

2m11-3102.5

**Université de Montréal**

**MÉTHODES MOLÉCULAIRES DE DÉTECTION D'ANIMAUX PORTEURS  
D'*ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* : COMPARAISON ET  
VALIDATION D'ÉPREUVES PCR**

**par**

**NAHUEL VICENTE FITTIPALDI**

**Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire**

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

**Avril, 2003**

**© Nahuel Vicente Fittipaldi, 2003**



SF  
607  
U54  
2004  
V.003

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé**

**MÉTHODES MOLÉCULAIRES DE DÉTECTION D'ANIMAUX PORTEURS  
D'*ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* : COMPARAISON ET  
VALIDATION D'ÉPREUVES PCR**

**présenté par**

**NAHUEL VICENTE FITTIPALDI**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes**

.....  
**Serge Messier, président-rapporteur**

.....  
**Marcelo Gottschalk, directeur de recherche**

.....  
**Josée Harel, codirectrice**

.....  
**André Broes, codirecteur**

.....  
**Mario Jacques, membre du jury**

# RÉSUMÉ

**Mots clés :** *Actinobacillus pleuropneumoniae* ; PCR ; amygdale ; diagnostic ; porc.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est l'agent de la pleuropneumonie porcine, maladie à l'origine de pertes économiques sévères pour l'industrie du porc partout dans le monde. La détection de cette bactérie chez les animaux infectés de façon sous-clinique est essentielle pour contrôler la maladie.

Le but du présent projet était de comparer huit épreuves PCR pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* à partir d'amygdales de porc. Les épreuves furent d'abord comparées pour leur spécificité et leur sensibilité. Les réactions PCR furent effectuées directement sur un homogénat d'amygdale (PCR directe), et après une étape de culture de l'échantillon (PCR après culture). La plupart des épreuves se sont avérées spécifiques. Des niveaux de sensibilité très variables furent notés parmi les épreuves pour la PCR directe. Par contre, pour la PCR après culture, la sensibilité fut élevée et très similaire d'une épreuve à l'autre.

Deux de ces épreuves furent validées sur le terrain et comparées à l'isolement bactérien standard et à celui par capture sélective immunomagnétique (IMS). Nous avons utilisé des biopsies d'amygdales, prélevées chez le porc vivant, et des amygdales entières récupérées à l'abattoir. La bactérie ne fut pas détectée dans un troupeau sérologiquement négatif pour *A. pleuropneumoniae*. Dans trois troupes infectés, la PCR à partir d'amygdales entières s'avéra plus sensible que l'isolement standard. La PCR après culture démontra la plus haute sensibilité, suivie de la PCR directe et de l'isolement IMS, qui avaient une sensibilité similaire. Le taux de détection par PCR fut plus élevé à partir d'amygdales entières qu'à partir de biopsies. Une bonne corrélation fut obtenue entre la présence de la bactérie dans les amygdales et le statut sérologique individuel des animaux testés.

## ABSTRACT

**Keywords :** *Actinobacillus pleuropneumoniae* ; PCR ; tonsils ; diagnostic ; pig

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of swine pleuropneumonia, a disease responsible of severe economic losses for the swine industry worldwide. Detection of subclinically infected animals is of main importance to control the disease.

The aim of this study was to compare eight PCR tests for the detection of *A. pleuropneumoniae* in swine tonsils. At first, the tests were compared regarding their specificity and their sensitivity. PCR were carried out both directly on tonsil homogenates (direct PCR), and after a culture step of the sample (after culture PCR). Most tests demonstrated a good specificity. A high variation in sensitivity among tests was observed for direct PCR whereas that of after culture PCR was high and very similar among tests.

Two PCR tests were further validated in the field and compared to standard and to immunomagnetic-separation-based (IMS) bacterial isolation. Field samples used were tonsil biopsies (from living animals) and whole tonsils (collected at the slaughterhouse). The organism was neither isolated nor detected by PCR in an *A. pleuropneumoniae* serologically negative herd. In three infected herds, using whole tonsils, PCR was more sensitive than standard isolation. After culture PCR offered the highest sensitivity followed by direct PCR and IMS isolation, that presented similar sensitivity values. PCR detection rate was higher from whole tonsils than from tonsil biopsies. A good agreement was found between the presence of *A. pleuropneumoniae* in the tonsils and an individual positive serological status.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>IDENTIFICATION DU JURY</b>	ii
<b>RÉSUMÉ</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	v
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	viii
<b>LISTE DES FIGURES</b>	ix
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b>	xi
<b>REMERCIEMENTS</b>	xiii
<b>I - INTRODUCTION</b>	1
<b>II - RECENSION DE LA LITTÉRATURE</b>	6
1.- Généralités sur <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	7
1.1.- Caractéristiques bactériologiques	7
1.2.- Taxonomie	8
1.3.- Sérotypes	9
2.- La pleuropneumonie porcine	10
2.1.- Caractéristiques de la maladie	10
2.2.- Transmission de la pleuropneumonie porcine	12
2.3.- Traitement et prophylaxie de la pleuropneumonie porcine	13
2.3.1.- Antibiothérapie	14

2.3.2.- Vaccination	
3.- Les facteurs de virulence d' <i>A. pleuropneumoniae</i>	16
3.1.- Exotoxines	16
3.2.- Les lipopolysaccharides	18
3.3.- La capsule polysaccharidique	20
3.4.- Systèmes de captation du fer	21
3.5.- Autres facteurs	23
3.5.1.- Les protéases extracellulaires	23
3.5.2.- Résistance à la phagocytose et au sérum	24
3.5.3.- Fimbriae	24
3.6.- Expression différentielle in vivo des gènes de virulence	25
4.- Le diagnostic	26
4.1.- Statut sanitaire des troupeaux	27
4.2.- La sérotypie	28
4.3.- Méthodes indirectes de détection : la sérologie	31
4.4.- Méthodes directes de détection	35
4.4.1.- Isolement d' <i>A. pleuropneumoniae</i>	35
4.4.1.1.- Méthode standard	35
4.4.1.2.- Méthode d'immunocapture magnétique	38
4.4.2.- Détection immunologique directe d' <i>A. pleuropneumoniae</i>	40
4.4.3.- Détection moléculaire d' <i>A. pleuropneumoniae</i>	41

4.4.3.1.- L'épreuve PCR canadienne	42
4.4.3.2.- L'épreuve PCR avec des amorces "arbitraires"	42
4.4.3.3.- L'épreuve PCR "toxines" (ApxI, ApxII et ApxIII)	43
4.4.3.4.- L'épreuve PCR <i>omlA</i> japonaise	43
4.4.3.5.- Détection différentielle du sérotype 5 par PCR	44
4.4.3.6.- L'épreuve PCR <i>aroA</i>	46
4.4.3.7.- L'épreuve PCR <i>omlA</i> danoise	46
4.4.3.8.- L'épreuve PCR multiplex <i>omlA</i>	47
4.4.3.9.- L'épreuve PCR <i>omlA</i> française	47
4.4.3.10.- Une épreuve PCR commerciale	48
4.4.3.11.- L'épreuve PCR <i>tbpA-tbpB</i>	49
4.4.3.12.- L'épreuve PCR nichée sur le gène <i>apxIVA</i>	49
4.4.3.13.- L'épreuve PCR <i>dsbE</i> -like	50
4.4.3.14.- Une épreuve PCR "en temps réel"	51
<b>III - MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS</b>	<b>52</b>
Article: Detection of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> in subclinically infected pigs Evaluation and field validation of PCR tests.	53
<b>IV - DISCUSSION</b>	<b>83</b>
<b>V - CONCLUSIONS</b>	<b>99</b>
<b>VI - BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>102</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>125</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b>	Production des toxines Apx par les différents sérotypes d' <i>A. pleuropneumoniae</i>	18
<b>Tableau II</b>	Sommaire des épreuves PCR disponibles pour la détection d' <i>A. pleuropneumoniae</i>	45
<b>Tableau III</b>	Sensibilité obtenue par les différentes épreuves PCR lorsque des extraits bruts, des extraits obtenus avec Instangene Matrix ou de l'ADN purifié ont été utilisés comme source de brin matrice pour la PCR directe	xix Annexe
<b>Tableau IV</b>	Résultats pour l'épreuve PCR Adiavet App ® lorsque deux sérotypes d' <i>A. pleuropneumoniae</i> ont été utilisés en même temps pour infecter expérimentalement des amygdales entières	xx Annexe

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** A) Photographie d'*A. pleuropneumoniae* poussant sur une gélose au sang de mouton non-supplémentée de NAD. Le satellitisme autour de la strie de *S. aureus* et le phénomène CAMP sont faciles à remarquer. B) Microphotographie montrant la morphologie coccobacillaire d'*A. pleuropneumoniae* 8
- Figure 2** A) Porcelets morts suite à un épisode de pleuropneumonie porcine causée par *A. pleuropneumoniae*. B) Poumon prélevé d'un porcelet atteint de la maladie. Les lésions au niveau des lobes diaphragmatiques sont clairement visibles. Photographies par courtoisie du Dr Marcelo Gottschalk 11
- Figure 3** Mécanismes d'acquisition du fer par *A. pleuropneumoniae*. Voir le texte pour plus de détails. Adaptée de Bosse et al., *Microbes Infect.* 2002, **4**: 225-235 22
- Figure 4** Schéma de la procédure utilisée pour l'isolement d'*A. pleuropneumonie* par capture immunomagnétique. Voir le texte pour plus de détails 38
- Figure 5** Pourcentage d'animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae* détectés dans le groupe 3 (N=36) par les différentes techniques utilisées dans cette études à partir d'amygdales entières récoltées à l'abattoir et de biopsies prélevées chez l'animal vivant. La sérologie (ELISA-LC-LPS) avait montré des réactions positives envers les sérotypes 5 et 12 d'*A. pleuropneumoniae* (34 et 3 animaux, respectivement). PCR directe indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir de l'échantillon sans une étape de culture. PCR après culture indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir d'une primoculture des échantillons. Les résultats positifs obtenus avec l'épreuve PCR Adiavet App ont correspondu au groupe de

typage comprenant le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*. La PCR *cps-cpx* est spécifique du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* et a été utilisée pour confirmer les résultats de l'épreuve Adiavet App xvi Annexe

**Figure 6** Pourcentage d'animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae* détectés dans le groupe 4 (N=39) par les différentes techniques utilisées dans cette études à partir d'amygdales entières récoltées à l'abattoir et de biopsies prélevées chez l'animal vivant. La sérologie (ELISA-LC-LPS) avait montré des réactions positives envers le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* (15 animaux, 38 %). PCR directe indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir de l'échantillon sans une étape de culture. PCR après culture indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir d'une primoculture des échantillons. Les résultats positifs obtenus avec l'épreuve PCR Adiavet App ont correspondu au groupe de typage comprenant le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*. La PCR *cps-cpx* est spécifique du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* et a été utilisée pour confirmer les résultats de l'épreuve Adiavet App xvii Annexe

**Figure 7** Pourcentage d'animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae* détectés dans le groupe 5 (N=39) par les différentes techniques utilisées dans cette études à partir d'amygdales entières récoltées à l'abattoir et de biopsies prélevées chez l'animal vivant. La sérologie (ELISA-LC-LPS) avait montré des réactions positives envers les sérotypes 7, 12 et 5 d'*A. pleuropneumoniae* (8, 2 et 1 animal, respectivement). PCR directe indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir de l'échantillon sans une étape de culture. PCR après culture indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir d'une primoculture des échantillons. Les résultats positifs obtenus avec l'épreuve PCR Adiavet App ont correspondu au groupe de typage comprenant le sérotype 7 d'*A. pleuropneumoniae*

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP- PCR	Arbitrarily primed polymerase chain reaction
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine serum albumin
CAMP	Christie, Atkin, Murch-Peterson
CFT	Complement fixation test
CFU	Colony forming unit
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene diamino tetraacetic acid
EIA	Test immunoenzymatique par inhibition
ELISA	Enzyme linked immunoadsorbent assay
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IMS	Immunomagnetic separation
IVET	In vivo expression technology
KDO	Keto-3-deoxyoctanate

LC-LPS	Long-chain-LPS
LPS	Lipopolysaccharides
MALT	Mucosal-associated lymphoid tissue
ME	2-mercaptoéthanol
NAD	$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide
ON	Over night
ONPG	o-Nitrophenyl $\beta$ -D-galactopyranoside
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PPLO	Pleuropneumoniae-like organisms
RFLP	Restricted fragment length polymorphism
RIA	Radio immuno assay
RTX	Repeats in the structural toxin
SCOTS	Selective capture of transcribed sequences
STM	Signature tagged mutagenesis
TAE	Tris-acetic-EDTA buffer
TNF	Tumor necrosis factor
UFC	Unité formatrice de colonies
UTP	Uridine triphosphate
UV	Ultra violet

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes et institutions ayant participé de près ou de loin à ce projet de maîtrise, et plus particulièrement :

- Mon directeur de recherche, le docteur Marcelo Gottschalk, d'abord pour m'avoir généreusement ouvert les portes de son laboratoire. Je le remercie aussi pour sa confiance lors des mes premiers pas dans la recherche en microbiologie, et pour m'avoir guidé tout au long de ce projet par sa présence et ses conseils judicieux, pleins de rigueur scientifique.
- Mes codirecteurs, la docteure Josée Harel et le docteur André Broes, pour avoir partagé avec moi leurs connaissances, pour leurs critiques constructives lors des discussions et pour leurs encouragements constants.
- La docteure Gabriela Martinez, pour son appui inconditionnel et son aide généreuse.
- Le docteur Réal Boutin, pour la partie d'identification des troupeaux et l'échantillonnage, Diane Côte pour son aide technique, et Guy Beauchamp pour l'analyse statistique des résultats.
- Le docteur Benoit D'Amours et Donald Tremblay pour leur aide lors de la standardisation des épreuves PCR.
- Les membres du laboratoire de recherche du Dr Gottschalk, présents et anciens, pour leur soutien tout au long de ce projet, et leurs leçons de français langue seconde.
- Les membres du GREMIP pour leur implication plus ou moins grande dans ce projet.

- Le Ministère des Affaires Étrangères de la République Argentine et le Ministère de l'éducation du Québec, pour m'avoir accordé la bourse d'exemption des frais de scolarité différentiels.
- Le Conseil de recherches en pêche et en agroalimentaire du Québec et le Réseau canadien de recherche sur les bactéries pathogènes du porc pour leur soutien financier.

# **I INTRODUCTION**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est une bactérie coccobacillaire capsulée, à Gram négatif, anaérobie facultative et hémolytique; 2 biotypes et 15 sérotypes ont été décrits jusqu'à présent (15, 170). *A. pleuropneumoniae* a été identifiée comme étant l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, maladie qui est à l'origine d'importantes pertes économiques pour l'industrie du porc partout dans le monde où l'on pratique l'élevage porcin (170). La maladie affecte particulièrement les porcelets en période post sevrage ou les porcs à l'engraissement. Chez les animaux reproducteurs, l'infection est généralement sous-clinique. Chez ces animaux, la bactérie est logée au niveau du tractus respiratoire supérieur, dans les cavités nasales et les amygdales (100, 119, 164). Récemment, une étude a démontré que *A. pleuropneumoniae* possède la capacité de survivre à l'intérieur des cryptes des amygdales, et que ce fait pourrait entraîner le développement de l'état porteur (26).

Ces animaux porteurs ne présentant pas de signes cliniques jouent un rôle important dans la dissémination de la bactérie d'un troupeau à un autre (124). Leur détection s'avère donc essentielle pour contrôler la maladie autant dans le cadre des programmes d'éradication du pathogène que dans celui des certifications des troupeaux reproducteurs. Pour accomplir cet objectif, des techniques de diagnostic rapides, économiques et fiables sont requises. Deux approches complémentaires peuvent être utilisées: l'une indirecte, soit la détection d'anticorps dans le sang, l'autre directe, soit la démonstration de la présence de la bactérie.

De nos jours, la sérologie constitue encore la méthode principale de surveillance des troupeaux. Elle a été très utile pour contrôler la pleuropneumonie porcine (20, 37, 52, 77). La sérologie a toutefois certaines limites en terme de sensibilité et de spécificité. En effet, elle ne permet pas de détecter les sujets récemment infectés qui n'ont pas encore développé d'anticorps ainsi que les animaux infectés depuis un certain temps chez qui les anticorps ont disparu et, enfin, ceux qui ne produisent jamais d'anticorps détectable (24, 119, 164). De plus, des résultats peu concluants en absence de signes cliniques ou de lésions pathologiques sont

occasionnellement obtenus. Dans ces cas, les méthodes directes de détection d'*A. pleuropneumoniae* deviennent utiles pour confirmer ou exclure la présence de la bactérie.

Les amygdales constituent un échantillon plus avantageux que les cavités nasales et le lavage broncho-alvéolaire pour démontrer la présence de la bactérie chez un animal porteur (27, 160). On peut les prélever des carcasses après l'abattage ou sur un animal vivant par biopsie (7). Cependant, les résultats obtenus à partir de ces deux types de prélèvements n'ont jamais été comparés en termes de sensibilité et de spécificité. De plus, nous ne savons pas si les conditions de conservation des échantillons avant leur envoi au laboratoire affectent la détection d'*A. pleuropneumoniae*

La détection d'*A. pleuropneumoniae* par des méthodes directes à partir des amygdales présente tout de même des défis importants. Les méthodes immunologiques telles que l'immunofluorescence, l'immunoperoxidase et la co-agglutination, techniques utiles à partir des poumons, ne sont pas recommandées à cause du risque élevé de faux positifs dus à la présence de bactéries antigéniquement apparentées dans les amygdales. Aussi, les méthodes traditionnelles d'isolement sont très peu sensibles en raison probablement de la colonisation de l'organe par la flore commensale, incluant des espèces NAD-dépendantes, qui interfèrent avec le processus d'isolement et d'identification, même lorsque des milieux sélectifs sont utilisés (83, 164). L'efficacité de l'isolement est toutefois considérablement augmentée après enrichissement par capture sélective au moyen de billes immunomagnétiques (IMS) (2, 47). Cependant, cette technique est relativement laborieuse et coûteuse lorsque le nombre d'échantillons à examiner est élevé. De plus, une nouvelle espèce bactérienne nommée '*A. porcitonisillarum*' a récemment été rapportée, après avoir été isolée en utilisant l'isolement immunomagnétique à partir d'amygdales de porcs (54). Ces isolats partagent plusieurs caractéristiques phénotypiques et antigéniques avec *A. pleuropneumoniae* (54) et ainsi, ils peuvent compliquer l'interprétation des résultats obtenus avec l'isolement

immunomagnétique, car on ne peut les différencier d'*A. pleuropneumoniae* qu'à l'aide de techniques moléculaires ou d'épreuves biochimiques très complexes.

Plusieurs épreuves PCR amplifiant des séquences bien définies du génome d'*A. pleuropneumoniae* ont été décrites au cours des dernières années (27, 30, 58, 59, 67, 107, 160, 161, 165). Ces techniques ont été décrites comme étant des outils performants pour la détection de la bactérie. De plus, un kit PCR prêt à utiliser est déjà commercialisé (Adiavet App®, Adiaçène, St-Brieuc, France). Certaines de ces épreuves PCR peuvent être utilisées pour la détection de l'espèce (27, 160, 161, 165), tandis que d'autres épreuves permettent la différenciation du sérotype 5 (107) ou de groupes de sérotypes, soit de façon directe par amplification différentielle du gène ciblé (59) ou par traitement RFLP de l'amplicon généré (30, 67). Toutes ces épreuves sont supposées posséder une bonne sensibilité et spécificité. Une comparaison de leurs performances telles que décrites dans les publications devient toutefois presque impossible, car les procédures expérimentales et l'échantillon de départ utilisé par les différentes épreuves PCR sont des plus variés. Ainsi, certaines épreuves n'ont été évaluées qu'à partir de cultures pures d'*A. pleuropneumoniae* et d'espèces apparentées ou présentes dans les amygdales de porc (59, 67). D'autres ont utilisé comme source d'ADN des cultures bactériennes mixtes provenant d'amygdales (58, 60) ou d'écouvillons nasaux et d'amygdales (27). Pour certaines autres épreuves, les réactions PCR ont été faites en utilisant de l'ADN extrait à partir de l'échantillon original, sans avoir effectué au préalable une étape de culture. Pour ces épreuves, des biopsies d'amygdales et des lavages broncho-alvéolaires (160), des poumons (30, 107, 161) et des écouvillons nasaux (30, 161) ont été utilisés comme échantillon de départ. De plus, la plupart des évaluations d'épreuves PCR menées jusqu'à présent en utilisant des échantillons d'origine porcine ont eu recours à l'infection expérimentale d'animaux et n'ont pas utilisé d'échantillons du terrain.

L'utilisation d'une épreuve moléculaire scientifiquement validée permettrait d'améliorer notre capacité à clarifier le statut des troupeaux suspectés d'être infectés en identifiant plus rapidement et à moindre coût les animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae*. Le but général de ce projet de maîtrise était donc d'optimiser les

méthodes de détection d'*A. pleuropneumoniae* dans les troupeaux suspectés d'être infectés de façon sous-clinique par cet organisme. De façon plus spécifique, nous voulions: a) établir une comparaison de la sensibilité et de la spécificité de 7 épreuves PCR décrites dans la littérature et une épreuve PCR commerciale pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* en utilisant des amygdales infectées expérimentalement ; b) valider sur le terrain la capacité de deux de ces épreuves PCR à détecter des animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae* ; c) comparer la performance des épreuves PCR avec les méthodes d'isolement classique et la méthode d'isolement utilisant des billes immunomagnétiques ; et enfin d) comparer les avantages et les désavantages à utiliser des biopsies d'amygdales prélevées chez le porc vivant ou des amygdales entières récoltées à l'abattoir pour détecter *A. pleuropneumoniae*. Une comparaison entre les résultats obtenus en effectuant les épreuves PCR à partir d'ADN obtenu avec ou sans une étape de culture de l'échantillon, ainsi que l'effet de différentes méthodes d'extraction d'ADN font aussi partie des objectifs de ce projet de maîtrise. Enfin, un dernier objectif était celui d'étudier une association possible entre le statut sérologique individuel des animaux et la présence du microorganisme dans leurs amygdales

**II RECENSION DE LA  
LITTÉRATURE**

# 1 GÉNÉRALITÉS SUR *A. PLEUROPNEUMONIAE*

## 1.1 Caractéristiques bactériologiques.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine (170), maladie décrite pour la première fois en 1957 en Angleterre (110, 143). Deux biotypes et 15 sérotypes ont été décrits jusqu'à présent (15, 170). *A. pleuropneumoniae* est un coccobacille, à Gram négatif, non sporulé, immobile, capsulé, se présentant de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes (Figure 1) A l'isolement, la bactérie est aérobie ou micro-aérophile, son métabolisme est de type fermentaire. Sur gélose au sang de mouton supplémentée de NAD les colonies sont hémolytiques. La croissance peut aussi être observée sur gélose au sang de mouton non supplémentée de NAD, seulement autour d'une strie de *Staphylococcus* spp. (source de NAD) et, en ce cas, la taille de la zone d'hémolyse est augmentée par l'hémolysine  $\beta$  des staphylocoques (réaction de CAMP positive) (170) (Figure 1).

Un caractère positif est noté pour l'oxydase, l'uréase généralement rapide et intense (exceptionnellement, il est possible d'isoler des variants uréase négative), l'ONPG, la réduction des nitrates et des nitrites, la phosphatase alcaline, l'acidification du fructose, du glucose, du maltose, du mannitol, du mannose, du saccharose et du xylose. Une réponse négative est obtenue pour les tests indole, production de gaz lors de la fermentation du glucose, acidification de l'inositol, de l'inuline, du mélibiose, de la salicine, du sorbitol et du tréhalose. Une réponse variable mais généralement négative est obtenue pour le test catalase et l'acidification du raffinose. Le biotype 1 est H<sub>2</sub>S positif (papier à l'acétate), lactose variable, arabinose négatif et il acidifie faiblement le galactose. Le biotype 2 est H<sub>2</sub>S négatif, lactose négatif, arabinose variable et galactose positif en 3 à 30 jours.

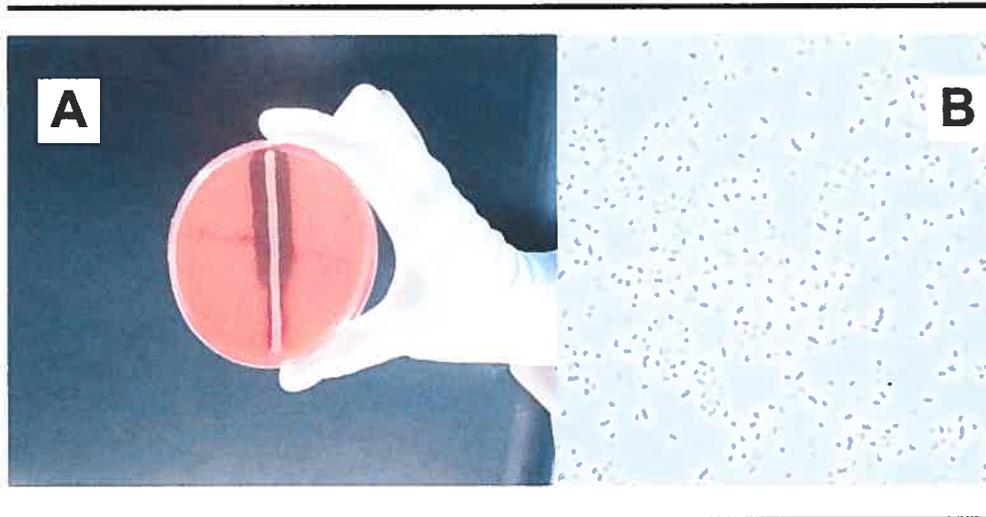


Figure 1. A) Photographie d'*A. pleuropneumoniae* poussant sur une gélose au sang de mouton non supplémentée de NAD. Le satellitisme autour de la strie de *S. aureus* et le phénomène CAMP sont faciles à remarquer. B) Microphotographie montrant la morphologie coccobacillaire d'*A. pleuropneumoniae*.

## 1.2 Taxonomie

La taxonomie d'*A. pleuropneumoniae* a subi de nombreux changements depuis sa découverte. Initialement, il a été suggéré que la bactérie pathogène impliquée dans les cas de pleuropneumonie porcine était similaire à des souches d'*Haemophilus parahaemolyticus* isolées chez l'humain. Suite à des analyses biochimiques approfondies, les isolats de porcs se sont avérés différents de ceux humains (94). Le nom d'*Haemophilus pleuropneumoniae* avait été donné, au préalable, à l'agent responsable d'un épisode de pleuropneumonie décrit en Argentine (163). Il a été ensuite proposé d'intégrer ces souches d'*H. parahaemolyticus* avec celles décrites par Shope dans une seule et même espèce: *H. pleuropneumoniae*, dont la souche type est la souche Shope S 4074 (95). Des études d'homologie de l'ADN et de l'ARNr 16S ont démontré que *H. pleuropneumoniae* est en fait plus proche d'*Actinobacillus lignieresii* que d'*Haemophilus influenzae*. *H. pleuropneumoniae* a donc été transféré dans le genre *Actinobacillus* sous le nom d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (170).

### 1.3 Sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

*A. pleuropneumoniae* est divisé en deux biotypes : le biotype 1 requérant pour sa croissance du NAD, et le biotype 2 étant NAD-indépendant (170). Jusqu'à 1997, 12 sérotypes du biotype 1, dont le sérotype 5 subdivisé en deux sous-groupes, a et b (134), et 2 sérotypes du biotype 2, avaient été décrits selon les différences entre leurs polysaccharides capsulaires (39, 132). Quelques isolats appartenant au biotype 2 ont été transférés aux sérotypes 2, 4, 7 et 9 du biotype 1, suite à une caractérisation approfondie de leurs antigènes capsulaires (8, 92, 125). Une intégration des schémas de sérotypage pour les biotypes 1 et 2 a été proposée (135), en ajoutant deux nouveaux sérotypes appartenant au biotype 2 (13 et 14). Récemment il a été proposé, suite à une étude sérologique et moléculaire, de classer quelques isolats australiens, auparavant tenus comme appartenant au sérotype 12, dans un nouveau sérotype 15, biotype 1 (15). Donc, les isolats d'*A. pleuropneumoniae* sont présentement assignés à un de ces 15 sérotypes.

Un système de typage pour *A. pleuropneumoniae* fondé sur la spécification des antigènes capsulaires (K) et lipopolisaccharidiques (O) (système K:O) a été suggéré (144). Ce système permettrait une classification plus rigoureuse de l'organisme étant donné que des isolats réagissant avec des anticorps dirigés contre la capsule du sérotype 1, mais qui possèdent des LPS caractéristiques des sérotypes 4-7 ont déjà été décrits (56). Cependant, le système K:O n'a pas été accepté partout.

Les sérotypes 1, 2, et 3 d'*A. pleuropneumoniae* ont été décrits en utilisant l'agglutination en tube et l'immunofluorescence (126). Les sérotypes 4 et 5 ont été identifiés à l'aide de l'agglutination en tube et de l'immunodiffusion en gel d'agarose (62). Le sérotype 5 a été plus tard subdivisé en 5a (souche de référence K 17) et 5b (souche de référence L 20), en utilisant les techniques d'hémagglutination sur lame et

d'immunodiffusion en gel d'agarose (132). Les sérotypes 6 et 7 ont été identifiées avec l'immunofluorescence indirecte (127, 155). Les sérotypes 8, 9 et 10 ont été décrits à l'aide de l'immunodiffusion en gel d'agarose et de l'hémagglutination indirecte (133, 136). Suite à une étude de Kamp, le sérotype 11 a été proposé (90). Le sérotype 12 a été décrit par la technique d'immunodiffusion (132). Les 2 sérotypes du biotype 2 avaient été décrits par les techniques d'hémagglutination indirecte et double diffusion en gel, selon les différences entre l'antigénicité et la structure de leurs polysaccharides capsulaires (39). Les techniques de précipitation en anneau et l'analyse moléculaire du profil de toxines ont été utilisées pour proposer le sérotype 15 (15).

