dans la flore normale des amygdales complique l'isolement d'*A. pleuropneumoniae*. Dans cette étude, une méthode de capture immunomagnétique pour l'isolement sélectif d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 à partir des amygdales a été développée et comparée à une technique standard d'isolement. Des billes superparamagnétiques, pré-adsorbées avec des anticorps de mouton anti-immunoglobuline G (IgG) de lapin, ont été couplées à des IgG polyclonales de lapin spécifiques au sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*. La standardisation de la technique a été effectuée à partir de cultures pures et mixtes d'*A. pleuropneumoniae* ainsi qu'avec des amygdales inoculées expérimentalement. Afin d'améliorer la récupération d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et de réduire l'isolement non-spécifique d'autres germes, plusieurs conditions ont été testées. Les conditions optimales de la récupération d'*A. pleuropneumoniae* ont été réalisées en utilisant 1×10^7 billes couplées avec 15 μg d'IgG de lapin, en filtrant le surnageant des amygdales passées au vortex et en incubant celui-ci avec les billes dans du PBS-BSA 0.1% pendant 30 minutes à température pièce, suivi par des lavages dans du PBS-0.05% Tween. Les billes ont ensuite étéensemencées sur géloses PPLO sélectives puis un dénombrement des colonies d'*A. pleuropneumoniae* et des autres germes a été effectué. La sensibilité a atteint 10 UFC (UFC: unités formatrices de colonies) d'*A.*

pleuropneumoniae/ 0,1 g d'amygdale et 10⁴ UFC/ 0.1 g d'amygdale avec la technique de capture immunomagnétique et l'isolement standard, respectivement. La validation de la technique à partir de trois troupeaux cliniquement infectés a permis de détecter trois fois plus d'amygdales positives pour *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 comparativement à l'isolement standard. Cette technique de capture immunomagnétique peut facilement être adaptée pour les autres sérotypes d' *A. pleuropneumoniae* et constitue une méthode de choix, comme complément à la sérologie, pour la détection des animaux infectés sous-cliniquement.

Puisqu'il est très difficile d'isoler des souches d' *A. pleuropneumoniae* à partir d'animaux porteurs, il n'existe que peu d'études sur la variabilité des souches d' *A. pleuropneumoniae* isolées de cas sous-cliniques (amygdales) et cliniques (poumons). Ainsi, la deuxième partie de notre travail consistait à étudier les caractéristiques phénotypiques et génotypiques de 25 souches de sérotype 1 et de 24 souches de sérotype 5, isolées d'amygdales ou de poumons. Les 49 souches ont été testées pour la dépendance au NAD, la présence d'hémolyse, la production d'uréase et la réactivité au Dot-ELISA avec des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes capsulaires ou situés dans la chaîne O du LPS. Une seule souche de sérotype 1, isolée d'amygdales, s'est avérée atypique par l'absence d'hémolyse et d'uréase. Trois autres souches de sérotype 1 provenant également d'amygdales n'ont pas réagi au Dot-ELISA avec aucun des trois anticorps monoclonaux testés. Les caractéristiques phénotypiques évaluées se sont avérées très homogènes pour le sérotype 5.

L'étude du génome de ces souches a été effectuée par amplification génomique arbitraire (RAPD). L'analyse des profils RAPD générés avec trois amorces différentes de 10-mer a indiqué que 1) les souches de sérotype 1 possèdent des profils distincts de ceux des souches de sérotype 5; 2) les souches de sérotype 1 sont beaucoup plus hétérogènes que les souches de sérotype 5; 3) les isolats de sérotype 1 provenant des poumons sont plus homogènes que ceux provenant des amygdales. Le RAPD constitue une approche intéressante pour l'étude génotypique des souches d'*A. pleuropneumoniae* et pourrait s'avérer un outil épidémiologique très utile.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	II
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XIV
DÉDICACE	XVII
REMERCIEMENTS	XVIII
I. INTRODUCTION	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1- Taxonomie	5
2- Sérotypes d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	6
2.1- Parenté antigénique entre les différents sérotypes	7
2.2- Méthodes de sérotypie	8
2.3- Distribution des sérotypes	12
3- Variations génotypiques des souches d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	14
4- Pathogénie de la pleuropneumonie porcine	17

5-	Épidémiologie des infections à <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	23
	5.1- Transmission de la pleuropneumonie porcine	23
	5.2- Statut sanitaire des troupeaux	24
6-	Diagnostic des infections sous-cliniques	25
	6.1- Diagnostic sérologique	25
	6.1.1- Méthodes sérologiques	26
	6.1.2- Problématique reliée à la sérologie	29
	6.2- Diagnostic bactériologique: détection de la bactérie	30
	6.3- Diagnostic moléculaire	34
7-	Traitement et contrôle de la pleuropneumonie porcine	35
	7.1- Antibiothérapie	35
	7.2- Vaccination	36
	7.3- Gestion des bâtiments	36
	7.4- Éradication	37
	7.5- Sevrage précoce médicamenté	37
8-	L'immunocapture magnétique	38
	8.1- Principe	38
	8.2- Applications	40
9-	L'amplification génomique arbitraire ou RAPD	41
	9.1- Principe	41
	9.2- La technique RAPD comme outil épidémiologique	43

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS 47

Partie A:

Gagné, A., S. Lacouture, A. Broes, S. D'Allaire and M. Gottschalk.

Development of an immunomagnetic method for the selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils.

(Soumis pour publication) 48

Partie B:

Étude de la variabilité phénotypique et génotypique de souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 5 isolées de cas cliniques et sous-cliniques. 81

1- Matériels et méthodes	82
1.1- Sélection des souches	82
1.2- Conditions de culture	82
1.3- Caractérisation phénotypique	83
1.4- Réactivité des anticorps monoclonaux avec les souches d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	83
1.4.1- Anticorps monoclonaux	83
1.4.2- Dot-ELISA	84
1.4.3- Sérotypie	85
1.5- Caractérisation génotypique	85
1.5.1- Extraction de l'ADN	85
1.5.2- Dosage et contrôle de la pureté de l'ADN86	

1.5.2.1- Dosage au spectrophotomètre	86
1.5.2.2- Électrophorèse en gel d'agarose	87
1.5.3- Préparation des solutions d'ADN	88
1.5.4- Préparation du mélange réactionnel	88
1.5.5- Protocole d'amplification de l'ADN	89
1.5.6- Sélection des amorces	90
1.5.7- Prévention de la contamination des échantillons	90
1.5.8- Visualisation des produits d'amplification	91
1.5.9- Analyse numérique des profils RAPD	92
1.5.10- Calcul d'un index de discrimination	93
2- Résultats	93
2.1- Caractérisation phénotypique et réactivité avec les anticorps monoclonaux	93
2.2- Sélection des amorces	94
2.3- Profils RAPD obtenus avec les amorces OPB7, OPB11 et #17	95
2.3.1- Profils RAPD des souches de sérotype 1	96
2.3.2- Profils RAPD des souches de sérotype 5	98
2.3.3- Résultats combinés des 3 amorces	98
2.4- Relation entre les profils RAPD et les caractéristiques phénotypiques	99
2.5- Relation entre les profils RAPD et le Dot-ELISA	99
2.6- Relation entre les profils RAPD et l'origine géographique des souches	100

2.7- Pouvoir discriminant du RAPD	100
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	119
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127

LISTE DES TABLEAUX

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Tableau 1: Sérotypes dominants d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* dans différentes régions géographiques. 13

Tableau 2: Production des toxines Apx par les différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* 20

Tableau 3: Caractéristiques différentielles de certaines bactéries fréquemment retrouvées dans le tractus respiratoire du porc. 33

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Partie A:

Table 1: Effect of bead concentration on the recovery of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) serotype 1 using the immunomagnetic separation technique. 75

Table 2: Effect of incubation time and temperature of incubation on the recovery of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from a mixed suspension with *Pasteurella multocida* using the immunomagnetic separation technique. 76

Table 3: Sensitivity (mean % \pm SD) of the immunomagnetic separation technique (IMS) obtained with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 artificially inoculated tonsils and comparison with direct culture (DC). 77

Table 4: Recovery of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils of animals from infected herds using the immunomagnetic separation technique (IMS) and the standard procedure (SP). 78

Table 5: Distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and normal flora recovered from tonsils of animals from infected herds, using the immunomagnetic separation (IMS) and the standard procedure (SP). Results are expressed as percentage of plated tonsils. 79

Partie B:

Tableau 1: Caractérisation phénotypique des 25 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 et réactivité avec les anticorps monoclonaux

1.5 C5 F4, F11-7F et 5.1 G8 F10. 102

Tableau 2: Caractérisation phénotypique des 24 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 5 et réactivité avec les anticorps monoclonaux App 4.1 et App 6.1 E7. E3. 104

Tableau 3: Amorces utilisées sur les 7 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* afin de tester leur pouvoir discriminant. 106

Tableau 4: Souches d'*A. pleuropneumoniae* testées avec les 21 amorces. 107

Tableau 5: Type RAPD des 49 souches d' *A. pleuropneumoniae* obtenu à partir des profils générés par les 3 amorces. 108

Tableau 6: Indice numérique de discrimination (D) calculé avec les données obtenues à partir des profils RAPD. 111

LISTE DES FIGURES

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1: Principe de l'immunocapture magnétique. 39

Figure 2: Schéma de l'amplification RAPD. 46

III. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Partie A:

Figure 1: Effect of different concentrations of antibody on the ability of immunomagnetic beads to bind *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) serotype 1. 80

Partie B:

Figure 1: Profils RAPD obtenus avec l'amorce OPB7 pour les 49 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 112

Figure 2: Profils RAPD obtenus avec l'amorce OPB11 pour les 49 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 113

Figure 3: Profils RAPD obtenus avec l'amorce #17 pour les 49 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 114

Figure 4: Relation génétique entre les 49 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*: 11 profils (A) ont été mis en évidence. Pour chaque profil, le nombre de souches isolées de poumons (P) et isolées d'amygdales (A) est indiqué. Les 24 souches de sérotype 5 se retrouvent dans les profils A10 et A11. 115

Figure 5: Relation génétique entre les 49 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*: 10 profils (B) ont été mis en évidence. Pour chaque profil, le nombre de souches isolées de poumons (P) et isolées d'amygdales (A) est indiqué. Les 24 souches de sérotype 5 se retrouvent dans le profil B10. 116

Figure 6: Relation génétique entre les 49 souches d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*: 12 profils (C) ont été mis en évidence. Pour chaque profil, le nombre de souches isolées de poumons (P) et isolées d'amygdales (A) est indiqué. Les 24 souches de sérotype 5 se retrouvent dans le profil C12. 117

Figure 7: Relation génétique entre les 49 souches d'*A. pleuropneumoniae* déterminée par RAPD avec les 3 amorces OPB7, OPB11 et #17 combinées. Le type RAPD est établi selon le patron de profils obtenu avec les 3 amorces. Les 24 souches de sérotype 5 se retrouvent dans la sous-population a. La sous-population b regroupe toutes les souches de sérotype 1 isolées de poumons et quelques-unes isolées d'amygdales. La sous-population c comporte 4 souches d'amygdales de sérotype 1. 118

A la mémoire de mon frère

A mes parents

A ma soeur

A Eric

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet, plus particulièrement:

- mon directeur de maîtrise le docteur Marcelo Gottschalk, pour son expertise, sa grande disponibilité et son appui constant.
- mon co-directeur le docteur André Broes, pour l'intérêt qu'il a porté à ce projet.
- le docteur Josée Harel, pour ses conseils judicieux et sans qui l'étude RAPD n'aurait pu être réalisée.
- le docteur Sylvie D'Allaire, pour ses connaissances et sa collaboration.
- le docteur Serge Messier, pour son intérêt et son aide précieuse lors de la récolte des amygdales à l'abattoir.
- le docteur Khyali Mittal et Suzanne Bourdon pour leur appui technique en sérotypie des souches.
- Sonia Lacouture, pour sa patience, sa grande disponibilité, sa compétence et sa gentillesse.
- Sonia Chatellier, pour avoir partagé avec moi ses nombreuses connaissances du RAPD et son aide technique.
- Dominique Dugourd, pour les échanges fructueux sur la technique RAPD.
- Diane Côté, pour son assistance technique soutenue et sa sympathie.
- Nathalie Charland, Mélanie Fugère et Mariela Segura pour leur précieuse amitié et leurs encouragements.

- la Fédération des producteurs de porcs du Québec et le CORPAQ pour leur appui financier.
-

I. INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae est une bactérie Gram-négative de la famille des *Pasteurellaceae*. Elle est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, maladie contagieuse responsable de pertes économiques importantes partout à travers le monde où l'on retrouve une production porcine intensive. L'infection chez le porc est parfois fatale et les animaux convalescents peuvent devenir des porteurs sains (Nicolet, 1992). La forme asymptomatique de la maladie, ou infection sous-clinique, peut être la seule manifestation de la maladie ou succéder aux formes suraigües ou aigües.

Douze sérotypes NAD-dépendants (NAD: nicotinamide adénine dinucléotide) sont jusqu'à maintenant décrits sur la base de différences au niveau du matériel capsulaire (Nielsen, 1986b). Au Québec, les sérotypes 5 et 1 sont dans l'ordre les plus fréquemment rencontrés dans les cas aigus de pleuropneumonie (Mittal et Higgins, 1994). Chez les porcs infectés de façon sous-clinique, la fréquence d'isolement des souches du sérotype 1 à partir des amygdales et/ou des cavités nasales est égale à celle des souches du sérotype 5 (Mittal et coll., 1992).

Au Québec, le moyen le plus efficace pour détecter les animaux porteurs dans des troupeaux infectés mais ne présentant pas de signes cliniques, est actuellement la sérologie. Cependant, les tests sérologiques sont limités en termes de sensibilité (résultats faussement négatifs) et de spécificité (résultats faussement positifs). Des résultats positifs à ces tests sont souvent mis en doute lorsqu'il n'y a aucune évidence clinique ou pathologique de l'infection.

Il est démontré que l'isolement de la bactérie à partir des amygdales et/ou des cavités nasales s'avère un bon complément à la sérologie (Sidibé et coll. 1993). Toutefois, ces sites sont fortement colonisés par une multitude de micro-organismes constituant la flore commensale. La mise en évidence d'*A. pleuropneumoniae* à partir d'échantillons d'amygdales ou d'écouvillonnages nasaux s'avère très difficile et laborieuse, même en utilisant des milieux sélectifs (Kume et coll., 1984; Sidibé et coll., 1993; Jacobsen et Nielsen, 1995).

Le premier objectif de la présente étude consistait à développer une méthode immunomagnétique pour isoler de façon sélective *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 à partir d'amygdales de porcs afin d'améliorer la détection des animaux porteurs asymptomatiques.

Le deuxième objectif était d'étudier la variation phénotypique et génomique d'isolats d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 5 provenant de cas d'infections cliniques et sous-cliniques.

I I. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1- Taxonomie

La taxonomie de l'agent responsable de la pleuropneumonie porcine a subi de nombreux changements depuis sa découverte à la fin des années 1950. La maladie est pour la première fois rapportée en Angleterre par Pattison et coll.(1957), Matthews et Pattison (1961) et Olander (1963) aux États-Unis. Ce dernier met en évidence la similitude de l'agent infectieux avec les souches d' *Haemophilus parahaemolyticus* d'origine humaine caractérisées et classifiées par Pittman (1953). Le nom d' *Haemophilus pleuropneumoniae* est ensuite donné à l'agent responsable d'une infection similaire décrite en Argentine par Shope (1964). Suite à des analyses biochimiques plus poussées, Kilian et coll. (1978) confirment cette désignation et proposent de classer ces souches avec la souche Shope 4074 (Shope 1964) comme souche-type.

Des études d'homologie de l'ADN permettent à Pohl et coll. (1983) de conclure que *H. pleuropneumoniae* est en fait plus proche d'*Actinobacillus lignieresii* que d' *Haemophilus influenzae*, ce qui les incite à transférer *H. pleuropneumoniae* dans le genre *Actinobacillus* et de lui donner le nom d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*. À l'intérieur de cette nouvelle espèce, se distingue deux biotypes; le biotype 1 désignant les souches nécessitant le facteur V (dont le NAD : nicotinamide adénine dinucléotide) pour leur croissance et le biotype 2 référant aux souches NAD-indépendantes.

A. pleuropneumoniae est un coccobacille pléomorphe Gram négatif, non-mobile, anaérobie facultatif et non-sporulé. Une hémolyse complète sur gélose sang est observée et accentuée en présence d'une strie de

Staphylococcus aureus (réaction de CAMP). C'est selon ce caractère qu'ont été classifiés les premiers isolats d'*Haemophilus parahaemolyticus* (Pattison et coll., 1957; Olander, 1963 et Shope, 1964). Ce micro-organisme possède un métabolisme fermentaire varié et dégrade rapidement l'urée.

2- Sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

La sérotypie d'*A. pleuropneumoniae* est basée sur les différences entre les polysaccharides capsulaires (Nielsen, 1986a). Jusqu'à présent 12 sérotypes, incluant le sérotype 5 qui a été subdivisé en sous-types a et b, ont été décrits parmi les souches NAD-dépendantes (Nielsen, 1986b). À l'intérieur du biotype 2, on retrouve les sérotypes 1 et 2 (Fodor et coll., 1989). Très récemment, Nielsen et coll. (1997) démontrent que huit souches d'*A. pleuropneumoniae* biotype 2 s'avèrent antigéniquement différentes des 12 sérotypes du biotype 1 et des 2 sérotypes du biotype 2. Le sérotype 3 du biotype 2 est donc proposé.

Tout d'abord, Nicolet et coll. (1971) décrivent les sérotypes 1, 2 et 3 en utilisant l'agglutination et l'immunofluorescence. Les sérotypes 4 et 5 sont identifiés par Gunnarsson et coll. (1977) à l'aide de l'agglutination en tube et de l'immunodiffusion. Le sérotype 5 sera plus tard subdivisé en 5a (souche K17) et 5b (souche L20) par Nielsen (1986a) en utilisant des techniques d'héماغglutination indirecte, d'agglutination sur lame et d'immunodiffusion. Le sérotype 6 est rapporté par Nielsen (1982) et le sérotype 7 est identifié avec l'immunofluorescence indirecte par Rosendal et Boyd (1982). Les sérotypes 8, 9 et 10 sont décrits respectivement par

Nielsen et O'Connor (1984) et Nielsen (1985a ; 1985b) à l'aide de l'immunodiffusion en gel et de l'hémagglutination. Suite à une étude de Kamp et coll. (1987), le sérotype 11 est proposé. Finalement, Nielsen (1986b) décrit le sérotype 12 par la technique d'immunodiffusion.

2.1- Parenté antigénique entre les différents sérotypes

La parenté antigénique entre certains sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* est à l'origine des réactions croisées observées lors des tests sérologiques. On retrouve des réactions croisées entre les sérotypes 1, 9 et 11, entre les sérotypes 3, 6, 8 ainsi qu'entre les sérotypes 4 et 7.

Nielsen (1985a), rapporte des antigènes communs, thermostables et de nature polysaccharidique entre des souches du sérotype 1 et du sérotype 9. Des résultats similaires sont observés par Mittal (1990), Mittal et Kobisch (1993), Perry et coll. (1990) et Rapp et coll. (1986). La présence des réactions croisées entre les sérotypes 1, 9 et 11 serait attribuable à des épitopes communs associés aux lipopolysaccharides (LPS). Perry et coll. (1990) démontrent, par analyse chimique, immunodiffusion et résonance magnétique que la chaîne "O" polysaccharidique du LPS est un des déterminants antigéniques communs aux sérotypes 1, 9 et 11. Ces observations sont corroborées par Nakai et coll. (1992) et Lairini et coll. (1995) qui, à l'aide d'anticorps monoclonaux, rapportent une structure de la chaîne "O" très similaire pour ces trois sérotypes. Inzana et Mathison (1987) et Nakai et coll. (1992) démontrent que les polysaccharides capsulaires constituent des déterminants antigéniques spécifiques des sérotypes d' *A. pleuropneumoniae*.

Des réactions croisées sont observées, par immunofluorescence indirecte, entre les sérotypes 4 et 7 (Mittal et Bourdon, 1991). Altman et coll. (1989a) observent une structure chimique similaire entre les chaînes "O" du LPS de ces deux sérotypes.

Nielsen et O'Connor (1984) notent, à l'aide de l'hémagglutination indirecte, que les souches des sérotypes 6 et 8 possèdent des déterminants antigéniques capsulaires communs de nature polysaccharidique; par contre, les lipopolysaccharides seraient responsables des réactions croisées observées entre les sérotypes 3 et 8. Altman et coll. (1989b) observent une composition chimique similaire de la chaîne "O" du LPS des souches de sérotype 3 et 6, ce qui pourrait expliquer les réactions croisées observées entre ces deux sérotypes.

Jacques et coll. (1988) proposent, à la suite d'observations effectuées en microscopie électronique de la capsule traitée avec des antisérums homologues ou hétérologues, que les réactions croisées entre les sérotypes 1, 9 (et 11), 4-7, 3-6 et 3-8 seraient attribuables aux LPS tandis que les réactions croisées entre les sérotypes 6 et 8 seraient d'origine capsulaire.

2.2- Méthodes de sérotypie

Afin d'établir un contrôle adéquat de la pleuropneumonie porcine, la connaissance des sérotypes impliqués s'avère nécessaire. De façon générale, les sérums utilisés pour ces méthodes sont obtenus en immunisant des lapins

avec des suspensions de cellules entières formolées ou non des différentes souches de référence des sérotypes d' *A. pleuropneumoniae* (Gunnarsson, 1979; Mittal et coll.,1982; Nicolet et coll.,1971 et Rosendal et coll.,1981). La spécificité de sérotype est obtenue en adsorbant le sérum de lapin avec les souches de référence des autres sérotypes. Pour le sérotype 1, puisque la chaîne O du LPS est antigéniquement similaire à celle des sérotypes 9 et 11, le sérum n'est pas adsorbé avec les souches de références de ces sérotypes afin d'éviter une réduction du titre d'anticorps contre le sérotype 1 (Lairini et coll., 1995). Plusieurs méthodes de sérotypie des souches d' *A. pleuropneumoniae* ont été développées :

- a) L'agglutination lente en tube (Gunnarsson et coll.,1977) et l'agglutination rapide sur lame (Mittal et coll.,1981, 1982 et 1987a). L'agglutination rapide sur lame est aussi efficace que la première mais s'avère moins dispendieuse et plus simple d'exécution. Toutefois, ces deux épreuves ne permettent pas de sérotyper les souches auto-agglutinantes ou non-agglutinantes (Hunter et coll.,1983; Mittal et coll.,1982 et Rapp et coll.,1985).
- b) L'immunodiffusion en gel (Nicolet et coll.,1971; Gunnarsson, 1979 et Rosendal et coll.,1981) est une technique assez spécifique mais qui demeure complexe et coûteuse. De plus, elle requiert des antigènes solubles. Elle possède cependant l'avantage de pouvoir sérotyper les souches auto-agglutinantes.
- c) L'immunofluorescence indirecte (Rosendal et coll.,1981) est rapide et pratique puisque la technique peut se faire à partir de coupes de tissus

pulmonaires ou de culture bactérienne. Après fixation des lames avec une solution de formol, un sérum de lapin anti-*A. pleuropneumoniae* est ajouté et la réaction est révélée par l'addition d'un sérum anti-IgG de lapin couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine. Bien qu'une corrélation ait été établie entre l'immunofluorescence indirecte et l'agglutination rapide sur lame, cette dernière s'avère plus spécifique et sensible (Rapp et coll., 1985).

d) L'épreuve d'hémagglutination indirecte (Mittal et coll., 1983a), qui utilise un extrait salin d' *A. pleuropneumoniae* ajouté à des érythrocytes de mouton, permet de différencier les isolats des sérotypes présentant des réactions croisées (Mittal et coll., 1988, 1989; Mittal, 1990 et Mittal et Bourdon, 1991) .

e) Le test de coagglutination (Mittal et coll., 1983b) utilise des immunoglobulines G de lapin anti-*A. pleuropneumoniae* fixées à la protéine A produite par la souche Cowan I de *Staphylococcus aureus*. Un extrait salin formolé d' *A. pleuropneumoniae* est ajouté à la suspension de *S. aureus* et la réaction d'agglutination est visualisée sur lame. Il s'agit d'une technique plus sensible et plus rapide que les tests d'agglutination, d'hémagglutination indirecte et d'immunodiffusion (Mittal, 1990). Elle permet de détecter les antigènes solubles et particulaires (Hunter et Livingstone, 1986).

f) L'agglutination utilisant des billes de latex (Inzana, 1995) ou de polystyrène (Dubreuil et coll., 1996) constitue un test très rapide (moins de 3 minutes) et simple d'exécution. Des anticorps polyclonaux ou

monoclonaux spécifiques de sérotype sont adsorbés sur les billes puis celles-ci sont mises en présence d'une suspension de cellules entières d'*A. pleuropneumoniae*. La réaction d'agglutination est visualisée sur lame. Le désavantage de ce test est qu'il ne permet pas de sérotyper les souches auto-agglutinantes.

