

## Pleuropneumonie à *Actinobacillus pleuropneumoniae* : pathogénie, diagnostic, traitement et prophylaxie

VANDEN BERGH P.<sup>§</sup>, ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D.

Département de Morphologie et de Pathologie, Service de Pathologie spéciale, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B43, 4000, Liège, Belgique

Correspondance : Prof. Daniel Demecht

Email : daniel.desmecht@ulg.ac.be

**RÉSUMÉ :** La pleuropneumonie porcine à *Actinobacillus pleuropneumoniae* est une maladie répandue mondialement, fréquente, hautement infectieuse et qui engendre des pertes économiques conséquentes liées aux déficits des gains zootechniques et à l'usage intensif d'antibiotiques. Cette revue a pour but de décrire les différentes étapes de la pathogénie : la colonisation des voies respiratoires de l'hôte, l'altération des mécanismes de clairance respiratoire, l'initiation et l'exacerbation de la réaction inflammatoire qui joue un rôle primordial dans le développement des lésions pulmonaires. Les signes cliniques, les lésions macroscopiques et microscopiques associés aux différentes formes de la pleuropneumonie sont rappelés et les récentes avancées diagnostiques, médicales et prophylactiques sont abordées.

### 1. INTRODUCTION

Dans les élevages porcins, les agents pathogènes du tractus respiratoire qui prévalent mondialement sont les mycoplasmes, les virus influenza porcins et du syndrome dysgénésique et respiratoire porcine, et les bactéries *Haemophilus parasuis* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Nicolet, 1992 ; Plagemann, 2003). *A. pleuropneumoniae* est l'agent étiologique des pleuropneumonies porcines, une maladie répandue mondialement (tableau 1), fréquente et hautement infectieuse (Sebunya et Saunders, 1983 ; Loeffen *et al.*, 1999 ; Schaller *et al.*, 1999). Les épizooties à *A. pleuropneumoniae* sont habituellement associées à des élevages indemnes où des conditions de production intensives optimisent la transmission de la bactérie. Cette maladie a un impact négatif sur la production mondiale de porc, engendrant des pertes économiques conséquentes liées au déficit des gains zootechniques et à l'usage intensif des antibiotiques (Nicolet, 1992 ; Bosse *et al.*, 2002). Un rapport indique ainsi qu'aux Etats-Unis, pour l'année 1995, la perte financière totale associée à *A. pleuropneumoniae* sur les opéra-

tions d'engraissement/ finition des porcs, se chiffre à environ 30 millions de dollars (Losinger, 2005).

Sur base de la diversité des antigènes O (AgO) des lipopolysaccharides (LPS) ainsi que des antigènes K (AgK) de la capsule polysaccharidique d'*A. pleuropneumoniae*, 15 sérotypes différents ont été décrits (tableau 2). Les sérotypes 1 et 5 ont par la suite été différenciés en 1a-1b et 5a-5b du fait de légères différences dans leurs structures polysaccharidiques (Perry *et al.*, 1990 ; Jolie *et al.*, 1994). Tous les sérotypes n'ont pas la même répartition géographique, certains se retrouvant préférentiellement dans certaines régions du monde (tableau 1). Globalement, les sérotypes 2, 3, 9 et 11 dominant en Europe et les sérotypes 1 et 5 en Amérique du Nord. Le sérotype 1 n'est trouvé qu'exceptionnellement en Europe tandis que le sérotype 9, fort rencontré en Europe, n'a jamais été isolé en Amérique du Nord (Satran et Nedbalcova, 2002).

Cette revue a pour objectif de décrire les différentes étapes de la pathogénie de la pleuropneumonie porcine à *A. pleuropneumoniae* : la colonisation des voies respiratoires de l'hôte, l'al-

tération des mécanismes de clairance respiratoire, l'initiation de la réaction inflammatoire et son exacerbation paroxystique liée à l'afflux massif de neutrophiles et de monocytes qui jouent un rôle primordial dans le développement des lésions pulmonaires. Par la suite, les signes cliniques, les lésions macroscopiques et microscopiques associés aux différentes formes de la pleuropneumonie sont rappelés. Les différentes techniques de diagnostic (bactériologiques et sérologiques) et les récentes avancées médicales et prophylactiques sont également abordées.