## **2 LA PLEUROPNEUMONIE PORCINE**

### **2.1 Caractéristiques de la maladie**

La pleuropneumonie porcine cause des pertes économiques très importantes à l'industrie porcine partout dans le monde où l'on pratique l'élevage porcin (170) . Trois formes de la maladie présentant des signes cliniques ont été décrites : suraiguë, aiguë et chronique. Une forme sous-clinique de la maladie, asymptomatique, est aussi possible, les animaux ainsi atteints étant des porteurs sains d'*A. pleuropneumoniae*. La forme suraiguë est caractérisée par des animaux très malades faisant de l'hyperthermie et de l'anorexie. Une courte période de diarrhée et de vomissement est souvent observée. La phase terminale est caractérisée par une dyspnée sévère et l'animal devient cyanosé. Des écoulements sanguinolents de la gueule sont observés avant la mort, laquelle survient entre 4 et 36 heures (Figure 2).

La forme aiguë est caractérisée par une évolution de la maladie moins rapide et par des symptômes respiratoires sévères incluant de la dyspnée et de la toux. De plus, les animaux présentent une hyperthermie modérée et souffrent d'anorexie. La forme aiguë peut évoluer vers un stade léthal (mort en environ 48 heures) ou vers la forme chronique. Cette dernière est plus difficile à caractériser cliniquement, car les animaux affectés sont souvent asymptomatiques. Cependant, ils souffrent d'anorexie, ce qui résulte en une diminution du taux de gain de poids (170).



Figure 2. A) Porcelets morts suite à un épisode de pleuropneumonie porcine causée par *A. pleuropneumoniae*. B) Poumon prélevé d'un porcelet atteint de la maladie. Les lésions au niveau des lobes diaphragmatiques sont clairement visibles. Photographies par courtoisie du Dr. Marcelo Gottschalk.

Les lésions résultant de l'infection sont principalement localisées dans le tractus respiratoire. Une pleurésie fibrineuse massive généralisée ou locale caractérise les formes suraiguë et aiguë de l'infection. La cage thoracique est riche en liquide séro-sanguinolent. Les lésions pulmonaires plus fréquentes sont retrouvées au niveau des lobes diaphragmatiques (Figure 2). La forme suraiguë se caractérise par une pneumonie à caractère hémorragique. Le poumon est ferme au toucher et de couleur variable, allant du rouge clair au rouge foncé. Dans la forme aiguë, une pleuropneumonie fibrino-hémorragique ou fibrino-nécrotique peut se développer. La partie atteinte du poumon est friable et de couleur rouge foncé et

les foyers affectés sont parfois confluents. L'aspect des lésions de la forme chronique est variable. Des adhérences pleurales locales avec ou sans abcès de grosseur variable peuvent être rencontrées dans les lobes diaphragmatiques. Ces abcès sont entourés d'une capsule de tissu conjonctif (170).

La morbidité et la mortalité varient selon la virulence de la souche infectante et la présence de facteurs prédisposants. Lorsqu'une souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* est introduite dans un troupeau susceptible, la maladie peut se répandre très rapidement. La maladie affecte essentiellement les porcelets en pouponnière et les porcs à l'engraissement, malgré le fait que tous les groupes d'âges puissent être atteints (170). L'augmentation des facteurs de stress comme l'entassement, le transport, les changements brusques de température ou une mauvaise ventilation augmentent aussi l'incidence de la maladie (170). La morbidité et la mortalité peuvent être augmentées par la présence d'infections concomitantes, telles que le syndrome reproductif et respiratoire porcin (SRRP) et la pseudorage. Des études expérimentales ont toutefois confirmé que l'infection combinée avec *A. pleuropneumoniae* et le virus du SRRP ne résulte pas nécessairement en une maladie plus sévère (148).

## 2.2 Transmission de la pleuropneumonie porcine

*A. pleuropneumoniae* est transmise par contacts directs et/ou indirects et par voie aérienne. La principale source d'infection est le porc lui-même. En effet, les animaux apparemment sains (porteurs asymptomatiques) sont la cause la plus fréquente de transmission de l'infection entre les troupeaux (170). La transmission à courte distance est causée soit par des aérosols, soit par contacts directs et/ou indirects entre les porcs, qui sont particulièrement importantes lors de manifestations aiguës de la maladie où l'agent infectieux est excrété de façon massive avec les sécrétions nasales.

L'organisme survit quelques heures dans l'air ambiant si le taux d'humidité est élevé et la température est basse. Cependant, lorsque protégé par du mucus ou une autre matière organique, l'organisme est capable de survivre pendant quelques jours. De plus, la survie peut atteindre 30 jours dans des eaux limpides à 4°C (170). Le repeuplement périodique des élevages favorise l'incidence de l'infection. Les animaux infectés de façon sous-clinique constituent de loin le principal réservoir et vecteur de transmission de l'infection entre troupeaux (36, 170).

Les conséquences de l'introduction de l'agent infectieux dépendent du statut immunitaire du troupeau et de la virulence de la souche. Les porcs des troupeaux sérologiquement négatifs et cliniquement indemnes 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 (36). Aussi, si le troupeau est déjà infecté par *A. pleuropneumoniae*, les risques de développer la maladie augmentent. Les études sérologiques démontrent que sur une base de troupeaux, les manifestations cliniques sont rares et les infections sous-cliniques sont la règle (170). Le développement de signes cliniques dans un troupeau infecté sous-cliniquement peut être la conséquence d'une augmentation des facteurs de risque décrits précédemment. L'existence d'infections sous-cliniques peut s'expliquer par trois phénomènes qui permettent à l'animal de combattre l'infection : un faible virulence de la souche, des facteurs de risque réduits et contrôlés et l'immunité passive colostrale chez les nouveau-nés (170). Les nouveau-nés ainsi protégés, peuvent devenir porteurs après avoir été infectés par *A. pleuropneumoniae*. Les animaux qui survivent à l'infection peuvent agir comme porteurs asymptomatiques pendant des mois car ils possèdent le potentiel d'excréter le micro-organisme (36, 170).

### **2.3 Traitement et prophylaxie de la pleuropneumonie porcine**

### 2.3.1 Antibiothérapie

La majorité des souches d'*A. pleuropneumoniae* sont sensibles à de nombreux antibiotiques, tels que la pénicilline, l'ampicilline, la céphalosporine, la tétracycline, le chloramphénicol et les sulfamides (170). Toutefois, le choix d'un antibiotique efficace doit être basé sur les résultats de l'antibiogramme car des résistances acquises ont été notées vis-à-vis des tétracyclines (synthèse de protéine Tet B) (182), des  $\beta$ -lactamines ( $\beta$ -lactamase du type TEM ou du type ROB-1) (88), des sulfamides, de la gentamicine, de la streptomycine, de l'érythromycine, de la tiamuline, de la tilmicosine, l'enrofloxacin, la danofloxacin, du florphénicol, du thiamphénicol et du chloramphénicol (actuellement interdit en élevage).

À l'exception de la résistance aux tétracyclines et aux quinolones, ces résistances sont généralement associées à la présence de plasmides appartenant à plus de 3 groupes d'incompatibilité différents ou de transposons conjugatifs (synthèse de méthylases A et/ou C conférant la résistance aux macrolides) (79, 80, 184). Certains plasmides codent pour une multi-résistance (sulfamide-streptomycine, sulfamide-ampicilline, sulfamide-ampicilline-chloramphénicol) et une unique souche peut héberger plusieurs plasmides de résistance (79).

Un rapport récent démontre que des isolats d'*A. pleuropneumoniae* sont susceptibles à des doses faibles de ceftiotur, danofloxacin et pénicilline (96). Les antibiotiques ne préviennent pas les infections à *A. pleuropneumoniae* mais réduisent la sévérité de la maladie (36). Le traitement par addition d'antibiotiques à la nourriture ou à l'eau est peu utile lors d'un épisode aigu de la maladie car les animaux sont souvent anorexiques (36). Dans ces cas, l'administration d'antibiotiques doit se faire par injection parentérale et en doses élevées; il s'agit cependant d'un procédé très coûteux et peu pratique (36). Malgré le succès obtenu habituellement lors du traitement des cas cliniques, l'antibiothérapie n'élimine pas l'infection du troupeau (170).

### 2.3.2 Vaccination

Les mécanismes immunitaires responsables de la protection envers l'infection à *A. pleuropneumoniae* ne sont pas parfaitement élucidés. Il est admis que la protection vis-à-vis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* est à médiation humorale (36). L'immunité passive colostrale jouerait aussi un rôle dans la protection (128, 129, 178). La vaccination contre la pleuropneumonie porcine a été faite, jusqu'aux dernières années, avec des bactérines (170). Les infections naturelles ou expérimentales avec l'organisme vivant offrent une protection hétérologue (36). Cependant, les bactérines ont offert une protection homologue limitée et très pauvre envers l'infection hétérologue (limitée à certains sérotypes) (170). Les vaccins sous-unitaires constitués d'une ou plusieurs des trois toxines Apx, d'une protéine de membrane externe ou de plusieurs antigènes capsulaires, ont des avantages théoriques importants car ils confèrent une protection contre tous les sérotypes (170).

Une étude a rapporté le développement d'un vaccin en utilisant les toxines ApxI et ApxII, purifiées (64). Ces toxines ont été adsorbées dans un adjuvant de phosphate d'aluminium et elles ont été utilisées pour vacciner des porcs. Lors du challenge avec la souche homologue (sérotipe 1) le groupe ayant reçu le vaccin a montré une protection supérieure par rapport au groupe témoin (64). Une autre étude récente a rapporté l'utilisation d'un vaccin commercial (Pleurostar, Biostar Inc, Saskatoon, Canada) préparé avec des antigènes recombinants (des toxines Apx et des protéines liant la transferrine). Lors d'un challenge endobronchial sévère avec *A. pleuropneumoniae* sérotipe 9, les animaux ayant reçu le vaccin ont montré une meilleure protection par rapport à ceux non vaccinés (176).

Par ailleurs, un vaccin vivant atténué a été développé en utilisant une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotipe 7 dont le gène *apxIIC* avait été muté (149). Ce gène est impliqué dans l'activation de la toxine ApxII (40, 81) (Tableau I). Le mutant exprimait donc une toxine non fonctionnelle. Le vaccin a été administré par voie

intra-nasale et les animaux vaccinés ont montré une bonne protection lors du challenge avec le sérotype 7 et, aussi lors d'un challenge avec le sérotype 1 (149).

Les vaccins induisent un niveau de protection élevé contre la morbidité, réduisent la mortalité et le nombre de traitements requis et elles permettent d'obtenir un taux de gain de poids plus élevé (170). Cependant, la vaccination ne permet pas toujours d'éviter l'infection sous-clinique (170).

### **3 LES FACTEURS DE VIRULENCE D'*A. PLEUROPNEUMONIAE*.**

*A. pleuropneumoniae* est un pathogène strict du porc. Des différences importantes ont été observées par rapport à la virulence des différents sérotypes. Les sérotypes 1, 5, 7 et quelquefois 9 et 11 sont souvent les plus virulents, causant une maladie à haute mortalité et produisant des lésions pulmonaires graves. Les autres sérotypes sont considérés moins virulents mais peuvent être la cause des déclenchements de la maladie dans plusieurs pays (21, 31). Le sérotype 3 est considéré particulièrement peu virulent dans quelques pays, mais épidémique dans d'autres (21). La virulence d'*A. pleuropneumoniae* dépend de plusieurs facteurs, tels que les exotoxines, les lipopolysaccharides, les polysaccharides capsulaires, sa capacité à acquérir du fer et, aussi, de certaines protéines membranaires (18, 140).

#### **3.1 Exotoxines**

Les exotoxines protéiques appartenant à la famille des toxines RTX (repeats in the structural toxin) sont considérées comme étant les facteurs de

virulence majeurs d'*A. pleuropneumoniae* (41, 43, 89). Trois différentes toxines RTX, désignées ApxI, ApxII et ApxIII, sont classées selon leur activité hémolytique et cytotoxique (Tableau I). ApxI (105 kDa) est fortement hémolytique et fortement cytotoxique envers les cellules phagocytaires. Cette toxine est produite chez les sérotypes 1, 5a, 5b, 9, 10 et 11. ApxII (103-105 kDa), produite par tous les sérotypes sauf le sérotype 10, possède une activité hémolytique faible et cytotoxique modérée. ApxIII (120 kDa), présente chez les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8, n'est pas hémolytique mais fortement cytotoxique envers les macrophages et les neutrophiles (40). Des mutants non-hémolytiques, induits par insertion d'un transposon dans l'opéron *apxIB*, lequel est impliqué dans l'exportation des toxines ApxI et ApxII, se sont avérés non-pathogènes chez le porc (169).

Les différents degrés de virulence observés entre les sérotypes 1 à 12 correspondent aux patrons de production des toxines RTX, ceux produisant ApxI et ApxII étant les plus virulents (40, 99). Un mutant de sérotype 5 induit par mutagenèse chimique et ne sécrétant ni ApxI ni ApxII s'est avéré non pathogène chez le porc et la souris (78). Un mutant de la souche de référence du sérotype 1, S 4074, ne produisant pas Apx I et ApxII a été incapable d'induire la destruction des neutrophiles porcins, contrairement à la souche-mère (86).

L'opéron des gènes *apxI* et *apxIII* est constitué de 4 gènes désignés CABD (87). Par contre, seuls C et A sont retrouvés dans l'opéron *apxII* (Tableau I). Le gène C code pour une enzyme d'activation, laquelle acyle la proto-toxine, codée à son tour par le gène A (81). Les gènes B et D sont responsables de l'exportation de la toxine à travers les membranes interne et externe (183). La distribution des opérons varie parmi les souches. Pour certaines souches, bien qu'elles sécrètent la toxine, l'opéron respectif ne présente pas tous les gènes (157).

Un quatrième type de toxine RTX a été récemment identifié suite à l'identification du gène *apxIVA* chez tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (162). Cette toxine (d'un poids moléculaire prédit d'environ 202 kDa), semble être exprimée seulement *in vivo*, car elle n'a pas pu être détectée en cultures d'*A.*

*pleuropneumoniae in vitro*, même en utilisant des conditions de croissance variées. Par contre, chez des porcs infectés expérimentalement avec les sérotypes 1, 5 ou 7, des anticorps reconnaissant la protéine ApxIV recombinante (synthétisée chez *E. coli*) ont été observés, ce qui indique la synthèse de la toxine *in vivo*. De plus, des sérums d'animaux infectés naturellement ont aussi réagi contre la protéine ApxIV recombinante. L'ARN messager codant pour cette toxine a été détecté dans des coupes de poumons de porcs fixées à la formaline et paraffinées, au moyen de l'hybridation *in situ* avec une sonde spécifique (28). Les mécanismes de synthèse et d'exportation de cette toxine sont mal connus (Tableau I).

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

Toxine	Opéron			Activité		Sérotypes
	Activateur	Structurel	Exportation	Hémolytique	Cytotoxique	
ApxI	<i>apxIC</i>	<i>apxIA</i>	<i>apxIBD</i> <sup>a</sup>	forte	forte	1, 5a, 5b, 9, 10, 11
ApxII	<i>apxIIC</i>	<i>apxIIA</i>	aucun <sup>a</sup>	faible	modérée	Tous sauf le 10
ApxIII	<i>apxIIIC</i>	<i>apxIIIA</i>	<i>apxIIIBD</i>	aucune	forte	2, 3, 6, 8
ApxIV <sup>b</sup>	ORF1? <sup>c</sup>	<i>apxIVA</i>	aucun <sup>a</sup>	faible	nd <sup>d</sup>	Tous

<sup>a</sup> Les gènes *apxIBD* sont retrouvés chez tous les sérotypes, excepté le 3. La sécrétion d'ApxII a lieu grâce à *apxIBD*. Rien n'est encore connu sur les mécanismes de sécrétion d'ApxIV.

<sup>b</sup> Différemment des autres toxines, ApxIV n'est produite qu'*in vivo*.

<sup>c</sup> L'ORF1 semble être requis pour la sécrétion d'ApxIV, malgré son absence d'homologie avec *apxIC*, *apxIIC*, ou *apxIIIC*.

<sup>d</sup> non déterminée.

Adapté de Bossé *et al.*, *Microbes and Infection* 4 (2002) 225–235

### 3.2 Les lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont des composants essentiels de la paroi de toutes les bactéries à Gram négatif. Les LPS sont constitués de trois parties: 1) l'antigène O polysaccharidique, 2) le noyau oligosaccharidique et 3) le lipide A (33). La chaîne polysaccharidique est formée d'unités répétitives composées d'une à quatre unités saccharidiques (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 noyau externe (outer core). Le noyau externe est lié au noyau interne composé d'heptose, de keto-3-desoxyoctanate (KDO) et de pyro-phosphoryl-éthanolamine. Le KDO est à son tour attaché au lipide A, lequel est ancré dans la membrane externe de la bactérie (33). Les LPS d'*A. pleuropneumoniae* sont exposés à la surface cellulaire sous la forme de vésicules traversant la couche capsulaire (84). Le LPS d'*A. pleuropneumoniae* active la voie alternative du complément (73) et stimule la production de cytokines inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumoral (TNF, tumor necrosis factor), l'interleukine 1 (IL-1) et l'interleukine 8 (IL-8) par les macrophages alvéolaires (6, 68, 106). 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 (5). Cependant, le LPS d'*A. pleuropneumoniae* n'affecte pas les cultures de neutrophiles porcins (71).

Le LPS d'*A. pleuropneumoniae* semble aussi jouer un rôle important dans la colonisation du tractus respiratoire du porc. Une étude a démontré que le LPS est l'adhésine majeure impliquée dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 aux anneaux de la trachée porcine (10). Chez certaines souches d'*A. pleuropneumoniae*, une affinité du LPS pour les sécrétions du tractus respiratoire porcine est également démontrée (11-13). L'adhérence du LPS à l'endothélium vasculaire, au mésenchyme pulmonaire et à l'épithélium trachéal du porc a aussi été décrite (142). Les glycosphingolipides présents dans les membranes des cellules de l'hôte seraient la cible des LPS (85).

Deux mutants d'*A. pleuropneumoniae* ont été produits à partir de la souche de référence du sérotype 1 (souche Shope 4074). Ces deux mutants n'ont pas réagi avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène O. Ces deux mutants permettent de confirmer l'importance du rôle des LPS dans la virulence, car l'un a présenté une adhésion diminuée à des sections trachéales de porcelets et tous les deux se sont avérés moins virulents pour la souris lors d'une infection expérimentale (152). Dans une autre étude, des mutants rugueux ont été générés à l'aide d'un transposon (153). Ils se sont avérés capables d'adhérer à des sections trachéales de porcelets, sauf un, dont le gène muté était *galU*, le gène structurel de l'UTP-alpha-D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, impliqué dans la biosynthèse du noyau du LPS. Il a été suggéré que la présence d'un noyau intact pourrait être importante pour l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* à des sections trachéales de porcelets, tandis que la présence de l'antigène O ne serait pas essentielle (153).

Cependant, la démonstration que les toxines Apx recombinantes, utilisées toutes seules sont capables d'induire des lésions pulmonaires typiques suggère que les LPS ne sont pas essentiels pour la production de lésions (91). La similarité des lésions produites par les LPS avec celles causées par les toxines serait due surtout à l'activité immunologique de l'hôte suite au contact avec le LPS et non pas un effet direct des LPS (157).

### 3.3 La capsule polysaccharidique

La spécificité de sérotype chez *A. pleuropneumoniae* est déterminée par les polymères d'oligosaccharides capsulaires, bien qu'un système K:O combinant la capsules et les LPS ait aussi été proposé (144). La capsule polysaccharidique est la responsable de l'iridescence caractéristique des colonies (33). *A. pleuropneumoniae* est généralement capsulé mais l'épaisseur du matériel capsulaire varie selon l'isolat et l'âge de la culture (84). Les cellules d'*A. pleuropneumoniae* présentes dans les

poumons de porcs infectés sont aussi recouvertes d'une couche de polysaccharides capsulaires (84). La composition et la structure de la capsule ont été déterminées pour les souches de référence de chaque sérotype (144). La capsule de cet organisme est composée d'unités répétitives d'oligosaccharides et, dû aux résidus d'acide carboxylique ou de phosphate, elle est chargée négativement (144). La capsule est la première structure qui protège la bactérie des différents mécanismes de défense de l'hôte, comme la phagocytose et l'effet bactéricide du sérum (voir plus loin). Il a été démontré, en utilisant la microscopie électronique, que l'épaisseur de la capsule variait selon le sérotype, les sérotypes plus virulents possédant une capsule plus épaisse (84). La croissance sous des conditions réduites en fer, condition comparable à ce que l'on retrouve *in vivo*, n'affecte pas la production de la capsule (141). Une portion du locus (*cpxDCBA*) impliquée dans l'exportation des polysaccharides capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5a a été identifiée, clonée et séquencée (179). Les gènes responsables de la biosynthèse capsulaire ont aussi été identifiés (181). La capsule polysaccharidique n'induit pas la maladie ni produit non plus de lésions pulmonaires (38). Un mutant non-capsulé a récemment été obtenu à partir de la souche de référence du sérotype 1 S4074 (154). L'utilisation de sections congelées de trachée de porcelets a indiqué que ce mutant présente une adhérence plus importante que la souche mère. De plus, il s'est avéré résistant envers le sérum de porc. Le mutant s'est toutefois avéré moins virulent lors d'une infection expérimentale chez le porc (154).

### 3.4 Systèmes de captation du fer

D'une manière générale, les bactéries à Gram négatif acquièrent le fer indispensable à leur croissance au moyen, entre autres, de sidérophores (118). Pendant longtemps l'on a cru que les souches de *A. pleuropneumoniae* des biotypes 1 et 2 ne synthétisaient pas de sidérophore. Toutefois, une étude a montré qu'une souche du biotype 1 et une souche du biotype 2 sont capables d'excréter un

sidérophore lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu pauvre en fer (32). Étonnamment, ce sidérophore n'est ni de type phénolate ni de type hydroxamate. Des récepteurs pour ce sidérophore n'ont pas été décrits jusqu'à présent pour *A. pleuropneumoniae*. Cependant, un récepteur (FhuA) pour le ferrichrome (hydroxamate) a récemment été mis en évidence (111).

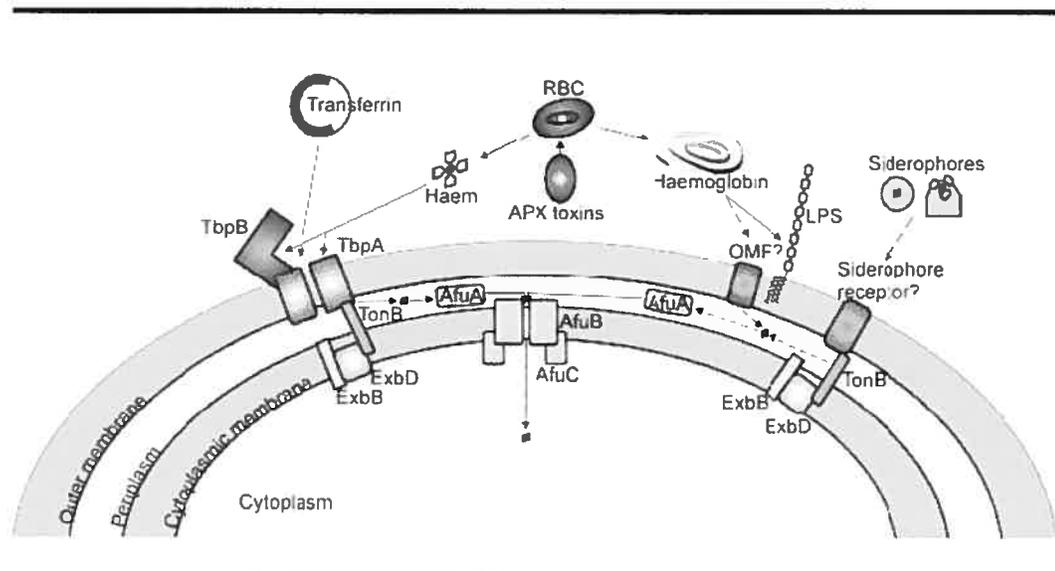


Figure 3. Mécanismes d'acquisition du fer par *A. pleuropneumoniae*. Voir le texte pour plus de détails. Adapté de Bosse *et al.*, *Microbes Infect.* 2002. 4:225-35.

D'autres mécanismes de captation du fer sont connus chez les bactéries et certains d'entre eux existent chez *A. pleuropneumoniae* (18). Lorsque cultivées dans des milieux carencés en fer, *A. pleuropneumoniae* exprime 2 protéines de membrane externe TbpB et TbpA (Tbp : transferrin-binding protein). La protéine TbpB est une protéine trans-membranaire tandis que la protéine TbpA est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe (Figure 3). Ces deux protéines semblent agir en synergie pour capter le fer lié à la transferrine, puis la protéine TbpB permettrait le transport

du fer au travers de la membrane externe suivi de sa fixation sur une protéine périplasmique (18). Ces Tbp sont spécifiques pour la transferrine porcine, ce qui expliquerait, en partie, la spécificité d'hôte de *A. pleuropneumoniae* (18). La culture de *A. pleuropneumoniae* dans un milieu carencé en fer augmente la synthèse de Tbp capables de fixer directement la transferrine porcine mais non la lactoferrine. La protéine TbpB est une protéine de haut poids moléculaire (99-110 kDa) alors que la protéine TbpA possède un poids moléculaire de l'ordre de 60 kDa (18). Les gènes codant pour les protéines TbpA et B ont été clonés et séquencés et leur organisation semble similaire à celle retrouvée pour *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* (50).

L'acquisition du fer peut également se faire à partir de l'hémoglobine, et le lipide A du LPS est impliqué dans cette fixation (9). 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* (Figure 3). Des conditions réduites en fer libre, chez le sérotype 1, affectent l'expression du LPS en augmentant l'accessibilité de celui-ci à la surface cellulaire (141). Cependant, des mutants LPS se sont avérés capables de lier l'hémoglobine aussi bien que la souche mère (4). Une régulation à la hausse des récepteurs d'hémoglobine a aussi été vérifiée lors de la croissance d'*A. pleuropneumoniae* dans un milieu restreint en fer (4).

### **3.5 Autres facteurs**

#### **3.5.1 Les protéases extracellulaires**

Des protéases présentes dans le surnageant de culture d'une souche du sérotype 1 ont été décrites (123). Ces protéases dégradent la gélatine porcine,

l'hémoglobine porcine, bovine et humaine et les IgA de porc. Elles pourraient faciliter l'invasion tissulaire et être impliquées dans les lésions sévères causées par *A. pleuropneumoniae*. Récemment, la libération dans le milieu de culture de vésicules contenant des protéases extracellulaires et toxines du type Apx a aussi été observée (122).

### 3.5.2 Résistance à la phagocytose et au sérum

La résistance à la phagocytose est dépendante des propriétés de la capsule polysaccharidique (76, 156). La résistance d'*A. pleuropneumoniae* au complément a été décrite et a été vérifiée même en utilisant des sérums provenant d'animaux convalescents (76). Des mutants capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 sont tués par le sérum normal de porcs. Par contre, les souches capsulées et un mutant capsulaire d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 sont résistants au sérum (154), tandis que les mutants rugueux sont sensibles (152). La capsule polysaccharidique limite la déposition des anticorps et de C9 sur la surface de la bactérie (180).

### 3.5.3 Fimbriae

Des fimbriae sont présentes chez une grande variété de pathogènes, et leur rôle dans la virulence a été bien défini (159). Récemment, des fimbriae intactes et des sous-unités de fimbriae ont été purifiées à partir des sérotypes 1, 2, 7, et 12 d'*A. pleuropneumoniae* (185). La production de fimbriae par d'autres sérotypes n'a pas encore été évaluée. La séquence amino-terminales des sous-unités fimbriaires d'*A. pleuropneumoniae* est identique à celle d'autres bactéries. De plus, des préparations de fimbriae ou de sous-unités de fimbriae ont montré des réactions croisées avec des

anticorps dirigées contre les fimbriae de type 4 de *Moraxella bovis* (185). La production de fimbriae semble être instable chez *A. pleuropneumoniae*. Cependant, il n'est pas clair si la variation de phase joue un rôle dans ce phénomène (172, 185). La production de fimbriae a été vérifiée *in vivo* et *in vitro* (172).

### 3.6 Expression différentielle *in vivo* de facteurs de virulence

Il existe plusieurs techniques pour identifier les gènes dont l'expression *in vivo* est différente de celle *in vitro*, tels que la "technologie d'expression *in vivo*" (IVET : "*in vivo* expression technology") (109), la "mutagenèse avec une étiquette signée" (STM : "signature tagged mutagenesis") (66), l'"hybridation soustractive" (174) et la "capture sélective de séquences transcrites" (SCOTS : "selective capture of transcribed sequences") (57). Ces techniques sont des outils puissants lorsqu'il s'agit de déterminer quels gènes sont nécessaires pour la survie et/ou l'infectivité d'un microorganisme pathogène à l'intérieur de l'hôte.

Un système IVET a été construit pour *A. pleuropneumoniae* (46) et a permis d'identifier 10 *loci* qui sont induits de façon différentielle *in vivo* lors d'une infection expérimentale chez le porc. Quatre de ces *loci*, ont été identifiés comme *ilvI*, l'opéron *ilvDA*, l'opéron *secE-nusG* et le gène *mrp*; les autres 6 *loci* demeurent sans identité. Chez *E. coli* et *H. influenzae*, *ilvI*, est retrouvé formant partie d'un opéron avec *ilvH* (44). Ces deux gènes codent pour les sous-unités majeure et mineure d'un enzyme essentiel pour la biosynthèse des acides aminés isoleucine, leucine et valine. L'opéron contenant *ilvD* est constitué comme partie de l'opéron *ilvGMEDA* chez *E. coli*.