- g) La technique de contre-immunoelectrophorèse (Piffer et coll.,1986) constitue une méthode rapide et simple pour détecter de très faible quantité d'antigène. Deux préparations antigéniques, soit un extrait salin et la phase aqueuse d'une extraction au phénol aqueux chaud, sont mise en présence d'un antisérum adsorbé avec des cellules entières d'une souche hétérologue.
- h) La sérotypie par chromatographie sur papier (Utrera et coll.,1988) utilise des cellules d' *A. pleuropneumoniae* homogénéisées et des antisérums adsorbés qui sont mis en présence de cellules de *S. aureus* (souche Cowan I). Le mélange sérum-*S. aureus* est coloré au bleu de toluidine. Les deux réactifs sont déposés sur une languette de papier filtre, à 2 cm de la bordure inférieure. La languette est ensuite placée dans de l'eau distillée jusqu'à une hauteur de 1 cm à partir du bas. Lorsque l'eau a été adsorbée jusqu'à une hauteur de 4 cm, on effectue la lecture des résultats. Une non-mobilité des taches indique un résultat positif; une traînée bleue, un résultat négatif. L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'elle ne requiert pas la préparation d'extraits salins et qu'elle permet de sérotyper les souches auto-agglutinantes ou non-agglutinantes.

Dans une étude portant sur la caractérisation sérologique de 3446 souches d'*A. pleuropneumoniae* isolées au Québec, Mittal et coll. (1992) utilisent plusieurs méthodes de sérotypage, seule ou en combinaison: agglutination sur lame et en tube, la précipitation en anneaux, la coagglutination, l'immunodiffusion, l'hémagglutination indirecte et la contre-immunoelectrophorèse.

Au cours de la dernière décennie, les méthodes de sérotypie ont continué d'évoluer, permettant d'établir une classification sérologique plus précise. Des tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes spécifiques ont été développés et ont permis de solutionner les problèmes de réactions croisées observés avec les anticorps polyclonaux de lapin (Lida et coll.,1990; Lacouture et coll., 1997). L'identification du sérotype par des techniques moléculaires est développée par Hennessy et coll. (1993) où une réaction de polymérisation aléatoire en chaîne (AP-PCR) permet de classer les isolats non-typables et ceux qui démontrent des réactions croisées.

2.3- Distribution des sérotypes

La pleuropneumonie porcine est rapportée dans presque tous les pays où la production porcine est industrialisée. La distribution des sérotypes est très variable d'une région géographique à l'autre.

Tableau 1. Sérotypes dominants d'*A. pleuropneumoniae* dans différentes régions géographiques.

Pays	Sérotype	Référence
Allemagne	9, 2, 7	Muller et coll., 1986
Argentine	1	Vena et coll., 1988
Australie	1	Eaves et Blackwell, 1988
Canada	1, 5	Mittal et coll., 1992
Chili	1	Olivares et Morgado, 1988
Danemark	2, 5b et 6	Jacobsen et coll., 1996
Espagne	4	Ferri et coll., 1990
États-Unis	1, 5	Fales et coll., 1989
Hongrie	1	Molnar, 1990
Mexique	1	Ciprian et coll., 1988
Pologne	1	Molenda, 1988

Les premières évidences de l'existence de cette affection respiratoire au Québec remonte à la fin des années 70, période d'expansion et d'intensification de la production porcine (Higgins et coll., 1982; Owen, 1984). Au Québec, Mittal et coll. (1992) rapportent dans une étude récente une prévalence du sérotype 1 entre 1980 et 1990 qui varie entre 53% et 87% (moyenne de 68%) des souches isolées. Le sérotype 5 (5a et 5b confondus)

est second avec une prévalence variant entre 9% et 30% (moyenne de 23%). Les sérotypes 2, 3, 6, 7, 8, 10 et 12 sont peu impliqués (9% des souches isolées). L'isolement des sérotypes 4, 9 et 11 quant à eux n'a jamais été rapporté au Québec jusqu'à ce jour. Le sérotype 1 s'avère le plus virulent alors que le sérotype 3 semble le moins virulent (Mittal et coll.,1992). Dans cette même étude on retrouve chez les porcs infectés chroniquement une prévalence des souches isolées à partir des amygdales et/ou des cavités nasales de 48% pour le sérotype 1, 49% pour le sérotype 5 et 22% pour le sérotype 7. Dans une étude plus récente, Mittal et Higgins (1994) rapportent qu'à partir de l'année 1991, le pourcentage de souches isolées de cas cliniques appartenant au sérotype 1 a considérablement diminué, atteignant 30% en 1993. Pour cette même année, on retrouve une prévalence dominante du sérotype 5 (44%) et une légère augmentation du sérotype 7 (12%) .

3- Variations génotypiques des souches d' *A. pleuropneumoniae*

Rapp et coll. (1986) étudient les profils des protéines de la membrane externe (OMP: outer membrane protein) d' *A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 à 9 par SDS-PAGE. Ils démontrent un profil identique entre les souches de référence des sérotypes 1 et 9 et entre les sérotypes 2 et 6. Les sérotypes 3, 4, 5, 6 et 7 présentent chacun un profil unique. Les profils de souches de champs des sérotypes 1, 5, 7 et 9 sont comparés aux souches de références respectives. Pour le sérotype 1, huit souches sur 15 ont un profil identique à la souche de référence, les souches de champs des sérotypes 7 et 9 ont un profil identique à la souche de référence respective et 67 souches de champs du sérotype 5 sur 70 partagent le même profil et sont similaires mais non-

identiques à la souche de référence. Ceci semble indiquer une clonalité à l'intérieur des souches des sérotypes 1, 5, 7 et 9.

MacInnes et coll. (1990) font l'étude des sérotypes 1 à 10 par analyse des empreintes générées par les endonucléases de restriction (REF: restriction endonuclease fingerprinting) *Bam*HI et *Hind*III. Les profils de REF des souches de références des sérotypes 1 et 9 se sont avérés identiques, alors que les sérotypes 2 à 8 montrent des profils très différents. Les profils de REF des isolats de champs des sérotypes 1, 5 et 7 sont similaires à la souche de référence respective. À l'intérieur du sérotype 1 et du sérotype 5, les isolats de champs sont tous similaires. Les profils de REF des isolats de champs du sérotype 7 montrent une plus grande variation. Aussi, sept isolats du sérotype 1 provenant d'un troupeau fermé présentent des similitudes mais ne sont pas identiques, suggérant ainsi qu'il existe un certain polymorphisme génétique à l'intérieur de populations clonales.

Une étude sur la relation génétique entre les souches de référence des sérotypes 1 à 12 par des techniques d'hybridation ADN-ADN et par REF est décrite par Borr et coll. (1991). L'hybridation ADN-ADN montre une homogénéité des sérotype 1 à 12, avec une homologie de séquence entre 74% et 90% avec la souche de référence du sérotype 1. Les profils de REF obtenus avec les endonucléases de restriction *Bam*HI et *Hind*III sont uniques à chaque sérotype.

Moller et coll. (1992) évaluent la diversité génétique, par "multilocus enzyme electrophoresis" (MEE), de 250 isolats d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1, 2, 6-10 et 12 provenant de poumons (cas cliniques) et

d'amygdales (cas sous-cliniques) dans différentes régions. Au total, 66% des isolats appartiennent à trois types électrophorétiques (TE) sur 37 types différents, ce qui démontre la structure clonale des isolats d' *A. pleuropneumoniae*. De plus, les isolats d'amygdales présentent le même TE que les souches de poumons. Une plus grande diversité génétique intra-sérotype est présente chez les sérotypes 7, 8 et 12. Les sérotypes 1 et 5 appartiennent à des TE différents. À l'intérieur du sérotype 1, sur un total de 26 isolats (19 isolats de poumons et sept isolats d'amygdales), on retrouve neuf TE différents formant un total de trois sous-populations. Les sept isolats d'amygdales partagent le même TE que trois souches de poumons. La souche de référence du sérotype 1 présente un TE unique et sept souches de poumons isolées au Canada appartiennent à deux TE différents. À l'intérieur du sérotype 5, les 26 souches (20 isolats de poumons et six isolats d'amygdales) appartiennent à trois TE différents et sont regroupées en deux sous-populations.

Hampson et coll. (1993) caractérisent aussi par MEE les souches de référence des sérotypes 1 à 12 et 52 isolats de champs de différents pays. Au total, 33 TE sont trouvés et groupés en huit clones différents. Les souches de référence des sérotypes 9 et 11 présentent le même TE que la souche de référence du sérotype 1. Sur les 12 isolats du sérotypes 1, quatre TE sont trouvés mais le peu de différence allélique les regroupe dans le même clone. Les sérotypes les plus hétérogènes, où deux clones ou plus sont trouvés, sont les sérotypes 3, 7, 11 et 12.

Beck et coll. (1994) analysent le génotype et le phénotype des souches de référence des sérotypes 1 à 12 et de 204 souches de champs par hybridation

ADN-ADN et immunoblot. Les souches de référence et de champs à l'intérieur des sérotypes 1, 5a et 5b, 9 et 11 sont toutes identiques, excepté une souche de champs du sérotype 11.

Rychlik et coll. (1994) analysent les empreintes génomiques des souches de référence des sérotypes 1 à 12 obtenues par REF avec les endonucléases de restriction *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Hinf*I, *Pst*I et *Amersham*. Des empreintes de DNA uniques et identiques sont observées avec les sérotypes 1, 9 et 11, tandis que les souches 2 à 8, 10 et 12 sont distinctes les unes des autres.

4- Pathogénie de la pleuropneumonie porcine

A. pleuropneumoniae possède une spécificité d'hôte très élevée et affecte essentiellement le système respiratoire porcine (Nicolet,1971). La maladie est associée aux conditions de stress engendrées par un système d'élevage intensif. Après inhalation d'un nombre suffisant d'*A. pleuropneumoniae*, les animaux susceptibles développent une pneumonie aiguë fibrino-hémorragique. Une infection antérieure ou concomitante par d'autres pathogènes du tractus respiratoire, notamment *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* toxigénique et certains virus, dont le virus de la pseudorage et le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcine, peut augmenter la sévérité de l'infection causée par *A. pleuropneumoniae* (Kobisch et coll.,1993; Fenwick et Henry, 1994).

Le développement de la maladie dépend de plusieurs facteurs qui sont interreliés: le niveau de stress et le statut immunitaire de l'animal, le manque

d'hygiène, les changements brusques de température, l'humidité, le transport, une ventilation déficiente, l'entassement et finalement le degré de virulence de la souche impliquée (Fenwick et Henry, 1994). Plus d'un sérotype peuvent être retrouvés chez un même animal (Taylor, 1995).

Des différences significatives dans la virulence sont observées parmi les 12 sérotypes, les sérotypes 1 et 5 étant les plus fréquemment impliqués, en Amérique du Nord, dans les cas d'épidémies sévères avec taux élevé de mortalité. Les sérotypes 3, 4, 6, 7, 8 et 12 sont généralement moins virulents et causent moins de mortalité (Nicolet, 1992). On observe aussi une variation dans la virulence de souches du même sérotype (Rosendal et coll., 1985; Vaillancourt et coll., 1987; Nicolet, 1992).

Au cours des dernières années, les connaissances concernant les facteurs impliqués dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* et la pathogénie de la maladie ont considérablement augmentées. Plusieurs facteurs de virulence sont reportés :

- a) les exotoxines protéiques appartenant à la famille des toxines RTX (repeats in the structural toxin), considérées comme étant les facteurs de virulence majeurs d'*A. pleuropneumoniae* (Kamp et coll., 1991; Frey et coll., 1993, 1994) (tableau 2). Les différentes toxines RTX, désignées Apx, sont classées selon leur activité hémolytique et cytotoxique. ApxI (105kDa) est fortement hémolytique et fortement cytotoxique envers les cellules phagocytaires et elle est produite chez les sérotypes 1, 5a, 5b, 9, 10 et 11. ApxII (103-105kDa) possède une activité hémolytique et cytotoxique modérée et est produite par tous les sérotypes sauf le

sérotype 10. ApxIII (120 kDa), présente chez les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8, n'est pas hémolytique mais fortement cytotoxique pour les macrophages et les neutrophiles (Frey, 1995). Des mutants non-hémolytiques, induits par insertion d'un transposon dans l'opéron *apxIB* qui est impliqué dans l'exportation des toxines ApxI et ApxII, s'avèrent non-pathogènes chez le porc (Tascon et coll.,1994). Les différents degrés de virulence observés entre les 12 sérotypes sont corrélés aux patrons de production des toxines RTX, ceux produisant ApxI et ApxII étant les plus virulents (Frey et coll.,1994; Komal et Mittal,1990) (tableau 2). Un mutant de sérotype 5 induit par mutagenèse chimique et ne sécrétant ni ApxI ni ApxII s'avère non-pathogène chez le porc et la souris (Inzana et coll.,1991). Un mutant de la souche de référence 4074 du sérotype 1 ne produisant pas ApxI et ApxII n'induit pas la destruction des neutrophiles porcins, contrairement à la souche-mère (Jansen et coll.,1995).

Tableau 2. Production des toxines Apx par les différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

Sérotypes	ApxI	ApxII	ApxIII
1	x	x	
2		x	x
3		x	x
4		x	x
5a	x	x	
5b	x	x	
6		x	x
7		x	
8		x	x
9	x	x	
10	x		
11	x	x	
12		x	

b) les lipopolysaccharides (LPS), qui possèdent une activité toxique (endotoxine). Les LPS sont constitués de trois parties: 1) l'antigène O polysaccharidique, 2) le core oligosaccharidique et 3) le lipide A (Fenwick, 1990). La chaîne polysaccharidique est formée d'unités répétitives composées d'une à quatre unités saccharidiques: elle constitue l'antigène O. Cette chaîne est rattachée à la membrane externe via un oligosaccharide composé de glucose, de galactose et de N-acétyl glucosamine, appelé le core externe (outer core). Ce core externe est lié à un core interne composé d'heptose, de KDO (2 Keto-3-desoxyoctanate)

et de pyro-phosphoryl-éthanolamine. Le KDO est à son tour attaché au lipide A qui est enveloppé par la membrane externe de la bactérie (Fenwick, 1990). Les LPS d' *A. pleuropneumoniae* sont exposés à la surface cellulaire sous la forme de vésicules (ou "blebs") traversant la couche capsulaire (Jacques et coll.,1988). Le LPS d' *A. pleuropneumoniae* active la voie alternative du complément (Inzana et coll.,1991) et stimule la production de cytokines inflammatoires telles que le "tumor necrosis factor" (TNF), l'interleukine 1 (IL-1) et l'IL-8 par les macrophages alvéolaires (Baarsch et coll.,1991; Huether et coll.,1993; Lin et coll.,1994). La surproduction de ces cytokines inflammatoires, surtout IL-1 et IL-8, dans les poumons accentue les dommages tissulaires et contribue à la sévérité de l'infection (Baarsch et coll.,1995). Toutefois, le LPS d'*A. pleuropneumoniae* n'affecte pas les cultures de neutrophiles porcins (Idris et coll.,1992). Le LPS d' *A. pleuropneumoniae* semble aussi jouer un rôle important dans la colonisation du tractus respiratoire du porc. Bélanger et coll. (1990) démontrent que le LPS est l'adhésine majeure impliquée dans l'adhérence d' *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 aux anneaux de la trachée porcine. Dom et coll. (1994) observent une adhérence *in vivo* d'une souche d' *A. pleuropneumoniae* sérotype 2 aux cellules épithéliales des poumons. Une affinité du LPS, chez certaines souches d' *A. pleuropneumoniae*, pour les sécrétions du tractus respiratoire porcine est également démontrée (Bélanger et coll.,1992; 1994). Paradis et coll. (1994) décrivent une adhérence du LPS à l'endothélium vasculaire, au mésenchyme pulmonaire et à l'épithélium trachéal du porc. Le lipide A du LPS s'avère responsable de la liaison du LPS à l'hémoglobine de porc. Pour certains isolats, cette liaison du LPS à l'hémoglobine représenterait une façon d'acquérir le fer *in vivo*, lequel

est relâché par les érythrocytes lysés par l'action des hémolysines d'*A. pleuropneumoniae* (Bélanger et coll.,1995). Des conditions réduites en fer libre, chez le sérotype 1, affecte l'expression du LPS en augmentant l'accessibilité de celui-ci à la surface cellulaire (Paradis et coll.,1996).

- c) la capsule, qui protège la bactérie contre les défenses de l'hôte. La capsule d' *A. pleuropneumoniae* est composée de polysaccharides chargés négativement. La structure est de type acide téichoïque formé par la répétition d'une unité dissaccharidique composée d'une unité 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, d'une unité D-galactose et d'un groupement O-acétyl (Altman et coll., 1986a). Des propriétés anti-phagocytaires sont associées à la capsule (Inzana, 1990). Celle-ci confère la résistance à l'action bactéricide du sérum et du complément, même en présence d'anticorps contre la capsule ou contre des antigènes somatiques (Inzana et coll.,1988; Rycroft et Cullen, 1990). Un mutant n'exprimant pas de capsule est facilement détruit et ce même en l'absence d'anticorps spécifiques (Inzana et coll.,1988). Le mécanisme en cause n'est pas très clair mais une étude de Ward et Inzana (1994) démontre qu'en fait la capsule n'empêche pas l'activation du complément mais elle limite la déposition du complexe d'attaque de la membrane par le complément. De plus, des anticorps spécifiques au LPS et présents dans le sérum normal semblent agir en synergie avec la capsule en bloquant l'activité des anticorps anti-capsule, limitant ainsi la capacité du complément à lyser *A. pleuropneumoniae* (Ward et Inzana,1994).

- d) les protéines de la membrane externe (OMP's). On retrouve trois à cinq protéines majeures et 10 à 20 protéines mineures dans la membrane externe des souches d' *A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 à 9 (Inzana, 1991). Sous des conditions réduites en fer libre, les souches des sérotypes 1 à 5 et 7 produisent de nouvelles protéines qui sont immunologiquement conservées (Inzana, 1991). Certaines de ces protéines sont identifiées comme récepteurs spécifiques pour la transferrine porcine (i.e. glycoprotéine retrouvée dans le sang et qui est impliquée dans la liaison et le transport du fer libre) et sont responsables, en partie, pour la spécificité d'hôte d' *A. pleuropneumoniae* (Gonzalez et coll.,1990; Niven et coll.,1989; Ricard et coll.,1991).
- e) les protéases extracellulaires. Des protéases présentes dans le surnageant de culture d'une souche du sérotype 1 sont décrites par Negrete-Abascal et coll. (1994). Ces protéases dégradent la gélatine porcine, l'hémoglobine porcine, bovine et humaine et les immunoglobulines A de porc. Elles pourraient faciliter l'invasion tissulaire et être impliquées dans les lésions sévères causées par *A. pleuropneumoniae*.

5. Épidémiologie des infections à *Actinobacillus pleuropneumoniae*

5.1 Transmission de la pleuropneumonie porcine

L'infection à *A. pleuropneumoniae* se transmet par contact direct et par voie aérienne. La transmission par l'intermédiaire des aérosols est particulièrement active lors d'infections aiguës où la bactérie, logée dans les voies respiratoires, les amygdales et/ou les cavités nasales, est excrétée de

façon massive (Nicolet, 1992). L'organisme survit quelques heures dans l'air ambiant si le taux d'humidité est élevé et la température est basse (Taylor, 1995). La maladie affecte essentiellement les porcelets en pouponnière et les porcs à l'engraissement, bien que tout les groupes d'âges peuvent être atteints. Au Québec, la maladie affecte surtout les animaux à l'engraissement (Vaillancourt et coll.,1987). Le repeuplement périodique des élevages favorise l'incidence de l'infection (Nicolet, 1992). Les animaux infectés de façon sous-clinique constituent de loin le principal réservoir et vecteur de transmission de l'infection entre troupeaux (Nicolet, 1992; Fenwick et Henry, 1994).

5.2 Statut sanitaire des troupeaux

Selon Fenwick et Henry (1994), on peut distinguer trois catégories de troupeaux selon leur statut envers *A. pleuropneumoniae*: 1) les troupeaux sérologiquement positifs ne présentant pas de signes cliniques (la majorité), 2) les troupeaux sérologiquement négatifs et cliniquement indemnes et 3) les troupeaux sérologiquement positifs où un diagnostic pathologique et bactériologique ont confirmé l'infection.

Les conséquences de l'introduction de l'agent infectieux dépend du statut immunitaire du troupeau, de la région et de la virulence de la souche. Les porcs de la catégorie 2 sont les plus vulnérables et l'introduction de porteurs asymptomatiques peut avoir des conséquences désastreuses. Cependant, si les conditions d'élevage sont adéquates, les risques de manifestations cliniques épidémiques sont considérablement diminués. Aussi, si le troupeau est déjà infecté par *A. pleuropneumoniae*, les risques de développer

la maladie sont augmentés. Les études sérologiques démontrent que sur une base de troupeaux, les manifestations cliniques sont rares et les infections sous-cliniques sont la règle et non l'exception. La majorité des troupeaux de porcs (approximativement 80%), peu importe la région géographique, sont sérologiquement positifs pour *A. pleuropneumoniae* mais seulement une faible proportion de ces troupeaux possède des animaux présentant des signes cliniques. Le développement de signes cliniques dans un troupeau infecté sous-cliniquement peut être la conséquence d'une augmentation des facteurs de risques (décrits précédemment).

L'existence des infections sous-cliniques peut s'expliquer par trois phénomènes qui permettent à l'animal de combattre l'infection: une faible virulence de la souche, des facteurs de risques réduits et contrôlés et l'immunité passive colostrale chez les nouveaux-nés. Les nouveaux-nés ainsi protégés peuvent devenir porteurs après avoir été infectés par *A. pleuropneumoniae*, infection qui peut survenir entre 11 et 21 jours d'âge. Les animaux survivant à l'infection peuvent agir comme porteurs asymptomatiques pendant des mois et ont le potentiel d'excréter le micro-organisme (Fenwick et Henry, 1994; Taylor, 1995).

6- Diagnostic des infections sous-cliniques

6.1- Diagnostic sérologique

C'est au niveau des troupeaux ne présentant pas de signes cliniques que la sérologie devient un outil de diagnostic important pour déterminer s'il y a infection ou non. La sérologie permet d'identifier les animaux qui ont

développé des anticorps en réponse à une exposition à *A. pleuropneumoniae*. Ces anticorps peuvent être détectés entre 10 et 14 jours après l'exposition, naturelle ou expérimentale, et atteindre un niveau maximal environ 4 à 6 semaines après l'infection. Ils persistent plusieurs mois après la disparition des lésions, assurant ainsi une protection contre une nouvelle infection (Nielsen, 1988; Nicolet, 1992). La persistance des anticorps pourrait peut-être aussi s'expliquer par une persistance de l'infection.

6.1.1- Méthodes sérologiques

Plusieurs tests sérologiques pour la détection d'anticorps anti-*A. pleuropneumoniae* ont été mis au point. Les plus couramment utilisés sont le test de fixation du complément (CFT) (Nicolet et coll.,1971; Lombin et coll.,1982) et différents tests ELISA (Nicolet et coll.,1981; Goyette, 1986; Bossé et coll.,1990b; Nielsen et coll.,1991; Trottier et coll.,1992). Ces épreuves permettent de classer les sérotypes en 5 groupes, soit 1-9-11; 2; 3-6-8; 4-7 et 5a et 5b (Vaillancourt et coll.,1988).

Le CFT a constitué pendant plusieurs années l'épreuve sérologique de référence, malgré sa complexité d'exécution, sa standardisation difficile et sa très faible sensibilité (Nicolet et coll.,1971; Stenbaek et coll.,1997). De plus, l'activité pro-complémentaire et anti-complémentaire de certains sérums de porcs rend ce test impossible à exécuter (Gottschalk, 1991). Gottschalk et coll. (1994a et 1994b) rapportent des sensibilités du CFT de 60% et 47% pour les sérotypes 1 et 5, respectivement.