### 2. LES INTERACTIONS HÔTE-BACTÉRIE ET LA PATHOGÉNIE

La vitesse et l'intensité de développement de la pleuropneumonie dépendent du statut immunitaire des porcs, des conditions environnementales et de facteurs liés à l'agent infectieux (degré d'exposition, virulence de la souche, antibiorésistance...) (Rosendal et Mitchell, 1983 ; Sebunya *et al.*, 1983 ; Rosendal *et al.*, 1985 ; Rogers *et al.*, 1990 ; Crujnsen *et al.*, 1995 ; Beskow *et al.*, 1998).

**Tableau 1 :** Répartition géographique des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

| Pays        | Sérotypes dominants   | Références   |
|-------------|---|--|
| Allemagne   | 2, 7, 9   | Schimmel et Hass, 1983<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000          |
| Australie   | 12 (41 %), 1 (30 %), 7 (24 %)   | Blackall <i>et al.</i> , 1999                                    |
| Belgique    | 2 (36 %), 3 (21 %), 9 (15 %), 5b (10 %)   | Dom <i>et al.</i> , 1994c<br>Maes <i>et al.</i> , 2002           |
| Corée       | 2 (56 %), 5 (28 %), 6 (11 %), 7 (2 %)   | Min et Chae, 1999  |
| Croatie     | 2, 9  | Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                                    |
| Danemark    | 2 (84 %), 6 (11 %)  | Nielsen, 1984; 1988<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000             |
| Espagne     | 4 (42,2 %), 7 (22,5 %), 2 (12,8 %)  | Gutierrez <i>et al.</i> , 1995<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000) |
| Etats-Unis  | 1 et 5  | Fales <i>et al.</i> , 1989                                       |
| France      | 9   | Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                                    |
| Hongrie     | 2, 3, 7   | Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                                    |
| Irlande     | 3   | Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                                    |
| Japon       | 2 (52,5 %), 1 (36,3 %), 5 (6,2 %),<br>7 (1,5 %), 8 (1,5 %), 3 (1,4 %), 12 (0,5 %) | Fukuyasu <i>et al.</i> , 1996                                    |
| Norvège     | 2   | Nielsen, 1984<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                   |
| Pays-Bas    | 2, 9, 11  | Kamp <i>et al.</i> , 1987<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000       |
| Pologne     | 1, 9  | Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                                    |
| Canada      | 1 (68 %), 5 (23 %), 3-6-7-8-10-12 (9 %)   | Mittal <i>et al.</i> , 1992                                      |
| Royaume-Uni | 2, 3, 8   | McDowell et Ball, 1994<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000          |
| Suède       | 2   | Nielsen, 1984<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                   |
| Suisse      | 2   | Nielsen, 1984<br>Dubreuil <i>et al.</i> , 2000                   |
| Tchéquie    | 9 (46,5 %), 2 (18,5 %), 11 (14,2 %),<br>4-5-7-12 (2,4 %)                          | Satran et Nedbalcova, 2002<br>Kucerova <i>et al.</i> , 2005      |

**Tableau 2 :** Caractéristiques antigéniques des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey *et al.*, 1993 ; Beck *et al.*, 1994 ; Frey, 1995 ; Rodriguez Barbosa *et al.*, 1995 ; Rodriguez Barbosa *et al.*, 1996 ; Euzéby, 1998).

| Biotype | Sérotipe | Souche de référence | Antigène |     |
|---------|----------|---------------------|----------|-----|
|         |          |                     | O        | K   |
| 1       | 1a       | S4074               | O1       | K1a |
|         | 1b       | ISU 158             | O1       | K1b |
|         | 2        | S1536               | O2       | K2  |
|         | 3        | S1421               | O3       | K3  |
|         | 4        | M62                 | O4       | K4  |
|         | 5a       | K17                 | O5       | K5a |
|         | 5b       | L20                 | O5       | K5b |
|         | 6        | fem                 | O3       | K6  |
|         | 7        | WF83                | O4       | K7  |
|         | 8        | 405                 | O3       | K8  |
|         | 9        | CVI 13261           | O1       | K9  |
|         | 10       | 13039               | O6       | K10 |
|         | 11       | 56153               | O1       | K11 |
|         | 12       | 8329                | O7       | K12 |
|         | 15       | HS143               | O3       | K15 |
| 2       | 2        | -                   | O2       | K2  |
|         | 4        | -                   | O4       | K4  |
|         | 7        | -                   | O4       | K7  |
|         | 9        | -                   | O1       | K9  |
|         | 13       | NRCC6230            | O4       | K13 |
|         | 14       | -                   | nd       | nd  |