Un système STM a aussi été utilisé pour l'identification des gènes de virulence exprimés *in vivo* (45). D'un total de 800 mutants générés par insertion de mini-Tn10, 20 *loci* mutés causant une atténuation de la virulence chez *A. pleuropneumoniae* ont été identifiés. Les gènes identifiés appartenaient à 5 classes

fonctionnelles : 1) enzymes bio-synthétiques (*lpdA*; *atpH*; *exbB*), 2) déterminants de virulence (*pomA*), 3) composants de la régulation cellulaire (*fkpA*; *tig*), 4) composants requis pour la traduction (tRNA-leu et tRNA-glu; *rpmF*) et 5) gènes dont la fonction demeure inconnue. De façon intéressante, très peu de facteurs de virulence classiques décrits plus haut ont été identifiés dans ces études.

## 4 LE DIAGNOSTIC

Les cas aigus de pleuropneumonie porcine sont faciles à diagnostiquer par la présence de signes cliniques et de lésions caractéristiques lors de la nécropsie (170). Cependant, il faut considérer que *A. suis* peut induire des lésions similaires à celles causées par *A. pleuropneumoniae* (170). L'infection chronique est généralement diagnostiquée à l'abattoir par la présence d'abcès et de pleurésie (170). La partie la plus difficile du diagnostic est l'identification des troupeaux infectés de façon sous-clinique. Avant de décrire en détails les différents types de troupeaux en fonction de leur statut envers *A. pleuropneumoniae* et les différentes techniques utilisées pour l'identification du pathogène, il est utile de définir 3 concepts importants pour le diagnostic : la sensibilité diagnostique, la sensibilité analytique et la spécificité.

Le terme sensibilité diagnostique décrit la détectabilité d'une cible par une technique donnée. Ainsi, la sensibilité diagnostique est la probabilité qu'une technique présente un résultat positif en présence de la cible. Elle est exprimée comme le pourcentage de résultats positifs obtenus avec des spécimens bien connus qui possèdent ou présentent la cible (48). La sensibilité analytique est la limite de détection d'une technique, c'est-à-dire, la quantité la plus petite de cible que peut être différenciée du bruit de fond avec précision et de façon constante (35, 48). La spécificité est le pourcentage de résultats négatifs obtenus par une technique avec des spécimens qui ne contiennent pas la cible (35).

## 4.1 Statut sanitaire des troupeaux

Il est possible de distinguer trois catégories de troupeaux selon leur statut envers *A. pleuropneumoniae* : 1) les troupeaux sérologiquement positifs sans une histoire de cas clinique 2) les troupeaux sérologiquement négatifs et cliniquement libres d'*A. pleuropneumoniae* et 3) les troupeaux sérologiquement positifs avec une histoire de cas cliniques confirmés par pathologie et bactériologie (36).

La catégorie 1 comprend la majorité des troupeaux (36). Il est postulé que ces troupeaux sont, soit infectés avec des souches à virulence pauvre, soit, ils présentent des conditions optimisant un combat de l'infection efficace, ce qui permettrait aux animaux de devenir infectés de façon sous-clinique. La résistance face à la maladie et l'immunité de ce genre de troupeau devrait être maintenue au plus haut niveau possible, et le stress et d'autres maladies à un niveau minimal. L'objectif est de minimiser l'impact économique associé au déclenchement de la maladie. Le coût d'une infection sous-clinique, en comparaison, est minime (36).

Dans le peu de troupeaux qui constituent la catégorie 2, les efforts doivent être dirigés à minimiser les opportunités d'introduction d'*A. pleuropneumoniae* dans le troupeau. La biosécurité est particulièrement critique dans ces troupeaux, puisque l'introduction du pathogène peut conduire au déclenchement de la maladie. L'introduction de nouveaux animaux doit se faire avec précaution, de préférence avec des animaux provenant d'autres troupeaux de la catégorie 2. L'insémination artificielle a réduit de beaucoup l'incorporation de nouveaux animaux et diminué les risques pour les troupeaux de cette catégorie (36).

Seulement un petit pourcentage des troupeaux possède des animaux avec signes cliniques. Dans ces troupeaux, des déclenchements de maladie aiguë sont habituels quand les animaux sont âgés entre 9 à 20 semaines. Dépendant du statut immunologique de la truie, la protection passive transmise par une truie qui a été

infectée auparavant suffit, en général, pour protéger les animaux face à une infection sévère jusqu'à ce qu'ils atteignent un âge de 8 semaines. Lorsque l'immunité passive diminue, le contact avec des animaux assainis plus âgés permet à la maladie de réapparaître. Ainsi, des épisodes périodiques de maladie aiguë sont observés dans ces troupeaux (36).

## 4.2 La sérotypie

La détermination du sérotype est importante pour comprendre l'épidémiologie, pour la préparation de vaccins, pour la surveillance sérologique des troupeaux infectés et aussi pour trouver la cause d'un échec lors de la vaccination d'un troupeau. Des anticorps polyclonaux sont le plus souvent utilisés pour le sérotypage. Ces anticorps sont obtenus en immunisant des lapins avec des suspensions de cellules entières, formolées ou non, de différentes souches de référence des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (61, 114, 126, 155). La spécificité de sérotype est obtenue en adsorbant le sérum de lapin avec les souches de référence des autres sérotypes. Pour le sérotype 1, étant donné que 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 référence de ces sérotypes afin d'éviter une réduction du titre d'anticorps contre le sérotype 1 (102). Plusieurs méthodes de sérotypie des souches d'*A. pleuropneumoniae* ont été développées:

**4.2.1** L'agglutination lente en tube (62) et l'agglutination rapide sur lame (69, 114, 151). L'agglutination rapide sur lame est aussi efficace que la première mais s'avère moins dispendieuse et plus simple d'exécution. Cependant, ces deux épreuves ne permettent pas de sérotyper les souches auto-agglutinantes ou non-agglutinantes (69, 114, 151)

**4.2.2** L'immunodiffusion en gel d'agarose (61, 126, 155) est une technique assez spécifique mais qui demeure complexe et coûteuse. De plus, elle requiert

des antigènes solubles. Par contre elle possède l'avantage de pouvoir sérotyper les souches auto-agglutinantes.

**4.2.3** L'immunofluorescence indirecte (155) est rapide et pratique, car la technique peut se faire à partir de coupes de tissus pulmonaires ou de culture bactérienne. Après la 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 (151).

**4.2.4** L'épreuve d'hémagglutination indirecte (113) utilise un extrait salin d'*A. pleuropneumoniae* ajouté à des érythrocytes de mouton. Cette technique permet de différencier les isolats des sérotypes présentant des réactions croisées (112, 116).

**4.2.5** Le test de co-agglutination (115) utilise des immunoglobulines G de lapin anti-*A. pleuropneumoniae* fixées à la protéine A produite par la souche Cowan I de *S. 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 (112). Elle permet de détecter les antigènes solubles et particulés (70).

**4.2.6** L'agglutination utilisant des billes de latex (72) ou de polystyrène (34) constitue un test très rapide (moins de trois 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.

**4.2.7** La technique de contre-immunoelectrophorese (145) 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 mises en présence d'antisérum adsorbé avec des cellules entières d'une souche hétérologue.

**4.2.8** La sérotypie par chromatographie sur papier (173) 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 4 cm, et la lecture des résultats est effectuée. 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.

Chacune des procédures décrites plus haut pour la sérotypie possède ses mérites, mais aucune n'a été épargnée de certains problèmes. Ces derniers sont souvent dus à des réactions croisées. Des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes spécifiques ont été évalués dans le cadre d'une classification sérologique plus précise (102, 105, 121). Une étude a utilisé, avec des bons résultats, des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes capsulaires et contre la chaîne O des LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 et des anticorps monoclonaux anti-chaîne O des LPS des sérotypes 5a et 5b pour sérotyper des souches de ces sérotypes au moyen de la technique de dot-ELISA (101). Cependant, le sérotype 5 ne peut être discriminé en 5a et 5b avec ces anticorps, car c'est au niveau de la capsule, et non pas des LPS que se retrouvent leurs différences antigéniques. Une autre étude a utilisé une combinaison d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes capsulaires et les LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 7 et 4 et démontré que cette combinaison peut être utilisée pour la sérotypie, car la combinaison d'anticorps monoclonaux a détecté 100 % des souches du sérotype 7 testées par dot-ELISA (103).

### 4.3 Méthodes indirectes de détection : la sérologie

La sérologie constitue un outil de diagnostic important pour déterminer si un animal ou un élevage sont infectés par *A. pleuropneumoniae*. Ceci est valable surtout au niveau des troupeaux qui ne présentent pas de signes cliniques. 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 ils atteignent un niveau maximal environ 4 à 6 semaines après l'infection. Ils peuvent persister plusieurs mois après la disparition des lésions (131, 170). La persistance des anticorps pourrait aussi s'expliquer par une persistance de l'infection.

Plusieurs tests sérologiques pour la détection d'anticorps anti-*A. pleuropneumoniae* produits chez le porc en réponse à une infection causée par *A. pleuropneumoniae* ont été mis au point. Les plus couramment utilisés sont le test de fixation du complément (CFT : complément fixation test) (108) et l'ELISA, dont il existe un grand nombre de variantes. 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. De plus, il s'agit d'une épreuve impossible à exécuter pour certains sérums de porcs à cause de l'activité pro-complémentaire et anti-complémentaire retrouvée dans ces sérums (51). La sensibilité du CFT a été démontrée comme étant faible, soit de 60% et 47% pour les sérotypes 1 et 5, respectivement (52, 55). Par contre, la spécificité du test est, en général, élevée.

L'ELISA semble être 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, permettant ainsi l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Au cours des dernières années, plusieurs tests ELISA ont été développés, différant

essentiellement dans l'antigène utilisé. La bactérie entière ou des extraits bruts de la bactérie entière ont été utilisés (137, 171). Des polysaccharides capsulaires et des LPS partiellement purifiés ont aussi été utilisés en ELISA (19, 37).

Plus récemment, un test ELISA pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* utilisant comme antigène la protéine recombinante ApxII a été décrit (104). Il s'agit d'un test dont l'utilité est limitée, car, d'abord, d'autres espèces retrouvées chez le porc, telles qu'*A. suis* (165), produisent cette toxine, et, deuxièmement, ce test ne permet pas l'identification des sérotypes du pathogène. Toutefois, un résultat négatif obtenu avec ce test démontre que des anticorps contre cette toxine d'*A. pleuropneumoniae* n'ont pas été générés chez les porcs dont les sérums ont été testés.

Une autre étude (138) a décrit l'utilisation des exotoxines ApxI, ApxII et ApxIII, purifiées, comme antigène pour un test ELISA pour la détection d'*A. pleuropneumoniae*. Des sérums provenant d'animaux infectés expérimentalement avec seulement un des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ont réagi avec les trois antigènes, sans égard au fait que seule une ou deux toxines pouvaient avoir été produites lors de l'infection. Cela démontre que les toxines sont antigéniquement apparentées et qu'il n'est pas possible d'obtenir une corrélation sérologique entre sérotype et sécrétion d'exotoxine. Comme dans le cas antérieur, il est possible qu'un résultat positif avec ce test soit dû à la présence chez le porc d'espèces autres qu'*A. pleuropneumoniae*. Par contre, un résultat négatif obtenu avec ce test démontre que des anticorps contre ces toxines d'*A. pleuropneumoniae* n'ont pas été générés chez les porcs dont les sérums ont été testés.

Un test ELISA utilisant des polysaccharides capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* hautement purifiés conjugués à la biotine a aussi été développé (75). Les antigènes capsulaires sont capturés dans une micro-plaque couplée à la streptavidine. En utilisant des sérums de porcs infectés expérimentalement avec *A. pleuropneumoniae* sérotypes 1, 5 et 7, une sensibilité et spécificité élevées pour l'espèce et pour les sérotypes individuels a été obtenue.

Trois tests ELISA pour les sérotypes 6 (97), 5 (98), et 12 (1) ont aussi été décrits durant les deux dernières années. Le test pour le sérotype 6 utilise des LPS purifiés comme antigène et est fondé sur l'inhibition (blocking ELISA) d'un sérum polyclonal dirigé envers les LPS du sérotype 6. Une bonne sensibilité a été rapportée pour ce test. Cependant, des réactions croisées avec les sérotypes 3 et 8 ont été remarquées (97). Le test détectant le sérotype 5 utilise des LPS et des polysaccharides capsulaires comme antigène. Des réactions croisées avec les sérotypes 3 et 12 ont été trouvées pour ce test (98). Le test ELISA pour le sérotype 12 utilise des LPS et est aussi fondé sur l'inhibition d'un sérum polyclonal (blocking ELISA). Des réactions croisées n'ont pas été décrites pour ce test lorsque évalué avec des sérums d'animaux infectés expérimentalement. Cependant, la validation sur le terrain n'a été faite qu'en utilisant des sérums d'animaux infectés par les sérotypes 2 et 12 d'*A. pleuropneumoniae* (1).

Le meilleur test ELISA disponible actuellement est celui qui utilise comme antigène les LPS à longue chaîne (LC-LPS) (52). Ce test permet une discrimination des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* très efficace, en 5 groupes, soit a) sérotypes 1, 9, 11; b) sérotypes 4, 7, c) sérotypes 3, 6, 8; d) sérotype 10 et e) sérotype 12. Plusieurs études (52, 53, 55) ont évalué l'utilisation des LPS-LC dans l'ELISA, et il a été démontré qu'ils permettent une diminution considérable des réactions croisées avec les autres sérotypes et une augmentation de la spécificité et de la sensibilité de la détection par rapport à l'utilisation des LPS (non des LC-LPS) ou des extraits bruts. Des méthodes pour faciliter l'obtention des LC-LPS ont aussi été décrites (150).

Outre l'ELISA et le CFT, d'autres tests variés ont été également décrits:

a) L'agglutination en tube en présence de 2-mercaptoéthanol (2-ME) a été développée (117) comme méthode alternative à l'épreuve de fixation du complément. L'addition du 2-ME 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.

b) La technique de radioimmunoassay (RIA), lorsque appliquée à la détection d'anticorps contre *A. pleuropneumoniae* s'est avérée très sensible (1 ng d'anticorps spécifique détecté) mais peu spécifique et exigeant un équipement sophistiqué (74).

c) 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 (167). Un test a été développé pour la détection d'anticorps spécifiques contre le sérotype 2 où les réactions croisées avec les autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ou avec les organismes apparentés sont absentes (167). Dans une étude similaire mais avec le sérotype 5, une sensibilité inférieure pour le test d'inhibition par rapport au CFT a été observée (166).

La sérologie constitue un outil performant dans la détermination du statut sanitaire des troupeaux envers *A. pleuropneumoniae*. Cependant, 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. De plus, 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. Il faut aussi remarquer que certains animaux peuvent être porteurs de la bactérie depuis un certain temps sans présenter de réponse sérologique (51).

Par ailleurs, 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*. Les tests sérologiques doivent donc être interprétés avec précaution : un résultat faussement négatif ne permettra pas de détecter un troupeau infecté et un résultat faussement positif condamnera par erreur 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.

## 4.4 Méthodes directes de détection

Une approche toute différente de celle utilisée par les méthodes sérologiques peut être utilisée pour déterminer si un animal ou un troupeau sont infectés par *A. pleuropneumoniae*. Cette approche consiste en démontrer directement la présence du pathogène chez l'animal. Ceci peut se faire soit par l'isolement de la bactérie, soit par la détection, à l'aide des techniques moléculaires, de ses acides nucléiques dans des différents tissus ou organes de l'animal.

### 4.4.1 Isolement d'*A. pleuropneumoniae*

#### 4.4.1.1 Méthode standard

L'isolement d'*A. pleuropneumoniae* à partir des poumons confirme généralement le diagnostic des infections cliniques. Cependant, pour la plupart des élevages conventionnels, l'absence de signes cliniques et/ou des lésions caractéristiques à l'abattoir ne signifie pas nécessairement que la bactérie est absente du troupeau (36, 51). Ces élevages peuvent être infectés de façon sous-clinique, et dans ce cas, la culture des poumons ne permet pas généralement d'isoler l'agent pathogène (130). La détection de ces animaux porteurs asymptomatiques est d'une importance capitale car ils constituent la source majeure de transmission de la maladie entre troupeaux (36, 170). 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 (164). Dans une étude, il a été démontré que les sérotypes 1, 2, 3, 5a, 5b, 7, 8, 10 et 12 peuvent être retrouvés au niveau des cavités nasales et des amygdales sans causer de manifestations cliniques (164).

Il semble que les amygdales sont le site privilégié de colonisation des animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae*. En effet, la bactérie semble être moins présente dans les cavités nasales (27, 164). Même le lavage broncho-alvéolaire semble être inférieur aux amygdales lorsqu'il s'agit de détecter le pathogène chez des animaux infectés de façon sous clinique (160). Les amygdales sont des organes lymphoïdes appartenant au tissu lymphoïde associé à la muqueuse (MALT : mucosal associated lymphoid tissue) et jouent un rôle important dans la défense du tractus respiratoire supérieur. Chez le porc, la surface des amygdales présente entre 160 à 190 invaginations de quelques centaines de micromètres, ou cryptes, qui sont connectées au tissu lymphoïde (14). Ces cryptes, dont l'épithélium est fortement infiltré par des lymphocytes, constituent une porte d'entrée pour de nombreux agents pathogènes majeurs chez le porc, entre autres *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* et *Streptococcus suis*. Suite à une infection expérimentale de porcs avec *A. pleuropneumoniae* une étude a rapporté que, 30 minutes post infection, *A. pleuropneumoniae* était retrouvée fortement associée à l'épithélium des amygdales. Une association avec la paroi de la crypte a été démontrée dans une étape ultérieure de l'infection (26).

Les amygdales sont aussi fortement colonisées par *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus porcinus* et *Actinobacillus indolicus* (120). Ces espèces sont considérées pour certains comme faisant partie de la flore normale du tractus respiratoire supérieur et non-pathogènes chez le porc (27). Cependant, elles ont déjà été isolées à partir de poumons de porcs présentant des lésions caractéristiques de pleuropneumonie porcine, mais où l'isolement d'*A. pleuropneumoniae* n'avait pas été possible (93). Que ces espèces soient ou non virulentes, leur présence dans les amygdales complique la détection d'*A. pleuropneumoniae*, à cause de leur ressemblance morphologique et biochimique.

Le prélèvement des amygdales en vue de l'isolement se fait généralement sur les carcasses de porcs à l'abattoir (119, 164). Des biopsies d'amygdale ont aussi été utilisées pour l'isolement d'*A. pleuropneumoniae* (160). La culture d'*A. pleuropneumoniae* à partir d'échantillons provenant des amygdales est réalisée sur un milieu sélectif afin d'éviter l'interférence de la flore normale avec le processus d'isolement du pathogène, qui est souvent présent en faible nombre. Plusieurs types de milieu sélectifs ont été utilisés, avec plus ou moins de succès (83, 100, 119, 164). Un milieu PPLO (pleuropneumonia-like organisms) additionné de 2 µg/ml de crystal violet, 1 µg/ml de lincomycine, 128 µg/ml de bacitracine et 1 µg/ml de NAD (164) est actuellement utilisé à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal pour l'isolement de routine d'*A. pleuropneumoniae*.

L'identification préliminaire d'*A. pleuropneumoniae* biotype I est généralement effectuée par les observations-clés suivantes: a) colonies d'aspect cireux ou mucoïde typiquement hémolytiques sur gélose au sang de mouton supplémentée de NAD; b) réaction de CAMP positive, c) dépendance au NAD visualisée sur gélose au sang par un phénomène de satellitisme autour d'une strie de *S. aureus* (source de NAD), d) réaction positive et souvent très rapide de la dégradation de l'urée sur le milieu urée de Christensen (36). L'identification est confirmée par le sérotypage de l'isolat. Cependant, la découverte de certaines souches d'*A. pleuropneumoniae* atypiques augmente le risque d'une mauvaise identification du microorganisme (16, 56).

L'absence d'isolement d'*A. pleuropneumoniae* dans des troupeaux avec sérologie atypique ne constitue pas un élément pour classer ces élevages comme libres d'*A. pleuropneumoniae* car il a été rapporté que, pour ce pathogène, l'isolement standard n'est pas une technique très sensible. (2, 27, 47, 58, 160, 161). Le développement de techniques d'isolement permettant d'éliminer les contaminants, aussi bien que des techniques moléculaires spécifiques pour l'espèce (voir plus loin) a rendu plus facile la détection d'*A. pleuropneumoniae* à partir des amygdales.

#### 4.4.1.2 Méthode d'immunocapture magnétique

L'isolement de cellules procaryotes suite à une immunocapture magnétique est une technique relativement récente. Des billes magnétiques, sur lesquelles des anticorps spécifiques envers un microorganisme ont été fixés, permettent sa capture sélective à partir de suspensions contenant des composants différents. Le champ magnétique généré par un aimant est utilisé afin de capturer les billes. Ces dernières, contenant le pathogène couplé à l'anticorps, sont par la suiteensemencées dans les conditions spécifiques dont la bactérie a besoin (Figure 4).

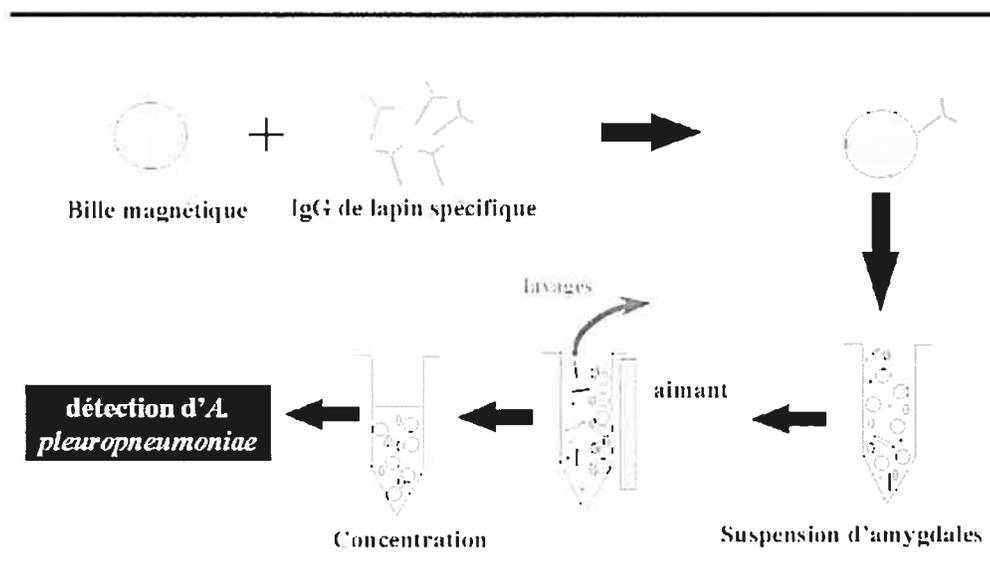


Figure 4. Schéma de la procédure utilisée pour l'isolement d'*A. pleuropneumoniae* par capture immunomagnétique. Voir le texte pour plus de détails.

En utilisant des billes couplées à des IgG de lapin spécifiques pour *A. pleuropneumoniae* sérotype 1, une étude a rapporté l'isolement sélectif d'*A. pleuropneumoniae* à partir d'amygdales provenant de troupeaux infectés (47). Une sensibilité 1000 fois supérieure à l'isolement traditionnel a été rapportée avec cette technique à partir d'amygdales inoculées artificiellement (47).

Des différences significatives (en faveur de l'isolement immunomagnétique) par rapport à la sensibilité entre les deux méthodes ont aussi été rapportées lorsque l'isolement a été fait à partir d'amygdales d'animaux provenant de troupeaux infectés (47). Cependant, ces différences au niveau de la sensibilité n'ont pas été observées lors d'une étude qui a utilisé comme échantillon de départ des biopsies d'amygdale provenant de porcs infectés expérimentalement (160). Il faut noter, cependant, que cette dernière étude n'a pas utilisé les mêmes procédures expérimentales qui avaient été suivies lors de la description de la technique d'immunocapture (47), et que l'absence de différences au niveau de la sensibilité pourrait bien être expliquée par ce fait. Par ailleurs, dans une étude récente, une limite de détection de 10 UFC/ml a été rapportée pour l'isolement immunomagnétique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 2 (2). De plus, lors d'une infection expérimentale chez le porc, 25% des animaux se sont avérés porteurs du pathogène par l'immunocapture magnétique, tandis que la présence de la bactérie n'a pas pu être démontrée par l'isolement traditionnel, et, de façon surprenante, non plus par une épreuve PCR à partir de cultures mixtes provenant d'amygdales (2).

Le rapport récent de l'isolement de deux souches supposées appartenir à une nouvelle espèce bactérienne, nommée tentativement '*Actinobacillus porcitonisillarum*' (54), démontre les limitations de cette technique en ce qui concerne la détection d'*A. pleuropneumoniae* à partir d'amygdales de porcs infectés de façon sous-clinique. Une de ces deux souches a été isolée à partir d'amygdales d'un animal provenant d'un troupeau présentant des résultats sérologiques suspects pour *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Cette souche a été caractérisée comme antigéniquement similaire à *A. pleuropneumoniae*, spécialement en ce qui concerne

la capsule polysaccharidique. Cette similarité explique la capture de ces souches par les IgG anti-*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 couplées aux billes. De plus cette souche et une deuxième provenant d'un cas clinique ont été identifiées, de façon erronée, comme étant des isolats d'*A. pleuropneumoniae* par le laboratoire de diagnostic bactériologique, puisque leurs caractéristiques biochimiques sont aussi très similaires à celles d'*A. pleuropneumoniae*. Cependant, lors de l'analyse moléculaire de ces deux isolats, il a été démontré qu'ils étaient négatifs pour la présence de l'ADN codant pour la toxine ApxIV, et que leur ARNr 16S était en fait différent de celui d'*A. pleuropneumoniae* (54). Évidemment, la présence de ce type de bactéries dans les amygdales complique l'interprétation des résultats positifs obtenus par isolement immunomagnétique et exige la mise en œuvre de techniques moléculaires de confirmation.

#### **4.4.2 Détection immunologique directe d'*A. pleuropneumoniae***

La détection directe d'*A. pleuropneumoniae* dans les tissus pulmonaires de porcs atteints de pleuropneumonie porcine au moyen de méthodes immunologiques est une alternative à l'isolement de la bactérie. Les techniques les plus souvent utilisées sont la co-agglutination (115) et l'immunofluorescence indirecte (155). Ces techniques sont aussi utilisées pour sérotyper le pathogène, tel que décrit plus haut (voir section 4.2.X). Le test de co-agglutination (115) utilise des immunoglobulines G de lapin anti-*A. pleuropneumoniae* fixées à la protéine A produite par la souche Cowan I de *S. aureus*. Un broyat de poumon dans du PBS formolé est ajouté à la suspension de *S. aureus* et la réaction d'agglutination est visualisée sur lame. L'immunofluorescence indirecte (155) peut se faire à partir de coupes de tissus pulmonaires. Après la 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. La technique d'immunoperoxidase (168)

pourrait aussi être adaptée pour détecter le pathogène directement dans les tissus pulmonaires.

La détection directe immunologique est efficace à partir des poumons provenant d'animaux atteints des formes aiguë et suraiguë de pleuropneumonie porcine. L'utilité de ces techniques pour la détection d'animaux porteurs est toutefois limitée. Chez ces animaux, *A. pleuropneumoniae* se retrouve naturellement au niveau du tractus respiratoire supérieur, surtout dans les amygdales, et en bas nombre (164). De plus, les amygdales sont fortement colonisées par des espèces bactériennes autres qu'*A. pleuropneumoniae*, souvent apparentées antigéniquement (54, 93). L'utilisation de ces techniques immunologiques à partir de cet organe conduirait à l'obtention d'un nombre important de résultats faussement négatifs, dus à l'incapacité des anticorps de reconnaître *A. pleuropneumoniae*, de même qu'à certains résultats faussement positifs dus à des réactions croisées.

#### **4.4.3 Détection moléculaire d'*A. pleuropneumoniae***

Les techniques moléculaires sont devenues des outils performants pour l'identification en microbiologie (146). Parmi ces techniques, la PCR, standard ou en temps réel (real time PCR), est une des plus populaires et souvent utilisée. La capacité de la PCR de détecter des quantités minuscules d'ADN spécifique à une espèce bactérienne est avantageuse pour plusieurs raisons: les réactions croisées sont évitées, des souches auto-agglutinantes dont le sérotype ne peut pas être déterminé peuvent être regroupées par PCR selon certaines de leurs caractéristiques moléculaires, l'amplification de l'ADN rend la PCR très sensible, et la PCR peut être accomplie directement sur l'échantillon, en évitant les étapes de culture et sous culture. Plus d'une douzaine d'épreuves PCR ont été décrites pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* (2, 27, 30, 42, 58, 59, 65, 67, 107, 139, 160, 161). Une description

de ces épreuves est présentée ci dessous. Le Tableau II présente un sommaire de la plupart de ces épreuves

#### 4.4.3.1 L'épreuve PCR canadienne

La première épreuve PCR pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* a été rapportée en 1991 (165). Il s'agit d'une épreuve fondée sur l'amplification d'une séquence génomique, dont la fonction demeure inconnue, présente, au moins, chez les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae*. Une large batterie d'espèces bactériennes phylogénétiquement proches d'*A. pleuropneumoniae* et des espèces souvent retrouvées dans les voies respiratoires supérieures de porcs ont été testées pour valider l'épreuve. Celle-ci s'est avérée spécifique pour l'espèce *A. pleuropneumoniae*, mais a aussi donné un signal positif pour *A. lignieresii*. Une sensibilité de  $10^3$  UFC/ml de culture pure d'*A. pleuropneumoniae* a été rapportée pour cette épreuve.