L'ELISA est sans contredit l'épreuve qui offre le plus d'avantages d'un point de vue technique et qui combine le mieux sensibilité et spécificité. De plus, elle peut être automatisée pour permettre l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (Nicolet, 1992). Au cours des dernières années, une multitude de tests ELISA ont été développés, différant essentiellement dans l'antigène utilisé. Ce dernier peut être constitué de la bactérie entière ou d'extraits bruts de la bactérie entière d'*A. pleuropneumoniae* (Nielsen et coll.,1991; Trottier et coll.,1992). Des polysaccharides capsulaires et des LPS partiellement purifiés sont aussi utilisés en ELISA (Fenwick et Osburn, 1986; Bossé et coll.,1990a et 1990b). Radacovici et coll. (1992) démontrent que l'utilisation du LPS à longue chaîne (LPS-LC) purifié comme antigène améliore la spécificité du test ELISA et facilite sa standardisation. Gottschalk et coll. (1994a, 1994b et 1997) évaluent le LPS à longue chaîne (LPS-LC) des sérotypes 1, 5 et 7 et démontrent que le LPS-LC permet une diminution considérable des réactions croisées avec les autres sérotypes et une augmentation de la spécificité et de la sensibilité, comparativement aux résultats obtenus avec l'extrait brut. Radacovici et coll. (1995) montrent que la culture d' *A. pleuropneumoniae* sérotype 5 en milieu liquide permet d'obtenir une plus grande quantité de LPS-LC que la culture sur milieu solide. Le LPS-LC est l'antigène présentement utilisé en ELISA au laboratoire de diagnostic de la pleuropneumonie porcine de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

D'autres tests variés sont également décrits:

- Mittal et coll. (1984) développent l'agglutination en tube en présence de 2-mercaptoéthanol (2-ME) comme méthode alternative à l'épreuve de

déviations du complément. L'addition de 2-mercaptoéthanol détruit l'activité des IgM, anticorps souvent impliqués dans les réactions croisées. Cette technique, bien qu'elle soit plus simple d'exécution que l'épreuve CFT, ne permet pas l'analyse rapide d'un grand nombre de sérums.

- La technique de RIA (radioimmunoassay) développée par Inzana et coll. (1990) pour la détection d'anticorps contre *A. pleuropneumoniae* s'avère très sensible (détecte 1 ng d'anticorps spécifique) mais peu spécifique et exigeant un équipement sophistiqué.
- Le test immunoenzymatique par inhibition (EIA) est basé sur l'inhibition de la fixation d'anticorps monoclonaux spécifiques de sérotype par des anticorps du sérotype homologue présents dans le sérum. Stenbaek et Schirmer (1994) développent un test pour la détection d'anticorps spécifiques au sérotype 2 où les réactions croisées avec les autres sérotypes d' *A. pleuropneumoniae* ou avec les organismes apparentés sont absentes. Dans une étude ultérieure avec le sérotype 5, Stenbaek et coll. (1997) observent pour le test d'inhibition une sensibilité inférieure à l'ELISA (LPS-LC), mais une sensibilité et une spécificité supérieure au CFT.
- Un ELISA utilisant un monoclonal de lapin contre l'hémolysine de 104 kDa est développé par Devenish et coll. (1990). Les sérums de porcs infectés expérimentalement avec les sérotypes 1, 2, 5 et 7 d' *A. pleuropneumoniae* sont positifs avec ce test, tout comme les sérums de porcs infectés naturellement par *Actinobacillus suis*.
- Le test d'inhibition de l'hémolysine rapporté par Crujisen et coll. (1995) permet de détecter les anticorps produits contre l'hémolysine, facteur de virulence très important, et s'avère très sensible. Par contre, ce test ne

permet pas de déterminer le sérotype impliqué, il est compliqué à réaliser et est plus dispendieux que les tests ELISA. De plus, des réactions croisées avec *A. suis* sont observées.

6.1.2- Problématique reliée à la sérologie

La sérologie constitue certes un outil performant dans la détermination du statut sanitaire des troupeaux envers *A. pleuropneumoniae*. Cependant, il faut garder à l'esprit les points suivants :

- 1) un test sérologique positif indique que l'animal a été exposé à la bactérie mais n'implique pas que l'agent est encore présent chez l'animal;
- 2) un test sérologique négatif peut être présent a) chez un animal non-infecté, b) chez un animal infecté depuis un certain temps chez qui les anticorps ont disparu, c) chez un animal récemment infecté où des anticorps spécifiques n'ont pas encore été produits ou ne sont pas encore détectables;
- 3) certains animaux peuvent être porteurs de la bactérie depuis un certain temps sans présenter de réponse sérologique (Gottschalk, 1991).

Aussi, un test sérologique positif peut être le résultat d'une exposition de l'animal à un micro-organisme présentant des antigènes communs avec *A. pleuropneumoniae* (réactions croisées). Les tests sérologiques doivent donc être interprétés avec précaution: un résultat faussement négatif ne permettra pas de détecter les troupeaux infectés et un résultat faussement positif condamnera à tort un troupeau non-infecté. De plus, chez les troupeaux

infectés sous-cliniquement, la prévalence d'animaux séropositifs peut être relativement faible, ce qui augmente le risque de faux-négatifs. Finalement, la sérologie ne permet pas de différencier les souches virulentes des souches non-virulentes et des troupeaux de haut niveau génétique, infectés avec des souches avirulentes, risquent d'être condamnés à tort.

6.2- Diagnostic bactériologique: détection de la bactérie

L'isolement d' *A. pleuropneumoniae* à partir des poumons confirme généralement le diagnostic des infections cliniques. Dans les élevages infectés de façon sous-clinique, la culture des poumons ne permet généralement pas d'isoler l'agent pathogène (Nielsen, 1970). La détection des animaux porteurs asymptomatiques est d'une importance extrême puisqu'ils constituent la source majeure de transmission de la maladie entre troupeaux (Nicolet, 1992; Fenwick et Henry, 1994). Dans ces cas, l'isolement de l'agent pathogène est réalisé à partir d'écouvillonnages des cavités nasales et à partir des amygdales, ces dernières permettant un meilleur isolement du germe que les narines (Sidibé et coll. 1993).

Les amygdales constituent un élément important du système immunitaire du porc. La surface des amygdales présente de nombreuses invaginations de quelques centaines de micromètres, ou cryptes, qui sont connectées au tissu lymphoïde (Belz et Heath, 1996). Ces cryptes constituent une porte d'entrée pour de nombreux agents pathogènes majeurs chez le porc: *A. pleuropneumoniae* (Sidibé et coll.,1993), *Pasteurella multocida* (DeJong, 1988) et *Streptococcus suis* (Alexander,1991).

L'isolement d' *A. pleuropneumoniae* à partir des voies respiratoires supérieures de porcs cliniquement sains, mais provenant de troupeaux avec indications sérologiques d'infection, constitue une méthode complémentaire au diagnostic sérologique (Sidibé et coll.,1993). L'absence d'isolement d'*A. pleuropneumoniae* dans des troupeaux avec sérologie atypique constitue un élément pour classer ces élevages comme indemne. Kume et coll. (1984) démontrent une très bonne corrélation sur une base individuelle, pour le sérotype 2, entre le titre sérologique et l'isolement d'*A. pleuropneumoniae* à partir des cavités nasales. Sidibé et coll. (1993) rapportent une forte corrélation sur une base de troupeau, pour le sérotype 5, alors que pour les autres sérotypes, certains troupeaux sont séropositifs mais l'isolement du sérotype correspondant n'est pas réalisé et d'autres sont sérologiquement négatifs alors que la bactérie a été isolée. Une faible corrélation entre les résultats sérologiques et l'isolement à partir des amygdales, sur une base de troupeau, est également retrouvée pour les sérotypes 1 et 2 (Moller et coll., 1993).

Dans une étude de Sidibé et coll. (1993), il est démontré que les sérotypes 1, 2, 3, 5a, 5b, 7, 8, 10 et 12 peuvent se retrouver au niveau des cavités nasales et des amygdales sans causer de manifestations cliniques, ce qui suggère que les souches isolées du tractus respiratoire supérieur seraient possiblement moins virulentes que les souches isolées à partir des poumons chez des animaux malades et seraient incapables de causer une infection aiguë ou que les facteurs de risques sont réduits de façon telle à ce que la maladie ne se développe pas.

L'absence de signes cliniques et/ou de lésions caractéristiques à l'abattoir et des résultats négatifs à la culture d'*A. pleuropneumoniae* ne signifient pas nécessairement que le germe est absent du troupeau (Gottschalk, 1991; Fenwick et Henry, 1994).

Le prélèvement des amygdales en vue de l'isolement se fait généralement sur les carcasses des porcs à l'abattoir (Sidibé et coll.,1993; Moller et coll.,1993). Cependant, Barrère et coll. (1993) démontrent l'innocuité d'une biopsie d'amygdales pour la recherche d'*A. pleuropneumoniae*.

La culture d' *A. pleuropneumoniae* à partir d'échantillons provenant des cavités nasales et des amygdales doit être réalisée sur un milieu sélectif puisque la flore normale abondante dans ces régions interfère avec le processus d'isolement de la bactérie qui est souvent présente en faible nombre. Plusieurs types de milieux sélectifs ont été utilisés, avec plus ou moins de succès (Kume et coll.,1984; Sidibé et coll.,1993; Moller et coll.,1993; Jacobsen et Nielsen,1995). Un milieu PPLO additionné de 2 µg/ml de crystal violet, 1 µg/ml de lincomycine, 128 µg/ml de bacitracine et 1 µg/ml de NAD est actuellement utilisé à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (Sidibé et coll, 1993).

Une identification préliminaire d'*A. pleuropneumoniae* est généralement effectuée par les observations-clés suivantes : colonies d'aspect cireux ou mucoïde typiquement hémolytiques sur gélose au sang de mouton, réaction de CAMP positive, dépendance au NAD visualisée sur gélose au sang par un phénomène de satellitisme autour d'une strie de *Staphylococcus aureus*

(source de NAD), réaction positive et souvent très rapide de la dégradation de l'urée sur le milieu urée de Christensen (Fenwick et Henry, 1994).

L'appareil respiratoire du porc peut être infecté par de nombreux agents pathogènes et il importe d'appliquer un diagnostic différentiel qui est relativement facile à réaliser (Tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques différentielles de certaines bactéries fréquemment retrouvées dans le tractus respiratoire du porc.

Caractéristiques	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>H. parasuis</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	taxon Minor group
Hémolyse (sang mouton)	+	+	-	-	-
Réaction de CAMP	+	-	-	-	-
Uréase	+	+	-	-	+
Dépendance au NAD	+ (biotype 1)	-	+	-	+

L'identification est confirmée par le typage sérologique de l'isolat. Cependant, la découverte relativement récente de certaines souches d'*A. pleuropneumoniae* atypiques aux États-Unis, c'est-à-dire appartenant au biotype 2 (NAD-indépendant) et ne produisant pas d'hémolyse ni d'uréase, augmente le risque de mal identifier le micro-organisme (Frank et coll., 1992; Blanchard et coll., 1993). Aucune étude sur la présence de ces souches

atypiques au Canada n'est rapportée jusqu'à maintenant, ce qui n'exclut pas la possibilité de leur existence.

6.3- Diagnostic moléculaire

La construction d'une sonde d'ADN utilisable dans la détection d' *A. pleuropneumoniae* par réaction de polymérisation en chaîne ("polymerase chain reaction" ou PCR) est décrite par Sirois et coll. (1991). Les amorces synthétisées à partir de cette sonde ont permis l'amplification à partir de cultures pures des 12 sérotypes d' *A. pleuropneumoniae* et aucun amplicon n'a été généré avec d'autres espèces bactériennes, sauf *A. lignieresii*, retrouvé chez les bovins et très rarement chez le porc. Ce test ne discrimine pas les sérotypes les uns des autres, ce qui s'avère peu utile dans le cadre du diagnostic de la pleuropneumonie porcine où la connaissance du sérotype impliqué est essentielle. Puisque la majorité des troupeaux conventionnels sont infectés par des sérotypes peu virulents (Sidibé et coll., 1993), un résultat positif avec ce PCR est difficile à interpréter.

Hennessy et coll. (1993) développent une technique de réaction de polymérisation aléatoire en chaîne ("Arbitrarily primed polymerase chain reaction" ou AP-PCR) où des amorces arbitraires permettent de générer des empreintes de DNA uniques pour chacun des 12 sérotypes d' *A. pleuropneumoniae*. Puisque l'amorce utilisée n'est pas spécifique pour *A. pleuropneumoniae*, cette technique n'est applicable que sur des cultures pures de la bactérie puisque l'amplification de l'ADN de tout autre micro-organisme peut changer considérablement le profil obtenu.

Dans une étude récente, Gram et coll. (1996) évaluent un système PCR, utilisant les amorces décrites par Sirois et coll. (1991), pour la détection d' *A. pleuropneumoniae* à partir de cultures d'amygdales. Aucun produit d'amplification n'est observé en culture pure avec d'autres pathogènes porcins et un seuil de détection de 10^3 CFU par tube PCR est atteint. Des produits PCR non-spécifiques sont par contre obtenus à partir des certaines cultures mixtes d'amygdales. La sensibilité s'avère près de trois fois supérieure à celle obtenue avec les techniques d'isolement traditionnelles. Cependant et tel que mentionnée plus haut, ce test ne différencie aucun des 12 sérotypes d' *A. pleuropneumoniae*.

7-Traitement et contrôle de la pleuropneumonie porcine

7.1- Antibiothérapie

La majorité des souches d' *A. pleuropneumoniae* sont sensibles à de nombreux antibiotiques, cependant une augmentation dans la fréquence des souches résistantes est observée (Fenwick et Henry, 1994; Bada et coll.,1995). En 1995, les antibiotiques envers lesquels différents isolats d'*A. pleuropneumoniae* ne présentent aucune ou très peu de résistance sont l'ampicilline-sulbactam, le ceftiofur, la céphalotine, l'enrofloxacin, la gentamicine, la tiamuline-tétracycline et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (Bada et coll.,1995).

Les antibiotiques, aussi efficaces soient-ils, ne préviennent pas les infections à *A. pleuropneumoniae* mais réduisent la sévérité de la maladie

(Fenwick et Henry, 1994). L'addition d'antibiotiques à la nourriture ou à l'eau est peu utile durant un épisode aigu de la maladie puisque les animaux sont anorexiques (Fenwick et Henry, 1994). Dans ces cas, l'administration d'antibiotiques doit se faire par injection parentérale; il s'agit cependant d'un procédé très coûteux et peu pratique (Fenwick et Henry, 1994).

7.2- Vaccination

L'immunité induite par les vaccins est spécifique au sérotype alors que les expositions naturelles confèrent une protection contre tous les sérotypes. Ainsi, un vaccin induisant une protection efficace contre tous les sérotypes d' *A. pleuropneumoniae* n'est pas disponible (Fenwick et Henry, 1994). Les vaccins confèrent une protection élevée dans les conditions expérimentales, néanmoins les observations faites sur le terrain demeurent moins concluantes (Nicolet, 1992). Ainsi, bien que réduisant le taux de mortalité et la sévérité des infections, les vaccins sont inefficaces dans la prévention des infections aiguës ou le développement de porteurs chroniques (Fenwick et Henry, 1994).

7.3- Gestion des bâtiments

Les systèmes de production modernes en continu signifie qu'un bâtiment héberge des animaux de tous âges en tout temps. L'isolement des animaux par groupe d'âge s'avère une mesure efficace pour contrôler la maladie. Dans ce système de production, on retrouve trois sites d'isolement: 1) la maternité, comprenant les truies et les nouveaux-nés non-sevrés; 2) l'unité d'engraissement, où sont retrouvés les porcs de 25 kg à 30 kg environ et 3)

le site d'engraissement pour les animaux de plus de 25 kg à 30 kg. De plus, le système en tout plein-tout vide, sans mouvement d'animaux entre groupes d'âge différent et où un nettoyage et une désinfection des locaux sont effectués entre chaque groupe d'animaux, est en voie de devenir un standard dans la production porcine (Fenwick et Henry, 1994).

7.4- Éradication

L'éradication est un processus stratégique hautement planifié, basé sur la sérologie et comportant plusieurs phases. Le protocole utilisé au Québec est, en résumé, le suivant: une antibiosupplémentation dans l'eau d'abreuvement est effectuée à l'échelle du troupeau entier puis le statut sérologique de tous les animaux reproducteurs est déterminé. Tous les animaux séroréacteurs sont éliminés. Un contrôle du "gel" de l'infection est ensuite effectué et si il n'y a aucun nouveau positif, la pouponnière, et l'unité d'engraissement, sont vidées, lavées et désinfectées. La médication est arrêtée lorsque tous les tests sérologiques demeurent négatifs, puis le repeuplement des locaux est effectué. Finalement, un monitoring sérologique est mis en place environ deux fois par année. Les coûts d'une telle opération sont considérables et parfois les résultats s'avèrent décevants (Fenwick et Henry, 1994). Plusieurs variantes dans les programmes d'éradication peuvent être observées.

7.5- Le sevrage précoce médicamenteux

Une alternative à l'éradication, qui démontre des résultats prometteurs, est le sevrage précoce jumelé à une médication chez des porcelets âgés entre 10 et 15 jours qui seront par la suite tenu en isolement. L'avantage considérable

de ce programme est qu'il permet une diminution substantielle des infections sous-cliniques, puisque les porcelets sont des vecteurs importants du germe et qu'avant l'âge de 16 jours, peu de porcelets auront été infectés par la truie (Fenwick et Henry, 1994).

8- L'immunocapture magnétique

8.1- Principe

L'immunocapture magnétique a fait son apparition à la fin des années 1970 où elle est d'abord utilisée pour l'isolement de cellules eukaryotes (Molday et coll.,1977; Campbell et coll., 1978). L'immunocapture magnétique appliquée aux cellules procaryotes est une technique relativement récente. Elle utilise le champs magnétique d'un aimant pour capturer des billes magnétiques sur lesquelles ont été fixés des anticorps spécifiques envers un micro-organisme (figure 1). Une multitude de billes magnétiques sont disponibles sur le marché, les plus couramment utilisées étant des billes recouvertes de polystyrène, de quelques micromètres de diamètre et qui sont superparamagnétiques, c'est-à dire qui ne démontrent pas de magnétisme en l'absence du champs magnétique. La surface poreuse des billes magnétiques permet la liaison d'une multitude de ligands: anticorps monoclonaux et polyclonaux, lectines, agglutinines, etc... L'efficacité de l'immunocapture magnétique dépend largement du ligand utilisé et de la méthode employée pour coupler ce dernier aux billes (Safarik et coll.,1995). Les bactéries immunologiquement couplées aux billes demeurent viables et leur croissance sur milieu nutritif ne semble pas affectée par leur attachement aux

billes (Swann et coll.,1992; Torensma et coll.,1993). Les billes étant retenues par l'aimant, les organismes non-spécifiques peuvent être éliminés par des lavages successifs et le micro-organisme-cible peut par la suite être concentré et détecté par microscopie (Lund et coll.,1988), culture sur milieux nutritifs (Skjerve et coll.,1990; Fratamico et coll.,1992; Dziadkowiec et coll.,1995), ELISA (Cudjoe et coll.,1995; Gundersen et coll.,1992), hybridation avec des sondes d'ADN ou ARN (Benkirane et coll.,1995) et PCR (Enroth et Engstrand, 1995; Biswas et coll.,1994).

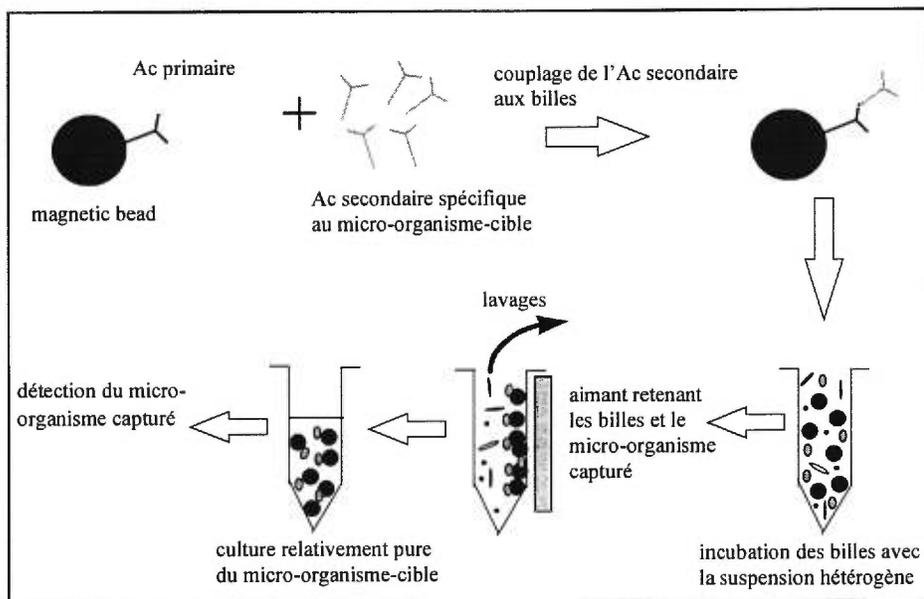


Figure 1. Principe de l'immunocapture magnétique

8.2- Applications

L'isolement sélectif et la détection d'un micro-organisme spécifique à partir d'un échantillon hétérogène est une technique fondamentale de la microbiologie. Les techniques conventionnelles d'ensemencement sur milieux sélectifs s'avèrent souvent décevantes et un isolement sélectif beaucoup plus performant peut être réalisé avec l'immunocapture magnétique (Safarik et coll.,1995). Les applications de cette technique sont très diversifiées:

- 1) microbiologie alimentaire: Skjerve et Olsvik (1991) séparent des salmonelles à partir de produits laitiers, viandes et légumes avec une limite de détection de 10^2 cellules/g d'aliment. Dziadkowiec et coll. (1995) développent un protocole permettant d'isoler *Salmonella virchow* à partir de lait écrémé à un seuil de détection de 5×10^1 CFU/ml en présence d'un nombre 1000 fois plus élevé d'organismes contaminants.
- 2) microbiologie clinique: Chapman et coll. (1994), dans une étude sur l'isolement d'*Escherichia coli* O157 à partir de fèces de bovins, montrent que l'immunocapture magnétique s'est avérée 100 fois plus sensible que la culture conventionnelle. Karsch et coll. (1996) évaluent l'immunocapture magnétique, la culture conventionnelle et des méthodes moléculaires (PCR et hybridation) pour l'isolement d'*E. coli* O157 à partir de fèces de patients HUS ("hemolytic-uremic syndrome") positifs. L'immunocapture magnétique s'est avérée au moins 100 fois plus

- sensible que les autres méthodes utilisées. Benkirane et coll. (1995) développent une technique de PCR immunomagnétique suivi d'une hybridation avec une sonde d'ADN pour l'isolement sélectif et l'identification de *Porphyromonas gingivalis*, avec une sensibilité de 100 CFU/ml.
- 3) environnementale: Morgan et coll. (1991) réalisent l'immunocapture magnétique sur des échantillons d'eau de lacs afin d'isoler de façon sélective *Pseudomonas putida*, à un seuil de détection de 10^2 CFU/ml. Wipat et coll. (1994) observent ce même seuil de détection quand ils isolent des spores de *Streptomyces lividans* à partir du sol.

9- Amplification génomique arbitraire ou RAPD

La technique de RAPD ("random amplification of polymorphic DNA"), proposée simultanément par Welsh et McClelland (1990) et Williams et coll. (1990), constitue une nouvelle approche pour étudier le génome. La génération d'empreintes polymorphes de DNA par le RAPD peut être utilisée pour un typage moléculaire des souches à l'intérieur d'une même espèce.

9.1-Principe

Le RAPD est une technique basée sur le PCR à la différence que la réaction d'amplification est réalisée à basse stringence et en utilisant une amorce

courte (9-10mer), unique et choisie de façon arbitraire. Ces amorces n'ont pas d'homologie complète avec les séquences-cibles et l'amplification à basse stringence permet aux amorces de s'associer, de façon partiellement ou totalement complémentaire, à différents endroits du génome. Ainsi, la totalité du génome d'un organisme peut être explorée sans connaissance préalable des séquences génomiques. Les produits d'amplifications du RAPD, qui sont composés de fragments de taille et de nombre variés, déterminent un profil génomique qui peut être hautement discriminatoire (Caetano-Anollés, 1993).

Chaque cycle d'amplification comporte trois étapes effectuées à différentes températures (Figure 2, p.41) :

- 1) la dénaturation, à 94°C, de l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire par rupture des liaisons hydrogènes.
- 2) l'hybridation, à 36°C, de l'amorce à l'ADN monocaténaire.
- 3) l'élongation, par l'ADN polymérase à 72°, de nouveaux brins d'ADN à partir de l'amorce hybridée.

Au cours du premier cycle, les deux brins de l'ADN matrice sont séparés à haute température (94°C). Par la suite, une diminution progressive de la température jusqu'à 36°C permet à l'amorce de s'hybrider sur les séquences partiellement ou totalement complémentaires qu'elle a identifiées. À partir de l'amorce hybridée, les désoxynucléotides triphosphates présents en large excès dans le milieu sont ajoutés successivement aux brins d'ADN en

extension, dans le sens 5'-3', par l'enzyme thermorésistante *Taq* DNA polymérase. À la fin de l'amplification, plusieurs brins de tailles différentes et délimités par la séquence de l'amorce constituent de très loin le produit majoritaire de l'amplification. Puisque l'élongation est réalisée de façon simultanée sur les deux brins d'ADN, le nombre de brins d'ADN double après chaque cycle. Le rendement théorique de la PCR est égal à 2^n , n étant le nombre de cycles d'amplification. L'ensemble de ces fragments amplifiés, ou amplicons, sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose et visualisés sous les ultra-violets après incubation du gel dans une solution de bromure d'éthidium (Caetano-Anollés, 1993).