Les souches de référence ne sécrétant qu'une seule toxine Apx apparaissent en rouge.

Tous les sérotypes sont capables de causer la maladie même si certains sont plus virulents que d'autres et que la virulence peut varier au sein d'un même sérotipe (Rosendal *et al.*, 1985 ; Rogers *et al.*, 1990 ; Frey, 1995 ; Stenbaek et Hovind-Haugen, 1996 ; Jacques *et al.*, 2005 ; Ramjeet *et al.*, 2005). Les sérotypes 1 et 5, et dans une moindre mesure les sérotypes 9 et 11, sont associés, épidémiologiquement et expérimentalement, à une maladie sévère avec des taux élevés de mortalité et des lésions pulmonaires majeures (Komal et Mittal, 1990 ; Koyama *et al.*, 2007). Les sérotypes 2-4, 6-8 et 12 sont généralement moins virulents et causent moins de mortalité, même s'ils produisent des lésions similaires à celles générées par les sérotypes les plus virulents (Komal et Mittal, 1990 ; Nicolet, 1992 ; Frey, 1995). En général, les souches du biotype 1 sont reconnues pour être plus virulentes que celles du biotype 2 (Dom et Haesebrouck, 1992 ; Dom *et al.*, 1994b). Ces variations de virulence peuvent être expliquées, au moins en partie, par la production de différentes combinaisons de toxines Apx, les sérotypes les plus virulents produisant à la fois ApxIA et ApxIIA (Frey, 1995). Par ailleurs, il a été montré chez la souris que la mortalité due à l'inoculation simultanée de deux sérotypes différents d'*A. pleuropneumoniae* était plus élevée que pour l'inoculation indépendante de chacun des sérotypes (Komal et Mittal, 1990). De plus, le sérotipe 1 dominerait au moins les sérotypes 2 et 5 puisque les taux d'antigènes spécifiques de ces derniers chutent dans le poumon, le foie et la rate lors d'une inoculation concomitante avec le sérotipe 1 (Komal et Mittal, 1990). Cette variabilité de la virulence entre sérotypes pourrait aussi être expliquée par des différences dans l'épaisseur de la capsule (Jensen et Bertram, 1986 ; Inzana *et al.*, 1988 ; Rosendal et MacInnes, 1990 ; Inzana *et al.*, 1993 ; Ward *et al.*, 1998 ; Rioux *et al.*, 2000). Ainsi, il a été démontré en microscopie électronique que la souche de référence du sérotipe 1 possédait une capsule plus épaisse que celle des sérotypes 2 et 5 (Jacques *et al.*, 1988).

## 2.1. La colonisation de l'hôte et l'adhérence

Lorsque *A. pleuropneumoniae* est transmise à des porcs indemnes, la bactérie colonise les cryptes des

**Figure 1 :** Micrographie électronique du poumon d'un porc à 30 min post-inoculation avec le sérotype 2 d'*Acetivobacillus pleuropneumoniae*. Les bactéries sont étroitement associées aux cils de la bronchiole terminale (Dom *et al.*, 1994a).