Après avoir confirmé les résultats qui précèdent, une autre étude (60) a rapporté l'application de cette technique pour la détection du pathogène à partir de primocultures d'amygdales. Une suspension d'amygdales est mise en culture sur une gélose, la croissance bactérienne est récoltée par lavage de la gélose avec un tampon (TE ou PBS) et l'ADN obtenu à partir de ce "lavage de gélose" est utilisé pour la PCR. Lorsque évaluée, l'épreuve PCR a détecté trois fois plus d'animaux positifs, lorsque comparée à la culture bactérienne. Des bandes non spécifiques (lesquelles ne devraient pas compliquer l'interprétation des résultats) ont été quelquefois observées lorsque l'amplification a été faite à partir de cultures mixtes.

#### 4.4.3.2 Épreuves PCR avec des amorces "arbitraires"

Une épreuve PCR avec des amorces "arbitraires" (AP-PCR; arbitrarily primed PCR) a été rapportée pour le typage des différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (65). Dans cette étude, l'utilisation des amorces universelles M13, T7 et T3, a permis de différencier tous les sérotypes du pathogène selon leurs profils d'amplification particuliers. Cependant, l'utilité de cette épreuve pour le diagnostic est très limitée, car elle requiert que l'ADN soit obtenu à partir de cultures pures de souches isolées. En effet, la présence de matériel génétique d'autres espèces ou souches provoque un grand changement dans le profil génomique. Ceci pourrait conduire à une identification erronée de la bactérie.

#### 4.4.3.3 L'épreuve PCR "toxines" (ApxI, ApxII et ApxIII)

Des séquences correspondant aux gènes responsables de la production et le transport des toxines Apx ont aussi été utilisées pour développer une épreuve PCR pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* (42). Deux réactions séparées ont permis, l'une l'amplification de séquences des gènes activateurs et structurels *apxICA*, *apxIICA* et *apxIIICA* et l'autre l'amplification des séquences des gènes de sécrétion *apxIBD* et *apxIIIBD*. Avec ces deux réactions, les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ont pu être classés en cinq groupes, selon leurs profils de toxines. Cependant, d'autres espèces de la famille *Pasteurellaceae* possédant des séquences similaires pour ces gènes, telles que *A. lignieresii*, *A. rossii* et *A. suis* donnent aussi un résultat positif avec cette épreuve. Puisque cette dernière espèce est souvent retrouvée chez le porc (167), l'utilisation de cette PCR lors du diagnostic n'est pas recommandée. Par contre, lorsqu'une souche est isolée, cette PCR devient très utile pour sa caractérisation.

#### 4.4.3.4 L'épreuve PCR *omlA* japonaise

Le gène *omlA* code pour OmlA, une lipoprotéine de la membrane externe présente chez tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. La variation génétique parmi les sérotypes a été étudiée (22, 49, 82) et a servi pour le développement de plusieurs épreuves PCR. Un groupe japonais (139) a rapporté l'utilisation du gène *omlA* dans une étude PCR suivi de l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP : restricted fragment length polymorphism) des sérotypes 1 à 12 du biotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*. Le profil RFLP de l'amplicon généré a permis la différenciation des sérotypes en cinq groupes, soit a) sérotypes 1,9,11 et 12; b) sérotypes 2 et 8, c) sérotypes 3, 6 et 7; d) sérotype 4 et e) sérotypes 5a, 5b et 10. Cependant, les amorces de cette épreuve PCR n'ont pas été testées sur des espèces autres qu'*A. pleuropneumoniae*, donc, rien n'est connu sur la spécificité de l'épreuve. De plus, aucune donnée n'a été présentée sur sa sensibilité.

#### 4.4.3.5 Détection différentielle du sérotype 5 par PCR

Une épreuve PCR multiplex pour la détection spécifique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 a aussi été décrite (107). Cette épreuve dispose d'un set d'amorces amplifiant, de façon spécifique pour l'espèce, le gène *cpx*, associé à l'exportation des polysaccharides capsulaires. L'autre set d'amorces amplifie, de façon spécifique pour le sérotype 5, le gène *cps*, codant pour des enzymes impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides capsulaires chez *A. pleuropneumoniae*. Lorsque évaluée avec des cultures pures de souches de référence et des isolats des sérotypes 1 à 12, tous les sérotypes, sauf le sérotype 4, ont présenté la bande spécifique d'espèce, et seul le 5 la bande séro-spécifique. Une évaluation avec des échantillons pulmonaires, utilisés sans une étape de culture, a été conduite pour cette épreuve.

Tableau II. Sommaire des épreuves PCR disponibles pour la détection d'*A. pleuropneumoniae*<sup>a</sup>

Épreuve (année)	Amorces	Utilisée à partir de
Sirois <i>et al.</i> (1991)	XP-1	5'-GAACAGTTGTTCCGCTAA-3'
	APL-1	5'-CCGCTTCCGTACAGCAATC-3'
<i>omIA</i> (1996) Gram <i>et Arhens</i>	LPF	5'-AAGGTTGATATGTCCGCACC-3'
	LPR 1	5'-TTTATAATGGTACCATCTTCG-3'
<i>cps-cpx</i> (1998) <sup>c</sup> Lo <i>et al.</i>	A	5'-TTTATCACTATCACCGTCCACACCT-3'
	B	5'-CATTCCGGTCTTGTGGCTACTAAA-3'
	C	5'-TGGCGATACCGGAAACAGAGTC-3'
	D	5'-GCGAAAGGCTATGGTATGGGTATGG-3'
<i>aroA</i> (1999) H Morali <i>et al.</i>	FAP	5'-GCCGCTTTAGCGAAAGGGACGAC-3'
	RAP	5'-GTAGGTTGCAATTTCTGCGTGT-3'
<i>tbpA-tbpB</i> (2000) de la Puente <i>et al.</i>	Tbpa33	5'-AAGCTTGAAACTAAGGTACTCTAA-3'
	Tbpa55	5'-TTAGCCTTGCTCTTCTTAGCC-3'
	Tbpb33	5'-CGTTTTGCACCAAAGACAGCG-3'
	Tbpb55	5'-ATGCATTTAAACTTAATCCC-3'
<i>apxIVA</i> (2000) <sup>d</sup> Schaller <i>et al.</i>	Apxiva-1L	5'-TGGCACTGACGGTGATGA-3'
	Apxiva-1R	5'-GGCCATCGACTCAACCAT-3'
	Apxivanest-1L	5'-GGGGACGTAACCTCGGTGATT-3'
	Apxivanest-1R	5'-GCTCACCAACGTTTGCTCAT-3'
<i>omIA</i> (2000) Savoie <i>et al.</i>	LPF	5'-AAGGTTGATATGTCCGCACC-3'
	OmlAr	5'-GCCGTAGCACCGATTACG-3'
<i>omIA</i> (2000) <sup>e</sup> Gram <i>et al.</i>	LPF	5'-AAGGTTGATATGTCCGCACC-3'
	LPR 1	5'-TTTATAATGGTACCATCTTCG-3'
	LPR 2	5'-TTTTACTAGAATGGTCATATTGC-3'
	LPR 3	5'-TATTTGGAGCTGTTTTGTTGAT-3'
	LPR 4	5'-ACCTGCAATCTTATTATTAATCG-3'
<i>dsbE-like</i> (2001) Chiers <i>et al.</i>	ApDsbE-1	5'-GATAAACCTTTCCGGAATT-3'
	ApDsbE-2	5'-TACCACACCGTGTATTATCAA-3'
Adiavet App <sup>f</sup>	séquences non disponibles	cultures d'écouvillons nasaux cultures mixtes d'amygdales <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Les épreuves PCR pour les toxines Apxl, II et III, celles utilisant des amorces arbitraires et l'épreuve *omIA* japonaise ne sont pas incluses dans ce tableau.

<sup>b</sup> Évaluée par Gram *et al.*, Vet Microbiol. 1996, 51:95-104.

<sup>c</sup> Épreuve "multiplex", permettant la discrimination du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*.

<sup>d</sup> Épreuve PCR nichée.

<sup>e</sup> Épreuve "multiplex", permettant la discrimination d'*A. pleuropneumoniae* en 5 groupes : a) sérotypes 1,9,11 et 12 ;

b) sérotypes 2 et 8 ; c) sérotypes 3, 6 et 8 ; d) sérotype 4 ; et e) sérotypes 5a, 5b et 10

<sup>f</sup> Épreuve "multiplex", permettant la discrimination d'*A. pleuropneumoniae* en 4 groupes : a) sérotypes 1,9,11 et 12 ;

b) sérotypes 2, 4, 7 et 8 ; c) sérotypes 3, 6 et 8 ; et d) sérotypes 5a, 5b et 10

<sup>g</sup> Évaluée par Chiers *et al.*, Vet Microbiol. 2001, 83:147-59.

#### 4.4.3.6 L'épreuve PCR *aroA*

Le gène *aroA*, codant pour une enzyme de la voie métabolique des acides aminés aromatiques, a aussi été utilisé pour le développement d'une autre épreuve PCR (67). Une sensibilité de seulement 12 UFC ou 0.8 pg d'ADN (cultures pures) a été rapportée pour cette épreuve. De plus, l'amplicon obtenu par PCR a été par la suite analysé par RFLP et a permis le sous-typage des sérotypes dans deux groupes, selon leur profil RFLP. Son pauvre pouvoir de discrimination, le fait que cette épreuve PCR détecte aussi d'autres espèces bactériennes, comme *A. equuli* et *A. lignieresii* et l'absence d'évaluation avec des échantillons autres que des cultures pures ne permettent pas d'évaluer son utilité pour le diagnostic. Cependant, la haute sensibilité rapportée pourrait conseiller son inclusion dans une étude portant sur la détection d'*A. pleuropneumoniae* par PCR.

#### 4.4.3.7 L'épreuve *omlA* danoise

Une deuxième épreuve PCR spécifique pour *A. pleuropneumoniae* en utilisant le gène *omlA* a été développée au Danemark (58). Lorsque les amorces reconnaissant le gène *omlA* ont été testées avec des cultures pures de tous les sérotypes du pathogène, avec des espèces phylogénétiquement proches ou souvent retrouvées chez le porc, cette épreuve PCR s'est avérée sensible et spécifique. L'épreuve a aussi été évaluée avec des cultures bactériennes mixtes provenant d'amygdales. Le seuil de détection de cette épreuve en utilisant comme source d'ADN des cultures pures a été de  $10^4$  UFC d'*A. pleuropneumoniae*/ml de culture. Dans cette même étude, les gènes *omlA* des 12 sérotypes du biotype 1 ont été séquencés. L'alignement des séquences a montré que les régions terminales du gène *omlA* sont conservées parmi l'espèce, tandis que la région centrale présente une variabilité qui permettrait de développer une épreuve PCR multiplex

permettant de discriminer les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* en groupes différents.

#### 4.4.3.8. L'épreuve *omlA* multiplex

La variabilité génétique au niveau des sérotypes du gène *omlA*, a été utilisée pour le développement d'une épreuve PCR multiplex permettant le typage d'*A. pleuropneumoniae* (59). Des amorces ont été conçues, divisant les sérotypes en cinq groupes différents : le groupe *omlA* I, comprenant les sérotypes 1, 9, 11 et 12 ; le groupe *omlA* II, comprenant les sérotypes 2 et 8 ; le groupe *omlA* III comprenant les sérotypes 3, 6 et 7 ; le groupe *omlA* IV, comprenant le sérotype 4 ; et le groupe *omlA* V comprenant les sérotypes 5a, 5b et 10. Lorsque les résultats de cette PCR ont été combinés avec le test PCR toxines Apx (42), presque tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ont pu être séparés, sauf le 1, 9 et 11 et le 2 et 8. Il est à noter que l'épreuve PCR multiplex *omlA*, étant spécifique pour l'espèce *A. pleuropneumoniae*, elle sert de témoin pour l'interprétation des résultats de l'épreuve PCR détectant les toxines. Le système a été testé avec 102 isolats de poumons de porcs malades et s'est avéré fonctionnel, seulement cinq souches du sérotype 8 ont présenté des profils différents de la souche de référence. Cependant, cette épreuve n'a été évaluée qu'avec des cultures pures d'*A. pleuropneumoniae*.

#### 4.4.3.9 L'épreuve *omlA* française

Le gène *omlA* a aussi été utilisé pour développer une autre épreuve PCR spécifique, cette fois en France (160). Dans la description originale de l'épreuve, les réactions ont été effectuées directement, sans une étape de culture, à partir

d'un extrait brut provenant de biopsies d'amygdales obtenues d'animaux infectés expérimentalement. Cette méthode a démontré une très bonne spécificité lorsque testée avec des espèces bactériennes autres qu'*A. pleuropneumoniae* et aussi une bonne sensibilité. En effet, le nombre d'échantillons positifs par PCR a été trois fois supérieur à celui obtenu par culture. De plus, des amygdales trop contaminées pour permettre l'isolement du pathogène, ont pu être testées (avec un résultat positif) avec cette épreuve PCR. Le seuil de détection a été similaire à celui obtenu pour une autre épreuve PCR fondée sur le même gène (58), soit  $10^4$  UFC d'*A. pleuropneumoniae*/ml de culture. En utilisant cette épreuve, la transmission de l'infection à *A. pleuropneumoniae* par la voie des aérosols sous des conditions expérimentales a pu être confirmée. Il est intéressant à remarquer que cette épreuve compte aussi un témoin interne d'inhibition permettant d'éviter les résultats faussement négatifs dus à l'absence d'amplification provoquée par inhibition de la réaction de polymérisation. Cependant, ce test n'a pas été validé avec des échantillons du terrain, c'est-à-dire avec des animaux infectés naturellement.

#### 4.4.3.10 Une épreuve PCR commerciale

Une épreuve PCR pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* (Adiavet App ®, Adiagène, St-Brieuc, France) a récemment été commercialisée. Le fabricant indique que le test a une spécificité de 100% concernant les espèces bactériennes isolées chez le porc et qu'il détecte 98% des souches d'*A. pleuropneumoniae* biotype 1 et 50% des souches biotype 2. Ce test semble être capable de diviser les souches d'*A. pleuropneumoniae* en quatre groupes, selon le sérotype, soit a) sérotypes 1, 9, 11 et 12; b) sérotypes 5a, 5b, et 10; c) sérotypes 2, 4, 7, 8 et 12 et d) sérotypes 3, 6, 7 et ceux du biotype 2 (23). Cette épreuve a été comparée à l'épreuve *omlA* danoise et à une nouvelle épreuve PCR fondée sur un gène *dsbE*-

like (voir plus bas). Dans cette étude, l'épreuve commerciale s'est avérée la moins sensible des trois (27).

#### 4.4.3.11 L'épreuve *tbpA-tbpB*

Les gènes *tbpA* et *tbpB*, codant pour les protéines membranaires induites par le fer TbpA et TbpB ont aussi été utilisés pour le développement d'une épreuve PCR pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* (30). Dans ce cas, il s'agit de deux paires d'amorces qui permettent l'amplification des gènes ciblés. Avec la première paire d'amorces, l'amplification de *tbpA* conduit à l'identification des sérotypes 1, 6, 8 et 12 d'*A. pleuropneumoniae* mais aussi d'*A. suis*. La deuxième paire d'amorces, spécifiques pour *tbpB* permet la détection des sérotypes 2, 3, 4, 7, 9, 10 et 11 d'*A. pleuropneumoniae*, mais aussi d'*H. parasuis*. Le traitement RFLP des amplicons permet par la suite la différenciation des espèces et aussi un sous-typage des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* en 10 groupes différents, les seules sérotypes qui échappent à la discrimination étant les 4-7 et le 7-9 (profil identique entre eux). L'épreuve a été évaluée avec des cultures pures et aussi avec des échantillons (poumons et écouvillons nasaux) provenant d'animaux infectés expérimentalement. Sa sensibilité a varié entre 50 UFC/ml (*tbpA*) et 10<sup>3</sup> UFC/ml (*tbpB*), pour les cultures pures. Cette épreuve, malgré son pouvoir de discrimination, comporte deux réactions PCR suivies de l'analyse des amplicons, ce qui augmente de beaucoup le temps requis pour obtenir un résultat.

#### 4.4.3.12 L'épreuve PCR nichée sur le gène *apxIVA*

Une épreuve PCR amplifiant *apxIVA*, le gène structural de la toxine ApxIV, a aussi été décrite (161). Tel que mentionné plus haut, le gène codant

pour cette toxine est spécifique à *A. pleuropneumoniae* et il est présent chez tous les sérotypes (162). Dans ce cas, il s'agit d'une PCR nichée (nested PCR). Elle a été testée à partir de cultures pures et aussi directement (sans étape de culture) à partir d'écouvillons nasaux et d'échantillons de poumons présentant des lésions provenant d'animaux infectés expérimentalement. L'épreuve semble être très sensible (5-10 équivalents du génome) et spécifique, car elle a été testée avec 17 espèces bactériennes étroitement liées à *A. pleuropneumoniae*, lesquelles se sont avérées négatives. Une comparaison avec l'isolement de la bactérie n'a pas été réalisée pour les écouvillons nasaux, il reste donc à confirmer si le test a détecté des bactéries viables ou seulement de l'ADN résiduel présent dans les cavités nasales. Par contre, lorsque le test a été accompli à partir de lésions pulmonaires, une comparaison avec l'isolement a été faite, le PCR s'avérant plus sensible (16/17 vs 13/17 animaux). Comme dans le cas précédent, cette épreuve n'a pas été validée avec des échantillons provenant du terrain.

#### 4.4.3.13 L'épreuve *dsbE*-like

Une nouvelle épreuve PCR a récemment été développée en utilisant un gène *dsbE*-like, codant, chez *E. coli*, pour une protéine d'échange de ponts disulfure (27). Un niveau de détection de 10<sup>2</sup> UFC (culture pure)/réaction PCR a été obtenu lors des études de sensibilité de cette épreuve. Concernant sa spécificité, *A. lignieresii* est faussement détectée. L'évaluation de l'épreuve a été faite en utilisant des cultures mixtes provenant de biopsies, des écouvillons de suspensions nasales et d'amygdales. Une comparaison avec les épreuves PCR Adiavet App ® et l'épreuve *omlA* danoise (58) a été accomplie. Les résultats présentés suggèrent que l'épreuve *dsbE*-like est plus sensible que les deux autres tests et que l'amygdale s'avère un meilleur choix que les cavités nasales pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* par PCR. L'épreuve PCR *dsbE*-like a été utilisée par la suite dans une étude épidémiologique (24) et dans une étude

comparative de la détection d'*A. pleuropneumoniae* dans les voies respiratoires supérieures (25).

#### 4.4.3.14 Une épreuve PCR "en temps réel"

Une épreuve PCR "en temps réel" (real-time PCR), utilisant aussi des séquences du gène *omlA* a été décrite (3). La sensibilité de l'épreuve semble être très élevée (1 UFC/tube PCR). Par ailleurs, avec cette épreuve il est possible de quantifier le microorganisme présent dans l'échantillon. En même temps l'exécution de l'épreuve requiert moins de temps qu'une PCR traditionnelle et elle peut réduire les problèmes de contamination dans le laboratoire, car il n'est pas nécessaire d'effectuer une électrophorèse des amplicons. Cependant, les coûts en équipement pour cette épreuve doublent ceux d'une PCR traditionnelle.

# **III MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

**Article : “Evaluation and Field Validation of PCR Tests for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Subclinically Infected Pigs”**

Publié dans JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2003, p. 5085–5093 Vol. 41, No. 11.

Je suis le premier auteur de cet article. J’ai contribué à la conception intellectuelle du projet, j’ai réalisé la majorité des manipulations et j’ai rédigé le manuscrit.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2003, p. 5085–5093 Vol. 41,  
No. 11. 0095-1137/03/\$08.00~0 DOI:10.1128/JCM.41.11.5085–5093.2003  
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

**Evaluation and Field Validation of PCR Tests for  
Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in  
Subclinically Infected Pigs**

Nahuel Fittipaldi,<sup>1,2</sup> André Broes,<sup>2,3</sup> Josée Harel,<sup>1,2</sup> Marylène Kobisch,<sup>4</sup> and Marcelo  
Gottschalk<sup>1,2\*</sup>

*Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine  
Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6<sup>1</sup>;  
Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine<sup>2</sup> and Centre de  
Développement du Porc du Québec Inc.,<sup>3</sup> Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4M7; and  
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Laboratoire d'Études et de  
Recherches Avicoles et Porcines, Unité de Mycoplasmiologie-Bactériologie, 22440  
Ploufragan, France<sup>4</sup>*

Received 15 April 2003/Returned for modification 16 May 2003/Accepted 18 August  
2003\* Corresponding author. Mailing address: GREMIP, Faculté de Médecine  
Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec,  
Canada J2S 7C6. Phone: (450) 773-8521, ext. 8374. Fax: (450) 778-8108. [REDACTED]

[REDACTED]

## ABSTRACT

Eight PCR tests were evaluated for their abilities to detect *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine tonsils. At first they were compared regarding their specificities by using *A. pleuropneumoniae* and related bacterial species and their analytical sensitivities by using tonsils experimentally infected in vitro. PCRs were carried out both directly with tonsil homogenates (direct PCR) and after culture of the sample (after-culture PCR). Most tests demonstrated good specificities; however, some tests gave false-positive results with some non-*A. pleuropneumoniae* species. High degrees of variation in the analytical sensitivities among the tests were observed for the direct PCRs ( $10^9$  to  $10^2$  CFU/g of tonsil), whereas those of most of the after-culture PCRs were similar ( $10^2$  CFU/g of tonsil). In a second phase, the effects of sample storage time and storage conditions were evaluated by using tonsils from experimentally infected animals. Storage at  $-20^\circ\text{C}$  allowed the detection of the organism for at least 4 months. Finally, the *omlA* PCR test described by Savoye et al. (C. Savoye et al., Vet. Microbiol. 73:337-347, 2000) and the commercially available Adiavet App PCR test were further validated with field samples. Their effectiveness was compared to those of standard and immunomagnetic separation-based methods of bacterial isolation. In addition, a comparison of tonsil biopsy specimens (from living animals) and whole tonsils (collected at the slaughterhouse) was also conducted. *A. pleuropneumoniae* was neither isolated nor detected by PCR from a herd serologically negative for *A. pleuropneumoniae*. PCR was more sensitive than the standard isolation method with whole tonsils from three infected herds. After-culture PCR offered the highest degree of sensitivity (93 and 83% for the *omlA* and Adiavet App PCRs, respectively). The PCR detection rate was higher with whole tonsils than with tonsil biopsy specimens. Good agreement ( $\kappa = 0.65$ ) was found between the presence of *A. pleuropneumoniae* in tonsils and the individual serological status of the animals.

## INTRODUCTION

*Actinobacillus pleuropneumoniae*, 2 biovars and 15 serotypes of which have been described so far (3, 38), is the causative agent of porcine pleuropneumonia. The disease occurs worldwide and causes important economic losses to the swine industry. The disease course may be acute and fatal, with untreated animals sometimes dying within a few hours. However, in many herds, pigs may be subclinically infected without presenting clinical signs. These apparently healthy animals harbor the organism in their upper respiratory tracts, particularly in their nasal cavities and tonsils (24, 31, 36). It has recently been shown that *A. pleuropneumoniae* can survive in tonsillar crypts, leading to the carrier state (7). Aerosol transmission under experimental conditions has been documented (12, 34), and it has been proposed that subclinically infected pigs are the main cause of *A. pleuropneumoniae* dissemination (32).

Early identification of subclinically infected herds is essential for control of the disease. Serology, both standard and immunomagnetic separation-based (IMS) bacterial isolation methods, as well as PCR techniques may be used for this purpose. Serological monitoring has been very helpful in the control of swine pleuropneumonia (5, 11, 14, 22), but it has some limitations. Infected pigs may be serologically negative (6, 31, 36), and sometimes, inconclusive serological results may be observed in the absence of clinical signs or pathological lesions. In these cases, isolation of the organism or its detection by direct methods becomes important for confirmation of the infection. Standard bacteriological isolation from tonsils has a very low sensitivity since swine tonsils are heavily colonized with the commensal flora (including several NAD-dependent bacterial species) that may interfere with the isolation and identification of *A. pleuropneumoniae*, even with the use of selective media (23, 36). IMS isolation of *A. pleuropneumoniae* has been shown to have a significantly higher sensitivity compared to that of standard isolation methods (1, 13), but the technique is time-consuming and expensive. Furthermore, by using IMS isolation, a recent study has reported the isolation of *A. pleuropneumoniae*-like strains, tentatively named "*Actinobacillus porcitonillarum*," that are phenotypically and antigenically very similar to but genetically different from *A. pleuropneumoniae* (15). These bacteria complicate the interpretation of the results of IMS isolation, as

they may be differentiated from *A. pleuropneumoniae* only by using molecular analysis.

Within the last 12 years several PCR techniques that amplify well-defined sequences of the *A. pleuropneumoniae* genome have been described as valuable tools for the rapid and affordable detection of the pathogen (8, 10, 17, 18, 21, 28, 34, 35, 37), and a ready-to-use PCR kit has even been commercialized (Adiavet App PCR test; Adiaçène, St. Brieuc, France). Some of these tests allow only species detection (8, 17, 34, 35, 37), while others discriminate a particular serotype (28) or groups of serotypes, either directly (18) or after restriction fragment length polymorphism analysis (10, 21). It is claimed that all these tests have good specificities and sensitivities. However, on the basis of published data, a comparison of their performances is almost impossible, since studies vary greatly in the experimental procedures as well as the samples that they use. Some tests have been evaluated only with pure cultures of different bacterial species (18, 21), while others have used mixed bacterial cultures, either from tonsils (17, 19) or from both nasal swabs and tonsils (8). Some tests were conducted directly, without a mixed culture step, with tonsil biopsy specimens and tracheobronchial washes (34), lung tissue (28), or both nasal swabs and lung tissue (10, 35). Moreover, most studies have used experimentally infected animals and have not been validated with field samples. A comparison of the tests by the use of similar conditions thus appears to be essential to evaluate their actual effectiveness and efficacy.

The samples used are critical for the detection of *A. pleuropneumoniae*. Tonsils have been shown to be better than nasal cavity swabs and tracheobronchial washes for PCR (8, 34). However, some studies were conducted with whole tonsils, while others used tonsil biopsy specimens. It is not known whether a tonsil biopsy specimen is actually representative of the whole tonsil and whether use of the latter does not present a risk of cross-contamination when specimens are collected at the slaughterhouse.

The objectives of the present study were (i) to compare the sensitivities and specificities of eight PCR tests for the detection of *A. pleuropneumoniae* by using

experimentally infected tonsils, (ii) to validate two of these PCR tests regarding their capacities to detect naturally infected *A. pleuropneumoniae* carrier animals, (iii) to compare the performances of the PCR tests to those of the standard and IMS isolation techniques, and (iv) to compare tonsil biopsy specimens and whole tonsils recovered at slaughter as samples in the PCR tests. In each case, the PCR tests were conducted with and without a previous culture step with the samples. Sample storage conditions were also examined. Finally, the correlation between the presence of the organism in tonsils and individual serological status was also evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** The bacterial strains used in this study included strains of the 15 described *A. pleuropneumoniae* serotypes (reference strains Shope 4074, S4226, ATCC 27090, ATCC 33378, ATCC 33377, Femo, ATCC 33590, 405, CVJ13261, D13039, 56153, 8329, N273, 3906, and HS143); *Actinobacillus minor* (field strain); *Actinobacillus equuli* (ATCC 19392); *Actinobacillus lignieresii* (ATCC 19393); *Actinobacillus suis* (ATCC 15557 and one field strain); *Actinobacillus porcicus* (field strain); *Haemophilus parasuis* (ATCC 19417); *Streptococcus suis* (S735); and two strains of “*A. porcitonillarum*”, an *A. pleuropneumoniae*-like species described recently (15). All strains with the exception of the *A. pleuropneumoniae* serotype 13, 14, and 15 reference strains originated from our collection. *A. pleuropneumoniae* serotype 13 and 14 reference strains were from Ø. Angen, Danish Veterinary Institute, Copenhagen, Denmark; and the serotype 15 reference strain was provided by J. Frey, University of Bern, Bern, Switzerland. All strains were grown as described previously (16, 31, 36).

**PCR tests.** The PCR tests evaluated in this study included (i) the test described by Sirois et al. (37), (ii) the *omlA* test described by Savoye et al. (34), (iii) the *dsbE*-like test described by Chiers et al. (8), (iv) the *aroA* test described by Hernanz Moral et al. (21), (v) the *apxIVA* nested PCR test described by Schaller et al. (35), (vi) the *cps-cpx*

multiplex PCR test described by Lo et al. (28), (vii) the *omlA* multiplex PCR test described by Gram et al. (18), and (viii) a commercially available multiplex PCR kit (Adiavet App PCR test; Adia-gène). The first five PCR tests allow the detection of the species *A. pleuropneumoniae* only (8, 21, 34, 35, 37) and do not provide information regarding a particular serotype. On the other hand, the multiplex *cps-cpx* PCR specifically detects most of the *A. pleuropneumoniae* serotypes by amplification of the *cpx* gene, while it allows the discrimination of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 by the selective amplification of its *cps* gene (28). The Adiavet App PCR test enables the detection and typing of the organism into four groups: group I indicates the presence of serotype 1, 9, 11, or 12; group II indicates the presence of serotypes 5a and 5b or 10; group III indicates the presence of serotype 2, 4, 7, 8, or 12; and group IV indicates the presence of serotype 3, 4, 6, or 7 or the NAD-independent serotypes (Adiavet App Technical Manual; Adia-gène). Finally, the *omlA* multiplex PCR test enables the typing of *A. pleuropneumoniae* serotypes into five groups: group omlAI, serotype 1, 9, 11, or 12; group omlAII, serotype 2 or 8; group omlAIII, serotypes 3, 6, or 7; group omlAIV, serotype 4; and group omlAV, serotype 5a, 5b, or 10 (18).