Cette technique très facile à exécuter peut souffrir cependant d'un manque de reproductibilité des profils RAPD (Penner et coll., 1993; Meunier et Grimont, 1993). Une grande rigueur technique est indispensable puisque la technique RAPD est affectée par de nombreux paramètres, dont la température d'hybridation, la concentration de $MgCl_2$ dans le tampon réactionnel, la qualité et la concentration de l'ADN, la *Taq* polymérase utilisée et le thermocycleur utilisé (Caetano-Anollés, 1993; Welsh et McClelland, 1990; Davin-Regli et coll., 1995; Penner et coll., 1993; Meunier et Grimont, 1993).

9.2- La technique RAPD comme outil épidémiologique

Le pouvoir discriminatoire de la technique RAPD dans l'étude de la variété génomique d'isolats d'une même espèce peut répondre à plusieurs questions importantes sur l'épidémiologie des infections causées par un micro-

organisme, questions concernant entre autre la cinétique de la transmission de l'agent infectieux et la clonalité des isolats (Belkum, 1994). Le typage génomique d'espèces bactériennes par RAPD a été largement décrit.

Kersulyte et coll. (1992) étudient des isolats cliniques d'*Histoplasma capsulatum* préalablement classifiés par RFLP ("restriction length polymorphism"). Chacun des 29 isolats au sein d'une même classe RFLP sont différenciés par analyse RAPD, avec seulement trois amorces différentes utilisées de façon indépendante.

Karkkainen et coll. (1996) évaluent le RAPD pour la détection de variations intra-spécifiques chez des souches d'*E. coli* d'origine clinique et l'analyse RAPD, avec les résultats combiné de trois amorces, a permis de discriminer plus de souches qu'avec le ribotypage.

Dugourd et coll. (1996) caractérisent le génome de 20 souches de *Serpulina hyodysenteriae*, un spirochète de l'intestin du porc, avec deux amorces différentes. L'analyse des profils révèle un polymorphisme des souches et permet de les classer en 11 sous-populations.

Dans une étude épidémiologique menée par Barbut et coll. (1993), 20 souches de références de *Clostridium difficile* ainsi que 11 isolats cliniques provenant apparemment de deux épisodes aigus de la maladie et 11 isolats non-reliés sont analysées par RAPD. Les 20 souches de référence démontrent un polymorphisme et les 11 isolats non-reliés se sont tous avérés différents. En contraste, les 11 isolats apparemment reliés démontrent un

profil qui dans chaque cas correspond à une souche épidémique, ce qui suggère une transmission directe de cette souche entre patients hospitalisés.

Davin-Regli et coll. (1996) étudient un épisode aigu d'infection à *Enterobacter aerogenes* dans deux unités de soins intensifs du même hôpital. Pour l'unité 1, 41 isolats sont cultivés chez 12 patients sur une période de quatre mois et 6 mois plus tard, 16 isolats sont cultivés chez 10 patients d'une autre unité. L'analyse RAPD à partir des résultats de trois amorces différentes révèle que les patients de l'unité 1 étaient affectés par 1 à 12 isolats distincts et que les patients de l'unité 2 hébergeaient des souches identiques. Ainsi, les infections dans l'unité 1 auraient été une "fausse épidémie", impliquant différentes souches d'*E. aerogenes*, alors que l'épidémie de l'unité 2 impliquerait la transmission d'une seule souche.

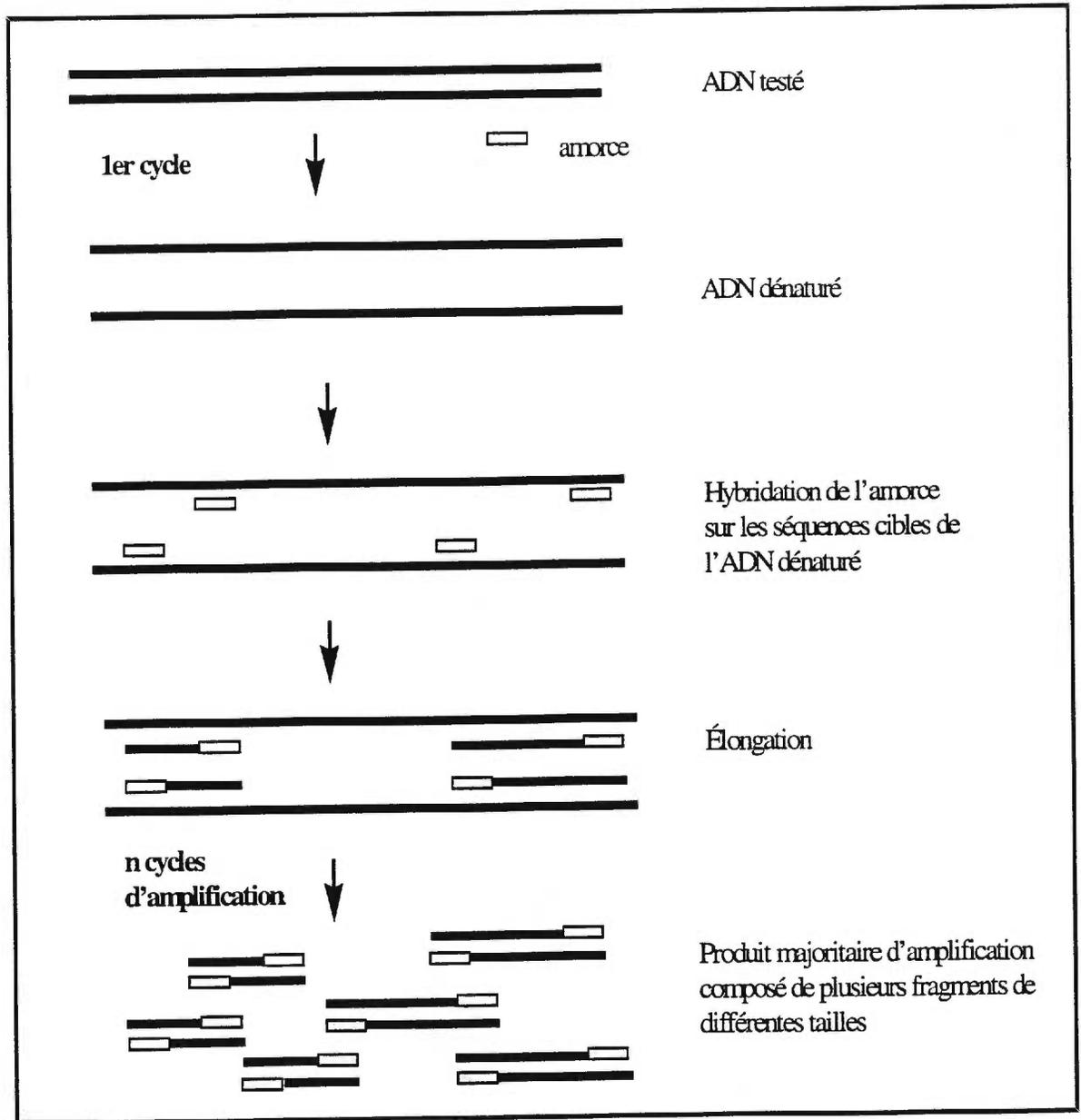


Figure 2: Schéma de l'amplification RAPD (D'après Chatellier, 1996).

I I I. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Partie A:

DEVELOPMENT OF AN IMMUNOMAGNETIC METHOD FOR THE
SELECTIVE ISOLATION OF *ACTINOBACILLUS*
PLEUROPNEUMONIAE SEROTYPE 1 FROM TONSILS

ANNIE GAGNE¹, SONIA LACOUTURE¹, ANDRÉ BROES², SYLVIE
D'ALLAIRE¹ AND MARCELO GOTTSCHALK¹ *

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 ¹ and Centre de Développement
du Porc du Québec (CDPQ), Sainte-Foy, (Québec), CANADA G1V 4M4 ²

* To whom correspondence should be addressed

Running title : *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolation with
immunomagnetic beads

ABSTRACT

Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the upper respiratory tract of pigs can be helpful, as a complement to serological testing, for the detection of carrier animals. In this study, an immunomagnetic separation technique (IMS) for the selective isolation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was developed. Superparamagnetic beads were coated with purified rabbit IgG specific for *A. pleuropneumoniae* serotype 1. The antibody concentration, the number of immunomagnetic beads, the incubation time as well as the temperature of incubation influenced the recovery of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from pure culture and artificially inoculated tonsils. Carryover of non-target organisms was significantly reduced by using PBS-0.1% BSA and by filtration of the vortex-mixed tonsils supernatants. The sensitivity of the IMS technique was 1000-fold higher than direct culture, as evaluated from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 artificially inoculated tonsils. When tonsils from animals of infected herds were tested, significantly more positive tonsils were detected with the IMS technique (68%) than with the standard procedures (22%). The method represents an innovative and highly sensitive approach for the selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils of

carrier animals. In addition, the technique can easily be adapted to other serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Actinobacillus pleuropneumoniae is the etiologic agent of porcine pleuropneumonia, a highly contagious disease that causes important economic losses world wide (22). Of the 12 NAD-dependent serotypes described (including subtypes 5a and 5b), serotype 1 is one of the most commonly isolated serotype from clinical cases of pleuropneumonia in North America (18). When clinical signs and pathological examination suggest the presence of the disease, *A. pleuropneumoniae* can easily be isolated from the lungs. Animals recovering from the infection frequently become healthy carriers, making the presence of *A. pleuropneumoniae* unnoticed in subclinically infected herds. Early identification of these herds is important for the control of the disease since carrier animals are the main source of contamination of immunologically naive herds (22, 25).

To identify subclinically infected herds, serology and bacteriological culture from the upper respiratory tract have been used (27). A variety of serological techniques have been developed, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (2, 4, 6, 8) and the complement fixation test (21). Although serological testing has been helpful in the control of swine pleuropneumonia, it has some limitations. Infected pigs may be serologically negative (19, 27) and when positive serological results are observed in absence of clinical

signs or pathological lesions, isolation of the organism becomes mandatory to confirm the presence of the infection. Since carrier pigs harbour *A. pleuropneumoniae* in their nasal cavities and/or in tonsils (11, 19), isolation of the microorganism can be attempted. However, these sites are heavily colonized by several other bacterial species, making the isolation of *A. pleuropneumoniae* very difficult and time consuming, even with the use of selective media (10, 27).

Immunomagnetic separation (IMS) methods allow the specific recovery of target bacteria from highly heterogenous suspensions (26). The method relies upon the interaction between cell-surface antigens and specific antibodies that are attached to magnetic polystyrene beads (24). This technique has been used to isolate pathogens such as *Escherichia coli* from bovine feces (3), *Salmonella* spp. from blood and stool samples (14) and *Listeria monocytogenes* from food (28). The aim of this study was the development of an IMS technique for selective isolation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from the tonsils of carrier pigs.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and antibodies

The reference strain of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (Shope 4074, ATCC 27088) was used to standardize the IMS technique. *A. pleuropneumoniae* reference strains of other serotypes came from our own collection. Growth conditions onto PPLO selective agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 0.1% glucose, 5% horse serum, 10% yeast extract, 2 µg/ml of crystal violet (Fisher Scientific Limited, Montreal, Quebec), 1 µg/ml of lincomycin (Upjohn, Orangeville, Ontario) and 6 IU/ml of bacitracin (Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO) have already been described (6). For some parts of the study, a strain of *Pasteurella multocida* (strain ATCC 12948) was used and grown onto Brain Heart Infusion agar (BHI) (Difco Laboratories). *P. multocida* was chosen since it is a normal inhabitant of the upper respiratory tract of pigs and it is not inhibited by the selective medium used.

Production of rabbit polyclonal antibodies against the strain Shope 4074 as well as the absorption of the serum with reference strains of serotypes 2 through 8, 10 and 12 of *A. pleuropneumoniae* were carried out as previously described (17). Since the O chain LPS of serotypes 1, 9 and 11 are antigenically similar (13), the serum was not absorbed with serotypes 9 and 11 to avoid significant antibody titer reduction against serotype 1. The specificity of the serum for *A. pleuropneumoniae* serotype 1 as well as for serotypes 9 and 11 was confirmed by an indirect ELISA (13). Purified immunoglobulins (IgG) were obtained using a protein A affinity chromatography column. Protein concentration was measured by a modified method of Lowry (16).

Determination of the optimal concentration of antibody coated on immunomagnetic beads

Superparamagnetic polystyrene immunomagnetic beads (IMB) precoated with sheep anti-rabbit IgG (Dynabeads M-280; Dynal, Oslo) were used. One ml of different concentrations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 specific IgG antibodies was incubated with 1 mg of IMB [10 mg per ml, (6 to 7) X 10^8 beads per ml] for 3 h at room temperature on a shaker to avoid settling

of the beads. Using a particule concentrator (MPC-M; Dynal), beads were magnetized and retained to one side of the tube and washed twice in 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) with 0.1 % bovine serum albumin (BSA) for 30 min each, with agitation at room temperature. Coated IMB were then resuspended to obtain the original concentration (10 mg/ml) in 100 μ l of PBS-0.1% BSA and stored at 4°C. A volume of 20 μ l of the different protein/bead ratios was added to 1 ml of 10^6 CFU/ml of strain Shope 4074 prepared in PPLO broth. An incubation of 30 minutes at room temperature with agitation was followed by two washes of 10 min each in 1 ml of PBS-0.05% Tween. Immunomagnetic beads were resuspended in 1 ml of PBS and diluted before plating onto PPLO selective agar. After 18h of incubation at 37°C in 5% CO₂, viable counts were carried out.

Determination of the optimal coated IMB concentration

Immunomagnetic beads were coated as described above with 15 μ g/ml of IgG (see results). Different numbers of coated IMB (3×10^6 , 6×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 and 5×10^7 beads) were added to 1 ml of 10^3 CFU/ml of strain Shope 4074 in PPLO broth (Difco) supplemented with 0.1% glucose, 5%

horse serum and 10% yeast extract. Incubation, washing and plating were done as described above.

Effect of incubation time and temperature of incubation

Incubation time and temperature of incubation may have some effects on the recovery of *A. pleuropneumoniae* and on the carryover of other organisms. To evaluate these effects, a mixed suspension of 10^3 CFU/ml of strain Shope 4074 and 10^6 CFU/ml of *P. multocida* was prepared in PPLO broth. A number of 1×10^7 IMB (see results) was added to 1 ml of the mixture and incubated at 4°C and room temperature for 5, 15, 30, 45 and 60 min. Immunomagnetic beads were then washed and resuspended in PBS as described before. Viable counts were carried out in two different media : PPLO selective agar for the growth of *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida* and a BHI agar for the growth of *P. multocida* only.

Reduction of non-target attachment to the IMB

A preliminary evaluation of IMS on artificially inoculated tonsils was performed as follows : strain Shope 4074 was diluted to 10^3 CFU/ml in

PPLO broth. Tonsils from high health status herds negative for *A. pleuropneumoniae* serotype 1 infection were used. Tonsils were cut in small pieces, added to the PPLO broth in order to obtain a final concentration of 0.1 g of tonsil/ml and vortex-mixed. A number of 1×10^7 IMB was then added to 1 ml of the tonsil supernatant and IMS was performed at room temperature for 30 minutes. Following washing procedure as described above, IMB were plated on PPLO selective agar. Since carryover of other bacteria was still observed (see results), some modifications were evaluated. The PPLO broth was replaced by one of two other solutions: PBS-0.1% BSA or PBS-2% casein. After vortex-mixing of the tonsils, supernatants were first filtered to remove cellular debris on a filter paper (Whatman type 4, Whatman International Limited, England) before adding IMB. Immunomagnetic separation was performed as described above.

Sensitivity of the IMS technique

A suspension of 10^4 CFU/ml of strain 4074 was serially diluted in PBS-0.1% BSA (see results). The count of each dilution was confirmed by a standard count procedure onto PPLO selective agar. Pieces of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 negative tonsils were added to each dilution of the bacteria, then

vortex-mixed and filtered. Before adding 1×10^7 IMB, each supernatant was plated onto PPLO selective agar (direct culture). The same supernatants were then used for IMS which was performed using the 30 minutes at room temperature protocol. After washing, IMB were plated on PPLO selective agar. *A. pleuropneumoniae* suspected colonies were identified as serotype 1 by testing for NAD dependence and urease reaction. Positive strains were serotyped as previously described (18).

Recovery of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from carrier animals

Validation of the IMS technique was achieved on a total of 150 tonsils from 3 different confirmed *A. pleuropneumoniae* serotype 1 infected herds. Tonsils were randomly collected at the slaughterhouse and separately stored at -20°C . Isolation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from each tonsil was carried out by IMS and the standard procedure. Each tonsil was seared on the surface with a hot spatula. For the standard procedure, 3 parallel incisions were swabbed and inoculated onto PPLO selective agar (27). For IMS, 0.3 g of tonsils were taken from an open cut, then reduce in small pieces with a scalpel and added to 3 ml of PBS-0.1% BSA. After vortex-mixing and filtration of the supernatants, IMS was performed using the 30

minutes at room temperature protocol. IMB were washed and plated onto PPLO selective agar. A count and a description of the type of colonies (natural flora included) on each plate were noted. *A. pleuropneumoniae* suspected colonies were confirmed as being serotype 1 by a dot-ELISA employing two monoclonal antibodies directed against capsular epitopes (12, 13). Strains negative with both monoclonal antibodies were tested for NAD dependence and urease production. Positive strains for both tests were serotyped (18).

Statistical analysis

A Chi square (χ^2) test was performed to ascertain whether differences obtained between IMS and the standard procedure were statistically significant.

RESULTS

Optimization of the IMS technique

For each step, the mean of at least three independent assays is presented. The amount of antibody required to achieve optimal binding of the target bacteria was determined and results are shown in Figure 1. The highest number of bound bacteria was obtained from a concentration of 5 μg of IgG per mg of beads. No significant differences could be observed with higher concentrations, up to 100 μg IgG/mg of beads. The number of bacteria recovered dropped drastically between 2.5 and 0.5 μg of IgG/mg of beads. In the absence of antibody, 0.01% of bacteria adhered non-specifically to the beads. A concentration of 15 μg of IgG per mg of IMB was chosen for the remainder of experiments to insure an excess of antibody.

The effect of the number of coated IMB used is reported in Table 1. Increasing the number of IMB raised the number of recovered *A. pleuropneumoniae* from 29.1% with 3×10^6 IMB to 81.8% with 1×10^7 IMB. Increasing the number of IMB over 1×10^7 did not seem to increase

the number of bound bacteria. In subsequent experiments, a number of 1×10^7 coated IMB was used.

As shown in Table 2, the incubation temperature affected the recovery of *A. pleuropneumoniae*. When the incubation was carried out at 4°C, the isolation rate of *A. pleuropneumoniae* was relatively low (below 20%). At room temperature (20°C), there was a considerable increase in the capacity of IMB to bound *A. pleuropneumoniae* and, starting from 30 minutes, a slight multiplication of the bacteria was found (recovery of 123.7%). In all cases, recovery rate of *P. multocida* never exceeded 0.1%. An incubation time of 30 minutes at room temperature was chosen for subsequent experiments.

The ratio of *A. pleuropneumoniae*/normal flora obtained with *A. pleuropneumoniae* artificially inoculated tonsils was significantly influenced by filtration of the tonsils supernatants (to eliminate cellular debris) and by using blocking agents. Before filtration and with the use of PPLO broth, the ratio was 1/1; after filtration, this ratio was improved to 7.4/1. Blocking agents PBS-2% casein and PBS-0.1% BSA were found to reduce the carryover, with ratios of 16.2/1 and 64.5/1, respectively. Thus, the optimal

A. pleuropneumoniae/normal flora ratio was obtained when IMS was performed in PBS-0.1% BSA after filtration of the tonsils supernatants.

Sensitivity of the IMS technique

Sensitivity was investigated with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 artificially inoculated tonsils by testing tenfold dilutions of the bacteria from 10^4 to 10^1 CFU/ml (Table 3). Direct culture and IMS were compared. Because of the overgrowth by other microorganisms on direct culture plates, no *A. pleuropneumoniae* counts could be done. A plate was considered positive when a single colony of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was identified. The detection limit of *A. pleuropneumoniae* with direct culture and the IMS technique was 10^4 and 10^1 CFU/0.1 g of tonsils, respectively. Increased recovery rate of *A. pleuropneumoniae* was observed when a higher number of bacteria was present; from 32.2% (10^1 CFU/0.1 g of tonsils) to 91.7% (10^4 CFU/0.1 g of tonsils).

Recovery of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from carrier animals

Of the 150 tonsils from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 infected herds, 19% were positive and 29% were negative by both IMS and standard procedure. Forty-nine percent of tonsils were positive by IMS alone and 3% by standard procedures alone (Table 4). The total percentage of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 tonsils detected by IMS (68%) was significantly ($p < 0.01$) higher than that obtained with standard procedures (22%). No other serotypes of *A. pleuropneumoniae* were isolated by IMS in comparison with standard procedures where few strains of serotype 7 have been found (data not shown). The number of *A. pleuropneumoniae* CFU/plate was higher with IMS than by standard procedures, with 58% and 25% of the plates with more than 10 CFU, respectively (Table 5). Also, the number of non-related microorganisms was considerably reduced with IMS compared to standard procedures, with 4% and 75% of the plates with more than 300 CFU, respectively. In 7% of the cases, *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was isolated in pure culture (results not shown).

DISCUSSION

One of the main concern in porcine pleuropneumonia control programs is to prevent the entry of the organism into free herds through the introduction of carrier animals (27). In addition to serology, such animals can be identified by isolation of *A. pleuropneumoniae* from nasal cavities and/or tonsils. The IMS technique described in this study is a sensitive, specific and innovative method for the isolation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from a heavily contaminated environment.

It has been established that the specificity and the sensitivity of the IMS technique rely in part on the specificity and affinity of the antibody used for coating the IMB (26). Protein A purified polyclonal antibodies against *A. pleuropneumoniae* were chosen as the affinity ligand to bind the target bacteria. The amount of IgG coated to the beads significantly influenced the recovery of *A. pleuropneumoniae* serotype 1, with a required minimum concentration of 5 µg of IgG per mg of beads, which is in agreement with previous reports (9, 15). A low degree of *A. pleuropneumoniae* recovery was

observed with uncoated beads; similar non-specific adherence has been reported elsewhere (1, 30).

One of the problems in the isolation of *A. pleuropneumoniae* from carrier animals from asymptomatic herds is that the number of *A. pleuropneumoniae* per tonsil is considerably low. Thus, a low concentration of bacteria was used (10^3 CFU/ml) to standardize the IMS technique in this study. The amount of IMB (1×10^7 beads/ml of sample) that allowed the best recovery rate (81.8%) of *A. pleuropneumoniae* was similar to previous studies in which a similar low number of target cells was used (28, 29). A ratio of IMB to target bacteria inferior to 1000:1 seemed to significantly affect the recovery of *A. pleuropneumoniae*.

It is also known that the recovery of target cells is affected by the incubation period and by the temperature of incubation (26). In the present study, increasing the incubation period at room temperature from 5 to 60 min improved the recovery of *A. pleuropneumoniae*, which is in agreement with previous studies (28, 29).

Almost no carryover was observed when a mixed culture (*A. pleuropneumoniae* and *P. multocida*) was used. However, in preliminary assays with artificially inoculated tonsils, the isolation rate of *A. pleuropneumoniae* was reduced due to the growth of non-target microorganisms (not shown). Attempts were then made to diminish this carryover. In contrast to other studies (5, 23), non-specific adherence of bacteria was not reduced with the use of siliconized tubes or by changing the tubes between washing (results not shown). On the other hand, we found that incubation in PBS-0.1% BSA after filtration of the vortex-mixed tonsils supernatants significantly improved the ratio of recovered *A. pleuropneumoniae*/non-target microorganisms, from 1/1 to 64.5/1.

The sensitivity of the IMS technique was 1000-fold higher than that of the standard procedure. As little as 10 CFU/0.1g of tonsils can be detected with IMS. In contrast to Mortlock and al. (20), no differences were found in the sensitivity of IMS from pure culture and from artificially inoculated samples (results not shown). Such improvements in the sensitivity of the test allowed the detection of a significantly ($P < 0.01$) higher percentage of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 positive tonsils with IMS (68%) compared to the standard procedure (22%). In addition, a higher number of *A.*

pleuropneumoniae serotype 1 colonies per plate were found. A lower percentage of plates with more than 300 CFU of non-target microorganisms was also observed with the IMS technique. It has already been shown with standard methods that *A. pleuropneumoniae* is usually isolated only in low numbers per plate and is also easily overgrown by the contaminating flora (10).