amygdales et cette invasion est rapidement suivie d'une forte infiltration neutrophilique dans les parties les plus profondes des cryptes (Chiers *et al.*, 1999). La bactérie serait capable d'adhérer aux cellules épithéliales buccales porcines via des glycoprotéines de la surface cellulaire, le mannose et la fibronectine (Hamer-Barrera *et al.*, 2004). Elle adhère plus difficilement à l'épithélium de la trachée et des bronches mais son adhérence augmente avec les cellules épithéliales des bronchioles et des alvéoles (Jacques *et al.*, 1991 ; Dom *et al.*, 1994a). Sa faculté d'adhérence au mucus respiratoire et aux cellules épithéliales de l'arbre respiratoire varie quant à elle entre sérotypes, mais aussi au sein d'un même sérotype. Elle dépend des conditions environnantes de croissance et de l'épaisseur du matériel capsulaire, les souches fortement encapsulées montrant une affinité nulle ou diminuée pour le mucus (Belanger *et al.*, 1992). Les LPS possèderaient aussi une affinité pour ce mucus (Belanger *et al.*, 1992 ; 1994). L'adhérence aux cellules épithéliales alvéolaires de porc serait aussi surtout liée à plusieurs types d'adhésines et dans une moindre mesure à des carbohydrates (Van Overbeke *et al.*, 2002 ; Boekema *et al.*, 2003).

*In vivo*, 30 minutes après inoculation, plus de 95 % des bactéries présentes dans les poumons adhèrent intimement, par leur plus long côté, à l'épithélium des alvéoles ou aux cils des

bronchioles terminales (figure 1) (Dom *et al.*, 1994a). Suite à l'adhérence aux cellules de l'hôte, l'établissement de l'infection dépend de la capacité de la bactérie à se protéger des mécanismes de défense de l'hôte et à s'accaparer tous les nutriments essentiels pour son métabolisme et sa croissance. En effet, dans le tractus respiratoire, les disponibilités en sucres et autres nutriments sont restreintes tant qualitativement que quantitativement (Macfadyen et Redfield, 1996).

## 2.2. L'altération de la clairance respiratoire de l'hôte

Une réponse défensive efficace de l'hôte vis-à-vis d'une infection bactérienne pulmonaire consiste en une clairance rapide des bactéries du tractus respiratoire qui dépend elle-même du bon fonctionnement du système mucociliaire et immunitaire non-spécifique (la phagocytose par les macrophages alvéolaires) et spécifique (mécanismes médiés par les lymphocytes et les anticorps). Classiquement, les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense des poumons contre les bactéries inhalées, en les phagocytant et en les tuant (Pabst, 1996). Ce processus d'élimination est constitué d'une séquence complexe d'évènements : (i) la perception de la présence de l'envahisseur, (ii) la migration vers la bactérie pathogène (chimiotactisme), (iii) l'attachement (opsonisation), (iv) la phagocytose, et (v) l'élimination du microorganisme.

Le mécanisme de clairance mucociliaire est très important dans la protection des poumons vis à vis d'une infection à *A. pleuropneumoniae*. Si le taux de multiplication des bactéries dépasse le taux d'élimination mucociliaire, une population significative de bactéries s'accumulera progressivement dans les poumons et sera le point de départ du développement de la maladie. En effet, il a été montré que la suppression de la production de mucus et de l'activité ciliaire, réalisées respectivement par l'administration d'atropine et de xylocaïne, augmentent fortement la sévérité de la maladie lorsque des porcs sont inoculés par voie respiratoire avec de faibles doses d'*A. pleuropneumoniae* (Narita *et al.*, 1995).

Par ailleurs, les bactéries qui échappent à la fonction ciliaire et pénètrent dans les espaces alvéolaires ont la capacité d'intoxiquer les macrophages

alvéolaires avant même d'avoir été opsonisées et phagocytées. *In vitro*, en présence de sérum issu de porc non infecté par *A. pleuropneumoniae*, la non neutralisation des toxines Apx et la non opsonisation ont pour résultat que les macrophages alvéolaires sont directement tués par la bactérie sans même avoir pu réaliser la phagocytose (Cullen et Rycroft, 1994). Toutefois, si le porc a déjà été confronté à l'agent pathogène et développé une immunité, la capacité des macrophages alvéolaires à phagocyter la bactérie sera logiquement augmentée. Ainsi, il a été montré *in vitro*, qu'en présence de sérum de porc convalescent, la capacité de phagocytose d'*A. pleuropneumoniae* par les macrophages est significativement augmentée par l'opsonisation des bactéries et la neutralisation des toxines Apx (Crujisen *et al.*, 1992 ; Cullen et Rycroft, 1994).