**Comparison of PCR test specificities and analytical sensitivities.** The specificities of the tests were evaluated by performing the PCRs with pure cultures of all the bacterial strains described above. The analytical sensitivities of the tests were compared by experimentally infecting tonsils obtained from animals originating from a herd considered free of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 to 12 on the basis of regular serological monitoring by the long-chain-lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay (LC-LPS-ELISA) (14) for the previous 3 years. A total of 0.5 g of tonsils was reduced to small pieces with a scalpel and added to 5 ml of serial dilutions ( $10^9$  to  $10^1$  CFU/ml) of a suspension of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 5, and 7, which were used separately or in combination. After vortex mixing for 2 min and filtration through filter paper (type 4; Whatman International Limited, Springfield Mill, England), 100  $\mu$ l of filtrate was plated onto selective PPLO agar and grown overnight (ON) at 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Bacterial growth was harvested by washing the agar plates with 3 ml of sterile Tris-EDTA buffer (pH 8), and the growth was immediately processed as described below. The remaining original filtrate was

fractionated into 1-ml aliquots and used as described below.

**Template preparation and PCR conditions.** Template DNA from pure cultures was prepared by the guanidinium thiocyanate method (33) and 1  $\mu$ l/PCR mixture was used for all tests. For PCRs carried out directly with the tonsil filtrate (direct PCRs), template DNA was obtained by a previously described technique by combining diatomaceous earth and guanidinium thiocyanate (4) from the pellet obtained after centrifugation (10,000 X *g* for 10 min) of 1 ml of the original tonsil filtrate. A total of 10  $\mu$ l of purified DNA per PCR was used for all tests described here with the exception of those performed with the commercial kit, for which the recommendations of the manufacturer were followed. For PCRs carried out with the mixed cultures (after-culture PCRs), template DNA was extracted from 100  $\mu$ l of the bacterial wash harvested from the PPLO agars (see above) by using the guanidinium thiocyanate method (33). All after-culture PCRs tests with the exception of those performed with the commercial kit were carried out with 1  $\mu$ l of purified DNA. For the PCRs performed with the commercial kit, the recommendations of the manufacturer were followed.

All PCR tests were carried out as described previously or as recommended by the manufacturer, with two exceptions. For the *cps-cpx* test (28), 0.5  $\mu$ M instead of 480  $\mu$ M each primers A, B, C, and D was used (T. Inzana, personal communication). The *omlA* PCR test (34) was performed in a final volume of 50  $\mu$ l containing the appropriate amount of purified template DNA, 5  $\mu$ l of 10 X buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.3], 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), each deoxyribonucleotide triphosphate at a concentration of 100  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M each primers LPF and omlAr (34) for the direct PCRs and 0.25  $\mu$ M each for the after-culture PCRs, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase. Each sample was subjected to 40 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s for the direct PCRs and annealing at 64°C for the after-culture PCRs, and extension at 72°C for 90 s). The first cycle was preceded by an initial denaturation step at 94°C for 5 min, and the last cycle was followed by a final extension step at 72°C for 10 min. Primers for all tests were purchased from Invitrogen (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada);

deoxyribonucleotide triphosphates, MgCl<sub>2</sub>, and *Taq* DNA polymerase were purchased from Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.). Amplifications were performed either in a DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer Applied Biosystem, Foster City, Calif.) or in T Gradient 96 thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany). Each test was performed in only one thermal cycler. For each test, the amplified products were separated by electrophoresis in agarose gels (1.2 to 2%, depending of the expected PCR product for each test; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in 1X TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer and were visualized by UV transillumination following ethidium bromide staining. A 100-bp DNA ladder (Invitrogen) was used as a molecular size standard in each gel.

**IMS isolation.** IMS isolation was performed with 1 ml of original tonsil filtrate as described previously (13) by using immunomagnetic beads coated with rabbit anti-*A. pleuropneumoniae* serotype 1 immunoglobulin G for artificially infected tonsils and tonsils originating from experimentally infected animals. For field samples, beads were coated with rabbit anti-serotype 5 or 7 immunoglobulin G, depending on the targeted serotype. Colonies suspected of being *A. pleuropneumoniae* were tested for NAD dependence and the CAMP reaction. NAD-dependent and CAMP reaction-positive colonies were confirmed as being serotype 1, 5, or 7 by dot ELISA with serotype-specific monoclonal antibodies (25–27). Positive strains were confirmed to be *A. pleuropneumoniae* by the *omlA* PCR (34) and were serotyped by conventional techniques (30).

**Experimental infection and sample storage conditions study.** Four 6-week-old piglets from a herd with minimal disease that was free of infection with *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 to 12 were intranasally infected with 4 ml of a suspension of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain Shope 4074 of  $2 \times 10^5$  CFU/ml. The animals were humanely killed 7 weeks after infection and in the presence of seroconversion. The tonsils were collected and immediately fractionated into 0.5-g pieces that were stored at room temperature, 4°C, or –20°C for different periods of time (see Results). Some pieces were also frozen and thawed once before being analyzed. Detection of *A. pleuropneumoniae* was carried out by both direct PCR and

after-culture PCR by using only the commercial PCR test (Adiavet App).

### **Validation of *omlA* (34) and Adiavet App PCR tests with field samples.**

**(i) Animals.** A total of 198 pigs (ages, 6 months) were used and divided into five groups (groups 1 to 5). Animals in groups 1 ( $n = 54$ ) and 2 ( $n = 30$ ) were obtained from a herd with minimal disease that was considered free of infection with *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 to 12 on the basis of regular serological monitoring by LC-LPS-ELISA (14). About 24 h before being sent to the slaughterhouse, a blood sample and a tonsil biopsy specimen (2) were taken from each well-identified animal. Early in the morning of the following day, the animals were slaughtered at a commercial slaughterhouse before the slaughtering of any other animal (group 1) or after the slaughtering of more than 500 animals from several origins (group 2) to increase the possibility that the water in the bath used to remove the pigs' hair had been exposed to pigs carrying *A. pleuropneumoniae*. Whole tonsils were recovered from the carcasses before they were placed in the chilling room and individually identified. The animals in groups 3, 4, and 5 were from farrow-to-finish herds infected or suspected of being infected with one or more serotypes of *A. pleuropneumoniae*. The pigs in group 3 ( $n = 36$ ) were from a herd previously identified by pathological and bacteriological examinations to be infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 5b and suffering from a sudden recrudescence of the disease, with several growers presenting clinical signs and/or pathological lesions at the time of sampling. Group 4 was composed of 39 pigs originating from a herd with no clinical signs of pleuropneumonia but in which the disease had been active in the finishing pigs about 6 months before sampling. *A. pleuropneumoniae* serotype 5b had already been isolated from the lungs of diseased animals, and previous serological examinations (LC-LPS-ELISA) had demonstrated that the herd was positive for serotype 5. The animals in group 5 ( $n = 39$ ) originated from a herd serologically suspected of being infected with *A. pleuropneumoniae* serotypes 5 and 7 on the basis of serological examinations but with no clinical signs. Identification of animals in groups 3, 4, and 5 was done; and blood samples, tonsil biopsy specimens, and whole tonsils were obtained as described above for group 1. For all groups, blood samples were used for

serology (LC-LPS-ELISA), and tonsil biopsy specimens and whole tonsils were conserved frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until they were analyzed.

**(ii) Processing of tonsillar samples.** Each whole tonsil was seared on the surface with a hot spatula. For the standard isolation procedure, three parallel incisions were swabbed and incubated on selective PPLO agar ON at  $37^{\circ}\text{C}$  (5%  $\text{CO}_2$ ), as described previously (36). A piece of tonsil weighing 0.5 g was also taken from an open cut and reduced to small pieces with a scalpel, added to 5 ml of phosphate-buffered saline–0.1% bovine serum albumin, and processed (for IMS isolation, direct PCR, and after-culture PCR) as described above for artificially infected tonsils. All biopsy specimens used weighed between 0.1 and 0.2 g. Due to their small size, the tonsil biopsy specimens were not seared, and neither the standard isolation technique nor IMS isolation was performed with these samples. For after-culture PCR, a selective PPLO agar was inoculated by touching the PPLO agar surface with the biopsy specimen and then streaking the inoculum with a loop. The organisms were allowed to grow on the agar ON at  $37^{\circ}\text{C}$  (5%  $\text{CO}_2$ ), and the ON growth was harvested and treated as described above for artificially infected tonsils. After inoculation of the PPLO agar, the biopsy specimens were reduced to small pieces with a scalpel, added to 2 ml of phosphate-buffered saline–0.1% bovine serum albumin, and processed as described above for artificially infected tonsils.

**Statistics.** Because a “gold standard” for the detection of *A. pleuropneumoniae* has not yet been defined, the sensitivity and specificity of each test in the field validation were calculated by using the results of isolation (either the standard or the IMS isolation technique) and both the *omlA* (34) and the Adiavet App PCR tests (performed either directly or after a culture step for each PCR test used) as independent benchmarks. A cumulative study combining all positive results was also done (9). The agreement between tests was evaluated by calculating Cohen’s kappa coefficient ( $\kappa$ ). A value of 1 indicates perfect agreement, while a value of 0 indicates that agreement is no better than chance. In general,  $\kappa$  values between 0.3 and 0.5 are considered to represent moderate agreement. The chi-square test was used to demonstrate differences in the results between tonsil biopsy specimens and whole

tonsils. The agreement between individual serologically positive status and demonstration of *A. pleuropneumoniae* in tonsillar samples was evaluated by use of  $\kappa$ .

## RESULTS

**Preliminary test comparison.** The *omlA* test (34), the *omlA* multiplex test (18), and the *apxIVA* test (35) were strictly specific for *A. pleuropneumoniae*. By contrast, and confirming the findings presented in previous reports, the test by Sirois et al. (37) and the *dsbE*-like test (8) also showed positive signals with *A. lignieresii*. Furthermore, the *cps-cpx* test (28) and the commercial PCR test (Adiavet App) also showed clear positive signals with this bacterial species (Fig. 1A and B). In our hands, two "*A. porcitonisillarum*" strains (15) gave a positive signal when they were tested by the *dsbE*-like test (Fig. 1A). The *aroA* test reacted with *A. equuli*, as described previously (21), and also, in our hands, with both reference strain ATCC 15557 (Fig. 1B) and a well-characterized field strain of *A. suis*. The *omlA* (18) and the Adiavet App multiplex PCR tests amplified the expected bands described to correspond to those of the different *A. pleuropneumoniae* serotypes. The latter test, however, presented a band pattern different from the pattern expected for the NAD-independent strains when it was used to test *A. pleuropneumoniae* serotype 14 reference strain 3906. The *cps-cpx* multiplex PCR test did not detect *A. pleuropneumoniae* serotype 4, as reported previously (28); however, it clearly identified the reference strains of serotypes 5a and 5b.

The analytical sensitivities of the tests for the detection of *A. pleuropneumoniae* from experimentally infected tonsils showed that most of them were able to detect the organism after a culture step only if  $\geq 2.2 \times 10^2$  CFU of the organism per g of tonsil was present (Table 1). The exception was the *aroA* test, which could detect the organism only in tonsils infected with a considerably higher concentration of *A. pleuropneumoniae*. By contrast, great variabilities in analytical sensitivities were

observed when detection was performed by direct PCR (Table 1). The *apxIVA* nested PCR test (35) was the most sensitive test, with analytical sensitivities within the same range as those obtained after a culture step. Other tests were less sensitive when they were performed directly; values ranged from  $10^4$  to  $10^7$  CFU/g of tonsil. The *aroA* test was unable to detect *A. pleuropneumoniae* even when the level of infection was more than  $10^9$  CFU/g of tonsil. With the exception of the *apxIVA* nested PCR test (35), the analytical sensitivity of IMS isolation was higher than that of direct PCR (Table 1).

**Effects of tonsil storage conditions.** The tonsils of four experimentally infected animals collected immediately after euthanasia (day 0) were positive by both direct and after-culture PCR (by the Adiavet App PCR test only). The results obtained with specimens tested on subsequent days are summarized in Table 2. In general, tonsil storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  allowed detection of the organism for at least 120 days by both the direct PCR and the after-culture PCR, while in tonsils conserved at  $4^{\circ}\text{C}$ , *A. pleuropneumoniae* could be detected for at least 2 weeks, also by both direct PCR and after-culture PCR. In samples stored at room temperature, the organism was detected by the direct PCR for at least 8 days, while most animals were negative by the after-culture PCR after 2 days of storage. All animals were positive by both the direct PCR and the after-culture PCR after a freezing (7 days at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) and thawing cycle.

#### **Field validation.**

**(i) Serological results.** Sera from animals in groups 1 and 2 did not react in the LC-LPS-ELISA with antigens of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 to 12. On the other hand, 34 of the 36 animals in group 3 were positive for *A. pleuropneumoniae* serotype 5, 3 were positive for serotype 12, and 2 were positive for serotype 2. Among the animals in group 2, 16 were seropositive for serotype 5; no reaction was observed with the other serotypes. Among the animals in group 3, 8 were positive by the LC-LPS-ELISA for serotypes 7 and 4 (27, 29), 2 were positive for serotype 12, and 1 was positive for serotype 5.

**(ii) Isolation, *omlA* PCR, and Adiavet App PCR test detection with tonsillar samples.** *A. pleuropneumoniae* could not be detected in any of the animals in groups 1 and 2, and this was regardless of the method used. *A. pleuropneumoniae* could be isolated from the tonsils of animals in groups 3, 4, and 5. All the isolates belonged to serotype 5 (groups 3 and 4) or 7 (group 5), as revealed by dot ELISA and serotyping. The results obtained by the Adiavet App PCR test showed that positive samples from animals in groups 3 and 4 belonged to Adiavet App PCR typing group II (which includes serotype 5 of *A. pleuropneumoniae*). Positive samples from animals in group 5 could be assigned to Adiavet App PCR typing groups III and IV (which include serotype 7). Positive samples from animals in groups 3 and 4 were confirmed as being in fact positive for serotype 5 by using the *cps-cpx* PCR test, which is specific for serotype 5 (28; results not shown).

Table 3 summarizes the results obtained by isolation (by both the standard technique and IMS isolation), as well as by the *omlA* PCR (34) and the Adiavet App PCR test, with whole tonsils and tonsil biopsy specimens from animals in groups 3, 4, and 5. When the groups are considered together, the rates of detection by the two PCR tests were in general significantly higher with whole tonsils than with tonsil biopsy specimens. Nevertheless, the rates of detection by the direct Adiavet App PCR test did not show significant differences with these two types of samples. When the groups are considered individually, a significantly higher rate of detection by PCR with whole tonsils than with tonsil biopsy specimens was observed for group 3. For groups 4 and 5, although the differences were not significant for most tests, a smaller number of animals showed a positive result when PCR was performed with tonsil biopsy specimens.

**(iii) Sensitivities, specificities, and agreements between tests.** Table 4 shows a comparison of the results of the standard isolation technique, IMS isolation, the *omlA* PCR (34), and the Adiavet App PCR test when the whole tonsil was used as a sample. By using the cumulative results (all tests) as the benchmark test, the highest sensitivities were obtained by both the after-culture *omlA* PCR (34) and the after-culture Adiavet App PCR test, followed by the direct Adiavet App PCR test.

Very good agreement ( $\kappa = 0.70$ ) was found between these three tests. IMS isolation and the direct *omlA* PCR (34) showed similar moderate sensitivities, very good agreement between themselves, and good agreement with the three PCR tests mentioned in the previous sentence. The standard isolation technique demonstrated the lowest sensitivities and fair or very low levels of agreement with the other tests. However, its specificities were high (99 and 100%), while the others tests showed lower, although very good, specificities.

Table 5 shows a comparison of the performances of both the *omlA* PCR (34) and the Adiavet App PCR test when tonsil biopsy specimens were used. In general, the sensitivities of these PCR tests were lower than those obtained by PCR with whole tonsils, and the levels of agreement between the tests ranged from moderate to good. Furthermore, the direct *omlA* PCR (34) showed only a fair level of agreement with the other tests. The specificities were also lower. Both the direct and the after-culture Adiavet App PCR tests showed the best sensitivities, followed by the after-culture *omlA* PCR (34).

**(iv) Agreement between serology and direct detection.** When the results for the 114 animals in groups 3, 4, and 5 are considered together, a good agreement ( $\kappa = 0.68$ ) was found between the serological status of an individual determined by the LC-LPS-ELISA (14) and the detection of the organism in the tonsils by any of the direct methods (both the standard technique and IMS isolation as well as both the direct and after-culture *omlA* PCRs (34) and the direct and after-culture Adiavet App PCR tests). A total of 44 animals were positive by both serology and direct detection, while 50 animals were negative by both serology and direct detection. *A. pleuropneumoniae* was not detected by any of the direct methods in six seronegative animals, while the organism was not detected either by isolation or by PCR in 14 seropositive animals. When the results for the groups are considered individually, a similar correlation was noted for groups 3 and 4. For group 5, too few animals were positive to accurately assess a possible correlation. However, a tendency for a similar association was noted for the last group (data not shown).

## DISCUSSION

Numerous PCR tests for the detection of *A. pleuropneumoniae* in carrier pigs have been described (8, 10, 17, 18, 21, 28, 34, 35, 37) and even commercialized (Adiavet App PCR test). In this study, a comparison of the specificities and the analytical sensitivities of eight of these PCR tests was carried out by using the same experimental procedures and samples. Specificity for the species is essential for validation of a positive result. The *apxIVA* PCR test and the two *omlA* PCR tests showed strict specificities for *A. pleuropneumoniae*. Some other tests also gave positive signals with *A. lignieresii* (8, 28, 37) (Adiavet App PCR) and *A. equuli* (21). These unspecific reactions should not necessarily prevent the use of these tests for diagnosis, since it is unlikely that these two bacterial species would be isolated from swine. However, two tests also detected species other than *A. pleuropneumoniae* likely to be present in swine tonsils. The *dsbE*-like test gave a positive signal with "*A. porcitosillarum*" (15), a species that was not yet described at the time that the *dsbE*-like test was originally reported. This unspecific reaction may complicate the interpretation of a positive result obtained by this test. It has been found that the *aroA* test does not detect *A. suis* (21). Nevertheless, in our hands, a positive signal with two *A. suis* strains was obtained by this test, which may significantly complicate the interpretation of a positive result. Furthermore, with experimentally infected tonsils, the *aroA* test showed a very low analytical sensitivity, although a very high sensitivity (12 CFU/PCR assay) had previously been reported for this test when it was performed with pure cultures (21). We hypothesize that the amplification conditions for this test may need to be adapted so that it can be used with DNA samples containing large amounts of foreign DNA and/or potential inhibitors, like those obtained from tonsils. The analytical sensitivities of the other PCR tests were similar, since they showed similar values when amplifications were performed after a culture step. This suggests that the factor limiting the analytical sensitivity for after-culture PCR could be *A. pleuropneumoniae* itself, as it may be overgrown by the

competing flora when it is present in the tonsil at concentrations  $< 10^2$  CFU/g of tonsil.

The results obtained by direct PCR demonstrate that the *apxIVA* nested PCR test (35) is the best option when a culture step is avoided and maximal analytical sensitivity is desired. However, this test may suffer from cross-contamination in a routine diagnostic laboratory, leading to consideration of a number of samples as false positive. In the absence of clinical signs, the tonsils of carrier pigs are not likely to harbor large numbers of the organism. The Adiavet App PCR test and one *omlA* PCR test (34) were thus chosen to be validated, as they offered good detection limits for both the direct and the after-culture PCRs in conjunction with a simplicity of execution. The remaining tests presented lower analytical sensitivities when they were performed directly, and their use for diagnosis would increase the risk of missing positive animals. Nonetheless, even if it is less sensitive, the *cps-cpx* PCR test (26) is the only molecular tool available that could accurately identify a sample positive for *A. pleuropneumoniae* serotype 5. The serotype 5-infected samples in this study were indeed confirmed to be positive for this serotype by this test (results not shown).

Validation of the *omlA* PCR test (34) and the Adiavet App PCR test with whole tonsils and tonsil biopsy specimens from field animals showed that these tests did not react with samples from any of the 54 seronegative animals in group 1, further confirming their species specificities with porcine samples. Cross-contamination between carcasses or via the water bath used to remove the pigs' hair at the slaughterhouse was not observed in this study, as negative results were obtained by PCR and by isolation for animals in group 2. Whole tonsils from the animals in this group had been collected at a commercial slaughterhouse after more than 500 animals of different origins had been slaughtered. Although sampling at the slaughterhouse does not seem to present a major risk of obtaining a false-positive result, a larger number of animals should be tested to confirm this hypothesis.

The results obtained with whole tonsils from animals in groups 3, 4, and 5 confirmed the results of previous reports showing that PCR is more sensitive than

standard isolation (8, 34, 35). Furthermore, when PCR was performed from whole tonsils after a culture step (and also when it was performed directly by the Adiavet App PCR test), the number of positive animals was higher than that obtained by IMS isolation. On the other hand and as opposed to what was reported in a previous study (34), IMS isolation presented a higher sensitivity than the direct *omlA* PCR test. It is possible that both techniques have similar sensitivities and that the different results obtained were due to differences in the contaminating flora present in the samples.

The after-culture Adiavet App PCR test has been evaluated in a previous study (8). However, no data concerning its use without culture of the sample have been published. In our hands, this test presented very good specificities and sensitivities with porcine samples when it was performed both directly and after culture. It also provides information regarding the possible serotypes present in tonsils. In fact, this information is important, as differences in virulence among serotypes have been found (20). The subtypes of positive field samples determined by this test correlated with the serotypes of the strains isolated and with the main serotypes identified by serology to be causing the infection. However, for the animals in groups 3 and 5, detection of other serotypes for which a positive result had been obtained by serology was not possible by using the Adiavet App PCR test or bacteriological isolation. It is not clear whether this reflects false-positive serological results, an actual absence of these serotypes in tonsils, or a detection limit problem of isolation and the Adiavet App PCR test. For the latter, if two different serotypes were present in the same tonsil, as might be the case for animals in groups 3 and 5, the risk of missing detection of one of them may exist. With artificially infected tonsils, the Adiavet App PCR test distinguished between groups of serotypes when they were used in combination at equivalent concentrations. By contrast, only the more concentrated serotype was detected when a combination of one serotype at high concentration ( $10^7$  CFU/g of tonsil) and another serotype at a low concentration ( $10^4$  CFU/g of tonsil) were tested (unpublished observations).

In general, fewer positive samples were found when tonsil biopsy specimens were used than when whole tonsils were used. This may be explained by the

smaller amount of tonsil biopsy specimen tissue used in comparison with the amount of whole tonsils used (34). The different methodologies used to culture both types of samples may account for the lower detection level observed for the after-culture PCRs with tonsil biopsy specimens. As the latter were cultivated by touching the agar surface with the biopsy specimen, it is possible that pathogens located deep in the tonsillar crypts were missed in these cultures (7). With whole tonsils from experimentally infected animals, *A. pleuropneumoniae* could be detected by both direct and after-culture Adiavet App PCR tests for at least 120 days when the tonsils had been stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . However, the same temporal study was not done with tonsil biopsy specimens. Although all biopsy specimens were tested within 2 weeks following sampling, there is a possibility for a loss of viability of the *A. pleuropneumoniae* organisms present in tonsil biopsy specimens. Even if the detection of the organism from tonsil biopsy specimens was less sensitive than that from whole tonsils, it is still an interesting type of sample, as it allows detection and follow-up of the progression of the infection in the living animal.

The main advantage of the direct PCR is that it greatly reduces the time required to obtain a result. In addition, non-viable microorganisms that may be present in poorly conserved samples may still be detected. This was confirmed in the present study, as samples stored for several days at room temperature tested positive by the direct method and negative by after-culture PCR. On the other hand, with samples conserved at  $4^{\circ}\text{C}$  for at least 2 weeks, *A. pleuropneumoniae* could be detected by both the direct and the after-culture techniques. Detection of the organism by direct or after-culture PCR from samples that were submitted to one freeze-thaw cycle before being tested did not seem to be affected.

In practice, and even if no published data support this procedure, veterinarians have the tendency to collect samples for isolation or PCR detection of *A. pleuropneumoniae* from seropositive animals. In fact, serology is an indirect method that allows identification of antibodies against *A. pleuropneumoniae* in sera from infected animals, while isolation and PCR allow the direct detection of the organism. However, even if neither isolation nor PCR detection in some

seropositive animals could be achieved, the results obtained in this study suggest a good agreement between the individual positive serological status and the presence of the pathogen in tonsils.

Bacterial detection by PCR has been proposed as a complementary test to confirm positive serological results for the identification of pigs that are *A. pleuropneumoniae* carriers (34). While only more extensive epidemiological studies with larger numbers of herds may confirm the suitability of this strategy, the data presented in this study suggest that the application of PCR-based detection tests would increase the accuracy of detecting infected animals by confirming the results of serological assays, especially in conflicting situations. In addition, these assays may have an important role to play in understanding the biological basis of the persistence of the infection in both immunologically positive and immunologically nonresponsive clinically healthy pigs.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Réal Boutin for identification of herds and sampling of field animals, Diane Côté for outstanding technical assistance, and Guy Beauchamps for the statistical analysis. We also thank Robert Desrosiers for critical review of the manuscript. This work was supported by the Conseil de Recherches en Pêche et en Agroalimentaire du Québec and the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine.

## REFERENCES

1. Angen, O., P. M. Heegaard, D. T. Lavritsen, and V. Sorensen. 2001. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 by immunomagnetic separation. Vet.

Microbiol. **79**:19–29.

2. **Barrère, E., P. Cabanié, Y. Nicolas, and P. Massabie.** 1993. Innocuité d'une technique de biopsie d'amygdale chez le porc, p. 329–334. *In* Proceedings 25èmes Journées de la Recherche Porcine en France. Paris, France.

3. **Blackall, P. J., H. L. Klaasen, H. Van Den Bosch, P. Kuhnert, and J. Frey.** 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* **84**:47–52.

4. **Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495–503.

5. **Bosse, J. T., R. P. Johnson, and S. Rosendal.** 1990. 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.

6. **Chiers, K., E. Donne, I. Van Overbeke, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2002. Evaluation of serology, bacteriological isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental infection. *Vet. Microbiol.* **88**:385–392.

7. **Chiers, K., F. Haesebrouck, I. van Overbeke, G. Charlier, and R. Ducatelle.** 1999. Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Vet. Microbiol.* **68**:301–306.

8. **Chiers, K., I. Van Overbeke, E. Donne, M. Baele, R. Ducatelle, T. De Baere, and F. Haesebrouck.** 2001. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene. *Vet. Microbiol.* **83**:147–159.

9. **De Groot, D., R. Ducatelle, L. J. van Doorn, K. Tilmant, A. Verschuuren, and F. Haesebrouck.** 2000. Detection of “candidatus *Helicobacter suis*” in gastric

samples of pigs by PCR: comparison with other invasive diagnostic techniques. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1131–1135.

10. **de la Puente-Redondo, V. A., N. G. del Blanco, C. B. Gutierrez-Martin, J. N. Mendez, and E. F. Rodriguez Ferri.** 2000. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Res. Microbiol.* **151**:669–681.

11. **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.

12. **Fussing, V., K. Barfod, R. Nielsen, K. Moller, J. P. Nielsen, H. C. Wegener, and M. Bisgaard.** 1998. Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. *Vet. Microbiol.* **62**:145–162.

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

14. **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.

15. **Gottschalk, M., A. Broes, K. R. Mittal, M. Kobisch, P. Kuhnert, A. Lebrun, and J. Frey.** 2003. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Vet. Microbiol.* **92**:87–101.

16. **Gottschalk, M., R. Higgins, and M. Jacques.** 1993. Production of capsular material by *Streptococcus suis* serotype 2 under different growth conditions. *Can. J. Vet. Res.* **57**:49–52.

17. **Gram, T., and P. Ahrens.** 1998. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. *J. Clin. Microbiol.* **36**:443–448.
18. **Gram, T., P. Ahrens, M. Andreasen, and J. P. Nielsen.** 2000. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes—evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet. Microbiol.* **75**:43–57.
19. **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.
20. **Haesebrouck, F., K. Chiers, I. Van Overbeke, and R. Ducatelle.** 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* **58**:239–249.
21. **Hernanz Moral, C., A. Cascon Soriano, M. Sanchez Salazar, J. Yugueros Marcos, S. Suarez Ramos, and G. Naharro Carrasco.** 1999. Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1575–1578.
22. **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.
23. **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.
24. **Kume, K., T. Nakai, and A. Sawata.** 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. *Nippon Juigaku Zasshi* **46**:641–647.
25. **Lacouture, S., K. R. Mittal, M. Jacques, and M. Gottschalk.** 1997. Serotyping

*Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. J. Vet. Diagn. Investig. **9**:337–341.

26. **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.

27. **Lebrun, A., S. Lacouture, D. Cote, K. R. Mittal, and M. Gottschalk.** 1999. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 7 and 4 using monoclonal antibodies: demonstration of common LPS O-chain epitopes with *Actinobacillus lignieresii*. Vet. Microbiol. **65**:271–282.

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

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

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

31. **Moller, K., L. V. Andersen, 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

32. **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. Iowa State University Press, Ames.

33. **Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol. **8**:151–156.

34. Savoye, C., J. L. Jobert, F. Berthelot-Herault, A. M. Keribin, R. Cariolet, H. Morvan, F. Madec, and M. Kobisch. 2000. A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions. *Vet. Microbiol.* **73**:337–347. Schaller, A., S. P.
35. Djordjevic, G. J. Eamens, W. A. Forbes, R. Kuhn, P. Kuhnert, M. Gottschalk, J. Nicolet, and J. Frey. 2001. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet. Microbiol.* **79**:47–62.
36. Sidibe, M., S. Messier, S. Lariviere, 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.
37. Sirois, M., E. G. Lemire, and R. C. Levesque. 1991. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1183–1187.
38. Taylor, D. J. 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p. 343–354. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D’Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, Iowa State University Press, Ames.