The IMS technique developed in this study represents a significant improvement for selective isolation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils of carrier animals. Recently, a PCR for the detection of *A. pleuropneumoniae* in mixed bacterial culture from tonsils has been standardized (7), with comparative recovery results similar to those obtained in this study. However, the PCR cannot differentiate among the different serotypes of *A. pleuropneumoniae*. Since most conventional herds are infected with different low pathogenic serotypes of *A. pleuropneumoniae* (27), this may lead to a difficult interpretation of a positive PCR result. The IMS technique can be adapted to the selective isolation of other important serotypes, such as serotypes 5 and 7, by changing only the specificity of the antibody used (unpublished observations). Moreover, with this technique, viable bacteria are recovered, which may allow the antimicrobial sensitivity

testing and the study of a larger number of *A. pleuropneumoniae* strains from subclinically infected herds. A better understanding of the epidemiology of this important swine pathogen may lead to the establishment of better surveillance programs.

Acknowledgements

We thank Dr. K. R. Mittal for serotyping the *A. pleuropneumoniae* strains and Dr. R. Higgins for reviewing the manuscript. This work was supported by a grant from CORPAQ (#4163) and the Fédération des producteurs de porcs du Québec.

REFERENCES

1. Biswas, B., R. Vemulapalli, and S. K. Dutta. 1994. Detection of *Ehrlichia risticii* from faeces of infected horses by immunomagnetic separation and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2147-2151.
2. Bossé, J. T., R. P. Johnson, and S. Rosendal. 1990. Serodiagnosis of pleuropneumonia using enzyme-linked immunosorbent assay with capsular polysaccharide of serotypes 1, 2, 5 and 7. *Can. J. Vet. Res.* **54**:427-431.
3. Chapman, P. A., D. J. Wright, and C. A. Siddons. 1994. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* **40**:424-427.
4. Fenwick, B. W., and B. I. Osburn. 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.* **54**:575-582.
5. Fratamico, P. M., F. J. Schultz, and R. L. Buchanan. 1992. Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of

- foods using an immunomagnetic separation method. *Food Microbiol.* **9**:105-113.
6. 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.
 7. Gram, T., P. Ahrens, and J. P. Nielsen. 1996. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet. Microbiol.* **51**:95-104.
 8. Inzana, T. J., and B. Mathison. 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **55**:1580-1587.
 9. Islam, D., S. Tzipori, M. Islam, and A. A. Lindberg. 1993. Rapid detection of *Shigella dysenteriae* and *Shigella flexneri* in faeces by an immunomagnetic assay with monoclonal antibodies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:25-32.
 10. Jacobsen, M. J., and J. P. Nielsen. 1995. Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils. *Vet. Microbiol.* **47**:191-197.

11. Kume, K., T. Nakai, and A. Sawata. 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. Jap. J. Vet. Sci. **46**:641-647.
12. Lacouture, S., K. R. Mittal, M. Jacques, and M. Gottschalk. 1997. Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. J. Vet. Diag. Inv. (In press).
13. Lairini, K., E. Stenbaek, S. Lacouture, and M. Gottschalk. 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Vet. Microbiol. **46**:369-381.
14. Luk, J. M. C., and A. A. Lindberg. 1991. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* (O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays. J. Immunol. Meth. **137**:1-8.
15. Lund, A., A. L. Hellemann, and F. Vartdal. 1988. Rapid isolation of K88⁺ *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles. J. Clin. Microbiol. **26**:2572-2575.
16. Markwell, M. A., 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.

17. Mittal, K. R., R. Higgins, and S. Larivière. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **15**:1019-1023.
18. Mittal, K. R., R. Higgins, S. Larivière, and M. Nadeau. 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Québec. Vet. Microbiol. **32**:135-148.
19. Moller, K., L. V. Anderson, G. Christensen, and M. Kilian. 1993. Optimization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. Vet. Microbiol. **36**:261-271.
20. Mortlock, S. 1994. Recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from mixed suspensions: evaluation and comparison of pre-coated immunomagnetic beads and direct plating. Bri. J. Biomed. Sci. **51**:207-214.
21. Nicolet, J., P. A. de Meuron, and Ph. Bachman. 1971. Sur l'hémophilose du porc. IV L'épreuve de déviation du complément, un test de dépistage des infections à *Haemophilus parahaemolyticus*. Schweiz. Arch. Tierheilkd. **113**:191-200.
22. Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p.401-408. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), Diseases of Swine, 7th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.

23. Okrend, A. J. G., B. E. Rose, and C. P. Lattuada. 1992. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads. *J. Food. Prot.* **55**:214-217.
24. Olsvik, O., T. Popovic, E. Skjerve, K. S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad, and M. Uhlen. 1994. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:43-54.
25. Rosendal, S., L. Lombin, and J. DeMoor. 1981. Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med.* **45**:271-274.
26. Safarik, I., M. Safarikova, and S. J. Forsythe. 1995. The application of magnetic separations in applied microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:575-585.
27. Sidibé, M., S. Messier, S. Larivière, M. Gottschalk, and K. R. Mittal. 1993. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Can. J. Vet. Res.* **57**:204-208.
28. Skjerve, E., L. M. Rorvik, and O. Olsvik. 1990. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3478-3481.

29. Vermunt, A. E. M., A. A. J. M. Franken, and R. R. Beumer. 1992. Isolation of salmonellas by immunomagnetic separation. *J. Appl. Bacteriol.* **72**:112-118.
 30. Wipat, A., E. M. H. Wellington, and V. A. Saunders. 1994. Monoclonal antibodies for *Streptomyces lividans* and their use for immunomagnetic capture of spores from soil. *Microbiol.* **140**:2067-2076.
-

TABLE 1. Effect of bead concentration on the recovery of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) serotype 1 using the immunomagnetic separation technique

No. of coated beads used	Ratio (beads/bacteria) ^a	Recovery of APP (mean %, ± SD)
3 X10 ⁶	500:1	29,1 ± 1,8
6 X10 ⁶	1000:1	51,4 ± 6,2
1 X10 ⁷	1667:1	81,8 ± 7,4
2 X10 ⁷	3333:1	68,4 ± 13,5
5 X10 ⁷	8333:1	76,0 ± 9,9

^a Initial inoculum of 6 X 10³ CFU/ml

SD = standard deviation

TABLE 2. Effect of incubation time and temperature of incubation on the recovery of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from a mixed suspension with *Pasteurella multocida* using the immunomagnetic separation technique ^a

Time (min)	Temperature	
	4°C	20°C
5	3.8 (± 1,9)	36.8 (± 4,1)
15	11.5 (± 6,9)	92.9 (± 19,5)
30	15.5 (± 3,6)	123.7 (± 24,6)
45	18.4 (± 3,3)	124.6 (± 26,9)
60	10.8 (± 0,6)	168.9 (± 34,7)

^a Initial number of 10^3 CFU/ml of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 and 10^6 CFU/ml of *P. multocida*. Results are expressed in mean percentage (± standard deviation).

TABLE 3. Sensitivity (mean % \pm SD) of the immunomagnetic separation technique (IMS) obtained with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 artificially inoculated tonsils and comparison with direct culture (DC)

Initial no. of bacteria (CFU/ml)	<i>A. pleuropneumoniae</i> recovery	
	IMS	DC ^a
10 ⁴	91.7 (\pm 8.4)	+
10 ³	67.9 (\pm 9.5)	-
10 ²	57.3 (\pm 11.3)	-
10 ¹	32.2 (\pm 3.9)	-

SD = standard deviation

^a With direct culture, overgrowth by other organisms precluded bacterial counts.

TABLE 4. Recovery of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils of animals from infected herds using the immunomagnetic separation technique (IMS) and the standard procedure (SP)

Method used		No. of tonsils (%)
IMS	SP	
+	+	28 (19)
+	-	74 (49)
-	+	4 (3)
-	-	44 (29)

TABLE 5. Distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) serotype 1 and normal flora recovered from infected herds, using the immunomagnetic separation (IMS) and the standard procedure (SP). Results are expressed as percentage of plated tonsils.

No. of CFU/plate	Method used			
	IMS		SP	
	APP	Normal flora	APP	Normal flora
< 10	26	36	75	3
10-300	58	60	19	22
> 300	16	4	6	75

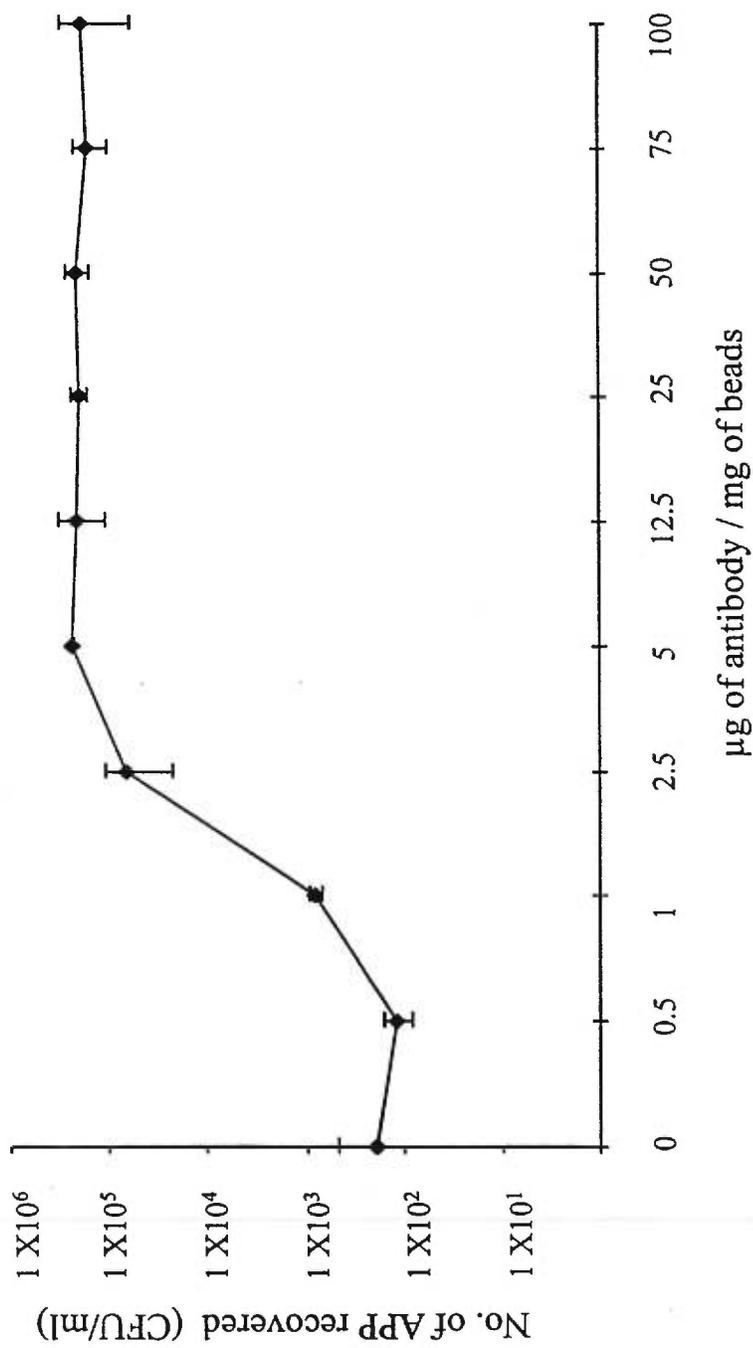


Fig.1. Effect of different concentrations of antibody on the ability of immunomagnetic beads to bind *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) serotype 1.

Partie B :

**Étude de la variabilité phénotypique et génotypique de souches
d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 5 isolées de
cas cliniques et sous-cliniques**

1- MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1- Sélection des souches

L'étude a été réalisée sur 46 isolats d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 5 isolées au Québec entre 1991 et 1996 et sur trois souches de référence (sérotypes 1 et 5). Les souches de terrain ont été isolées soit de troupeaux présentant des signes cliniques (souches de poumons), soit de troupeaux sérologiquement positifs mais ne présentant aucun signe clinique ni de lésions à l'abattoir (souches d'amygdales ou cavités nasales). Les souches proviennent de troupeaux différents, sauf pour quelques exceptions (voir plus loin). Au total, 49 souches d' *A. pleuropneumoniae* ont été étudiées :

- 14 souches de poumons appartenant au sérotipe 1
- 10 souches d'amygdales appartenant au sérotipe 1
- la souche de référence Shope 4074 du sérotipe 1
- 14 souches de poumons appartenant au sérotipe 5
- 7 souches d'amygdales appartenant au sérotipe 5
- 1 souche de sérotipe 5 isolée des cavités nasales
- la souche de référence K17 du sérotipe 5a
- la souche de référence 81-750 du sérotipe 5b (utilisée au Québec)

1.2- Conditions de culture

Les souches ont été ensemencées sur milieu PPLO gélosé (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) supplémenté avec 0,1% de glucose, 5% de

sérum de cheval et 10% d'extrait de levure, puis incubées à 37°C pour 18 h dans une atmosphère de 5% CO₂. La pureté de chaque souche a été contrôlée en repiquant une colonie isolée sur un second milieu PPLO.

1.3- Caractérisation phénotypique

Les 49 souches ont été évaluées pour la présence d'hémolyse, la dépendance au NAD et la production d'uréase. Chaque souche d'une culture de 18 h sur milieu PPLO a été ensemencée sur gélose TSA ("trypticase soy agar") (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) au sang de mouton et une strie perpendiculaire de *Staphylococcus aureus* (source de NAD) a été effectuée. La production d'uréase a été vérifiée en ensemencant chaque souche sur une gélose urée de Christensen inclinée. Les géloses ont ensuite été incubées à 37°C jusqu'à 48 h.

1.4- Réactivité des anticorps monoclonaux avec les souches d'*A. pleuropneumoniae*

1.4.1- Anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux spécifiques au sérotype 1 et au sérotype 5 ont été produits et caractérisés lors de travaux antérieurs (Lairini et coll., 1995; Lacouture et coll., 1997). Pour le sérotype 1, trois anticorps monoclonaux ont été testés dans la présente étude: les anticorps 1.5C5.F4 et F11-7F reconnaissent des épitopes de la capsule et l'anticorps 5.1 est dirigé contre un épitope situé sur la chaîne O du LPS. Pour le sérotype 5, deux anticorps

monoclonaux ont été évalués: App 6.1E7.E3 et App 4.1, tous deux dirigés contre des épitopes différents de la chaîne "O" du LPS.

1.4.2- Dot-ELISA

La réactivité de ces anticorps avec les 49 souches d'*A. pleuropneumoniae* a été évaluée par un Dot-ELISA. Brièvement, 10 µl d'une suspension de bactéries formolées (0,2% formol v/v) dans du tampon 10mM Tris-HCl (pH 7.4) contenant 0,9% de NaCl (Tris-NaCl) et d'une densité optique de 4 à 540 nm est déposé sur une membrane de nitrocellulose (Mandel Scientific Company Ltd, Ontario). Après avoir laissé sécher la membrane, celle-ci est rincée dans du Tris-NaCl puis bloquée en incubant pendant 1 h à température pièce dans une solution de 2% caséine Tris-NaCl. Après trois lavages de la membrane, l'anticorps dilué dans la même solution est ajouté (dilution optimale de 1/100 pour 1.5C5.F4, 1/10 pour F11-7F, 1/2 pour 5.1 G8 F10, 1/8 pour App 6.1E7.E3 et 1/400 pour App 4.1) et incubé à température pièce pendant 2 h. La membrane est ensuite lavée puis des anticorps de chèvre anti-souris conjugués à la peroxidase et dilué 1/1500 dans une solution de 2% caséine Tris- NaCl sont ajoutés à la membrane et incubés pendant 1 h à température pièce. La membrane est ensuite lavée dans du Tris-NaCl et la réaction antigène-anticorps est révélée à l'aide d'une solution constituée de 0,3% de 4-chloro-1-naphtol dans 10 mL de méthanol froid mélangé à 50 mL de Tris-NaCl contenant 0,06% de H₂O₂.

1.4.3-Sérotypie

Le sérotypage des souches a été effectué au laboratoire du docteur K. R. Mittal de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal par la technique d'immunodiffusion en gel et par coagglutination (Mittal et coll., 1992).

1.5- Caractérisation génotypique

1.5.1- Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est effectuée à partir d'une culture bactérienne de 18 h sur milieu gélosé PPLO. La culture est prélevée à l'aide d'un fil à boucle de façon à remplir la boucle et trois bouclées sont resuspendus dans 1 mL d'un tampon de lyse constitué de 10mM Tris-HCl (pH 7,5) 1mM EDTA (Fisherbiotech) (tampon TE) et vortexés jusqu'à ce que la solution soit homogène. La suspension est ensuite centrifugée 5 min à vitesse maximale (centrifugeuse 5415C, Brinkmann Instruments Inc., New York). Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon TE puis 500 µl d'une solution de lyse contenant 5 M d'isothiocyanate de guanidium (Sigma, St-Louis, USA), 250 mM d'EDTA (pH 8,0) et 1,3% (p/v) de N-Lauroyl-Sarcosine (Sigma) est ajouté et la suspension vortexée. Une fois devenue claire (après 15 à 30 min), la suspension est mise sur la glace et 250 µl d'une solution de 7,5 mM d'acétate d'ammonium froid (4°C) (Sigma) sont ajoutés et la suspension est vortexée. Après 10 min sur la glace, 500 µl d'un mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool (PCIA) (25:24:1) (Sigma) sont ajoutés et

la suspension est agitée vigoureusement à la main. Une centrifugation pendant 15 min à 12 000 rpm est effectuée, ce qui permet d'obtenir une phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques, une interface composée de protéines et la phase phénolique inférieure. La phase aqueuse supérieure est prélevée et mise dans un second tube de 1,5 mL. L'extraction au PCIA est répétée deux fois et 500 µl de la phase aqueuse sont gardés. Un volume d'isopropanol (FisherScientific, Ontario) froid (-20°C) égal à 0,54 fois le volume de la phase aqueuse est ajouté, soit 270 µl. La suspension est vortexée pendant 1 min et mise à -20°C pour 20 à 30 min. La suspension contenant les acides nucléiques précipités est vortexée pendant 15 min à 12 000 rpm et le culot est lavé 2 fois dans 1 mL d'éthanol 80% froid (-20°C). La suspension est vortexée pendant 3 min à vitesse maximale puis le culot est lavé dans 1 mL d'éthanol 100%. Finalement, l'éthanol est enlevé et les tubes sont laissés ouverts pendant 5 min afin de permettre au culot de s'assécher. Le culot est ensuite délicatement dissout dans 50 µl de tampon TE. L'ARN est détruit en ajoutant 2 µl de RNase (Sigma) (1 mg/mL) dissoute dans 1 mL de Tris-HCl 10mM pH 7,5. La solution d'ADN est ensuite conservée à 4°C.

1.5.2- Dosage et contrôle de la pureté de l'ADN

1.5.2.1- Dosage au spectrophotomètre

Un dosage de l'ADN est effectué avant l'addition de la RNase. L'ADN a une absorbance maximale à une longueur d'onde de 260 nm et les protéines ont une absorbance optimale à 280 nm. Afin de déterminer la concentration

d'ADN, l'échantillon est dilué au 1/100ème dans de l'eau distillée et les densités optiques (D.O.) sont mesurées à 260 nm et 280 nm. Une D.O. égale à 1 correspond à une concentration d'ADN bicaténaire de 50 µg/mL. La concentration en ADN de la solution dosée s'obtient ainsi:

$$[\text{ADN}]_{\mu\text{g/ml}} = \text{D.O. à } 260\text{nm} \times \text{facteur de dilution} \times 50$$

La pureté de l'ADN est estimée à l'aide du rapport $R = \text{D.O. à } 260 \text{ nm} / \text{D.O. à } 280 \text{ nm}$. Le rapport R doit être compris entre 1,8 et 2. Des valeurs inférieures à 1,7 reflètent une contamination de la solution par des protéines ou par le matériel d'extraction. Lorsque la valeur R des échantillons n'était pas dans les normes, une nouvelle extraction de l'ADN était effectuée.

1.5.2.2- Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse d'une petite quantité de l'échantillon permet de vérifier la pureté et la qualité de l'ADN : présence d'un ADN de haut poids moléculaire sans dégradation partielle et sans contamination par l'ARN.

Préparation du gel d'agarose 1,0% : 1,5 g d'agarose (Sigma) est dissout dans 150 mL de tampon TAE 1X (Tris acétate 40mM ; EDTA 1mM pH 8,0 ; acide acétique glacial 0,1%). Le mélange est porté à ébullition puis refroidi jusqu'à environ 40°C et coulé sur un support horizontal de 10 cm X 16 cm .

Préparation des échantillons: Un volume de 3 µl de la solution d'ADN non-diluée sont ajoutés à 7 µl d'eau distillée et à 2 µl de solution de dépôt.

La solution de dépôt est préparée à partir de 0,25% de bleu de bromophénol (BioRad, Californie), 0,25% de xylène cyanole (Sigma) et 40% (p/v) de sucrose dilué dans l'eau (BDH Inc., Toronto). Une échelle de poids moléculaire de 1 Kb (Gibco BRL, USA) est diluée 1/10 (100 µl de marqueur dans 200 µl de solution de dépôt et 700 µl d'eau distillée) et 10 µl sont inclus dans chaque gel.

Migration électrophorétique et révélation : les échantillons ont été déposés dans les puits du gel et la migration conduite à 100 V pendant 1h30 dans le tampon TAE 1X. Ensuite, les fragments d'ADN ont été visualisés sous lumière ultra-violette (UV) après incubation du gel pendant 30 min dans 150 µl de tampon TAE 1X contenant du bromure d'éthidium (BET) (Sigma) à une concentration finale de 1 µg/mL.

1.5.3- Préparation des solutions d'ADN

Les ADN précédemment extraits puis contrôlés ont été dilués dans de l'eau distillée de façon à obtenir une concentration d'ADN de 5 µg/mL. Ces solutions ont été aliquotées dans un volume de 8 µl pour usage unique et ont été conservées à -20°C pendant plusieurs mois.

1.5.4- Préparation du mélange réactionnel

Cette étape est réalisée sous une hotte biologique dans une pièce séparée et contrôlée pour éviter la contamination des échantillons par de l'ADN parasite (cultures bactériennes, ADN extraits, produits d'amplification).

Chaque échantillon a été préparé sous un volume final de 25 μ l de la façon suivante:

- 12,5 μ l d'eau distillée et filtrée sur filtre Millipore de 0,2 μ m (Gelman Sciences, Minnesota)
- 2,5 μ l de tampon de réaction 10X : Tris-HCl 100mM, pH 8,3 ; MgCl₂ 25mM et KCl 500 mM
- 2 μ l d'amorce à 2,5 μ M ou 8 μ M selon l'amorce (Département de Biochimie, Université de Montréal, Québec)
- 2,5 μ l d'un mélange de dATP, dCTP, dTTP et dGTP à 1 mM (PharmaciaBiotech, Baie D'Urfé, Québec)
- 0,5 μ l d'enzyme Taq DNA polymérase (PharmaciaBiotech, Baie d'Urfé, Québec) à 5 U/ μ l

Les 20 μ l ont été recouverts d'une goutte d'huile minérale (Sigma) puis 5 μ l de la solution d'ADN à 5 μ g/mL ont été ajoutés.

L'eau distillée stérile et le tampon de réaction 10X ont été aliquotés pour usage unique. Les amorces diluées et les dNTP diluées ont été aliquotées dans un volume permettant 2 usages. Tous les constituants du mélange réactionnel ont été conservés à -20°C.

1.5.5- Protocole d'amplification de l'ADN

L'amplification a été réalisée sous un volume final de 25 μ l contenant 25 ng d'ADN extrait, 0,2 ou 0,6 μ M d'amorce, 100 μ M de chaque désoxynucléotide triphosphate, 0,5 unité d'enzyme *Taq* DNA polymérase

dans le tampon de réaction (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 ; MgCl₂ 2,5 mM et KCl 50 mM) et une goutte d'huile minérale.

L'amplification a été effectuée à l'aide du thermocycleur DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) programmé de la façon suivante:

1er cycle: 4 min à 94°C, 1 min à 36°C et 2 min à 72°C

33 cycles: 1 min à 94°C, 1 min à 36°C et 2 min à 72°C

dernier cycle: 1 min à 94°C, 1 min à 36°C et 10 min à 72°C

L'absence d'amplification parasite a été vérifiée en incluant dans chaque série un tube contrôle contenant 5 µl d'eau à la place de 5 µl de la solution d'ADN à 5 µg/mL.