Les toxines Apx produites dans le milieu extracellulaire par *A. pleuropneumoniae* exercent donc une toxicité directe sur les macrophages. Il a été montré qu'elles sont responsables, à doses sous-lytiques, du dysfonctionnement sévère du chimiotactisme, de l'attachement et de la phagocytose des macrophages alvéolaires (Pijon, 1986 ; Van Leengoed *et al.*, 1989 ; Tarigan *et al.*, 1994). Leur action membranaire est également capable d'altérer le métabolisme de l'oxygène (Bendixen *et al.*, 1981 ; Pijon, 1986) entraînant une diminution de la production de dérivés toxiques de l'oxygène et donc de l'activité bactéricide (Crujisen *et al.*, 1992). En effet, il a été montré qu'à haute concentration en toxine, la stimulation du métabolisme oxydatif du macrophage est suivie par une inhibition totale (Dom *et al.*, 1992a).

De plus, les macrophages alvéolaires qui sont parvenus à phagocyter *A. pleuropneumoniae* ne semblent pas pouvoir l'éliminer (Crujisen *et al.*, 1992 ; Cullen et Rycroft, 1994). Il a été avancé que la libération intracellulaire des toxines Apx par la bactérie pourrait diminuer la capacité des macrophages à tuer *A. pleuropneumoniae* (Crujisen *et al.*, 1992). Les toxines Apx exerçant leur activité toxique sur les membranes cellulaires, il est possible qu'elles parviennent à s'implanter dans la membrane du phagosome, créant des pores empêchant l'acidification du phagosome et sa fusion avec le lysosome. La lyse des macrophages, consécutive à l'intoxication, aboutirait

ensuite au relargage de l'agent pathogène, toujours viable, dans le milieu extracellulaire. Cependant, il faut garder à l'esprit que d'autres facteurs permettent à *A. pleuropneumoniae* de survivre dans le macrophage : la capsule et les LPS (Bilinski, 1991), la [Cu, Zn] superoxyde dismutase (Langford *et al.*, 1996), les protéines de stress (Fuller *et al.*, 2000) et l'ammoniaque (Bosse et MacInnes, 2000).

En conclusion, il semble donc qu'*A. pleuropneumoniae* soit gagnante à toutes les étapes de la phagocytose par les macrophages alvéolaires puisque : (i) les toxines Apx peuvent neutraliser, à distance de la bactérie, une partie de ces cellules et altérer leur rôle phagocytaire, et/ou (ii) une fois la phagocytose réalisée, inhiber l'activité bactéricide intramacrophagique.

### 2.3. L'initiation de la réaction inflammatoire

Dans les espaces alvéolaires, les toxines Apx (surtout ApxIA et ApxIIIA), le LPS et d'autres facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* peuvent agir directement sur les pneumocytes, en plus des macrophages alvéolaires, ouvrant des brèches dans le tissu pulmonaire (Idris *et al.*, 1993 ; van de Kerkhof *et al.*, 1996 ; Chen, 1997). De plus, les macrophages alvéolaires infectés, chargés en bactéries, pourraient aussi constituer de véritables chevaux de Troie, capables de franchir la barrière alvéolo-capillaire ou de pénétrer dans les agrégats lymphofolliculaires (Lauweryns et Baert, 1977). Dans la pleuropneumonie porcine, l'altération des macrophages alvéolaires et des pneumocytes constitue l'événement déclencheur de la pathogenèse aboutissant à l'altération des mécanismes de clairance respiratoire et à la libération de médiateurs de l'inflammation.