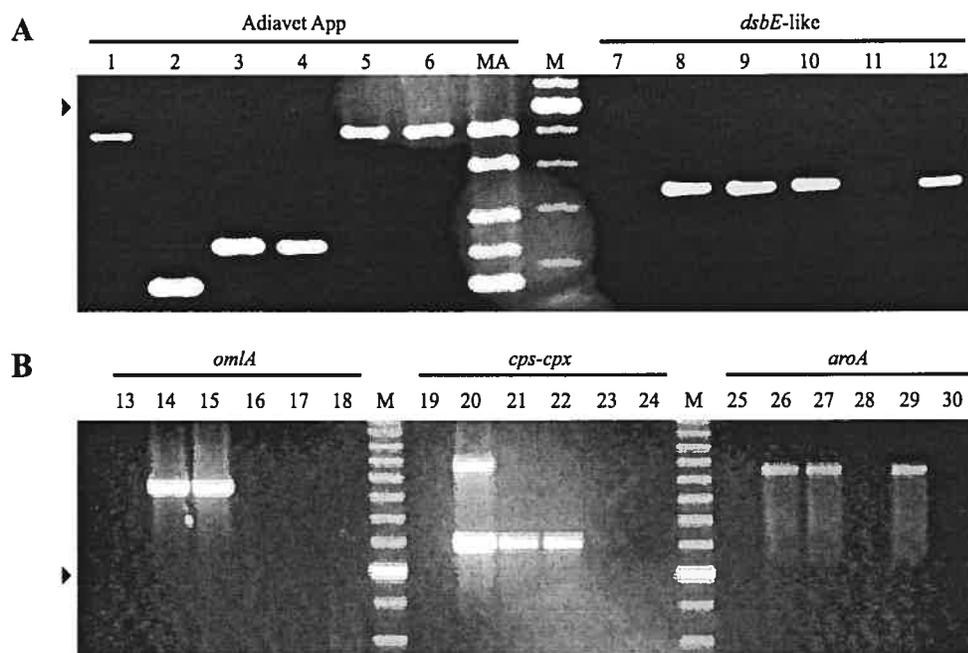


FIG. 1. Examples of electrophoretic profiles, as observed in 2% (A) or 1.4% (B) agarose gels of the Adiavet App, *dsbE*-like (8), *omlA* (34), *cps-cpx* (28), and *aroA* (21) PCR tests. Reactions were carried out with no DNA (lanes 1, 7, 13, 19, and 25) or 1  $\mu$ g of purified genomic DNA from *A. pleuropneumoniae* serotype 5 (lanes 2, 8, 14, 20, and 26), *A. pleuropneumoniae* serotype 7 (lanes 3, 9, 15, 21, and 27), *A. lignieresii* (lanes 4, 10, 16, 22, and 28), *A. suis* ATCC 15557 (lanes 5, 11, 17, 23, and 29), and "*A. porcitisillarum*" (lanes 6, 12, 18, 24, and 30). Lanes M, 100-bp ladder (Invitrogen); arrowheads indicate the position of the 600-bp band of this ladder; lane MA, molecular weight marker provided with the Adiavet App PCR test. Bands of this size marker allow rapid assignment of the amplicons generated to one of the four Adiavet App PCR typing groups. The amplicons observed in lanes 1, 5, and 6 correspond to the internal inhibition control of the Adiavet App PCR test.

TABLE 1. Sensitivities of the different PCR tests and IMS isolation for detection of *A. pleuropneumoniae* from experimentally infected tonsils

PCR test (reference)	Sensitivity (CFU/g of tonsil) <sup>a</sup>	
	Direct PCR <sup>b</sup>	After-culture PCR <sup>c</sup>
<i>apxIVA</i> (35)	3.6 x 10 <sup>2</sup>	2.2 x 10 <sup>2</sup>
Adiavet App <sup>d</sup> (8)	1.7 x 10 <sup>4</sup>	2.2 x 10 <sup>2</sup>
<i>omlA</i> (34)	4 x 10 <sup>4</sup>	2.2 x 10 <sup>2</sup>
<i>dsbE</i> -like (8)	4.8 x 10 <sup>5</sup>	5.2 x 10 <sup>2</sup>
<i>aroA</i> (21)	< 10 <sup>9</sup>	2.2 x 10 <sup>5</sup>
Multiplex <i>omlA</i> (18)	3.4 x 10 <sup>6</sup>	2.2 x 10 <sup>2</sup>
<i>cps-cpx</i> (28)	1.8 x 10 <sup>7</sup>	5.2 x 10 <sup>2</sup>
Sirois et al. (37)	2.1 x 10 <sup>7</sup>	2.2 x 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain Shope 4074 was used to infect the tonsils. The sensitivity of IMS isolation was 4.39 x 10<sup>3</sup> CFU/g of tonsil.

<sup>b</sup> PCR was carried out with DNA obtained without culture of the sample.

<sup>c</sup> PCR was carried out with DNA obtained after culture of the sample.

<sup>d</sup> Commercial PCR test.

TABLE 2. Effects of time and storage conditions on Adiavet App PCR detection of *A. pleuropneumoniae* from whole tonsils of experimentally infected animals

Storage temp (°C)	Method	No. of animals positive after storage for the following times (days) <sup>a</sup> :				
		2	4	8	17	120
RT <sup>b</sup>	Direct PCR <sup>c</sup>	4	4	3 <sup>d</sup>	ND	ND <sup>e</sup>
	After-culture PCR <sup>f</sup>	0	1	0 <sup>d</sup>	ND	ND
4°	Direct PCR	4	4	4	4	ND
	After-culture PCR	4	4	4	4	ND
-20°	Direct PCR	ND	ND	4	4	4
	After-culture PCR	ND	ND	4	4	4

<sup>a</sup> A total of four animals were tested.

<sup>b</sup> RT, room temperature.

<sup>c</sup> PCR was carried out with DNA obtained without culture of the sample.

<sup>d</sup> Only three animals were tested.

<sup>e</sup> ND, not done.

<sup>f</sup> PCR was carried out with DNA obtained after culture of the sample.

TABLE 3. Results of standard isolation, IMS isolation, and PCR detection (*omlA* and Adiavet App PCR tests) of *A. pleuropneumoniae* with whole tonsils or tonsil biopsy specimens from animals originating from infected herds

Group and specimen	No. of animals positive					
	Isolation		PCR			
	Standard	IMS <sup>a</sup>	Direct <sup>b</sup>		After culture <sup>c</sup>	
<i>omlA</i> <sup>d</sup>			Adiavet App	<i>omlA</i>	Adiavet App	
Group 3 (n = 36)						
Whole tonsils	8	23	22 <sup>e</sup>	34	35 <sup>e</sup>	35 <sup>e</sup>
Biopsies	ND <sup>f</sup>	ND	12 <sup>e</sup>	28	15 <sup>e</sup>	22 <sup>e</sup>
Total positive <sup>g</sup>	8	23	25	35	35	35
Group 4 (n = 39)						
Whole tonsils	3	5	8	12	20 <sup>e</sup>	12
Biopsies	ND	ND	3	9	6 <sup>e</sup>	10
Total positive	3	5	8	14	21	14
Group 5 (n = 39)						
Whole tonsils	0	4	0	3	6	7
Biopsies	ND	ND	0	0	2	4
Total positive	0	4	0	3	7	9
All positive groups (n = 114)						
Whole tonsils	11	32	30 <sup>e</sup>	49	61 <sup>e</sup>	54 <sup>e</sup>
Biopsies	ND	ND	15 <sup>e</sup>	37	23 <sup>e</sup>	36 <sup>e</sup>
Total positive	11	32	33	52	63	58

<sup>a</sup> IMS for serotype 5 (groups 3 and 4) or serotype 7 (group 5).

<sup>b</sup> PCR was carried out with DNA obtained without culture of the sample.

<sup>c</sup> PCR was carried out with DNA obtained after culture of the sample.

<sup>d</sup> As described by Savoye et al. (34).

<sup>e</sup> Significant differences in detection between whole tonsils and tonsils biopsy specimens ( $P < 0.05$ ).

<sup>f</sup> ND, not done.

<sup>g</sup> Number of positive animals for each test, regardless of the sample used.

TABLE 4. Sensitivities, specificities, and agreement ( $\kappa$ ) of standard isolation technique, IMS isolation, and PCR tests (*omlA* and Adiavet App PCRs) for detection of *A. pleuropneumoniae* from whole tonsils

Test	Results of comparison with the following benchmark tests																		
	PCR																		
	All tests <sup>a</sup>																		
	Positive samples			Standard			IMS			Direct <sup>b</sup>			After culture <sup>c</sup>						
SE <sup>e</sup> (%)	SP <sup>f</sup> (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$		
Standard isolation	10	17	100	0.15	31	99	0.38	37	100	0.46	22	100	0.25	18	100	0.17	20	100	0.21
IMS isolation	28	49	100	0.46	91	79	0.38	83	91	0.73	61	97	0.61	49	96	0.44	56	97	0.53
<i>omlA</i> PCR, direct	26	46	100	0.42	100	82	0.46	78	94	0.73	61	100	0.64	49	100	0.47	55	100	0.57
Adiavet App PCR, direct	43	75	100	0.73	100	63	0.25	94	77	0.61	100	77	0.64	77	96	0.72	87	97	0.84
<i>omlA</i> PCR, after culture	53	93	100	0.93	100	51	0.17	94	62	0.44	100	63	0.47	96	78	0.72	98	86	0.84
Adiavet App PCR, after culture	47	83	100	0.81	100	58	0.21	94	71	0.53	100	71	0.57	96	89	0.84	87	98	0.84

<sup>a</sup> A sample was considered positive if *A. pleuropneumoniae* was detected by at least one assay, a sample was considered negative if *A. pleuropneumoniae* was not detected by any of the assays.

<sup>b</sup> PCR was carried out with DNA obtained without culture of the sample.

<sup>c</sup> PCR was carried out with DNA obtained after culture of the sample.

<sup>d</sup> As described by Savoye et al. (34).

<sup>e</sup> SE, sensitivity. The sensitivity of a test was defined as the number of samples positive by the test that were also positive by the benchmark test divided by the total number of samples positive by the benchmark test.

<sup>f</sup> SP, specificity. The specificity of a test was defined as the number of samples negative by the test that were also negative by the benchmark test divided by the total number of samples negative by the benchmark test.

TABLE 5. Sensitivities, specificities, and agreement ( $\kappa$ ) of standard isolation technique, IMS isolation, and PCR tests (*omlA* and Adiavet App PCRs) for detection of *A. pleuropneumoniae* from tonsil biopsy specimens<sup>a</sup>

Results of comparison with the following benchmark tests:

Test	Positive samples	PCR											
		All tests				Direct <sup>b</sup>				After culture <sup>c</sup>			
		omlA <sup>d</sup>		Adiavet App		omlA <sup>d</sup>		Adiavet App		omlA <sup>d</sup>		Adiavet App	
SE (%)	SP (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$	SE (%)	SP (%)	$\kappa$		
<i>omlA</i> PCR, direct	13	31	100	0.34	37	97	0.41	43	93	0.41	29	93	0.26
Adiavet App PCR, direct	32	75	100	0.78	87	77	0.41	77	78	0.44	74	87	0.61
<i>omlA</i> PCR, after culture	20	47	100	0.49	60	87	0.41	46	93	0.44	58	99	0.64
Adiavet App PCR, after culture	31	73	100	0.76	67	74	0.26	72	88	0.61	95	83	0.64

<sup>a</sup> See footnotes a, c, and f of Table 4 for definitions of all tests, SE, and SP, respectively.

<sup>b</sup> PCR was carried out with DNA obtained without culture of the sample.

<sup>c</sup> PCR was carried out with DNA obtained after culture of the sample.

<sup>d</sup> As described by Savoye et al. (34).

## **IV DISCUSSION**

Les animaux infectés de façon sous-clinique par *A. pleuropneumoniae* (animaux dits porteurs) jouent un rôle majeur dans la dissémination de l'infection par *A. pleuropneumoniae* (124). La détection de ces animaux est d'une importance capitale pour contrôler la maladie. La sérologie constitue la méthode utilisée de routine (20, 37, 52, 77). Toutefois, elle ne permet pas la détection des sujets récemment infectés qui n'ont pas encore développé d'anticorps, des animaux infectés depuis un certain temps chez qui les anticorps ont disparu et, finalement, des animaux infectés qui ne produisent jamais d'anticorps détectables (24, 119, 164). De plus, elle donne parfois lieu à des résultats positifs difficilement interprétables en absence de signes cliniques ou de lésions pathologiques.

Dans ces cas, la recherche de la bactérie par des méthodes directes peut être utile pour confirmer ou exclure la présence d'infection. Cependant, l'isolement bactérien standard possède une sensibilité limitée (83, 164) et l'isolement par immunocapture magnétique (2, 47) est une technique laborieuse et coûteuse. Dès lors, la PCR peut constituer une alternative intéressante.

Plus d'une dizaine d'épreuves PCR permettant la détection d'*A. pleuropneumoniae* ont été décrites. Parmi elles on peut citer :

- L'épreuve *dsbE*-like, qui cible un gène codant pour une protéine impliquée dans l'échange de ponts disulfure (27);
- L'épreuve *aroA* qui cible le gène codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse des acides aminés aromatiques (67);
- L'épreuve *cps-cpx* qui est spécifique des gènes impliqués dans la synthèse et l'exportation de polysaccharides capsulaires (107);
- L'épreuve *omlA* qui cible les gènes codant pour une lipoprotéine de la membrane externe (160);
- L'épreuve *apxIVA* spécifique pour la toxine ApxIV (161);
- Une épreuve *omlA* multiplex (59);

- Une épreuve ciblant une séquence génomique dont la fonction demeure inconnue (165);
- Une épreuve PCR commerciale (Adiavet App ®), disponible sur le marché depuis les dernières années.

Le choix d'une technique PCR destinée à être utilisée en laboratoire de diagnostic doit se faire en fonction de différents paramètres. Ainsi, il est important de connaître la sensibilité, analytique et diagnostique, et la spécificité de la technique (35, 48). Lorsque plusieurs techniques sont disponibles, il faut évaluer leur sensibilité et leur spécificité dans des conditions similaires et contrôlées. Il est nécessaire également de les évaluer en utilisant des échantillons du terrain. Les informations disponibles sur les différentes épreuves PCR pour *A. pleuropneumoniae* ne permettent pas de les comparer adéquatement. En effet, les procédures expérimentales et les échantillons utilisés ont été très variables d'une technique à l'autre. De plus, la plupart des techniques ont utilisé des animaux infectés expérimentalement et n'ont jamais été validées sur le terrain. Une étude a bien comparé certaines de ces épreuves PCR mais l'information générée est partielle et insuffisante pour réaliser un choix judicieux (27).

Dans la première partie de notre étude, nous avons étudié et comparé les 8 épreuves PCR mentionnées plus haut eu égard à leur spécificité et à leur sensibilité en utilisant les mêmes procédures expérimentales et le même type d'échantillon. Une collection de souches d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 à 15 et d'espèces bactériennes proches ou habituellement présentes dans les amygdales de porcs, telles que *A. suis*, *A. porcinus*, *A. lignieresii*, *A. equuli*, *H. parasuis*, *S. suis* et '*A. porcitonillarum*' a été utilisée pour évaluer la spécificité pour l'espèce. Nos résultats ont montré que les épreuves *apxIVA* et les deux épreuves *omlA* sont strictement spécifiques pour *A. pleuropneumoniae*, confirmant ainsi des rapports précédents (59, 160, 161). Par contre, les épreuves *dsbE-like*, *cps-cpx* et celle décrite par Sirois *et al.* ont aussi donné un signal positif pour *A. lignieresii* alors que l'épreuve *aroA* a donné un signal positif avec *A. equuli*. Les résultats faussement positifs pour les épreuves *dsbE-like* et celle décrite par Sirois *et al.* avec *A. lignieresii*, de même que la réaction

de l'épreuve *aroA* avec *A. equuli* avaient déjà été rapportés (27, 165). Par contre, rien n'avait été publié concernant la réaction de l'épreuve *cps-cpx* avec *A. lignieresii*. Ces réactions non-spécifiques avec *A. lignieresii* et *A. equuli* ne devraient pas, nécessairement, empêcher l'utilisation des épreuves PCR concernées, puisque ces espèces sont exceptionnelles chez le porc.

L'épreuve *dsbE*-like a aussi donné un résultat positif pour '*A. porcitosillarum*'. Il s'agit d'une probable nouvelle espèce bactérienne qui n'avait pas été décrite au moment où l'épreuve *dsbE*-like a été rapportée. '*A. porcitosillarum*' présente des similitudes antigéniques avec *A. pleuropneumoniae*, spécialement au niveau de la capsule polysaccharidique. Ses caractéristiques biochimiques sont aussi très similaires. Cependant, l'analyse moléculaire a montré qu'elle ne possède pas les gènes codant pour la toxine ApxIV, et que son ARN 16S est différent de celui d'*A. pleuropneumoniae* (54). La détection d'*A. porcitosillarum*' par l'épreuve *dsbE*-like hypothèque l'intérêt de cette épreuve en raison de la présence possible de cette bactérie dans les amygdales de porc (54).

L'épreuve *aroA* avait été décrite comme ne détectant pas *A. suis* (67). Cependant, nous avons personnellement obtenu un signal positif pour la souche de référence et une souche de champ bien caractérisée d'*A. suis*. Ce fait pourrait aussi compliquer l'interprétation d'un résultat positif obtenu avec cette épreuve, car *A. suis* est fréquemment isolée à partir de porcs malades ou d'animaux ne présentant pas de signes cliniques (175).

Par la suite, nous avons utilisé des échantillons d'amygdales provenant d'un troupeau réputé exempt des sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* afin de déterminer la sensibilité analytique des épreuves dans des conditions contrôlées. Un broyat préparé avec 0.5 g d'amygdales a été infecté expérimentalement avec 5 ml d'une série de dilutions ( $10^9$  à  $10^1$  UFC/ ml) d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1, 5 et 7, utilisés séparément ou en combinaison de deux sérotypes. D'abord, nous avons évalué différentes méthodes d'extraction d'ADN, soit une simple lyse bactérienne par incubation à 95°C pendant 5 minutes suivie de centrifugation (un extrait brut), une extraction avec Instagene Matrix (Biorad, Hercules, CA) et une purification

complète de l'ADN, par deux méthodes différentes (17, 147). Les résultats obtenus (tableau III, Annexe) ont montré que, pour la PCR directe (c'est-à-dire sans une étape préalable de culture de l'échantillon) et pour certaines épreuves, une sensibilité 1000 fois plus élevée peut être obtenue si de l'ADN purifié est utilisé au lieu d'un extrait brut. Cette différence dans la sensibilité diminue à 10 fois en faveur de l'ADN purifié par rapport à l'extrait avec Instangene Matrix. À l'inverse, avec la PCR après culture (c'est-à-dire après une étape de culture de l'échantillon) des différences par rapport à la sensibilité n'ont pas été constatées, quelle qu'ait été la méthode d'extraction de l'ADN. Cependant, en utilisant des extraits bruts ou l'extrait Instangene Matrix, des résultats variables et quelquefois contradictoires ont été obtenus (résultats non présentés). Ainsi, des extraits bruts ayant montré un signal positif pour *A. pleuropneumoniae* s'avéraient négatifs lors d'une répétition. De plus, un certain nombre d'extraits bruts ou d'extraits "Instangene Matrix" obtenus à partir d'une infection expérimentale du broyat d'amygdale avec une concentration donnée d'*A. pleuropneumoniae* s'avéraient négatifs, tandis que ceux obtenus à partir d'une concentration moins élevée de la bactérie s'avéraient positifs. Ces situations n'ont pas été observées lorsque de l'ADN purifié a été utilisé. Les étapes de purification de l'ADN permettent d'augmenter sa concentration et de réduire celle d'autres substances présentes dans l'échantillon (158). Il est possible qu'en purifiant l'ADN une réduction dans la charge des inhibiteurs potentiellement présents dans nos échantillons d'amygdales ait été obtenue, et que cette réduction soit à l'origine des résultats plus performants notés avec l'ADN purifié. Même si la purification de l'ADN est plus laborieuse que l'obtention d'un extrait, l'effet positif sur la reproductibilité des résultats compense de loin l'augmentation des temps de manipulation.

Une fois établi que la purification complète de l'ADN permet d'obtenir des résultats consistants et reproductibles, nous avons évalué la sensibilité analytique des différentes épreuves PCR en utilisant de l'ADN purifié à partir d'amygdales infectées expérimentalement. Lorsque les réactions d'amplification ont été effectuées après une étape de culture de l'échantillon d'amygdale, le niveau de sensibilité des épreuves PCR autres que l'épreuve *aroA* s'est révélé très satisfaisant et similaire

( $\sim 10^2$  UFC/ g d'amygdale). Ceci suggère que le facteur limitant la sensibilité de la PCR après culture pourrait être la concentration d'*A. pleuropneumoniae*. On peut penser que la bactérie pourrait être incapable de croître si sa concentration dans l'amygdale est égale ou inférieure à  $10^2$  UFC/ g d'amygdale et qu'elle doit faire face à la compétition de la flore normale de l'amygdale.

Par contre, une grande variabilité (résultats variant entre  $10^2$  et  $10^9$  UFC/ g amygdale) a été notée parmi les épreuves PCR lorsqu'elles ont été utilisées sans une étape de culture de l'échantillon. En particulier, la sensibilité de l'épreuve *aroA* s'est avérée très faible alors qu'une sensibilité élevée (12 UFC/réaction PCR) avait été rapportée en utilisant des cultures pures d'*A. pleuropneumoniae* lors de la description originale de la technique (67). Il est possible que les paramètres d'amplification de cette épreuve doivent être adaptés à des échantillons d'amygdales, lesquels possèdent une charge élevée d'ADN d'espèces bactériennes autres qu'*A. pleuropneumoniae*, et/ou, aussi, des inhibiteurs potentiels de la réaction d'amplification. D'autres épreuves, telles que celle décrite par Sirois *et al.*, *cps-cpx*, *omlA* multiplex et *dsbE*-like ont démontré une faible sensibilité ( entre  $\sim 10^5$  et  $\sim 10^7$  UFC/ g amygdale respectivement), comparativement à celle obtenue par les épreuves *omlA* et Adiavet App ® ( $\sim 10^4$  UFC/ g amygdale). Quant à la PCR nichée *apxIVA*, elle a démontré la sensibilité la plus élevée pour la PCR directe ( $\sim 10^2$  UFC/ g amygdale). Avec cette épreuve, nous avons toutefois constaté, à l'occasion, des résultats faussement positifs par contamination croisée et ce, même si une attention spéciale était portée lors des manipulations (résultats non présentés). La contamination croisée est un risque inhérent à la PCR nichée qui rend problématique son utilisation en routine (177).

Les épreuves Adiavet App ® et *omlA* ont été donc choisies pour être validées sur le terrain, car elles offrent un niveau de détection acceptable pour la PCR directe, tout en étant faciles à exécuter dans un laboratoire standard. Par ailleurs, les autres épreuves PCR nous sont apparues trop peu sensibles pour être utilisées en PCR chez des animaux infectés de façon sous-clinique chez qui la concentration d'*A. pleuropneumoniae* dans les amygdales est faible. Il est à remarquer, cependant, que

parmi ces épreuves moins sensibles, on retrouve la seule épreuve capable de différencier le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* (107).

Dans la deuxième étape de l'étude, nous avons évalué l'effet des conditions de conservation des échantillons d'amygdale sur la détectabilité d'*A. pleuropneumoniae*. Cette évaluation est importante, d'un point de vue du diagnostic en général, mais aussi pour la troisième étape de cette étude puisque l'étape de validation sur le terrain impliquait l'analyse d'un grand nombre d'échantillons qu'il est impossible d'examiner extemporanément et tous en même temps. Il était donc essentiel de s'assurer que l'on pouvait conserver les échantillons sans risques d'affecter la détection d'*A. pleuropneumoniae*.

Pour cette évaluation, 4 porcelets de 6 semaines d'âge, issus de l'élevage réputé exempt d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 à 12 ont été infectés par voie intranasale avec une faible dose d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (4 ml d'une suspension  $2 \times 10^5$  UFC/ml). Les animaux ont été euthanasiés 7 semaines après l'infection après s'être assuré qu'ils avaient bien séroconverti et que les signes cliniques avaient disparu. Les amygdales ont été récoltées, fractionnées en échantillons de 0,5 g et conservées à la température de la pièce, à 4°C et à -20°C. Des échantillons ont également été congelés pendant 7 jours et décongelés (1 fois) avant d'être analysés. L'évaluation s'est faite en utilisant l'épreuve PCR Adiavet App ®. Les échantillons conservés jusqu'à 17 jours à 4°C ont présenté un résultat positif par PCR directe, de même que par PCR après culture. Les échantillons conservés jusqu'à 120 jours à -20°C ont également donné un résultat positif par PCR directe et après culture. Par conséquent, on peut recommander la congélation de l'échantillon s'il ne peut être examiné dans les deux semaines suivant son prélèvement.

Un des avantages de la PCR directe par rapport à la PCR indirecte est de réduire grandement le temps requis pour l'obtention d'un résultat. De plus, on peut espérer qu'elle permet de détecter la présence d'*A. pleuropneumoniae* dans des échantillons dont la conservation aurait été négligée et à partir desquels il serait impossible de le cultiver. Ceci a effectivement été confirmé dans cette étude avec des

échantillons d'amygdales conservés plusieurs jours à température de la pièce qui ont présenté un résultat positif par PCR directe et négatif par PCR après culture.

Les vétérinaires ou praticiens désireux de faire parvenir leurs échantillons au laboratoire par courrier craignent la décongélation pendant le transport de spécimens congelés (observations non-publiées). En pratique, il arrive que des échantillons qui ont été congelés avant d'être envoyés parviennent décongelés au laboratoire (observations non-publiées). De plus, le laboratoire n'est pas toujours en mesure d'examiner immédiatement les échantillons qu'il reçoit et ceux-ci doivent alors être conservés pendant un certain temps avant d'être examinés. Nos résultats montrent qu'un cycle de congélation et décongélation des échantillons n'a pas d'effet notable sur la détection d'*A. pleuropneumoniae* par PCR directe et après culture. Par conséquent, les risques paraissent limités d'obtenir un résultat faussement négatif dû à la congélation-décongélation de l'échantillon.

La dernière étape de cette étude avait pour but de valider sur le terrain l'utilisation des épreuves PCR *omLA* et Adiavet App<sup>®</sup> pour la détection d'*A. pleuropneumoniae*. Elle comportait trois sous-objectifs soit, a) comparer la détection d'*A. pleuropneumoniae* au moyen de ces 2 épreuves PCR (avec ou sans étape préalable de culture de l'échantillon) avec l'isolement bactérien standard et l'isolement par billes immunomagnétiques ; b) comparer la détection d'*A. pleuropneumoniae* à partir de biopsies d'amygdales avec celle effectuée à partir d'amygdales entières collectées à l'abattoir ; et c) établir une corrélation entre le statut sérologique individuel vis-à-vis d'*A. pleuropneumoniae* des animaux testés et la détection de la bactérie dans leurs amygdales par des techniques directes.

Pour cette partie de l'étude, 198 porcs âgés d'environ 6 mois ont été utilisés et répartis dans 5 groupes (groupes 1 à 5). Les animaux des groupes 1 (N=54) et 2 (N=30) provenaient d'un troupeau réputé exempt des sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* sur la base d'un suivi sérologique régulier au moyen de l'épreuve ELISA LC-LPS. À la ferme, un échantillon de sang et une biopsie d'amygdale ont été prélevés de chacun des animaux environ 24 heures avant qu'ils soient abattus. Les amygdales ont été récupérées sur les carcasses, après l'étape d'échaudage. Les

animaux du groupe 1 ont été abattus avant l'abattage d'autres porcs et ceux du groupe 2, après l'abattage de plus de 500 animaux de différentes provenances, possiblement infectés par *A. pleuropneumoniae*. Tous les échantillons ont été identifiés individuellement

Les groupes 3, 4 et 5 étaient originaires des troupeaux infectés par au moins un sérotype d'*A. pleuropneumoniae*. Les porcs du groupe 3 (N=36) étaient originaires d'un troupeau infecté par le sérotype 5b d'*A. pleuropneumoniae*. Au moment du prélèvement, plusieurs animaux présentaient des signes cliniques aigus ou étaient morts avec des lésions de pleuropneumonie porcine. Les animaux du groupe 4 (N=39), étaient originaires d'un troupeau sans signes cliniques, mais où la maladie avait été active 6 mois plus tôt et d'où l'on avait isolé le sérotype 5b d'*A. pleuropneumoniae*. De plus, des résultats sérologiques précédents avaient indiqué la présence du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*. Finalement, les animaux du groupe 5 (N=39) provenaient d'un troupeau sans signe clinique mais suspecté d'être infecté par les sérotypes 5 et 7 d'*A. pleuropneumoniae*, selon des rapports sérologiques précédents. Les prélèvements des animaux des groupes 3, 4 et 5 ont été effectués comme décrit pour les groupes 1 et 2. Pour tous les groupes, les échantillons de sang ont été utilisés pour la sérologie (test ELISA LC-LPS) alors que les biopsies et les amygdales entières ont été conservées congelées à -20°C jusqu'à leur analyse.

L'examen des amygdales entières et des biopsies d'amygdale provenant des 54 animaux originaires du groupe 1 au moyen des épreuves PCR Adiavet App<sup>®</sup> et *omlA* (160) n'a produit aucun résultat positif. La sérologie (ELISA-LC-LPS) a aussi présenté des résultats négatifs pour les sérotypes 1 à 12 et la bactérie n'a pas été démontrée ni par isolement standard ni par isolement par billes immunomagnétiques. Ceci confirme la spécificité des épreuves PCR Adiavet App<sup>®</sup> et *omlA* pour *A. pleuropneumoniae* à partir d'échantillons de champ d'origine porcine.