1.5.6- Sélection des amorces

Un total de 21 amorces de dix bases (tableau 3) a été testé sur sept souches d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype, d'origine et d'organe différents (tableau 4) afin de déterminer si la technique RAPD permet de mettre en évidence un polymorphisme génomique au sein de l'espèce et de sélectionner les amorces générant les profils les plus discriminatoires.

1.5.7- Prévention de la contamination des échantillons

Les différentes étapes de préparation et d'amplification ont été effectuées dans plusieurs pièces de manière à ce que l'ADN non-amplifié n'entre jamais en contact avec l'ADN précédemment amplifié. Quatre pièces différentes ont été utilisées:

- 1) une pièce pour la préparation des solutions d'ADN (culture bactérienne, extractions et dosages de l'ADN)
- 2) une pièce pour la préparation du mélange réactionnel
- 3) une pièce d'amplification où est installé le thermocycleur
- 4) une pièce pour effectuer les électrophorèses des produits d'amplification

Toutes les manipulations de la technique RAPD ont été effectuées en utilisant deux micro-pipettes munies de cônes avec filtre (Molecular Bioproducts inc., California): la première réservée pour la préparation du mélange réactionnel et une seconde pour la manipulation de l'ADN amplifié.

1.5.8- Visualisation des produits d'amplification

Un volume de 20 μ l de produits d'amplification a été prélevé et déposé (avec les micro-pipettes munies de cônes avec filtre), avec 2 μ l de solution de dépôt, dans un puits du gel. Les fragments amplifiés, ou amplicons, ont été séparés par électrophorèse à 100 V pendant 90 min sur gel d'agarose à 1.4% dans du tampon TAE 1X. Le gel a ensuite été incubé pendant 30 min dans une solution de bromure d'éthidium à 1 μ g/mL. Les amplicons ont été visualisés sous rayons U.V. (260 nm) et le gel a été photographié.

1.5.9- Analyse numérique des profils RAPD

Les photographies des gels ont été digitalisées à l'aide d'une caméra connectée à un ordinateur (FotoAnalyst, Fotodyne inc.). L'analyse numérique des profils RAPD a été effectuée à l'aide du logiciel TAXOTRON® (Taxolab, Institut Pasteur, Paris, France) comportant 4 programmes: Restrictoscan®, Restrictotyper 500®, Adanson® et Dendrograf®.

Les images digitalisées ont été transférées sur un ordinateur Macintosh et les valeurs de migration des fragments ont été transformées en unités pixel à l'aide du programme RestrictoScan®. Ces valeurs de migration ont été traitées par le programme Restrictotyper 500® de façon à déterminer la taille de chaque fragment ("cubic spline method"). Une représentation schématique des profils électrophorétiques a été obtenue, toujours avec le programme Restrictotyper 500®, puis une matrice de distances basée sur les coefficients de DICE (SD), i.e. deux fois le nombre de fragments communs par paire de souches divisé par le nombre total de fragments présents chez deux souches, a été déterminée. Cette matrice de distance a été utilisée pour agréger les souches par la méthode des moyennes pondérées (UPGMA: "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean") à l'aide du programme Adanson®. Ces données ont ensuite été traitées par le programme Dendrograf® qui établit un arbre de classification puis un dendrogramme. La classification hiérarchique et le calcul du degré de divergence des isolats ont été effectués par la méthode UPGMA.

1.5.10- Calcul d'un index de discrimination

Afin d'évaluer le pouvoir discriminant de la technique RAPD, nous avons utilisé l'indice de discrimination décrit par Hunter et Gaston (1988) qui calcule la probabilité que deux souches non-reliées appartiennent à deux groupes différents. L'indice a été calculé à l'aide de la formule suivante:

$$D = 1 - [1/N(N-1)] \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

où N correspond au nombre total de souches dans la population, S est le nombre total de types (profils RAPD) décrits et n_j est le nombre de souches appartenant au type j . Un index D supérieur à 0,95 signifie que deux souches prises au hasard dans la population ont moins de cinq chances sur 100 d'appartenir au même groupe.

2- RÉSULTATS

2.1- Caractérisation phénotypique et réactivité avec les anticorps monoclonaux

Parmi les 25 souches de sérotype 1 (tableau 1), une seule souche, isolée à partir d'amygdales, s'est avérée atypique: aucune hémolyse sur gélose sang et aucune dégradation de l'urée. Cette souche a cependant réagi en Dot-ELISA avec les anticorps 1.5 C5 F4 et F11-7F. Trois souches d'amygdales n'ont réagi avec aucun des trois anticorps monoclonaux. Cependant, ces

souches ont été identifiées à plusieurs reprises par sérotypie comme appartenant au sérotype 1.

Les 24 souches du sérotype 5 ont été trouvées identiques pour la dépendance au NAD, l'hémolyse et la production d'uréase. Elles ont toutes réagit en Dot-ELISA avec les deux anticorps testés (tableau 2).

2.2- Sélection des amorces

Un total de 21 amorces composées chacune de dix bases (tableau 3) ont été testées sur sept souches d'*A. pleuropneumoniae* (tableau 4). Les souches du sérotype 1 ont généré des profils RAPD plus hétérogènes que les souches du sérotype 5. Certaines amorces n'ont généré aucune ou une très faible amplification (OPB2, OPB3, OPB4, OPB9, OPB12, OPB13 et OPB20). Deux amorces ont produit de nombreux fragments plus ou moins visibles qui n'étaient pas reproductibles (OPB15 et OPB17). Plusieurs amorces ont permis l'amplification de un à trois fragments de tailles différentes (OPB1, OPB5, OPB10, OPB14, OPB16 et OPB18). Trois amorces ont généré deux fragments de taille très rapprochée (OPB6, OPB8 et OPB19). Les amorces OPB7 et OPB11 ont produit jusqu'à quatre fragments bien définis et répartis sur une large gamme de taille (figure 1 et 2). L'amorce #17 a permis d'amplifier trois à dix fragments d'intensité variable et de poids moléculaire assez répartis (figure 3). Ces trois dernières amorces (OPB7, OPB 11 et #17) ont été sélectionnées pour étudier les 49 souches puisqu'elles ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité des trois souches du sérotype 1 et se sont avérées très reproductibles. Pour chacune de ces trois amorces, les trois souches de sérotype 1 (Shope 4074, une souche isolée de

poumons et une souche isolée d'amygdales) ont montré des profils différents. Pour les trois souches de sérotype 5, seule l'amorce OPB7 a généré un profil différent avec la souche K17. Les deux autres souches de sérotype 5, qui proviennent du Québec, se sont avérées identiques avec les trois amorces. La souche 4226 du sérotype 2 a été caractérisée par un profil unique, très différent des souches de sérotype 1 et 5 et ceci pour les trois amorces OPB7, OPB11 et #17. Ces amorces ont donc démontré une hétérogénéité intra-sérotype 1 et inter-sérotypes (1, 2 et 5). Les résultats obtenus avec chaque amorce pour les sept souches ont été contrôlés à trois reprises, avec des résultats très similaires.

2.3- Profils RAPD obtenus avec les amorces OPB7, OPB11 et #17

Sur les 49 souches étudiées, 11 profils ont été observés avec l'amorce OPB7, dix profils avec l'amorce OPB11 et 12 profils avec l'amorce #17 (figures 1, 2 et 3).

L'amorce OPB7 a généré entre un à six fragments allant de 0,7 à 4,2 Kpb (figure 1). Les profils obtenus avec OPB11 sont composés de un à cinq fragments de tailles comprises entre 0,5 et 5,9 Kpb (figure 2). Les profils observés avec l'amorce #17 sont constitués de trois à dix fragments de taille variant entre 0,4 et 6,1 Kpb (figure 3). Il s'agit dans tous ces cas de fragments d'intensité moyenne à forte; les bandes mineures, de très faible intensité et non-reproductibles, n'ont pas été prises en considération.

L'amorce #17 a généré le plus grand nombre de fragments d'intensité et de tailles différentes, compliquant la lecture des profils. Cependant, elle s'est avérée la plus reproductible. Les profils obtenus avec chacune des trois

amorces sont facilement différenciables puisque les fragments sont répartis sur une large gamme de taille.

Sur l'ensemble des souches étudiées, la combinaison des profils obtenus avec les trois amorces a permis d'obtenir 15 types différents. L'analyse numérique des profils RAPD effectuée à l'aide du logiciel TAXOTRON a permis de déterminer la relation génétique entre les 49 souches. Les profils obtenus avec chaque amorce ainsi que le degré de divergence entre chacun des profils sont présentés sur les figures 4, 5 et 6. À l'intérieur des souches de sérotype 5, le degré de divergence entre les profils s'est avéré très limité avec l'amorce OPB7 (moins de 16% de divergence) et inexistant (profils identiques) avec les amorces OPB11 et #17. En ce qui concerne les souches de sérotype 1, le degré de divergence entre les profils a été plus élevé.

2.3.1- Profils RAPD des souches de sérotype 1

Les souches de sérotype 1 sont apparues de manière plus hétérogène que les souches de sérotype 5 (figures 4, 5 et 6). Sur les neuf profils identifiés avec l'amorce OPB7, cinq souches sont regroupées dans le profil A1, dix souches dans le profil A9, trois souches dans le profil A2, une souche dans les profils A3, A4, A5, A7 et A8 et deux souches dans le profil A6. Sur les neuf profils générés avec l'amorce OPB11, 15 souches sont incluses dans le profil B1, une souche dans les profils B2, B4, B5, B6, B8 et B9 et deux souches dans les profils B3 et B7 (figure 5). Avec l'amorce #17, les souches sont réparties en 11 profils différents: 11 souches dans le profil C4, une souche dans les profils C1, C3, C5, C6, C7, C10 et C11, deux souches dans les profils C2 et C8 et trois souches dans le profil C9 (figure 6).

Les souches d'amygdales et de poumons du sérotype 1 ne partagent aucun profil commun, sauf avec l'amorce OPB11 où une seule souche d'amygdale est retrouvée dans un profil (profil B1) constitué de 14 souches de poumons (figure 5). La distribution des souches de poumons est plus restreinte que celle des souches d'amygdales. Ainsi, avec l'amorce OPB7 (figure 4), les souches de poumons sont regroupées dans les profils A1 et A9 alors que pour les souches d'amygdales, trois souches sont incluses dans le profil A2, deux souches dans le profil A6 et une souche dans les profils A3, A4, A5, A7 et A8. Avec l'amorce OPB11 (figure 5), les souches de poumons sont réparties en deux profils: B1 qui comporte 14 souches et B2 qui en comporte une seule. Une seule souche d'amygdale est retrouvée dans le profil B1, deux souches sont groupées dans les profils B3 et B7 et les profils B4, B5, B6, B8 et B9 sont constitués d'une seule souche. Avec l'amorce #17 (figure 6), les souches de poumons sont réparties en trois profils: 11 souches dans le profil C4, une souche dans le profil C1 et trois souches dans le profil C9. Le profil C9 s'apparente plus aux profils des souches d'amygdales qu'aux profils C1 et C4. Les souches d'amygdales sont divisées en huit profils: deux souches dans les profils C2 et C8 et une souche dans les profils C3, C5, C6, C7, C10 et C11. Les différences entre les profils des souches de poumons et d'amygdales de sérotype 1 se retrouvent au niveau de plusieurs fragments: un à cinq fragments avec OPB7, un à trois fragments avec OPB11 et un à dix fragments avec l'amorce #17.

2.3.2- Profils RAPD des souches de sérotype 5

La répartition des souches de sérotype 5 dans les différents profils montre une forte homogénéité (figures 4, 5 et 6). Un seul profil RAPD a été obtenu pour les 24 souches de sérotype 5 avec l'amorce OPB11 (profil B10) et l'amorce #17 (profil C12). L'amorce OPB7 a généré seulement deux profils dont 23 souches dans le profil A1 et une souche (K17) dans le profil A11 (figure 4).

Pour chacune des trois amorces, aucun profil commun n'a été trouvé entre les souches de sérotype 1 et les souches de sérotype 5. Les souches de sérotype 5 étaient caractérisées par des profils beaucoup plus simples que les souches de sérotype 1 (figures 1, 2 et 3).

2.3.3- Résultats combinés des trois amorces

Afin d'augmenter le pouvoir de discrimination de la technique RAPD, la relation génétique entre les 49 souches d'*A. pleuropneumoniae* a été calculée en combinant les profils RAPD obtenus avec les trois amorces OPB7, OPB11 et #17. Le dendrogramme généré par la méthode des moyennes pondérées (UPGMA) est présenté à la figure 7. Un total de trois groupes, soit A, B et C caractérisant la totalité des souches ont été trouvés, avec une divergence de 5%, 40% et 80% respectivement. La répartition des souches dans ces trois groupes est la suivante: le groupe A est caractérisé par les 24 souches de sérotype 5, le groupe B comporte 15 souches de

poumons du sérotype 1 et six souches d'amygdales du sérotype 1 et le groupe C comporte quatre souches d'amygdales de sérotype 1. Les souches de sérotype 5 et les souches de poumons de sérotype 1 sont distribuées de façon très homogène. Les souches d'amygdales de sérotype 1 sont partagées en deux groupes. Aucun profil commun n'est retrouvé entre les souches de sérotype 1 et 5.

2.4- Relation entre les profils RAPD et les caractéristiques phénotypiques

Une forte homogénéité des souche de sérotype 5 a été observée lors de la caractérisation phénotypique, homogénéité qui transparait dans les profils RAPD. Une souche de sérotype 1, qui s'est avérée la seule souche de la population étudiée à ne pas produire d'hémolyse ni d'uréase, a été caractérisé par un profil unique et ce pour les trois amorces.

2.5- Relation entre les profils RAPD et le Dot-ELISA

Aucune corrélation n'a été observée entre les profils RAPD et les résultats du Dot-ELISA. Toutes les souches du sérotype 5, sauf la K17, ont des profils RAPD identiques alors que l'intensité des réactions en Dot-ELISA avec les deux anticorps monoclonaux est différente. Les souches de sérotype 1 caractérisées par une réaction identique avec les trois anticorps n'appartiennent pas nécessairement aux même profils RAPD et certaines souches montrant des réactivités différentes avec les trois anticorps monoclonaux ont été regroupées dans les même profils pour chaque amorce.

Trois des quatre souches du groupe C n'ont pas réagi en Dot-ELISA avec les trois anticorps monoclonaux.

2.6- Relation entre les profils RAPD et l'origine géographique des souches

Sur l'ensemble des souches étudiées, sept paires de souches isolées d'un même troupeau (quatre paires pour le sérotype 1 et trois paires pour le sérotype 5) et présentant des réactions différentes en Dot-ELISA ont été sélectionnées. Pour le sérotype 1, un seul troupeau (troupeau 25) sur quatre comportait deux souches d'amygdales aux profils différents avec les amorces OPB7 et OPB11 (tableau 5). Les trois autres troupeaux (3, 23 et 38) présentaient chacun deux souches identiques avec les trois amorces. Pour le sérotype 5, les troupeaux 4, 5 et 7 présentaient deux souches aux profils identiques. Aussi, deux souches de poumons de sérotype 5, isolées d'une même ferme (troupeau 9) mais prélevées à une année d'intervalle, avaient des profils identiques. Par ailleurs, neuf souches à l'intérieur du sérotype 1 et 17 souches à l'intérieur du sérotype 5 provenant de troupeaux différents montraient des profils identiques.

2.7- Pouvoir discriminant du RAPD

Le caractère discriminant de la technique RAPD appliquée au typage des souches d'*A. pleuropneumoniae* a été évalué en calculant l'indice de discrimination décrit par Hunter et Gaston (1988) sur les 49 souches d'*A. pleuropneumoniae* à partir de leur profil RAPD. Un indice D supérieur à

0,90 signifie que deux souches prises au hasard dans la population ont moins de 10 chances sur 100 d'appartenir au même groupe (Hunter et Gaston, 1988).

Le calcul de l'indice de discrimination a été effectué sur les 49 souches (sérotypes 1 et 5) et sur les 25 souches de sérotype 1. Ce calcul n'a pas été fait pour les souches de sérotype 5 uniquement étant donné leur faible hétérogénéité. Les données obtenues pour chaque amorce ont permis d'obtenir un indice D égal ou inférieur à 0,73 et 0,80 pour l'ensemble des souches et pour le sérotype 1 seul, respectivement (tableau 6). Toutes les combinaisons associant deux amorces ont conduit à des valeurs D égales ou inférieures à 0,73 pour les sérotypes 1 et 5 regroupés et égales ou inférieures à 0,84 pour les souches du sérotypes 1. La plus grande valeur D a été obtenue en combinant les données des trois amorces; 0,74 pour la totalité des souches et 0,84 pour les souches du sérotype 1 uniquement.

Tableau 1. Caractérisation phénotypique des 25 souches d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et réactivité au dot-ELISA avec les anticorps monoclonaux 1.5 C5 F4, F11-7F et 5.1 G8 F10.

Souche	Troupeau	Organe	NAD	Hémolyse	Uréase	Ac monoclonaux ^c		
						1.5 C5 F4	F11-7F	5.1 G8 F10
Shope 4074	Réf.	P ^a	+	+	+	4+	-	4+
FMV91-0405	1	P	+	+	+	2+	4+	-
FMV92-0339-8	2	P	+	+	+	3+	4+	-
95-8405	3	P	+	+	+	2+	4+	-
95-8997	3	P	+	+	+	2+	4+	-
Amy91-0781C 17e	23	A ^b	+	+	+	2+	3+	4+
Amy91-0781C 3c	23	A	+	+	+	1+	3+	4+
Amy91-0781H 27e	24	A	+	+	+	2+	3+	-
Amy91-0781F 26b	25	A	+	+	+	2+	-	-
Amy91-0781E 4d	26	A	+	+	+	1+	4+	4+
Amy91-0781E 8a	26	A	+	+	+	-	4+	4+
Amy94-0900 20b	27	A	+	+	+	-	-	-
Amy93-1112 8h	28	A	+	+	+	-	-	-
Amy94-0496-9i	29	A	+	+	+	-	-	-
Amy96-0088 3f	30	A	+	-	-	3+	1+	-

Tableau 1 (suite)

Souche	Troupeau	Organe	NAD	Hémolyse	Uréase	Ac monoclonaux		
						1.5 C5 F4	F11-7F.	5.1 G8 F10
Shy92-2943	31	P	+	+	+	1+	4+	-
STF91-4098	32	P	+	+	+	2+	3+	-
FMV92-2515	33	P	+	+	+	2+	4+	4+
SHY91-4734	34	P	+	+	+	2+	4+	4+
SHY92-1357	35	P	+	+	+	2+	4+	4+
SHY91-4030	36	P	+	+	+	3+	4+	4+
FMV91-1333	37	P	+	+	+	3+	4+	4+
96-B26a	38	P	+	+	+	2+	4+	4+
96-S26a	38	P	+	+	+	-	-	3+
Shy92-1803	39	P	+	+	+	1+	4+	4+

^a : souche isolée à partir des poumons (P)

^b : souche isolée à partir des amygdales (A)

^c : les niveaux de réactivité avec les anticorps monoclonaux sont exprimés de façon qualitative de 1+ à 4+, où 1+ indique une faible réactivité (tache très pâle) et 4+ une forte réactivité (tache très foncée).

Tableau 2. Caractérisation phénotypique des 24 souches d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 et réactivité au dot-ELISA avec les anticorps monoclonaux App 4.1 et App 6.1 E7. E3

Souche	Troupeau	Sous- type	Organe	NAD	Hémolyse	Uréase	Ac monoclonaux ^d	
							App 4.1	App 6.1 E7.E3
K17	référence	5a	P ^a	+	+	+	3+	2+
81-750	référence	5b	P	+	+	+	2+	2+
Amy91-0781F 23a	4	5b	A ^b	+	+	+	2+	4+
Amy91-0781F 10c	4	5b	A	+	+	+	2+	2+
Amy91-0781D 22b	5	5a	A	+	+	+	2+	2+
Amy91-0781G 18a	5	5b	A	+	+	+	2+	1+
Amy91-0781H 102b	6	5b	A	+	+	+	3+	4+
Amy91-0781M 21d	7	5a	A	+	+	+	3+	3+
ECN91-0781M 3a	7	5a	N ^c	+	+	+	4+	1+
Amy91-0781N 10b	8	5b	A	+	+	+	3+	2+
FMV92-1639	9	5a	P	+	+	+	1+	3+
FMV93-0877	9	5a	P	+	+	+	1+	3+
FMV94-3810	11	5a	P	+	+	+	3+	4+
STF91-1064	12	5a	P	+	+	+	2+	4+
SHY91-1946	13	5a	P	+	+	+	2+	3+

Tableau 2 (suite)

Souche	Troupeau	Sous- type	Organe	NAD	Hémolyse	Uréase	Ac monoclonaux App 4.1 App 6.1 E7.E3
SHY92-4861	14	5a	P	+	+	+	2+ 4+
FMV95-0822	15	5a	P	+	+	+	2+ 3+
STF92-1435-2	16	5b	P	+	+	+	4+ 4+
ASS92-2596	17	5b	P	+	+	+	2+ 4+
STF93-0320	18	5b	P	+	+	+	4+ 4+
SHY91-1706	19	5b	P	+	+	+	2+ 3+
FMV94-3322	20	5b	P	+	+	+	3+ 4+

^a : souche isolée à partir des poumons (P)

^b : souche isolée à partir des amygdales (A)

^c : souche isolée à partir des cavités nasales (N)

^d : les niveaux de réactivité avec les anticorps monoclonaux sont exprimés de façon qualitative de 1+ à 4+, où 1+ indique une faible réactivité (tache très pâle) et 4+ une forte réactivité (tache très foncée).

Tableau 3. Amorces utilisées sur les 7 souches d'*A. pleuropneumoniae* afin de tester leur pouvoir discriminant

Amorce ^a	Séquence (5' - 3')	G+C (%)
OPB1	GTTTCGCTCC	60
OPB2	TGATCCCTGG	60
OPB3	CATCCCCCTG	70
OPB4	GGA CTGGAGT	60
OPB5	TGCGCCCTTC	70
OPB6	TGCTCTGCCC	70
OPB7	GGTGACGCAG	70
OPB8	GTCCACACGG	70
OPB9	TGGGGGACTC	70
OPB10	CTGCTGGGAC	70
OPB11	GTAGACCCGT	60
OPB12	CCTTGACGCA	60
OPB13	TTCCCCCGCT	70
OPB14	TCCGCTCTGG	70
OPB15	GGAGGGTGTT	60
OPB16	TTTGCCCGGA	60
OPB17	AGGGAACGAG	60
OPB18	CCACAGCAGT	60
OPB19	ACCCCAAG	70
OPB20	GGACCCTTAC	60
# 17 ^b	ACGCGCATAG	60

^a Série fournie par la compagnie Operon Technologies Inc, Californie, USA (Dugourd et coll. 1996)

^b Seule amorce utilisée à une concentration de 8 µM

Tableau 4 . Souches d'*A. pleuropneumoniae* testées avec les 21 amorces

Souche	Sérotype	Organe	Provenance
Shope 4074	1	poumons	Argentine (référence)
4226	2	poumons	Danemark (référence)
K17	5a	articulation (mouton)	USA (référence)
81-750	5b	poumons	Québec (référence)
SHY92-1803	1	poumons	Québec
Amy96-0088-3f	1	amygdales	Québec
Amy91-0781M 21d	5a	amygdales	Québec

Tableau 5. Type RAPD des 49 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* obtenu à partir des profils générés par les trois amorces.