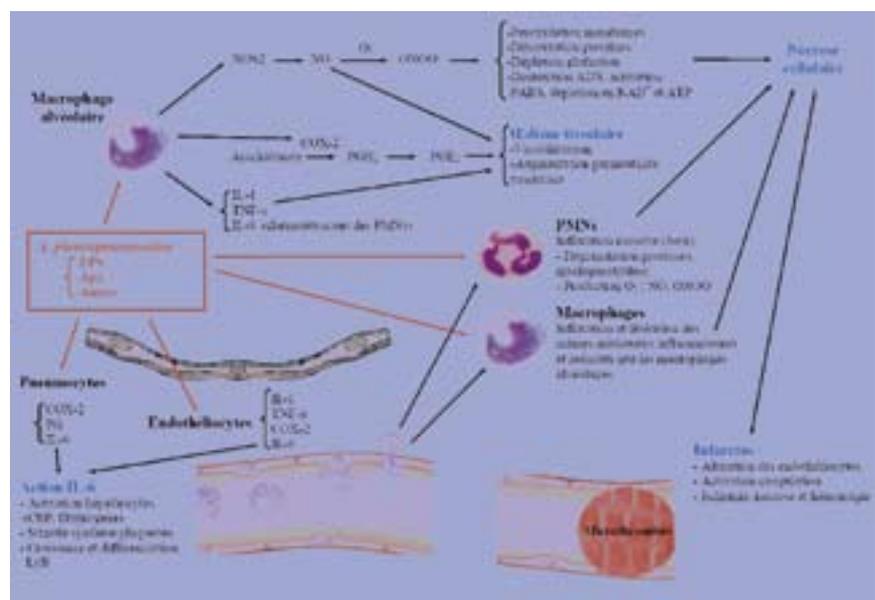
Certaines études indiquent que dans la pleuropneumonie aiguë, les toxines Apx seraient responsables de la nécrose et que les LPS seraient responsables de l'inflammation pulmonaire aiguë (Udeze *et al.*, 1987 ; Cho et Chae, 2001 ; Choi *et al.*, 2001). Les prostaglandines sont des médiateurs importants de l'inflammation induite par les LPS. En effet, l'administration d'indométacine, un inhibiteur non sélectif des cyclooxygénases (COX), à des porcs inoculés avec *A. pleuropneu-*

*moniae* atténue les lésions pulmonaires et la mortalité (Bertram, 1988). De plus, il existe des corrélations significatives entre les niveaux d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandine PGE<sub>2</sub> et le score de lésions pulmonaires. Celles-ci suggèrent que les enzymes intervenant dans la synthèse de ces composants, l'oxyde nitrique synthase NOS2 et COX-2 jouent un rôle dans la pathogenèse de cette pleuropneumonie aiguë (Cho et Chae, 2004a). Ainsi, une étude *in vitro* montre clairement qu'*A. pleuropneumoniae* a des effets détectables sur les activités NOS2 et COX-2 dans les macrophages alvéolaires porcins (Cho et Chae, 2003a) bien que l'expression de NOS2 ne soit pas induite par le LPS (Pampusch *et al.*, 1998). L'expression de ces deux enzymes pourrait être induite directement par d'autres facteurs d'*A. pleuropneumoniae* ou par des cytokines produites en réponse au LPS tel que le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*) et l'IL-1 (*Interleukine-1*) (Cho et Chae, 2004a). La façon dont ces molécules agissent n'est pas complètement

comprise mais il est possible que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 exercent leur effet en synergie avec le LPS pour induire l'expression de NOS2 et COX-2 (Cho et Chae, 2004a).

NOS2 produit le NO qui réagit rapidement avec l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pour produire le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) (figure 2) (Koppenol *et al.*, 1992). Ces dérivés toxiques de l'oxygène sont libérés par les macrophages au cours du processus inflammatoire (Ischiropoulos *et al.*, 1992 ; Babior, 1995). Le peroxy-nitrite est une molécule hautement oxydante et cytotoxique comparativement au NO (Koppenol *et al.*, 1992 ; Huie et Padmaja, 1993). Il altère la cellule et induit la nécrose via plusieurs mécanismes incluant la peroxydation des membranes lipidiques, la dénaturation des protéines et la déplétion en glutathion (figure 2) (Nathan, 1992 ; Crow et Beckman, 1995 ; Phelps *et al.*, 1995). De plus, le peroxy-nitrite peut aussi casser les brins d'ADN, causant l'activation de l'enzyme nucléaire poly-(ADP-ribose)-synthétase (PARS)