Les animaux du groupe 2 ont permis d'évaluer si le prélèvement d'amygdales à l'abattoir présente des risques de contamination croisée entre les carcasses. Tous les animaux du groupe 2 se sont avérés négatifs pour *A. pleuropneumoniae*, que ce soit par PCR directe ou après culture, par isolement standard ou par isolement à l'aide de

billes immunomagnétiques. Ceci semble indiquer que les risques de contamination croisée à l'abattoir seraient faibles. En effet, les amygdales des animaux du groupe 2 avaient été récoltées après l'abattage de plus de 500 autres animaux. Le statut de ces animaux envers *A. pleuropneumoniae* (infecté ou libre d'infection) n'a pas été déterminé. Cependant, dû à leur origine diverse, il est probable que certains de ces animaux aient été infectés par *A. pleuropneumoniae*. Toutefois, seule l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux et la certitude de la présence parmi eux d'individus infectés pouvant servir de témoins permettrait d'assurer que l'échantillonnage à l'abattoir ne présente pas des risques majeurs d'obtenir des résultats faussement positifs. Le groupe 3 (N=36) a présenté une haute proportion (94%) d'animaux positifs pour *A. pleuropneumoniae* sérotype 5 par sérologie. De plus, 3 des 36 animaux possédaient aussi des anticorps contre le sérotype 12 d'*A. pleuropneumoniae*. Lors de la détection directe de la bactérie à partir d'amygdales entières, notre étude confirme des résultats déjà rapportés dans la littérature (27, 160, 161) quant à une supériorité de la PCR par rapport à l'isolement bactérien standard. De plus, lorsque effectuées après une étape de culture, les épreuves PCR *omlA* et Adiavet App ® se sont avérées plus sensibles que l'isolement par billes immunomagnétiques. Cependant, l'isolement par billes immunomagnétiques a détecté plus d'animaux porteurs que la PCR *omlA* directe. La PCR Adiavet App ® directe et après culture a détecté un nombre d'animaux porteurs similaire (94 et 97 % respectivement), tandis que la PCR *omlA* s'est avérée plus performante lorsque effectuée après une étape de culture (61% directe contre 97% après culture) (Figure 5).

L'épreuve commerciale Adiavet App ® est une épreuve multiplex générant des amplicons de différente taille selon les sérotypes. L'importance de la discrimination des sérotypes impliqués dans l'infection sera abordée plus loin dans cette discussion. L'amplicon généré avec l'épreuve Adiavet App ® à partir des animaux testés positifs correspondait à celui du groupe de typage PCR incluant le sérotype 5. Une confirmation de la présence d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 a été obtenue en utilisant l'épreuve PCR *cps-cpx*, qui est spécifique pour ce sérotype (Figure 5). Cependant, cette confirmation a été obtenue seulement pour les

échantillons qui ont été soumis à une étape de culture. L'examen des échantillons par PCR directe avec l'épreuve *cps-cpx* s'est révélée négative (résultats non-présentés), possiblement dû à la faible sensibilité de cette technique lorsque effectuée sans une étape de culture.

Le groupe 4 (N=39) a présenté un pourcentage inférieur d'animaux séropositifs (41%) envers le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*. Aucun autre sérotype n'a été détecté par sérologie. La détection directe à partir d'amygdales entières a présenté, en proportion, des résultats similaires à ceux obtenus pour le groupe 3, les 2 épreuves PCR exécutées après une étape de culture étant les techniques les plus performantes, suivies par la PCR Adiavet App ® directe, la PCR *omlA* directe, l'isolement immunomagnétique et, finalement, l'isolement standard (Figure 6). Comme pour le groupe 3, l'amplicon généré avec l'épreuve PCR Adiavet App ® à partir des animaux positifs correspondait à celui du groupe de typage PCR incluant le sérotype 5. Comme pour le groupe 3, ceci a été confirmé, sur les échantillons ayant été soumis à une étape de culture, en utilisant l'épreuve PCR *cps-cpx*, qui est spécifique pour ce sérotype (Figure 6).

Le groupe 5, composé de 39 animaux, comprenait des animaux positifs par sérologie pour les sérotypes 7, 12 et 5 d'*A. pleuropneumoniae* (8, 2, et 1 animal, respectivement). L'isolement standard et la PCR *omlA* directe n'ont pas réussi à identifier d'animaux porteurs. Comme avec les autres 2 groupes positifs, les 2 épreuves PCR effectuées après une étape de culture ont détecté le nombre le plus élevé d'animaux porteurs, suivies cette fois par l'isolement immunomagnétique et la PCR Adiavet App ® (Figure 7). Pour ce groupe, l'amplicon généré avec l'épreuve PCR Adiavet App ® à partir des animaux positifs correspondait à celui du groupe de typage PCR incluant le sérotype 7. Les tentatives d'isolement d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5, 7 et 12 par la méthode immunomagnétique n'ont abouti que pour le sérotype 7 et pas pour les sérotypes 5 et 12 (résultats non-présentés). Certaines questions concernant l'échec dans ces essais sont discutées plus loin.

La validation des épreuves de diagnostic inclut l'évaluation de la sensibilité diagnostique (35). Or, il n'existe malheureusement pas encore de méthode étalon

pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* (27). Dès lors, dans cette étude, la sensibilité diagnostique, de même que la spécificité des 2 épreuves PCR et des 2 méthodes d'isolement ont été calculées en utilisant les résultats individuels de chacune des épreuves comme repères indépendants. Une étude cumulative, combinant tous les résultats positifs a aussi été menée (29). La corrélation entre les différentes épreuves a été évaluée en calculant le coefficient  $\kappa$ , dont une valeur 1 indique une corrélation parfaite et une valeur 0 indique que la corrélation n'est pas meilleure que le hasard. Une valeur de  $\kappa$  entre 0.3 et 0.5 est considérée représenter, en général, une corrélation modérée. Les résultats de l'analyse statistique sont présentés dans l'article accompagnant ce mémoire.

L'analyse statistique a révélé que, lorsque la PCR a été effectuée à partir d'amygdales entières après une étape de culture (et aussi, pour l'épreuve Adiavet App<sup>®</sup> effectuée de façon directe) elle présente une sensibilité plus élevée que celle obtenue par l'isolement par billes immunomagnétiques. Par contre, l'isolement par billes immunomagnétiques a présenté une sensibilité plus élevée que celle de l'épreuve *omlA* directe. Ce résultat confirme un rapport précédent quant à une meilleure performance de l'isolement par billes immunomagnétiques par rapport à une autre technique PCR fondée sur le gène *omlA* (2). Par contre, il diffère de celui d'une autre étude dans laquelle une sensibilité supérieure de la PCR *omlA* (directe) par rapport à l'isolement immunomagnétique avait été observée en utilisant des biopsies d'amygdales (160). Dans notre étude, l'isolement immunomagnétique a été effectué à partir d'amygdales entières en suivant la procédure originale (47). Par contre, dans l'autre étude, il s'agissait de biopsies d'amygdale dont la surface n'avait pas été stérilisée avant de procéder à l'isolement immunomagnétique (160). La stérilisation de la surface de l'amygdale a pour effet de diminuer la charge totale de micro-organismes contaminants. Dans l'étude précédente (160) l'absence de stérilisation pourrait avoir affecté l'isolement d'*A. pleuropneumoniae*, et avoir conduit à une sous-estimation de la sensibilité de cette technique. Cependant, il est aussi possible que la PCR *omlA* directe et l'isolement immunomagnétique possèdent un seuil de détection similaire et que les différences observées aient été provoquées

par une composition différente de la flore normale présente dans les échantillons utilisés par chacune des études.

Les deux épreuves PCR ont obtenu, en général, une très bonne sensibilité et spécificité. La corrélation mesurée par le coefficient  $\kappa$  a aussi été très bonne parmi les épreuves PCR. Il est toutefois nécessaire de remarquer que l'épreuve *omlA* est spécifique de l'espèce *A. pleuropneumoniae*. Un résultat positif obtenu avec cette épreuve témoigne de la présence d'au moins un des 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Cependant aucune conclusion ne peut être tirée sur le ou les sérotypes présents. Cette information est pourtant d'une importance primordiale, car des différences marquées dans la virulence parmi les sérotypes ont été décrites (63). Si l'épreuve PCR *omlA* est utilisée seule pour le dépistage, il est impossible de savoir si un troupeau s'étant avéré positif est infecté par un sérotype virulent ou non.

À l'inverse, l'épreuve commerciale Adiavet App<sup>®</sup> permet d'obtenir un portrait sur les sérotypes possiblement impliqués. Cette épreuve, utilisée après culture, avait déjà été évaluée par une étude précédente (27). Rien n'a toutefois été publié concernant son utilisation sans une étape de culture. Dans la présente étude, l'épreuve Adiavet App<sup>®</sup> s'est avérée très sensible et spécifique, avec ou sans une étape de culture. De plus, nous avons constaté une excellente corrélation entre le sous-typage obtenu avec l'épreuve Adiavet App<sup>®</sup> et le sérotypage des souches isolées ainsi que les résultats de sérologie. Cependant, dans les groupes 3 et 5, certains sérotypes dont la présence était suggérée par les résultats sérologiques n'ont pas été détectés ni par l'épreuve Adiavet App<sup>®</sup> ni par isolement. Il reste à déterminer si ceci reflète des résultats faussement positifs en sérologie, l'absence réelle de ces sérotypes au niveau des amygdales des animaux examinés ou un problème de sensibilité de l'isolement et de l'épreuve Adiavet App<sup>®</sup>. Avec cette dernière épreuve, en cas de présence de deux sérotypes différents dans la même amygdale, il pourrait avoir un certain risque de ne pas détecter le sérotype présent en concentration moindre. En fait, en infectant expérimentalement des amygdales avec deux sérotypes différents, l'épreuve Adiavet App<sup>®</sup> a pu les identifier seulement s'ils étaient présents à des concentrations semblables. Par contre, lorsqu'un sérotype était

présent à une concentration élevée ( $10^7$  UFC/g d'amygdale), et un deuxième à une concentration plus faible ( $10^4$  UFC/g d'amygdale), seul le plus concentré était détecté (Tableau IV, Annexe).

Les amygdales entières, récupérées à l'abattoir ont été souvent utilisées pour la recherche d'*A. pleuropneumoniae* (25, 27, 47). D'autres études ont rapporté l'utilisation de biopsies d'amygdales prélevées chez les animaux vivants (160). Cependant, l'utilisation de biopsies n'a jamais été validée et comparée à l'échantillon d'amygdale entière. Il a été suggéré que le faible volume de tissu constituant une biopsie pourrait être à l'origine de résultats faussement négatifs (160).

Les figures 5, 6 et 7 présentent les résultats obtenus dans cette étude pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* par PCR à partir de biopsies d'amygdales. La détectabilité d'*A. pleuropneumoniae* à partir de ces 2 échantillons fait l'objet d'une comparaison en utilisant le test  $\chi^2$ . Elle est présentée dans l'article accompagnant ce mémoire. En général, une détectabilité moins élevée a été obtenue à partir de biopsies en comparaison aux amygdales entières. Ceci pourrait être expliqué par la quantité moindre de tissu d'une biopsie par rapport à l'amygdale entière (160) ou par les difficultés inhérentes au prélèvement d'amygdales. Tout au long de la validation, la proportionnalité des dilutions lors de la préparation des homogénats d'amygdales entières et de biopsies a été gardée afin de permettre une comparaison des résultats obtenus avec ces deux échantillons. Ainsi, 0.5 g d'amygdale entière de chaque animal ont été homogénéisés dans 5 ml de PBS, alors que 0.2 g de biopsies l'ont été dans 2 ml PBS. Cependant, un certain nombre de biopsies dont le poids était inférieur à 0.2 g ont été quand-même homogénéisées dans 2 ml de PBS. Par ailleurs, à partir d'une amygdale entière, il est possible de choisir une région à haute densité de cryptes, endroit où le pathogène est logé de préférence, afin de préparer l'homogénat (26). À l'inverse, il est très difficile d'assurer que le tissu prélevé par biopsie sur un animal vivant contiendra des cryptes en nombre élevé. Nos résultats suggèrent que les amygdales entières sont un meilleur choix que les biopsies d'amygdale. Cependant, même si la détection par PCR à partir de biopsies d'amygdale a été moins sensible qu'à partir d'amygdales entières, les biopsies d'amygdale demeurent encore un

échantillon intéressant, car elles permettent la détection et le suivi de l'infection chez l'animal vivant.

Notre évaluation de la détection d'*A. pleuropneumoniae* à partir de biopsies a aussi compris une comparaison des performances de chacune des épreuves PCR exécutées avec et sans une étape de culture à partir de cet échantillon. Les données obtenues ont été analysées statistiquement tel que décrit plus haut et sont présentés dans l'article accompagnant ce mémoire. Lors de l'analyse des amygdales entières, une supériorité dans le niveau de sensibilité avait été notée pour la PCR après culture. Cependant, à partir de biopsies cette supériorité n'a pas été constatée pour l'épreuve PCR Adiavet App<sup>®</sup>. Dans le cas de l'épreuve *omlA* la détection après culture a été plus sensible que la détection directe, mais la différence a été moins grande que celle obtenue avec les amygdales. Une explication possible pour ce niveau de détection moins élevé obtenu pour les biopsies d'amygdale en comparaison à l'amygdale entière pour la PCR après culture pourrait être le fait d'avoir cultivé les échantillons de façon différente. Étant donné que les cultures de biopsies ont été obtenues en touchant la surface de la gélose avec la surface de la biopsie, il est possible que les bactéries logées en profondeur des cryptes amygdaliennes aient échappé à la détection. Tel que décrit plus haut, en utilisant des amygdales entières provenant d'animaux infectés expérimentalement, *A. pleuropneumoniae* a pu être détecté au moins durant 4 mois par PCR directe ou après culture lorsque les amygdales avaient été conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cependant, la même étude temporelle n'a pas été faite avec des biopsies d'amygdale. Bien que toutes les biopsies aient été évaluées dans les deux semaines suivant l'échantillonnage, il est possible qu'*A. pleuropneumoniae* présente dans la biopsie d'amygdale ait perdu sa viabilité.

En vue de mettre en évidence *A. pleuropneumoniae* par isolement ou par PCR, les vétérinaires ont pris l'habitude de soumettre des échantillons prélevés chez des animaux séropositifs (observations non-publiées). Cette pratique n'est toutefois pas supportée par aucune donnée publiée. En fait, la sérologie permet de détecter la présence d'anticorps anti-*A. pleuropneumoniae* dans le sérum des animaux infectés, tandis que l'isolement et la PCR permettent la détection directe de l'organisme. Il a

déjà été proposé que l'isolement d'*A. pleuropneumoniae* à partir de certains animaux séropositifs n'est pas toujours possible (160). Cependant, les résultats de notre étude suggèrent qu'il y a une bonne corrélation entre un statut sérologique individuel positif et la présence d'*A. pleuropneumoniae* dans les amygdales. En effet, une très bonne corrélation (coefficient  $\kappa = 0.65$ ) a été obtenue entre la détection directe de la bactérie et la sérologie. Ainsi, la bactérie a été détectée par au moins une des méthodes directes chez 44 des 114 animaux appartenant aux groupes 3, 4 et 5 qui étaient positifs par sérologie tandis que 50 animaux s'étant avérés négatifs par sérologie ont aussi été négatifs par isolement ou PCR. Seulement un faible nombre d'animaux (20) ont été positifs par sérologie tout en étant négatifs par détection directe ou vice-versa.

La détection d'*A. pleuropneumoniae* par PCR a été proposée comme un outil complémentaire pour confirmer des résultats sérologiques positifs (160). Seules des études épidémiologiques utilisant un plus grand nombre d'animaux pourront confirmer si cette utilisation complémentaire est appropriée; les données présentées dans cette étude suggèrent toutefois que l'utilisation de la PCR comme complément de la sérologie peut soit augmenter les chances de détecter les animaux porteurs, soit diminuer le risque de considérer par erreur comme infecté un troupeau en réalité non-infecté.

De plus, la PCR pourrait être avantageusement utilisée dans les travaux visant à étudier l'épidémiologie et la transmission d'*A. pleuropneumoniae*, de même que la colonisation des amygdales par *A. pleuropneumoniae*. Des techniques de prélèvement moins invasives, telles que des écouvillonnages et des brossages d'amygdales mériteraient aussi d'être évalués pour le diagnostic par PCR.

## **V CONCLUSIONS**

La PCR est un outil très intéressant pour confirmer présence de la bactérie chez un animal suspecté d'être infecté. Elle est aussi utilisable pour confirmer l'absence de la bactérie, dans les limites toutefois imposées par sa sensibilité analytique.

- Lorsque la PCR est utilisée pour confirmer la présence de la bactérie, un résultat positif obtenu avec une épreuve PCR spécifique pour l'espèce mais ne discriminant pas le sérotype doit être interprété avec précaution.
- Pour la plupart des épreuves, la PCR effectuée après une étape de culture est plus sensible que la PCR directe.
- Les épreuves PCR *omlA* et Adiavet App ® telles que nous les avons validées constituent des méthodes complémentaires intéressantes à la sérologie pour la détection d'animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae*. Lors de la validation, l'épreuve *omlA* après culture s'est avérée plus sensible que la PCR Adiavet App ®. L'inverse a été observé lorsque les PCR étaient effectuées sans culture préalable (PCR directe).
- L'utilisation d'amygdales récupérées à l'abattoir permet d'atteindre une meilleure sensibilité qu'avec des biopsies. La biopsie demeure toutefois un échantillon intéressant pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* chez l'animal vivant.
- Lors de prélèvement d'amygdales à l'abattoir, il semble ne pas avoir de risques majeurs d'obtention des résultats faussement positifs par contamination croisée.
- Les amygdales peuvent être conservées réfrigérées si la PCR est effectuée au cours des deux semaines suivant le prélèvement. Elles peuvent être conservées plus longtemps congelées à -20°C.
- La PCR commerciale Adiavet App ® s'est avérée très robuste autant pour la PCR directe que pour la PCR après culture. De plus, elle permet de classer les différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* en 4 groupes.

- La corrélation observée entre un statut sérologique individuel et la présence de la bactérie dans les amygdales suggère d'utiliser les animaux séropositifs en vue de mettre en évidence la bactérie.

## **VI BIBLIOGRAPHIE**

1. **Andresen, L. O., J. Klausen, K. Barfod, et V. Sorensen.** 2002. Detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 12 in pig serum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* **89**:61-7.
2. **Angen, O., P. M. Heegaard, D. T. Lavritsen, et V. Sorensen.** 2001. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 by immunomagnetic separation. *Vet Microbiol* **79**:19-29.
3. **Angen, O., J. Jensen, et D. T. Lavritsen.** 2001. Evaluation of 5' nuclease assay for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol* **39**:260-5.
4. **Archambault, M., S. Rioux, et M. Jacques.** 1999. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiol Lett* **173**:17-25.
5. **Baarsch, M. J., R. W. Scamurra, K. Burger, D. L. Foss, S. K. Maheswaran, et M. P. Murtaugh.** 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **63**:3587-94.
6. **Baarsch, M. J., M. J. Wannemuehler, T. W. Molitor, et M. P. Murtaugh.** 1991. Detection of tumor necrosis factor alpha from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay. *J Immunol Methods* **140**:15-22.
7. **Barrère, E., P. Cabanié, Y. Nicolas, et P. Massabie.** 1993. Innocuité d'une technique de biopsie d'amygdale chez le porc. *In Proceedings 25èmes Journées de la Recherche Porcine en France* p329-34. Paris, France.
8. **Beck, M., J. F. van den Bosch, I. M. Jongenelen, P. L. Loeffen, R. Nielsen, J. Nicolet, et J. Frey.** 1994. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *J Clin Microbiol* **32**:2749-54.
9. **Belanger, M., C. Begin, et M. Jacques.** 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* **63**:656-62.

10. **Belanger, M., D. Dubreuil, J. Harel, C. Girard, et M. Jacques.** 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun* **58**:3523-30.
11. **Belanger, M., D. Dubreuil, et M. Jacques.** 1994. Identification of porcine respiratory tract mucus proteins binding lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ann N Y Acad Sci* **730**:249-51.
12. **Belanger, M., D. Dubreuil, et M. Jacques.** 1994. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **62**:868-73.
13. **Belanger, M., S. Rioux, B. Foiry, et M. Jacques.** 1992. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **76**:119-25.
14. **Belz, G. T., et T. J. Heath.** 1996. Tonsils of the soft palate of young pigs: crypt structure and lymphoepithelium. *Anat. Rec.* **245**:102-113.
15. **Blackall, P. J., H. L. Klaasen, H. Van Den Bosch, P. Kuhnert, et J. Frey.** 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* **84**:47-52.
16. **Blanchard, P. C., M. J. Walker, et I. Gardner.** 1993. Pleuropneumonia in swine associated with urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Vet. Diag. Invest.* **5**:279-282.
17. **Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, et J. van der Noordaa.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28**:495-503.
18. **Bosse, J. T., H. Janson, B. J. Sheehan, A. J. Beddek, A. N. Rycroft, J. Simon Kroll, et P. R. Langford.** 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* **4**:225-35.

19. **Bosse, J. T., R. P. Johnson, et S. Rosendal.** 1990. Capsular polysaccharide antigens for detection of serotype-specific antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* **54**:320-5.
20. **Bosse, J. T., R. P. Johnson, et S. Rosendal.** 1990. 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**:427-31.
21. **Brandreth, S. R., et I. M. Smith.** 1987. Comparative virulence of some English strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 3 in the pig. *Res Vet Sci* **42**:187-93.
22. **Bunka, S., C. Christensen, A. A. Potter, P. J. Willson, et G. F. Gerlach.** 1995. Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* **63**:2797-800.
23. **Chevallier, B., B. Blanchard, A. Keïta, E. Pagot, et P. Pommier.** 2000. Détection d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* par la technique PCR: Evaluation terrain. *Jour Rech Porc* **32**.
24. **Chiers, K., E. Donne, I. Van Overbeke, R. Ducatelle, et F. Haesebrouck.** 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet Microbiol* **85**:343-52.
25. **Chiers, K., E. Donne, I. Van Overbeke, R. Ducatelle, et F. Haesebrouck.** 2002. Evaluation of serology, bacteriological isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental infection. *Vet Microbiol* **88**:385-392.
26. **Chiers, K., F. Haesebrouck, I. van Overbeke, G. Charlier, et R. Ducatelle.** 1999. Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Vet Microbiol* **68**:301-6.

27. **Chiers, K., I. Van Overbeke, E. Donne, M. Baele, R. Ducatelle, T. De Baere, et F. Haesebrouck.** 2001. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene. *Vet Microbiol* **83**:147-59.
28. **Cho, W. S., et C. Chae.** 2001. Expression of the *apxIV* gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Comp Pathol* **125**:34-40.
29. **De Groote, D., R. Ducatelle, L. J. van Doorn, K. Tilmant, A. Verschuuren, et F. Haesebrouck.** 2000. Detection of "*Candidatus Helicobacter suis*" in gastric samples of pigs by PCR: comparison with other invasive diagnostic techniques. *J Clin Microbiol* **38**:1131-5.
30. **de la Puente-Redondo, V. A., N. G. del Blanco, C. B. Gutierrez-Martin, J. N. Mendez, et E. F. Rodriguez Ferri.** 2000. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Res Microbiol* **151**:669-81.
31. **Desrosiers, R., K. R. Mittal, et R. Malo.** 1984. Porcine pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 in Quebec. *Vet Rec* **115**:628-9.
32. **Diarra, M. S., J. A. Dolence, E. K. Dolence, I. Darwish, M. J. Miller, F. Malouin, et M. Jacques.** 1996. Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl Environ Microbiol* **62**:853-9.
33. **Dubreuil, J. D., M. Jacques, K. R. Mittal, et M. Gottschalk.** 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev* **1**:73-93.
34. **Dubreuil, J. D., A. Letellier, E. Stenbaek, et M. Gottschalk.** 1996. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 strains using a monoclonal-based polystyrene agglutination test. *Can J Vet Res* **60**:69-71.

35. **Ekins, R., et P. Edwards.** 1997. On the meaning of sensitivity. *Clin. Chem.* **43**:1824-31.
36. **Fenwick, B., et S. Henry.** 1994. Porcine pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc* **204**:1334-40.
37. **Fenwick, B. W., et B. I. Osburn.** 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect Immun* **54**:575-82.
38. **Fenwick, B. W., B. I. Osburn, et H. J. Olander.** 1986. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res* **47**:1433-41.
39. **Fodor, L., J. Varga, E. Molnar, et I. Hajtos.** 1989. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Vet Microbiol* **20**:173-80.
40. **Frey, J.** 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* **3**:257-61.
41. **Frey, J., M. Beck, U. Stucki, et J. Nicolet.** 1993. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **123**:51-8.
42. **Frey, J., M. Beck, J. F. van den Bosch, R. P. Segers, et J. Nicolet.** 1995. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol Cell Probes* **9**:277-82.
43. **Frey, J., A. Haldimann, J. Nicolet, A. Boffini, et P. Prentki.** 1994. Sequence analysis and transcription of the *apxI* operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **142**:97-102.
44. **Frey, J., H. van den Bosch, R. Segers, et J. Nicolet.** 1992. Identification of a second hemolysin (HlyII) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**:1671-6.

45. **Fuller, T. E., S. Martin, J. F. Teel, G. R. Alaniz, M. J. Kennedy, et D. E. Lowery.** 2000. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb Pathog* **29**:39-51.
46. **Fuller, T. E., R. J. Shea, B. J. Thacker, et M. H. Mulks.** 1999. Identification of in vivo induced genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **27**:311-27.
47. **Gagne, A., S. Lacouture, A. Broes, S. D'Allaire, et M. Gottschalk.** 1998. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. *J Clin Microbiol* **36**:251-4.
48. **Galen, S., et S. R. Gambino.** 1975. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. John Wiley & Sons, New York.
49. **Gerlach, G. F., C. Anderson, S. Klashinsky, A. Rossi-Campos, A. A. Potter, et P. J. Willson.** 1993. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* **61**:565-72.
50. **Gonzalez, G. C., R. H. Yu, P. R. Rosteck, Jr., et A. B. Schryvers.** 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology* **141**:2405-16.
51. **Gottschalk, M.** 1991. Current diagnostic tools for dealing with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Proceedings Western Canadian Association of Swine Practitioners*.
52. **Gottschalk, M., E. Altman, N. Charland, F. De Lasalle, et 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.

53. **Gottschalk, M., E. Altman, S. Lacouture, F. De Lasalle, et 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**:62-5.
54. **Gottschalk, M., A. Broes, K. R. Mittal, M. Kobisch, P. Kuhnert, A. Lebrun, et J. Frey.** 2003. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Vet Microbiol* **92**:87-101.
55. **Gottschalk, M., F. De Lasalle, S. Radacovici, et J. D. Dubreuil.** 1994. Evaluation of long chain lipopolysaccharides (LC-LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet Microbiol* **38**:315-27.
56. **Gottschalk, M., A. Lebrun, S. Lacouture, J. Harel, C. Forget, et K. R. Mittal.** 2000. Atypical *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates that share antigenic determinants with both serotypes 1 and 7. *J Vet Diagn Invest* **12**:444-9.
57. **Graham, J. E., et J. E. Clark-Curtiss.** 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11554-9.
58. **Gram, T., et P. Ahrens.** 1998. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. *J Clin Microbiol* **36**:443-8.
59. **Gram, T., P. Ahrens, M. Andreasen, et J. P. Nielsen.** 2000. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes--evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol* **75**:43-57.
60. **Gram, T., P. Ahrens, et J. P. Nielsen.** 1996. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet Microbiol* **51**:95-104.

61. **Gunnarson, A.** 1979. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus paraahaemoliticus* (*pleuropneumoniae*): extraction of type specific antigens. *Am J Vet Res* **40**:469-472.
62. **Gunnarson, A., E. L. Biberstein, et B. Hurvell.** 1977. Serological studies on porcine strains of *Haemophilus paraahaemoliticus* agglutination reactions. *Am J Vet Res* **38**:1111-1114.
63. **Haesebrouck, F., K. Chiers, I. Van Overbeke, et R. Ducatelle.** 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol* **58**:239-49.
64. **Haga, Y., S. Ogino, S. Ohashi, T. Ajito, K. Hashimoto, et T. Sawada.** 1997. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *J Vet Med Sci* **59**:115-20.
65. **Hennessy, K. J., J. J. Iandolo, et B. W. Fenwick.** 1993. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**:1155-9.
66. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, et D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400-3.
67. **Hernanz Moral, C., A. Cascon Soriano, M. Sanchez Salazar, J. Yugueros Marcos, S. Suarez Ramos, et G. Naharro Carrasco.** 1999. Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. *J Clin Microbiol* **37**:1575-8.
68. **Huether, M. J., G. Lin, D. M. Smith, M. P. Murtaugh, et T. W. Molitor.** 1993. Cloning, sequencing and regulation of an mRNA encoding porcine interleukin-1 beta. *Gene* **129**:285-9.
69. **Hunter, D., M. A. Jones, et T. McKendry.** 1983. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates using ring precipitate tests. *Vet Rec* **113**:158.

70. **Hunter, D., et J. Livingstone.** 1986. Detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* antigens using the coagglutination test. *Vet Rec* **118**:129.
71. **Idris, U. E., B. G. Harmon, F. A. Udeze, et S. Kadis.** 1993. Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide. *Vet Pathol* **30**:234-41.
72. **Inzana, T. J.** 1995. Simplified procedure for preparation of sensitized latex particles to detect capsular polysaccharides: application to typing and diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol* **33**:2297-303.
73. **Inzana, T. J.** 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **11**:305-16.
74. **Inzana, T. J., G. F. Clark, et J. Todd.** 1990. Detection of serotype-specific antibodies or capsular antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a double-label radioimmunoassay. *J Clin Microbiol* **28**:312-8.
75. **Inzana, T. J., et B. Fenwick.** 2001. Serologic detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine by capsular polysaccharide-biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **39**:1279-82.
76. **Inzana, T. J., J. Ma, T. Workman, R. P. Gogolewski, et P. Anderson.** 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* **56**:1880-9.
77. **Inzana, T. J., et B. Mathison.** 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* **55**:1580-7.
78. **Inzana, T. J., J. Todd, J. N. Ma, et H. Veit.** 1991. Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microb Pathog* **10**:281-96.