Souche	Organe ^a	Sérotype	Troupeau	OPB 7	OPB 11	#17	Type RAPD
4074	P	1	Réf.	A1	B1	C1	R1
FMV91-0405	P	1	1	A1	B1	C4	R2
FMV92-0339-8	P	1	2	A1	B1	C9	R3
95-8997	P	1	3	A1	B1	C9	R3
95-8405	P	1	3	A1	B1	C9	R3
Amy91-0781C 17e	A	1	23	A2	B3	C8	R6
Amy91-0781C 3c	A	1	23	A2	B3	C8	R6
Amy91-0781H 27e	A	1	24	A2	B6	C10	R7
Amy91-0781F 26b	A	1	25	A3	B1	C3	R8
Amy91-0781E8a	A	1	26	A4	B5	C2	R9
Amy91-0781E4d	A	1	26	A5	B4	C2	R10
Amy94-0900 20b	A	1	27	A6	B7	C5	R11
Amy93-11128 h	A	1	28	A6	B7	C6	R12
Amy94-0496-9I	A	1	29	A7	B8	C7	R13

Tableau 5. (Suite)

Souche	Organe	Sérotype	Troupeau	OPB 7	OPB 11	#17	Type RAPD
Amy96-0088-3f	A	1	30	A8	B9	C11	R14
Shy92-2943	P	1	31	A9	B1	C4	R15
STF91-4098	P	1	32	A9	B1	C4	R15
FMV92-2515	P	1	33	A9	B1	C4	R15
Shy91-4734	P	1	34	A9	B1	C4	R15
Shy92-1357	P	1	35	A9	B1	C4	R15
96-B26a	P	1	38	A9	B1	C4	R15
Shy91-4030	P	1	36	A9	B1	C4	R15
FMV91-1333	P	1	37	A9	B1	C4	R15
96-S26a	P	1	38	A9	B1	C4	R15
Shy92-1803	P	1	39	A9	B2	C4	R16
Amy91-0781F 23a	A	5b	4	A10	B10	C12	R4
Amy91-0781F 10c	A	5b	4	A10	B10	C12	R4
Amy91-0781D 22b	A	5a	5	A10	B10	C12	R4
Amy91-0781O 18a	A	5b	5	A10	B10	C12	R4

Tableau 5 (suite)

Souche	Organe	Sérotype	Troupeau	OPB 7	OPB 11	#17	Type RAPD
Amy91-781H 102b	A	5b	6	A10	B10	C12	R4
Amy91-0781M 21d	A	5a	7	A10	B10	C12	R4
ECN91-0781M 3a	N	5a	7	A10	B10	C12	R4
Amy91-0781N 10b	A	5b	8	A10	B10	C12	R4
FMV92-1639	P	5a	9	A10	B10	C12	R4
FMV93-0877	P	5a	9	A10	B10	C12	R4
FMV94-3810	P	5a	11	A10	B10	C12	R4
STF91-1064	P	5a	12	A10	B10	C12	R4
SHY91-1946	P	5a	13	A10	B10	C12	R4
SHY92-4861	P	5a	14	A10	B10	C12	R4
FMV95-0822	P	5a	15	A10	B10	C12	R4
STF92-1435-2	P	5b	16	A10	B10	C12	R4
ASS92-2596	P	5b	17	A10	B10	C12	R4
STF93-0320	P	5b	18	A10	B10	C12	R4
SHY91-1706	P	5b	19	A10	B10	C12	R4

Tableau 5 (suite)

Souche	Organe	Sérotype	Troupeau	OPB 7	OPB 11	#17	Type RAPD
FMV94-3322	P	5b	20	A10	B10	C12	R4
81-750	P	5b	Réf.	A10	B10	C12	R4
FMV95-616	P	5b	21	A10	B10	C12	R4
FMV96-1900	P	5b	22	A10	B10	C12	R4
K17	P	5a	Réf.	A11	B10	C12	R5

^a Origine des échantillons: poumons (P), amygdales (A) et cavités nasales (N)

Tableau 6. Indice numérique de discrimination (D) calculé avec les données obtenues à partir des profils RAPD

Amorce	Sérotypes 1 et 5		Sérotype 1	
	Nb de profils	D	Nb de profils	D
OPB7	11	0,73	9	0,80
OPB11	10	0,67	9	0,64
#17	12	0,71	11	0,80
OPB7 + OPB11	12	0,71	10	0,69
OPB7 + #17	14	0,73	12	0,80
OPB11 + #17	14	0,72	13	0,84
OPB7 + OPB11 + #17	15	0,74	13	0,84

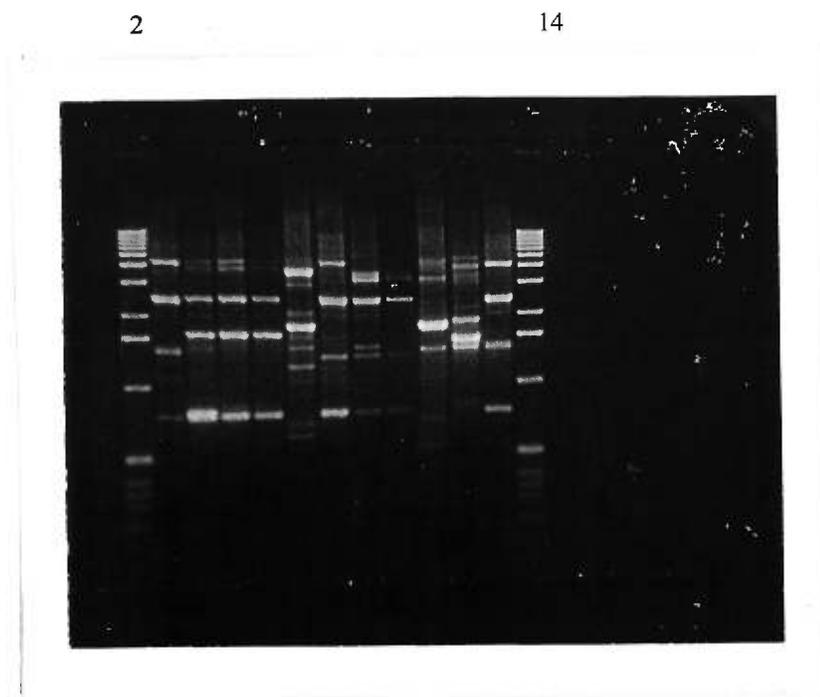


Figure 1. Profils RAPD obtenus avec l'amorce OPB7 pour les 49 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

- Piste 1: témoin négatif
- Pistes 2 et 14 : témoin de taille (ladder 1 kb)
- Piste 3 : profil A10
- Piste 4 : profil A1
- Piste 5 : profil A3
- Piste 6 : profil A7
- Piste 7: profil A2
- Piste 8 : profil A4
- Piste 9 : profil A5
- Piste 10 : profil A6
- Piste 11 : profil A8
- Piste 12 : profil A9
- Piste 13 : témoin positif (souche de *Streptococcus suis*, #95-8242)

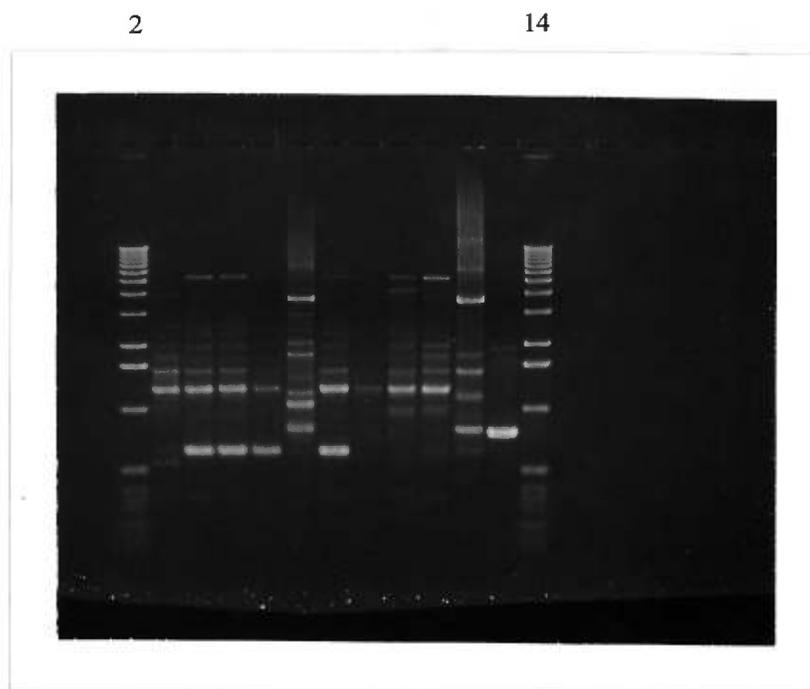


Figure 2. Profils RAPD obtenus avec l'amorce OPB11 pour les 49 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Piste 1 : témoin négatif

Pistes 2 et 14: témoin de taille (ladder 1 kb)

Piste 3 : profil B10

Piste 4 : profil B1

Piste 5 : profil B3

Piste 6 : profil B7

Piste 7 : profil B2

Piste 8 : profil B4

Piste 9 : profil B5

Piste 10 : profil B6

Piste 11 : Profil B8

Piste 12 : témoin positif (souche de *Streptococcus suis*, #95-8242)

Piste 13 : profil B9

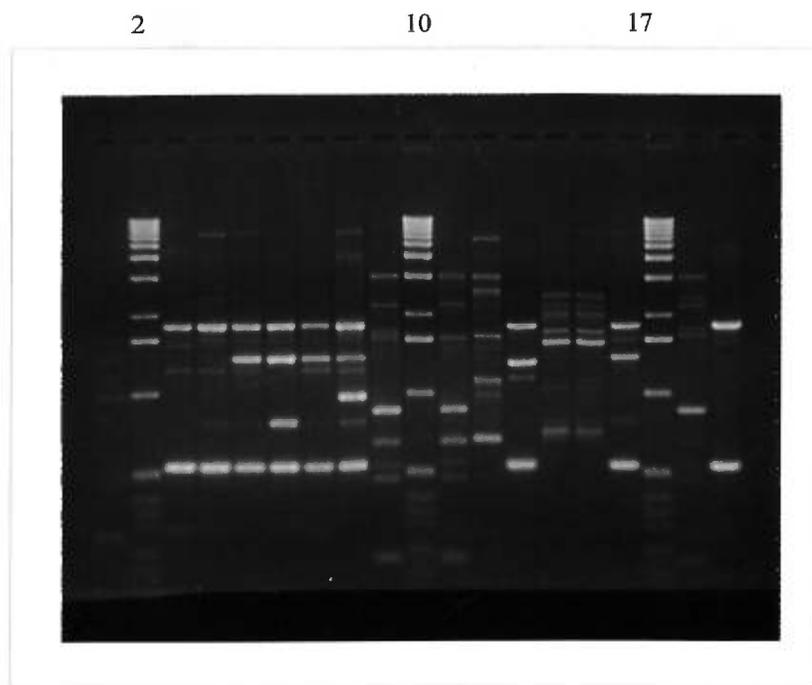


Figure 3. Profils RAPD obtenus avec l'amorce #17 pour les 49 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Piste 1: témoin négatif

Pistes 2,10 et 17 : témoin de taille (ladder 1 kb)

Piste 3 : profil C12

Piste 4 : profil C4

Piste 5: profil C9

Piste 6 : profil C2

Piste 7 : profil C8

Piste 8 : profil C3

Piste 9 : profil C5

Piste 11 : profil C6

Piste 12 : profil C7

Piste 13 : profil C10

Piste 14 : profil C11

Piste 15 : profil C11

Piste 16: profil C1

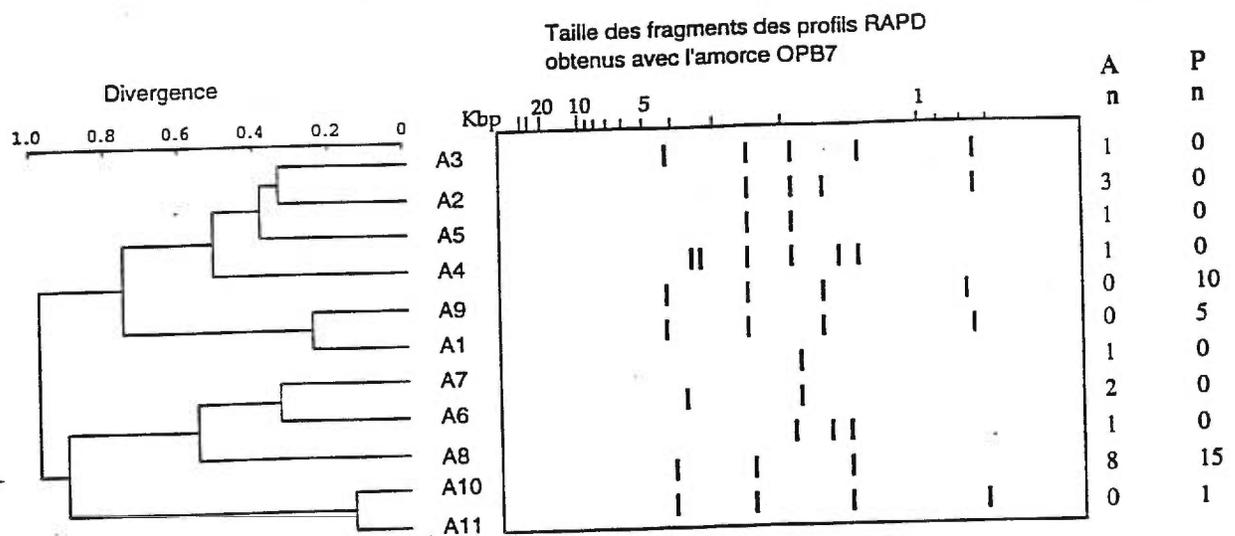


Figure 4. Relation génétique entre les 49 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*: 11 profils (A) ont été mis en évidence. Pour chaque profil, le nombre de souches isolées de poumons (P) et isolées d'amygdales (A) est indiqué. Les 24 souches de sérotype 5 se retrouvent dans les profils A10 et A11.

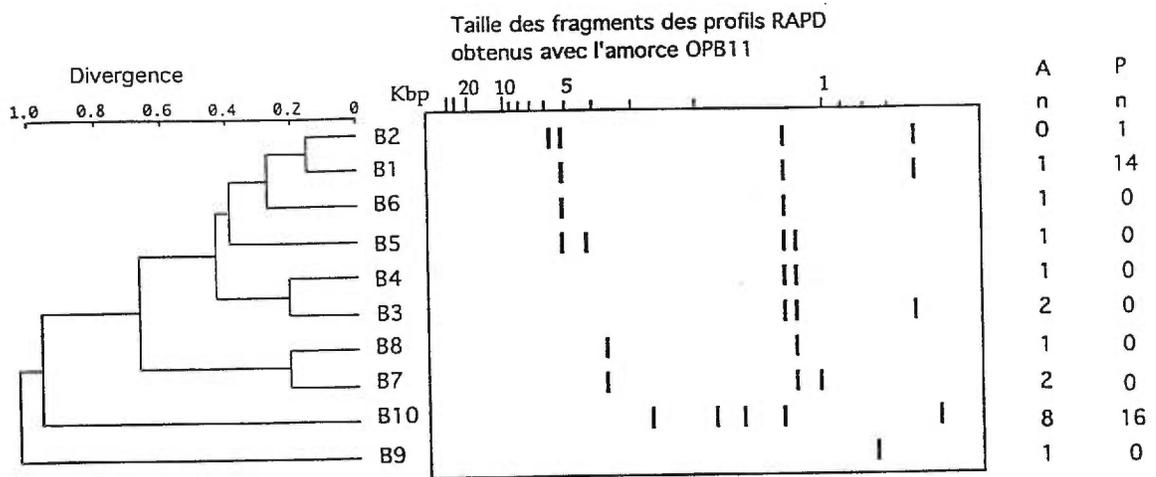


Figure 5. Relation génétique entre les 49 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*: 10 profils (B) ont été mis en évidence. Pour chaque profil, le nombre de souches isolées de poumons (P) et isolées d'amygdales (A) est indiqué. Les 24 souches de sérotype 5 se retrouvent dans le profil B10.

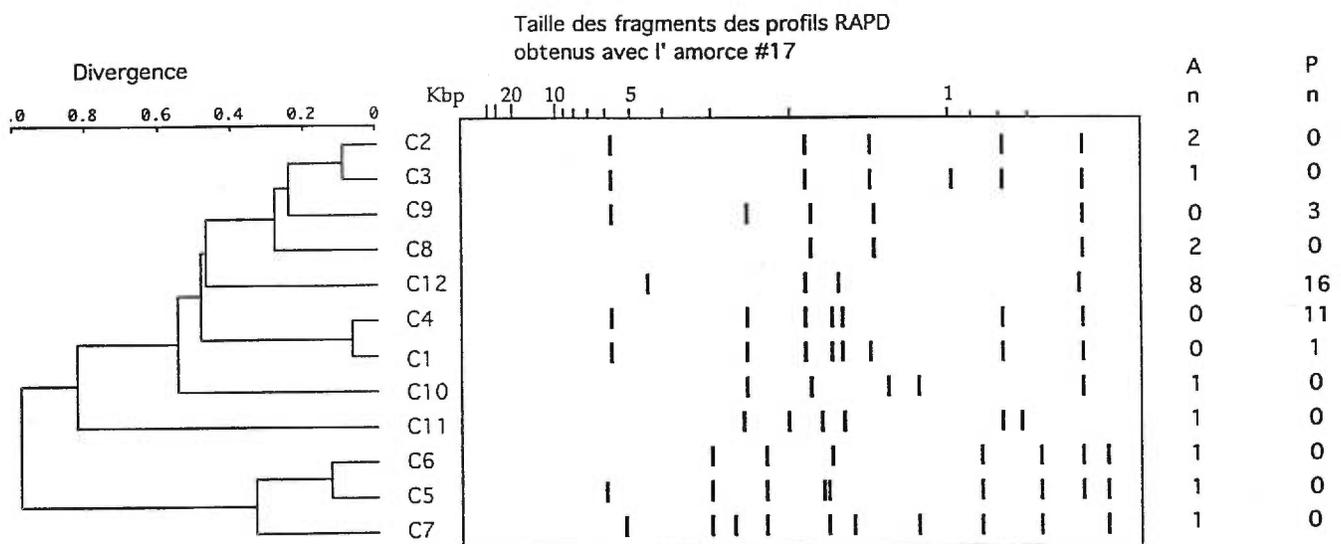
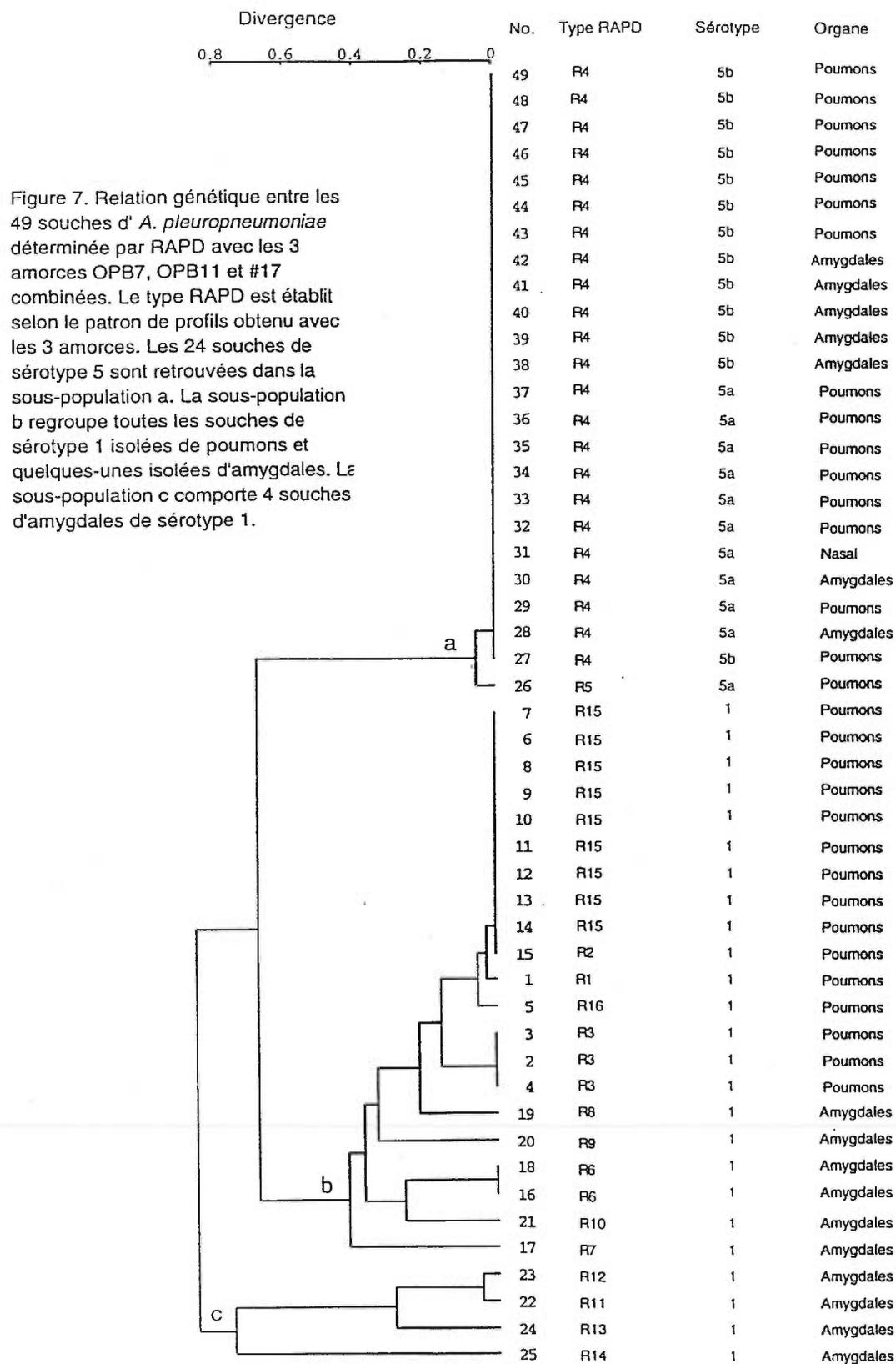


Figure 6. Relation génétique entre les 49 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*: 12 profils (C) ont été mis en évidence. Pour chaque profil, le nombre de souches isolées de poumons (P) et isolées d'amygdales (A) est indiqué. Les 24 souches de sérotype 5 se retrouvent dans le profil C12.



I V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Le premier objectif de la présente étude consistait à développer une méthode immunomagnétique pour isoler de façon sélective *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 à partir d'amygdales de porcs infectés sous-cliniquement. Cette approche, utilisée en complément à la sérologie, visait à améliorer la détection des animaux porteurs asymptomatiques afin d'exercer un contrôle plus efficace de la maladie. Le deuxième objectif visait à étudier la variété phénotypique et génomique d'isolats d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 5 provenant de cas d'infections cliniques et sous-cliniques.

La détection des infections sous-cliniques causées par *A. pleuropneumoniae* peut s'effectuer de deux façon: la détection des anticorps produits ou de la bactérie. L'isolement de la bactérie à partir des amygdales et/ou des cavités nasales constitue un bon complément à la sérologie (Sidibé et coll. 1993). Cependant, la colonisation de ces sites par une multitude de micro-organismes constituant la flore commensale rend très difficile la mise en évidence d'*A. pleuropneumoniae* à partir d'échantillons d'amygdales ou d'écouvillonnage nasaux, et ce même en utilisant des milieux sélectifs (Kume et coll., 1984; Sidibé et coll., 1993).

Ainsi, pour répondre à notre premier objectif d'étude, des billes magnétiques couplées à des anticorps polyclonaux spécifiques au sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae* ont été utilisées. L'immunocapture magnétique a été largement utilisée afin d'isoler de façon sélective des micro-organismes à partir d'échantillons très hétérogènes (Skjerve et Olsvik, 1991; Dziadkowiec et coll., 1995; Chapman et coll., 1994; Luk et Lindberg, 1991). La spécificité et la sensibilité de la technique dépendent d'une multitude de facteurs, qui ont tous été évalués dans le présent travail, dont la spécificité et

l'affinité de l'anticorps utilisé pour coupler les billes, la concentration de cet anticorps sur les billes, le ratio billes/bactérie, la température et le temps d'incubation et les solutions d'isolement et de lavages (Safarik et coll., 1995).

Une concentration de 15 µg d'IgG/mg de billes s'est avérée optimale. Une quantité de billes équivalente à 1×10^7 billes/mL d'échantillon a permis de récupérer un maximum (81,8%) de bactéries à partir d'une culture de 10^3 CFU d'*A. pleuropneumoniae*/mL. Une variation dans la récupération des bactéries a été observée aux différents temps et température d'incubation et une incubation de 30 min à 20°C a été choisie pour les expériences subséquentes. La standardisation de la technique s'est vue compliquée à cause de l'isolement non-spécifique de germes de la flore normale des amygdales. Cette adhérence non-spécifique, contrairement à Fratamico et coll. (1992) et Okrend et coll. (1992), n'a pu être réduite en utilisant des tubes siliconisés ou en changeant les tubes entre les lavages. Les amygdales ont été traitées de façon différente à l'isolement standard, où un simple écouvillonnage de l'intérieur des amygdales est réalisé, afin d'obtenir le plus de bactéries d'*A. pleuropneumoniae* possible (et conséquemment des autres germes) dans l'échantillon: homogénéisation d'une suspension contenant quelques grammes d'amygdales hachées, par mélange au vortex. L'utilisation d'une solution de blocage (PBS-0,1% BSA) et une filtration des surnageants des amygdales a permis d'augmenter de façon significative le rapport *A. pleuropneumoniae*/ micro-organismes non-ciblés, de 1/1 à 64,5/1 dans les conditions initiales et finales respectivement. La technique développée dans cette étude s'avère très sensible, soit 1000 fois plus que la technique standard d'isolement. Elle permet de détecter aussi peu que 10

CFU d' *A. pleuropneumoniae*/0,1 g d'amygdale, ce qui constitue un avantage considérable sachant que le nombre d' *A. pleuropneumoniae* par amygdale est très faible. De plus, la validation de la technique effectuée à partir de 150 amygdales provenant de troupeaux infectés a permis de détecter 3 fois plus d'amygdales positives pour *A. pleuropneumoniae* comparativement à l'isolement standard, 68% et 22% respectivement. De plus, une réduction marquée de la charge de contaminants sur les géloses et un nombre plus élevé de colonies d'*A. pleuropneumoniae*/plaque ont été observés avec la technique d'immunocapture magnétique.

En facilitant l'isolement d' *A. pleuropneumoniae* à partir des amygdales, l'utilisation des billes magnétiques permettrait dans un premier temps et en parallèle avec la sérologie, de préciser le statut sanitaire des troupeaux et, dans un deuxième temps et à plus long terme, d'isoler un plus grand nombre de souches d'amygdales (cas sous-cliniques) et d'établir les propriétés phénotypiques et génomiques de ces souches. De plus, l'immunocapture magnétique confère l'avantage de pouvoir être adaptée aux autres sérotypes importants, tels les sérotypes 5 et 7, simplement en changeant la spécificité de l'anticorps utilisé.

Afin de répondre à notre deuxième objectif, nous avons tout d'abord vérifié certaines caractéristiques phénotypiques de la population d' *A. pleuropneumoniae* étudiée; présence d'hémolyse, dépendance au NAD, dégradation de l'urée et réactivité en Dot-ELISA avec des anticorps monoclonaux spécifiques de sérotype. En second lieu, nous avons évalué l'intérêt d'une technique moléculaire, le RAPD, pour le typage génomique

de ces souches. L'amplification génomique arbitraire ou RAPD, technique basée sur le PCR et développée en 1990 par Williams et coll. et Welsh et McClelland, s'avère un moyen simple et rapide pour le typage génomique d'espèces bactériennes (Kersulyte et coll., 1992; Karkkainen et coll., 1996; Dugourd et coll., 1996; Barbut et coll., 1993; Davin-Regli et coll., 1996).

La caractérisation phénotypique des souches de sérotype 5 a révélé une forte homogénéité tandis que pour le sérotype 1, les résultats en Dot-ELISA suggèrent une hétérogénéité plus élevée. De plus, chez les souches d'amygdales de sérotype 1, une souche s'est avérée atypique (absence d'hémolyse et aucune production d'uréase) et trois autres n'ont réagi en Dot-ELISA avec aucun des trois anticorps monoclonaux testés. Ces quatre souches forment le groupe C déterminé par la combinaison des trois amorces. Il subsiste un doute à savoir si les trois souches négatives au Dot-ELISA appartiennent véritablement à l'espèce *A. pleuropneumoniae*. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les profils RAPD générés et le Dot-ELISA ou l'origine géographique des souches.

Les études antérieures sur la variation génotypique des souches d'*A. pleuropneumoniae* suggèrent une clonalité des souches de sérotype 1 et 5 de poumons et d'amygdales (MacInnes et coll., 1990; Moller et coll., 1992; Hampson et coll., 1993; Beck et coll., 1994). Les résultats de la présente étude qui utilise pour la première fois le RAPD montre une hétérogénéité plus élevée à l'intérieur du sérotype 1 comparativement au sérotype 5. Toutes les souches de sérotype 5 se sont avérées identiques avec les trois amorces sauf la souche de référence K17 qui montrait un profil différent, au niveau d'une seule bande, avec l'amorce OPB7. Cette différence pourrait

être dû au fait que la souche K17 a été isolée du mouton alors que toutes les autres souches étudiées proviennent du porc. Il est établi que les souches de sérotype 1 diffèrent des souches de sérotype 5, du moins selon les empreintes générées par REF, le type électrophorétique généré par MEE et les profils de la membrane externe (MacInnes et coll., 1990; Moller et coll., 1992; Rapp et coll., 1986). Une hétérogénéité inter-sérotype 1 et 5 des souches d' *A. pleuropneumoniae* a également pu être mise en évidence dans la présente étude. Les études sur la variété phénotypique ou génotypique des souches d'amygdales et de poumons sont peu nombreuses et Moller et coll. (1992) ont observé, par "multilocus enzyme electrophoresis" pour les sérotypes 1, 2, 6-10 et 12, que les souches d'amygdales présentaient le même type électrophorétique que les souches de poumons. La technique RAPD a permis d'observer pour la première fois des différences nettes, pour le sérotype 1, entre des souches de poumons et des souches d'amygdales. Il s'agit d'une observation très intéressante suggérant une différence possible au niveau de la virulence, c'est-à-dire que les souches d'amygdales, isolées d'animaux porteurs asymptomatiques, ne sont peut-être pas en mesure de causer la maladie, hypothèse à confirmer *in vivo*. Le fait que les souches d'amygdales pourraient s'avérer non-virulentes ouvre la possibilité que des troupeaux de haute valeur génétique cliniquement sains, où une souche d' *A. pleuropneumoniae* a été isolée à partir des amygdales, soient condamnés à tort alors qu'ils sont infectés par une souche non-virulente. Un polymorphisme beaucoup plus prononcé est apparu à l'intérieur des souches d'amygdales de sérotype 1 comparativement aux souches de poumons; il est possible qu'une certaine sélection soit exercée sur les souches de poumons leur permettant de causer la maladie alors qu'aucune pression n'est exercée sur les souches colonisant les amygdales.

Le pouvoir discriminant du RAPD a été évalué pour chaque amorce et pour chaque combinaisons de celles-ci. L'indice de discrimination le plus élevé a été obtenu en combinant les résultats des trois amorces (0,74 et 0,84). Afin d'atteindre un indice supérieur à 0,90, l'utilisation d'un plus grand nombre d'amorces en combinaison pourrait être nécessaire. Cependant, un indice de discrimination relativement peu élevé ne signifie pas nécessairement que la technique n'est pas discriminante mais peut-être que la population étudiée est clonale.

CONCLUSIONS

Le développement d'une technique de capture immunomagnétique en première partie de ce travail représente une amélioration significative de la détection des animaux porteurs asymptomatiques d'*A. pleuropneumoniae* au niveau des amygdales. Cette méthode innovatrice s'avère beaucoup plus sensible et spécifique que l'isolement standard. De plus, elle permettra ultérieurement l'isolement d'un nombre plus élevé de souches à partir des voies respiratoires supérieures du porc.

L'utilisation de la technique RAPD constitue un outil intéressant pour étudier la diversité génomique des isolats d' *A. pleuropneumoniae*, particulièrement avec les souches isolées des amygdales par la technique d'immunocapture magnétique. Des différences au niveau des profils RAPD ont pu être démontrées entre les souches de sérotype 1 et 5. De plus, la technique RAPD a permis pour la première fois de mettre en évidence un polymorphisme entre les souches de poumons et d'amygdales du sérotype

1. À plus long terme, la technique RAPD pourrait améliorer notre compréhension de l'épidémiologie de la pleuropneumonie porcine en permettant de retracer les sources d'infection et étudier la cinétique et d'autres caractéristiques épidémiologiques de la maladie. La recherche d'amorces plus discriminantes permettrait peut-être de mettre en évidence une variation plus importante des souches de sérotype 5. Aussi, plusieurs méthodes utilisées en parallèle pourraient nous permettre d'obtenir dans un premier temps une confirmation des résultats obtenu par RAPD et en second lieu fournir une étude du génome suffisamment discriminante; l'électrophorèse en champs pulsé ("pulse-field gel electrophoresis"), la REF ("restriction endonuclease fingerprinting") et l'étude des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (rDNA RFLP: ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism).

TRAVAUX FUTURS

Les souches isolées à partir des amygdales chez des porcs ne présentant pas de signes cliniques pourront être étudiées de façon plus approfondie, entre autre pour la production de toxines, la virulence et la confirmation de l'espèce par PCR. Ainsi, la PCR espèce pourrait être appliquée directement à partir des billes magnétiques et une PCR pour le profil de toxines et/ou RAPD pourrait par la suite être effectuée si la souche est identifiée à *A. pleuropneumoniae*.

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alexander, T. J. L. 1991. *Streptococcus suis*: an update. *Pig Vet. J.* **27**:50-60.

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

Altman, E., M.B. Perry and J.R. Brisson. 1989a. Structure of the lipopolysaccharide antigenic O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 4 (ATCC 33378). *Carbohydrate Res.* **191**: 295-303.

Altman, E., J.R. Brisson and M.B. Perry. 1989b. Structure of the lipopolysaccharide O antigen of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 6 (ATCC 33590). *Can. J. Chem.* **67**: 703-707.

Baarsch, M. J., M. J. Wannemuehler, T. W. Molitor and M .P. Murtaugh. 1991. Detection of tumor necrosis factor-alpha from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay. *J.Immunol. Met.* **140**:15-22.

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

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

Barbut, F., N. Mario, M. Delmée, J. Gozian and J. C. Petit. 1993. Genomic fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates by using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**:161-166.

Barrère, E., P. Cabanié, Y. Nicolas et P. Massabie. 1993. Innocuité d'une technique de biopsie d'amygdale chez le porc. In: 25èmes Journées de la recherche porcine en France, Institut technique du porc (éd.), Paris, France. pp.329-334.

Beck, M., J. F. van den Bosch, I. M. C. A. Jongenelen, P. L. W. Loeffen, R. Nielsen, J. Nicolet and J. Frey. 1994. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2749-2754.

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

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

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

Bélanger, M., S. Rioux, B. Foiry and M. Jacques. 1992. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**:119-126.

Belkum, A. V. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:174-184.

Belz, G. T. and T. J. Heath. 1996. Tonsils of the soft palate of young pigs: crypt structure and lymphoepithelium. *Anat. Rec.* **245**:102-113.

Benkirane, R. M., E. Guillot and C. Mouton. 1995. Immunomagnetic PCR and DNA probe for detection and identification of *Porphyromonas gingivalis*. J. Clin. Microbiol. **33**:2908-2912.

Biswas, B., R. Vemulapalli and S. K. Dutta. 1994. Detection of *Ehrlichia risticii* from feces of infected horses by immunomagnetic separation and PCR. J. Clin. Microbiol. **32**:2147-2151.

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

Borr, J. D., D. A. J. Ryan and J. I. MacInnes. 1991. Analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related organisms by DNA-DNA hybridization and restriction endonuclease fingerprinting. Int. J. Sys. Bacteriol. **41**:121-129.

Bossé, J. T., R. P. Johnson and S. Rosendal. 1990a. Capsular polysaccharide antigens for detection of serotype specific antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. J. Vet. Res. **54**:320-325.

Bossé, J. T., R. P. Johnson and S. Rosendal. 1990b. Serodiagnosis of pleuropneumonia using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with capsular polysaccharide antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5 and 7. *Can. J. Vet. Res.* **54**:427-431.

Caetano-Anollés, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Meth. Applic.* **3**:85-94.

Campbell, G., O. Abraomsky and A. D. Silberberg. 1978. Isolation of oligodeandocytes from mouse cerebellum using magneticmicrosphere. *Soc. Neurosci. Abstr.* **4**:64.

Chapman, P. A., D. J. Wright and C. A. Siddons. 1994. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* **40**:424-427.

Chatellier, S. 1996. Caractérisation génomique de souches de *Streptococcus agalactiae* isolées des infections génitales, materno-foetales et néonatales: mise en évidence de caractéristiques particulières des opérons *rrn* des souches invasives. Thèse de Doctorat, Université François Rabelais de Tours, France, p.138.

Ciprian, C. A., A. G. Medina, R. M. Fuentes, A. C. Pijoan, A. O. Torres, V. G. Colmenares and M. J. Camacho. 1988. Serotyping of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolated from pigs in Mexico. *Vet. Mexico*. **19**:205-210.

Crujisen, T., L.A. M. G. van Leengoed, E. M. Kamp, W. A. Hunneman, K. Riepema, A. Bartelse and J. H. M. Verheijden. 1995. Prevalence and development of antibodies neutralizing the haemolysin and cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in three infected pig herds. *Vet. Quart.* **17**:96-100.

Cudjoe, K. S., T. Hagtvedt and R. Dainty. 1995. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. *Int. J. Food Microbiol.* **27**:11-25.

Davin-Regli, A., P. Saux, C. Bollet, F. Gouin and P. de Micco. 1996. Investigation of outbreaks of *Enterobacter aerogenes* colonisation and infection in intensive care units by random amplification of polymorphic DNA. *J. Med. Microbiol.* **44**:89-98.

Davin-Regli, A., Y. Abel, R. N. Charrel, C. Bollet and P. de Micco. 1995. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* **146**:561-568.

De Jong, M. F. 1988. Dans: Les programmes de suivi sanitaire de sélection-multiplication. C.R. Séminaires I. T. P., Rennes, pp. 74-82.

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

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

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

Dugourd, D., M. Jacques, M. Bigras-Poulin and J. Harel. 1996. Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 by random amplification of polymorphic DNA analysis. Vet. Microbiol. **48**:305-314.

Dziadkowiec, D., L. P. Mansfield and S. J. Forsythe. 1995. The detection of *Salmonella* in skimmed milk powder enrichments using conventional methods and immunomagnetic separation. Lett. Appl. Microbiol. **20**:361-364.

Eaves, L. and P. J. Blackall. 1988. Serological characterization of Australian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Aust. Vet. J. **65**:379-381.

Enroth, H. and L. Engstrand. 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. J. Clin. Microbiol. **33**:2162-2165.

Fales, W. H., L. F. Morehouse, K. R. Mittal, C. B. Knudsen, S. L. Nelson, L. D. Kinter, J. R. Turk, M. A. Turk, T. P. Brown and D. P. Shaw. 1989. Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine. J. Vet. Diagn. Invest. **1**:16-19.

Fenwick, B. and S. Henry. 1994. Porcine pleuropneumonia. JAVMA. **204**:1334-1342.

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

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

Ferri, E. E. R., C. B. Gutiérrez, J. A. Vazquez, R. I. Tascon, J. A. Garcia Pena and R. Fuente. 1990. Isolation and characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains from swine pneumonia and pleuropneumonia in Spain. Proc. 11th Int. Pig Vet. Soc. Congr. Lausanne, Switzerland, p.29.

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

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

Fratamico, P. M., F. J. Schultz and R. L. Buchanan. 1992. Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an immunomagnetic separation method. Food. Microbiol. **9**:105-113.

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

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

Frey, J., R. Kuhn and J. Nicolet. 1994. Association of the Camp phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiol. Letters.* **124**:245-252.

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

Gottschalk, M. 1991. Current diagnostic tools for dealing with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Proc. Western Can. Ass. Swine Prac, Annual Meeting. pp.60-80.

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

Gottschalk, M., E. Altman, S. Lacouture, F. De Lasalle and J. D. Dubreuil. 1997. Serodiagnosis of swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 7 and 4 using long-chain lipopolysaccharides. *Can. J. Vet. Res.* **61**:62-65.

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

Gram, T., P. Arhens and J. P. Nielsen. 1996. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet. Microbiol.* **51**:95-104.

Gundersen, S. G., I. Haagensen, T. O. Jonassen, K. J. Figenschau, N. De Jonge and A. M. Deelder. 1992. Magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *J. Immunol. Methods.* **148**:1-8.

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

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

Hampson, D. J., D. J. Blackall, J. M. Woodward and A. J. Lymbery. 1993. Genetic analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and comparison with *Haemophilus* spp. Taxon "Minor Group" and Taxon C. *Zbl. Bakt.* **279**:83-91.

Hennessy, K. J., J. J. Iandolo and B. W. Fenwick. 1993. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1155-1159.

Higgins, R., S. Larivière, K. R. Mittal, R. Desrosiers, A. Désilets, C. Bédar-Royal, R. Éthier and J. Simard. 1982. La pleuropneumonie porcine au Québec. *Med. Vet. Québ.* **12**:33-47.

Huether, M. J., G. Lin, D. M. Smith, M. P. Murtaugh and T. W. Molitor. 1993. Cloning, sequencing and regulation of an mRNA encoding porcine interleukin-1 β . *Gene.* **129**:285-289.

Hunter, P. R. and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465-2466.

Hunter, D. and J. Livingstone. 1986. Detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* antigens using the coagglutination test. *Vet. Rec.* **118**:129.

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

Idris, V. A., W. L. Steffens, F. A. Udeze and S. Kadis. 1992. Effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide on cultured porcine neutrophils. *Curr. Microbiol.* **24**:81-87.

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

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

Inzana, T.J. and B. Mathison. 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **55**: 1580-1587.

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

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

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

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

Jacobsen, M. J., J. P. Nielsen and R. Nielsen. 1996. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. Vet. Microbiol. **49**:159-168.

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

Jansen, R., J. Briaire, H. E. Smith, P. Dom, F. Haesebrouck, E. M. Kamp, A. L. J. Gielkens and M. A. Smits. 1995. Knock-out mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins, do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect. Immun.* **63**:27-37.

Kamp, E.M., J.K. Popma and L.A.M.G. Van Leengoed. 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: With emphasis on heterogeneity within serotype 1 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.* **27**: 1187-1191.

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

Karkkainen, U. M., J. Kauppinen, R. Ikaheimo and M. L. Katila. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Escherichia coli* strains- comparison of urinary and concomitant blood isolates of urosepsis patients. *APMIS.* **104**:437-443.

Karsch, H., C. Janetzki-Mittmann, S. Aleksic and M. Datz. 1996. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J. Clin. Microbiol.* **34**:516-519.

Kersulyte, D., J. P. Woods, E. J. Keath, W. E. Goldman and D. E. Berg. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* **174**:7075-7079.

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

Kobisch, M., A. Labbé, P. Morvan, M. M. Lemoine, B. Beaurepaire, R. Cariolet and J. F. Pansart. 1993. Pathologie pulmonaire du porc: un modèle expérimental associant *Mycoplasma Hyopneumoniae* et *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 25ème Journées de la Recherche Porcine en France, Institut technique du porc (éd.), Paris, France. pp.339-344.

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

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

Lacouture, S., K. R. Mittal, M. Jacques and M. Gottschalk. 1997. Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. J. Vet. Diag. Inv. (In press).

Lairini, K., E. Stenbaeck, S. Lacouture and M. Gottschalk. 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Vet. Microbiol. **46**:369-381.

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

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

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

Luk, J. M. C., and A. A. Lindberg. 1991. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* (O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays. J. Immunol. Meth. **137**:1-8.

Lund, A., A. L. Hellemann and F. Vartdal. 1988. Rapid isolation of K88 *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles. J. Clin. Microbiol. **26**:2572-2575.

MacInnes, J. I., J. D. Borr, M. Massoudi and S. Rosendal. 1990. Analysis of Southern Ontario *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolates by restriction endonuclease fingerprinting. Can. J. Vet. Res. **54**:244-250.

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

Meunier, J. R. and P. A. D. Grimont. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res. Microbiol. **144**:373-379.

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

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

Mittal, K. R. and R. Higgins. 1994. Distribution des différents sérotypes d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades, au cours des dernières années au Québec. Le Médecin Vétérinaire du Québec. **24**:175-176.

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

Mittal, K. R., R. Higgins and S. Larivière. 1981. Capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. In: 24th Annual Proc. Am. Ass. Vet. Lab. Diag. pp. 237-280.

Mittal, K.R., R. Higgins and S. Larivière. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **15**: 1019-1023.

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

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

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

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

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

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

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

Molday, R. S., S. P. S. Yen and A. Rembaum. 1977. Application of magnetic microspheres in labeling and separation of cells. Nature. **268**:437.

Molenda, J. 1988. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a causative agent of pleuropneumonia in pigs. *Med. Wetery.* **44**:592-595.

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

Moller, K., R. Nielsen, L. V. Andersen and M. Kilian. 1992. Clonal analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* population in a geographically restricted area by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **30**:623-627.

Molnar, E. 1990. Survey of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine by different methods. *Acta Vet. (Hungaria)*, **38**:231-238.

Morgan, J. A. W., C. Winstanley, R. W. Pickup and J. R. Saunders. 1991. Rapid immunocapture of *Pseudomonas putida* cells from lake water by using bacterial flagella. *Appl. Env. Microbiol.* **57**:503-509.

Muller, E., G. Korte and K. Petzoldt. 1986. Isolation and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in Northwestern Germany. *Proc. 9th Int. Pig Vet. Soc. Cong.* p.261.

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

Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, J. J. Serrano, C. Garcia and M. de la Garza. 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. Can. J. Vet. Res. **58**:83-86.

Nicolet, J. 1971. Sur l'hémophilose du porc. Différentiation sérologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. Zentrabl. Bakteriол. Parasithed. Infectionskr. **216**: 487-495.

Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Taylor, D. J. (ed.), Section 3, Bacterial Diseases, Swine Diseases. **31**:401-408. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Okrend, A., B. E. Rose and C. P. Lattuada. 1992. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads. J. Food Prot. **55**:214-217.

Olander, H.J. 1963. A septic disease of swine and its causative agent *Haemophilus parahaemolyticus*. Ph.D. Thesis Univ. California, Davis, USA.

Olivares, P. and A. Morgado. 1988. Isolation and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in three porcine pleuropneumonia outbreaks in central Chile. Arch. Med. Vet. (Chile). **20**:147-152.

Owen, C. J. 1984. The hog industry in Quebec. Working paper, Agriculture Canada, 57 p.

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

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

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

Penner, G. A., A. Bush, R. Wise, W. Kim, L. Domier, K. Kasha, A. Laroche, G. Scoles, S. J. Molnar and G. Fedak. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth. Appl.* **2**:341-345.

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

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

Pittman, M.A. 1953. A classification of the hemolytic bacteria of the genus *Haemophilus*: *Haemophilus Haemolyticus* Bergey and al. and *Haemophilus parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **65**: 750-751.

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

Radacovici, S., M. Gottschalk and J. D. Dubreuil. 1995. Recovery of lipopolysaccharides from liquid culture of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotype 5) for ELISA serodiagnosis. *Vet. Res.* **26**:63-67.

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

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

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

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

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

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

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

Rychlik, I., M. Bartos and K. Sestak. 1994. Use of DNA fingerprinting for accurate typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Med.- Czech.* **39**:167-174.

Rycroft, A. N. and J. M. Cullen. 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine. *Am. J. Vet. Res.* **51**:1449.

Safarik, I., M. Safarikova and S. J. Forsythe. 1995. The application of magnetic separations in applied microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:575-585.

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

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

Sirois, M., E. G. Lemire and R. C. Lévesque. 1991. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **29**:1183-1187.

Skjerve, E. and O. Olsvik. 1991. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. Int. J. Food Microbiol. **14**:11-18.

Skjerve, E., L. M. Rorvik and O. Olsvik. 1990. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. Appl. Env. Microbiol. **56**:3478-3481.

Stenbaek, E. I. And A. L. Schirmer. 1994. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in pig sera by an inhibition Enzyme Immuno Assay (E.I.A.). Vet. Microbiol. **39**:231-244.

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

Swann, I. D., G. B. Dealtry and D. Rickwood. 1992. Differentiation-related changes in quantitative binding of immunomagnetic beads. J. Immunol. Methods. **152**:245-251.

Tascon, R. I., J. A. Vazquez-Boland, C. B. Gutierrez-Martin, I. Rodriguez-Barbosa and E. F. Rodriguez-Ferri. 1994. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.* **14**:207-216.

Taylor, D. J. 1995. Pleuropneumonia (*Actinobacillus pleuropneumoniae* infection). In: Pig Diseases, Taylor D. J. (éd.), St-Edmundsbury Press, Suffolk, England, p.188.

Torensma, R., M. J. C. Visser, C. J. M. Aarsman, M. J. J. G. Poppelier, A. C. Fluit and J. Verhoef. 1993. Monoclonal antibodies that react with live *Listeria* spp. *Appl. Env. Microbiol.* **59**:2713-2716.

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

Utrera, V., C. Pijoan, A. Gallardo and L. Marino. 1988. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by paper chromatography test. Proc. 10th Int. Pig Vet. Soc. Congr. Rio de Janeiro, Brazil, p.75.

Vaillancourt, J., G. P. Martineau, R. Higgins and S. Larivière. 1987. Pleuropneumonie porcine due à *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Partie 2: De la situation épidémiologique mondiale à celle du Québec. Med. Vet. Québ. **17**:189-193.

Vaillancourt, J., R. Higgins, G. P. Martineau, K. R. Mittal and S. Larivière. 1988. Changes in the susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to antimicrobial agents in Quebec (1981-1986). J. Am. Vet. Med. Assoc. **193**: 470-473.

Vena, M. M., J. M. Miquet and P. Nardone. 1988. Detection and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pig lungs in Argentina by coagglutination test. Proc. 10th Int. Pig Vet. Soc. Cong. Rio de Janeiro, Brazil. p.80.

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

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. **18**:7213-7218.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.

Wipat, A., E. M. H. Wellington and V. A. Saunders. 1994. Monoclonal antibodies for *Streptomyces lividans* and their use for immunomagnetic capture of spores from soil. *Microbiol.* **140**:2067-2076.