79. **Ishii, H., T. Fukuyasu, S. Iyobe, et H. Hashimoto.** 1993. Characterization of newly isolated plasmids from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res* **54**:701-8.
80. **Ishii, H., Y. Nakasone, S. Shigehara, K. Honma, Y. Araki, S. Iyobe, et H. Hashimoto.** 1990. Drug-susceptibility and isolation of a plasmid in *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Nippon Juigaku Zasshi* **52**:1-9.
81. **Issartel, J. P., V. Koronakis, et C. Hughes.** 1991. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* **351**:759-61.
82. **Ito, H., I. Uchida, T. Sekizaki, E. Ooishi, T. Kawai, T. Okabe, A. Taneno, et N. Terakado.** 1995. Molecular cloning of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane lipoprotein (OmlA) from serotype 5a. *Microb Pathog* **18**:29-36.
83. **Jacobsen, M. J., et J. P. Nielsen.** 1995. Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils. *Vet Microbiol* **47**:191-7.
84. **Jacques, M., B. Foiry, R. Higgins, et K. R. Mittal.** 1988. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* **170**:3314-8.
85. **Jacques, M., et S. E. Paradis.** 1998. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol Rev* **22**:45-59.
86. **Jansen, R., J. Briaire, H. E. Smith, P. Dom, F. Haesebrouck, E. M. Kamp, A. L. Gielkens, et M. A. Smits.** 1995. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect Immun* **63**:27-37.
87. **Jansen, R., J. Briaire, A. B. van Geel, E. M. Kamp, A. L. Gielkens, et M. A. Smits.** 1994. Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons. *Infect Immun* **62**:4411-8.

88. **Juteau, J. M., M. Sirois, A. A. Medeiros, et R. C. Levesque.** 1991. Molecular distribution of ROB-1 beta-lactamase in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1397-402.
89. **Kamp, E. M., J. K. Popma, J. Anakotta, et M. A. Smits.** 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun* **59**:3079-85.
90. **Kamp, E. M., J. K. Popma, et L. A. Van Leengoed.** 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: with emphasis on heterogeneity within serotype 1 and (proposed) serotype 9. *Vet Microbiol* **13**:249-57.
91. **Kamp, E. M., N. Stockhofe-Zurwieden, L. A. van Leengoed, et M. A. Smits.** 1997. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect Immun* **65**:4350-4.
92. **Kamp, E. M., T. M. Vermeulen, M. A. Smits, et J. Haagsma.** 1994. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect Immun* **62**:4063-5.
93. **Kielstein, P., H. Wuthe, O. Angen, R. Mutters, et P. Ahrens.** 2001. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance. *Vet Microbiol* **81**:243-55.
94. **Kilian, M.** 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* species, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* **93**:9-62.
95. **Kilian, M., J. Nicolet, et E. L. Biberstein.** 1978. Biochemical and serological characterisation of *Haemophilus pleuroneupmoniae* Matthews and Pattison, 1961 Shope 1964 and proposal of a new type strain. *Int J Syst Bacteriol* **28**:20-26.
96. **Kim, B., K. Min, C. Choi, W. S. Cho, D. S. Cheon, D. Kwon, J. Kim, et C. Chae.** 2001. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

isolated from pigs in Korea using new standardized procedures. *J Vet Med Sci* **63**:341-2.

97. **Klausen, J., L. O. Andresen, K. Barfod, et V. Sorensen.** 2001. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 6 in pig serum. *Vet Microbiol* **79**:11-8.

98. **Klausen, J., L. O. Andresen, K. Barfod, et V. Sorensen.** 2002. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 in pig herds. *Vet Microbiol* **88**:223-32.

99. **Komal, J. P., et 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**:229-40.

100. **Kume, K., T. Nakai, et A. Sawata.** 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. *Nippon Juigaku Zasshi* **46**:641-7.

101. **Lacouture, S., K. R. Mittal, M. Jacques, et M. Gottschalk.** 1997. Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. *J Vet Diagn Invest* **9**:337-41.

102. **Lairini, K., E. Stenbaek, S. Lacouture, et M. Gottschalk.** 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet Microbiol* **46**:369-81.

103. **Lebrun, A., S. Lacouture, D. Cote, K. R. Mittal, et M. Gottschalk.** 1999. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 7 and 4 using monoclonal antibodies: demonstration of common LPS O- chain epitopes with *Actinobacillus lignieresii*. *Vet Microbiol* **65**:271-82.

104. **Leiner, G., B. Franz, K. Strutzberg, et G. F. Gerlach.** 1999. A novel enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae*

ApxII antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**:630-2.

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

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

107. **Lo, T. M., C. K. Ward, et T. J. Inzana.** 1998. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **36**:1704-10.

108. **Lombin, L. H., S. Rosendal, et 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**:109-14.

109. **Mahan, M. J., J. M. Slauch, P. C. Hanna, A. Camilli, J. W. Tobias, M. K. Waldor, et J. J. Mekalanos.** 1993. Selection for bacterial genes that are specifically induced in host tissues: the hunt for virulence factors. *Infect Agents Dis* **2**:263-8.

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

111. **Mikael, L. G., R. Srikumar, J. W. Coulton, et M. Jacques.** 2003. *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect. Immun.* **71**:2911-2915.

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

113. **Mittal, K. R., R. Higgins, et S. Lariviere.** 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J Clin Microbiol* **17**:787-90.

114. **Mittal, K. R., R. Higgins, et S. Lariviere.** 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol* **15**:1019-23.
115. **Mittal, K. R., R. Higgins, et S. Lariviere.** 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol* **18**:1351-4.
116. **Mittal, K. R., R. Higgins, et S. Lariviere.** 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**:985-9.
117. **Mittal, K. R., R. Higgins, S. Lariviere, et D. Leblanc.** 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am J Vet Res* **45**:715-9.
118. **Moeck, G. S., et J. W. Coulton.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**:675-81.
119. **Moller, K., L. V. Andersen, G. Christensen, et M. Kilian.** 1993. Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Vet Microbiol* **36**:261-71.
120. **Moller, K., V. Fussing, P. A. Grimont, B. J. Paster, F. E. Dewhirst, et M. Kilian.** 1996. *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp. nov., and *Actinobacillus indolicus* sp. nov., three new V factor-dependent species from the respiratory tract of pigs. *Int J Syst Bacteriol* **46**:951-6.
121. **Nakai, T., K. Kawahara, Y. Horiguchi, H. Danbara, et K. Kume.** 1992. Characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Am J Vet Res* **53**:1519-23.

122. **Negrete-Abascal, E., R. M. Garcia, M. E. Reyes, D. Godinez, et M. de la Garza.** 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol Lett* **191**:109-13.
123. **Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, J. J. Serrano, C. Garcia, et M. de la Garza.** 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can J Vet Res* **58**:83-6.
124. **Nicolet, J.** 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p. 401-408. In I. S. U. Press (ed.), A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire and D. J. Taylor (ed) *Diseases of swine*, Ames, Iowa, USA.
125. **Nicolet, J.** 1982. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Proceedings of the 7th International Pig Veterinary Society*, Mexico City, Mexico.
126. **Nicolet, J., P. A. DeMeuron, et 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.
127. **Nielsen, J. P.** 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae*. Ph.D Thesis, Copenhagen, Denmark.
128. **Nielsen, R.** 1975. Colostral transfer of immunity to *Haemophilus parahaemolyticus* in pigs. *Nordisk Veterinaermedicin* **27**:319-328.
129. **Nielsen, R.** 1995. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype 2. *Vet Microbiol* **43**:277-81.
130. **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.
131. **Nielsen, R.** 1988. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Microbiol* **29**:580-582.

132. **Nielsen, R.** 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet Scand* **27**:453-5.
133. **Nielsen, R.** 1985. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. *Acta Vet Scand* **26**:501-12.
134. **Nielsen, R.** 1986. Serology of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes a and b. *Acta Vet Scand* **27**:49-58.
135. **Nielsen, R., L. O. Andresen, T. Plambeck, J. P. Nielsen, L. T. Krarup, et S. E. Jorsal.** 1997. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet Microbiol* **54**:35-46.
136. **Nielsen, R., et P. J. O'Connor.** 1984. Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet Scand* **25**:96-106.
137. **Nielsen, R., T. Plambeck, et N. T. Foged.** 1991. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *J Clin Microbiol* **29**:794-7.
138. **Nielsen, R., J. F. van den Bosch, T. Plambeck, V. Sorensen, et J. P. Nielsen.** 2000. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **71**:81-7.
139. **Osaki, M., Y. Sato, H. Tomura, H. Ito, et T. Sekizaki.** 1997. Genetic diversity of the genes encoding the outer membrane lipoprotein (*omlA*) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Med Sci* **59**:213-5.
140. **Oswald, W., D. V. Konine, J. Rohde, et G. F. Gerlach.** 1999. First chromosomal restriction map of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and localization of putative virulence-associated genes. *J Bacteriol* **181**:4161-9.

141. **Paradis, S. E., D. Dubreuil, et M. Jacques.** 1996. Examination of surface polysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 grown under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol Lett* **137**:201-6.
142. **Paradis, S. E., D. Dubreuil, S. Rioux, M. Gottschalk, et M. Jacques.** 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* **62**:3311-9.
143. **Pattison, I. H., D. G. Howell, et J. Elliot.** 1957. A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and associated pneumonic lesions. *J Comp Pathol* **67**:320-329.
144. **Perry, M. B., E. Altman, J. R. Brisson, L. M. Beynon, et J. C. Richards.** 1990. Structural characteristic of the antigenic capsular polysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy of Infectious Diseases* **4**:299-308.
145. **Piffer, I. A., G. R. Carter, et A. A. Botovchenco.** 1986. Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet Rec* **118**:292-4.
146. **Pitcher, D. G., et N. K. Fry.** 2000. Molecular techniques for the detection and identification of new bacterial pathogens. *Journal of Infection* **40**:116-120.
147. **Pitcher, D. G., N. A. Saunders, et R. J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* **8**:151-156.
148. **Pol, J. M., L. A. van Leengoed, N. Stockhofe, G. Kok, et G. Wensvoort.** 1997. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet Microbiol* **55**:259-64.
149. **Prideaux, C. T., C. Lenghaus, J. Krywult, et A. L. Hodgson.** 1999. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. *Infect Immun* **67**:1962-6.

150. **Radacovici, S., M. Gottschalk, et J. D. Dubreuil.** 1995. Recovery of long-chain lipopolysaccharides from liquid culture of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotype 5) for ELISA serodiagnosis. *Vet Res* **26**:63-7.
151. **Rapp, V. J., R. F. Ross, et B. Z. Erickson.** 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine. *Am J Vet Res* **46**:185-192.
152. **Rioux, S., C. Begin, J. D. Dubreuil, et M. Jacques.** 1997. Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr Microbiol* **35**:139-44.
153. **Rioux, S., C. Galarneau, J. Harel, J. Frey, J. Nicolet, M. Kobisch, J. D. Dubreuil, et M. Jacques.** 1999. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can J Microbiol* **45**:1017-26.
154. **Rioux, S., C. Galarneau, J. Harel, M. Kobisch, J. Frey, M. Gottschalk, et M. Jacques.** 2000. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb Pathog* **28**:279-89.
155. **Rosendal, S., et D. A. Boyd.** 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J Clin Microbiol* **16**:840-3.
156. **Rycroft, A. N., et J. M. Cullen.** 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am J Vet Res* **51**:1449-53.
157. **Rycroft, A. N., et L. H. Garside.** 2000. *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *Vet J* **159**:18-36.
158. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, et T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
159. **Sauer, F. G., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. J. Martinez, et S. J. Hultgren.** 2000. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **3**:65-72.

160. Savoye, C., J. L. Jobert, F. Berthelot-Herault, A. M. Keribin, R. Cariolet, H. Morvan, F. Madec, et M. Kobisch. 2000. A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions. *Vet Microbiol* **73**:337-47.
161. Schaller, A., S. P. Djordjevic, G. J. Eamens, W. A. Forbes, R. Kuhn, P. Kuhnert, M. Gottschalk, J. Nicolet, et J. Frey. 2001. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet Microbiol* **79**:47-62.
162. Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. Segers, et J. Frey. 1999. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **145**:2105-16.
163. Shope, R. E. 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *Jour. Exp. Med* **119**:357-368.
164. Sidibe, M., S. Messier, S. Lariviere, M. Gottschalk, et 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**:204-8.
165. Sirois, M., E. G. Lemire, et R. C. Levesque. 1991. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**:1183-7.
166. Stenbaek, E. I., F. De LaSalle, et M. Gottschalk. 1997. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 using an inhibition enzyme immunoassay. *Can J Vet Res* **61**:1-7.
167. Stenbaek, E. I., et A. L. Schirmer. 1994. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in pig sera by an inhibition enzyme immuno assay (EIA). *Vet Microbiol* **39**:231-44.

168. **Takashima, H., H. Sakai, T. Yanai, et T. Masegi.** 1999. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5 and 7 using the immunohistochemical staining. *J Vet Med Sci* **61**:713-6.
169. **Tascon, R. I., J. A. Vazquez-Boland, C. B. Gutierrez-Martin, I. Rodriguez-Barbosa, et 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**:207-16.
170. **Taylor, D. J.** 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p. 343–354. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D’Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, Iowa State University Press, Ames.
171. **Trottier, Y. L., P. F. Wright, et S. Lariviere.** 1992. Optimization and standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay protocol for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *J Clin Microbiol* **30**:46-53.
172. **Utrera, V., et C. Pijoan.** 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet Rec* **128**:357-8.
173. **Utrera, V., C. Pijoan, A. Gallardo, et L. Marino.** 1988. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by paper chromatography test. In *Proceedings of the 10th International Pig Veterinary Society*, Rio de Janeiro, Brazil.
174. **Utt, E. A., J. P. Brousal, L. C. Kikuta-Oshima, et F. D. Quinn.** 1995. The identification of bacterial gene expression differences using mRNA- based isothermal subtractive hybridization. *Can J Microbiol* **41**:152-6.
175. **Van Ostaaijen, J., J. Frey, S. Rosendal, et J. I. MacInnes.** 1997. *Actinobacillus suis* strains isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry *apxICABD*var. suis and *apxIICA*var. suis toxin genes. *J Clin Microbiol* **35**:1131-7.
176. **Van Overbeke, I., K. Chiers, R. Ducatelle, et F. Haesebrouck.** 2001. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs

vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**:15-20.

177. **Vaneechoutte, M., et J. Van Eldere.** 1997. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* **46**:188-94.

178. **Vigre, H., O. Angen, K. Barfod, D. T. Lavritsen, et V. Sorensen.** 2002. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Veterinary Microbiology* **89**:151-159.

179. **Ward, C. K., et T. J. Inzana.** 1997. Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Infect Immun* **65**:2491-6.

180. **Ward, C. K., et 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**:2110-21.

181. **Ward, C. K., M. L. Lawrence, H. P. Veit, et T. J. Inzana.** 1998. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* **66**:3326-36.

182. **Wasteson, Y., D. E. Roe, K. Falk, et M. C. Roberts.** 1996. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **48**:41-50.

183. **Welch, R. A., et S. Pellett.** 1988. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. *J Bacteriol* **170**:1622-30.

184. Willson, P. J., H. G. Deneer, A. Potter, et W. Albritton. 1989. Characterization of a streptomycin-sulfonamide resistance plasmid from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:235-8.

185. Zhang, Y., J. M. Tennent, A. Ingham, G. Beddome, C. Prideaux, et W. P. Michalski. 2000. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **189**:15-8.

## **VII ANNEXE**

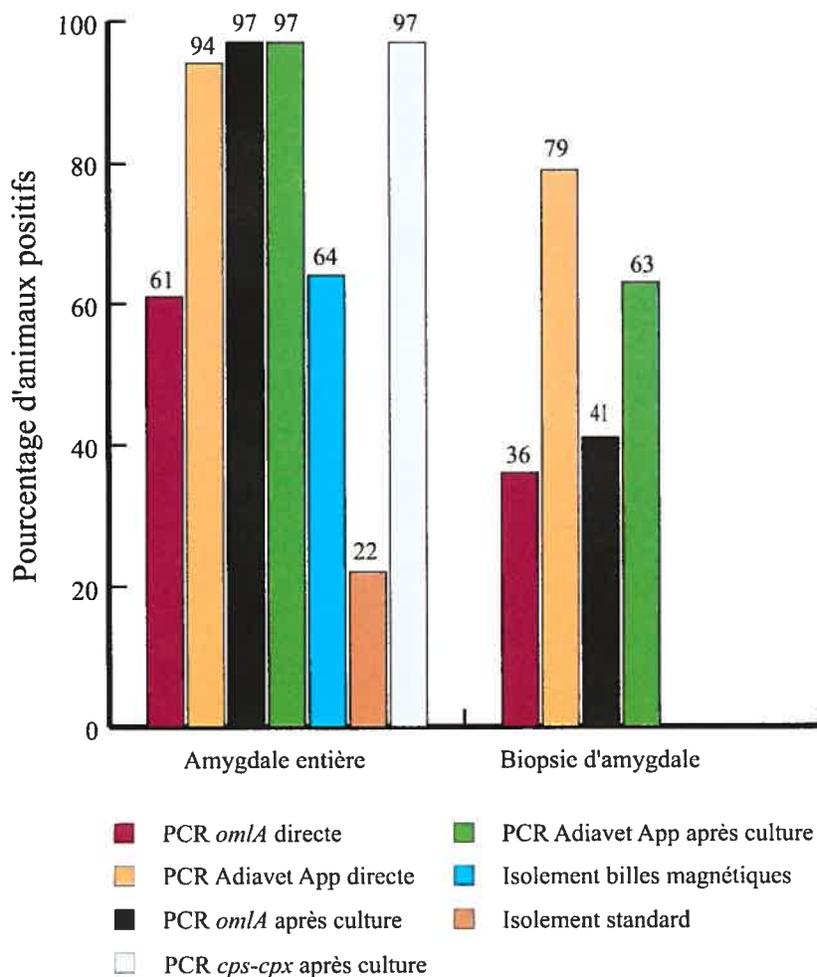


Figure 5. Pourcentage d'animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae* détectés dans le groupe 3 (N=36) par les différentes techniques utilisées dans cette étude à partir d'amygdales entières récoltées à l'abattoir et de biopsies prélevées chez l'animal vivant. La sérologie (ELISA-LC-LPS) avait montré des réactions positives envers les sérotypes 5 et 12 d'*A. pleuropneumoniae* (34 et 3 animaux, respectivement). PCR directe indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir de l'échantillon sans une étape de culture. PCR après culture indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir d'une primoculture des échantillons. Les résultats positifs obtenus avec l'épreuve PCR Adiavet App ont correspondu au groupe de typage PCR comprenant le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*. La PCR *cps-cpx* est spécifique du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* et a été utilisée pour confirmer les résultats de l'épreuve Adiavet App.

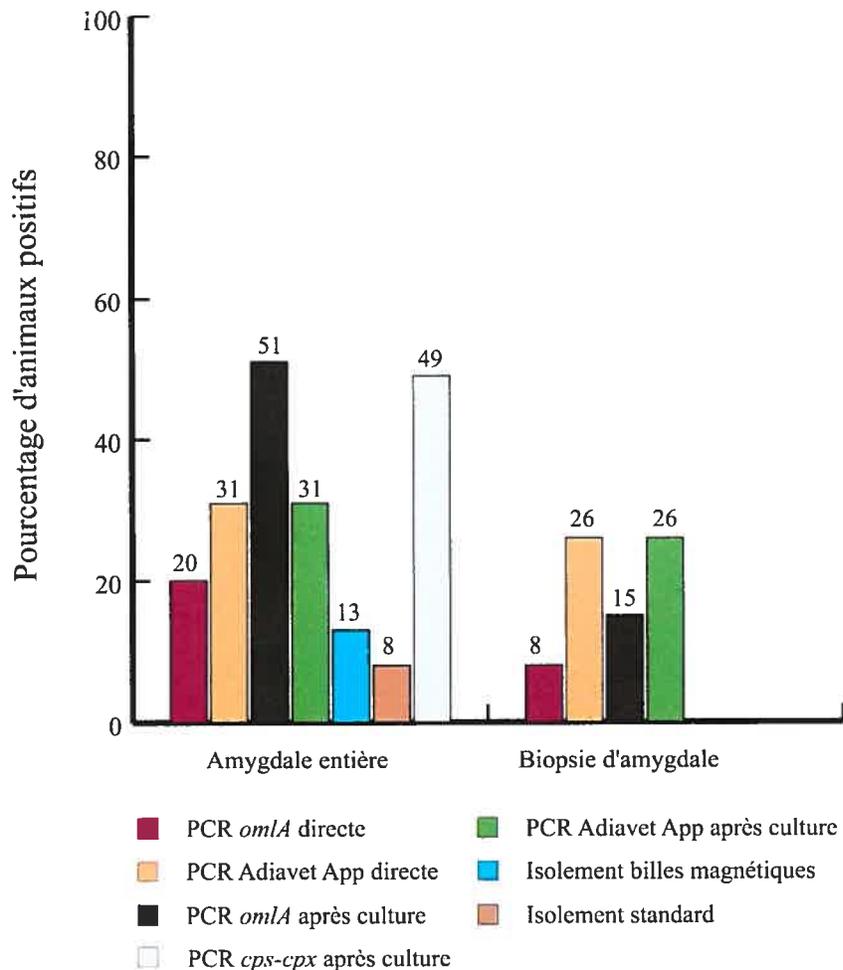


Figure 6. Pourcentage d'animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae* détectés dans le groupe 4 (N=39) par les différentes techniques utilisées dans cette étude à partir d'amygdales entières récoltées à l'abattoir et de biopsies prélevées chez l'animal vivant. La sérologie (ELISA-LC-LPS) avait montré des réactions positives envers le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* (15 animaux, 38 %). PCR directe indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir de l'échantillon sans une étape de culture. PCR après culture indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir d'une primoculture des échantillons. Les résultats positifs obtenus avec l'épreuve PCR Adiavet App ont correspondu au groupe de typage PCR comprenant le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*. La PCR *cps-cpx* est spécifique du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* et a été utilisée pour confirmer les résultats de l'épreuve Adiavet App.

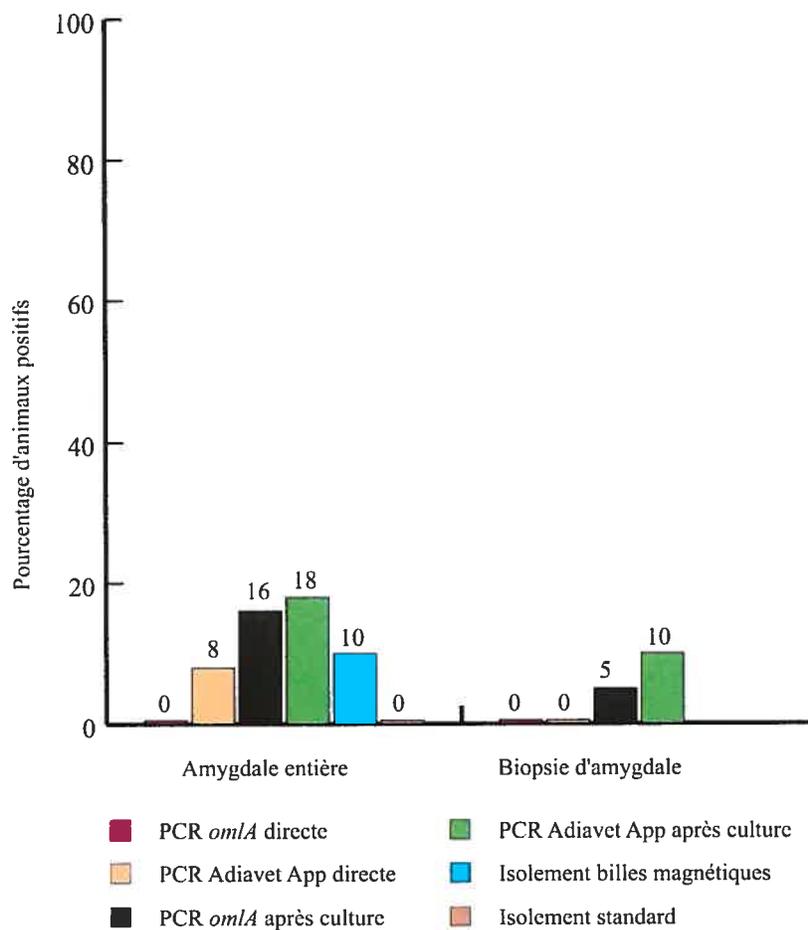


Figure 7. Pourcentage d'animaux porteurs d'*A. pleuropneumoniae* détectés dans le groupe 5 (N=39) par les différents techniques utilisées dans cette étude à partir d'amygdales entières récoltées à l'abattoir et de biopsies prélevées chez l'animal vivant. La sérologie (ELISA-LC-LPS) avait montré des réactions positives envers les sérotypes 7, 12 et 5 d'*A. pleuropneumoniae* (8, 2 et 1 animal respectivement). PCR directe indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir de l'échantillon sans une étape de culture. PCR après culture indique que l'ADN utilisé a été purifié à partir d'une primoculture des échantillons. Les résultats positifs obtenus avec l'épreuve PCR Adiavet App ont correspondu au groupe de typage PCR comprenant le sérotype 7 d'*A. pleuropneumoniae*.

TABLEAU III. Sensibilité obtenue par les différentes épreuves PCR lorsque des extraits bruts, des extraits obtenus avec Instangene Matrix ou de l'ADN purifié ont été utilisés comme source de brin matrice pour la PCR directe<sup>a</sup>

Épreuve PCR	Sensibilité (UFC/g d'amygdale) <sup>b</sup>		
	Extrait brut <sup>c</sup>	Instangene Matrix <sup>d</sup>	ADN purifié <sup>e</sup>
<i>epxIVA</i> <sup>d</sup> (Schaller <i>et al.</i> )	$3.6 \times 10^2$	$3.6 \times 10^2$	$3.6 \times 10^2$
<i>omlA</i> (Savoie <i>et al.</i> )	$4 \times 10^7$	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^4$
<i>omlA</i> (Gram <i>et al.</i> )	$> 10^7$ <sup>f</sup>	$3.4 \times 10^7$	$3.4 \times 10^6$
Sirois <i>et al.</i>	$> 10^7$ <sup>f</sup>	$> 10^7$ <sup>f</sup>	$2.1 \times 10^7$

<sup>a</sup> La PCR a été effectuée sans une étape de culture de l'échantillon.

<sup>b</sup> La souche de référence (Shope 4074) d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 a été utilisée pour infecter les amygdales.

<sup>c</sup> Une suspension bactérienne provenant des amygdales infectées expérimentalement a été utilisée comme source d'ADN.

<sup>d</sup> La procédure recommandée par le fabricant a été suivie.

<sup>e</sup> L'ADN a été purifié selon la méthode de Boom *et al.* (ref. 17).

<sup>f</sup> La concentration maximale d'*A. pleuropneumoniae* utilisée a été de  $10^7$  UFC/g d'amygdale.

TABLEAU IV. Résultats pour l'épreuve PCR Adiavet App ® lorsque deux sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ont été utilisés en même temps pour infecter expérimentalement des amygdales entières

Concentration de sérotype A <sup>a</sup> (UFC/g d'amygdale)	Concentration de sérotype B (UFC/g d'amygdale) <sup>a</sup>				
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
10 <sup>3</sup>	(-) <sup>b</sup>	B	B	B	B
10 <sup>5</sup>	nd <sup>c</sup>	nd <sup>c</sup>	B/A	nd <sup>c</sup>	nd <sup>c</sup>
10 <sup>7</sup>	A	A	A	B/A	B/A

<sup>a</sup> Les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* utilisés ont été (A), le sérotype 1 et (B), les sérotypes 2 ou 5b.

<sup>b</sup> Aucun des deux sérotypes n'a été détecté.

<sup>c</sup> Non évalué

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## Identification de l'étudiant

<b>Nom de l'étudiant</b> NAHUEL VICENTE FITTIPALDI		<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> MICROBIOLOGIE

## Description de l'article

<b>Auteurs</b> NAHUEL FITTIPALDI, ANDRÉ BROES, JOSÉE HAREL, MARYLENE KOBISCH ET MARCELO GOTTSCHALK	
<b>Titre</b> DETECTION OF ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE IN SUBCLINICALLY INFECTED PIGS : EVALUATION AND FIELD VALIDATION OF PCR TESTS	
<b>Revue</b> JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY	<b>Date de publication</b> SOU MIS

## Déclaration des coauteurs

<b>Déclaration</b>		
<p>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</p> <p>NAHUEL VICENTE FITTIPALDI   TITRE: Méthodes moléculaires de détection d'animaux porteurs d'Actinobacillus pleuropneumoniae: comparaison et évaluation de preuves PCR</p>		
<b>Coauteur</b> ANDRÉ BROES	<b>Sig</b> [REDACTED]	<b>Date</b> 01/03/2003
<b>Coauteur</b> JOSÉE HAREL	<b>Sig</b> [REDACTED]	<b>Date</b> 01/03/2003
<b>Coauteur</b> MARYLENE KOBISCH	<b>Sig</b> [REDACTED]	<b>Date</b> 01/03/2003
<b>Coauteur</b> MARCELO GOTTSCHALK	<b>Sig</b> [REDACTED]	<b>Date</b> 01/03/2003
<b>Coauteur</b> SANS OBJET	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

Envoyé à la FÉS

le

2003-04-18