**Figure 2 :** Initiation de la réaction inflammatoire induite par *A. pleuropneumoniae* dans le tissu pulmonaire. Via ses différents facteurs de virulence, *A. pleuropneumoniae* va, dans un premier temps, induire l'activation des macrophages alvéolaires, altérer les pneumocytes et les endothélicytes, ce qui aboutit à la libération de radicaux toxiques dérivés de l'oxygène et de médiateurs de l'inflammation servant de signaux entraînant un afflux massif de PMNs dans le tissu pulmonaire. L'activation de ces PMNs est responsable d'une libération supplémentaire, importante, de dérivés toxiques de l'oxygène et de protéases. La somme de ces composés toxiques induit la nécrose des cellules pulmonaires dont les cellules endothéliales, menant à la formation de microthrombi et d'hémorragies pulmonaires qui seront responsables de ces foyers de nécrose de coagulation typiques de la pleuropneumonie porcine à *A. pleuropneumoniae*. PARS : nucléaire poly (ADP-ribose) synthétase.



qui va entraîner une déplétion en  $\text{NAD}^+$  et en ATP laquelle aboutit au dysfonctionnement et à la mort de nombreux types cellulaires dont les macrophages (Zingarelli *et al.*, 1996). Bien que le NO produit par NOS2 soit un vasodilatateur potentiel et contribue en général à la formation d'œdème durant la phase aiguë de l'inflammation, les niveaux de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$  n'augmentent pas de façon significative au début de l'infection à *A. pleuropneumoniae*. La phase précoce de cette pneumonie, c'est-à-dire trois à six heures après infection, semble être médiée par les eicosanoïdes et non par le NO qui interviendrait plus tard dans la pathogénie (après 12-36h) (Cho et Chae, 2004a).

Au cours de l'infection par *A. pleuropneumoniae*, les cellules épithéliales bronchiques, bronchiolaires, les pneumocytes de type I et les macrophages alvéolaires montrent une activation de l'isoforme COX-2 de la cyclooxygénase (figure 2) (Cho et Chae, 2003d). Elle induit la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine  $\text{PGH}_2$  qui est transformé ensuite par différentes synthases en d'autres prostaglandines ( $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_2$  et  $\text{PGE}_2$ ) et en thromboxane (Chang *et al.*, 1989). La  $\text{PGE}_2$  cause la vasodilatation et augmente la perméabilité vasculaire (figure 2) (Chang *et al.*, 1989 ; Salvemini *et al.*, 1995).

Des cytokines proinflammatoires sont produites par le macrophage alvéolaire intoxiqué (le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et le chémoattractant potentiel des PMNs, l'IL-8) (Lin *et al.*, 1994 ; Baarsch *et al.*, 1995 ; Scamurra *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 1999) ou par les cellules du tissu pulmonaire (pneumocytes et endothéliocytes) (IL-6) (figure 2) (Baarsch *et al.*, 1995). Lorsque des porcs sont infectés par *A. pleuropneumoniae*, la bioactivité de l'IL-1, de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  est augmentée, rapidement et fortement, dans les lavages pulmonaires et le sérum (Baarsch *et al.*, 1995 ; Choi *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 1999 ; Cho et Chae, 2002a). L'hypothèse a été émise que la surproduction de ces cytokines inflammatoires jouait un rôle dans les dommages pulmonaires associés à la pleuropneumonie (Stephens *et al.*, 1988 ; Goldblum *et al.*, 1989). En effet, l'IL-10, qui est une cytokine anti-inflammatoire produite par les cellules T, B, les monocytes et les macrophages et qui généralement supprime les réactions immunes et inflammatoires (Spits et de Waal

Malefyt, 1992 ; Rennick *et al.*, 1997), n'inhibe pas seulement l'expression du TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  directement dans les macrophages alvéolaires mais induit aussi la surexpression d'autres cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-1R des fibroblastes et le sTNF-RI (Hart *et al.*, 1995a ; Hart *et al.*, 1995b ; Thomassen *et al.*, 1996). Les propriétés anti-inflammatoires et immunorégulatrices de l'IL-10 lui confèrent un potentiel thérapeutique dans les maladies caractérisées par une production exubérante de cytokines inflammatoires (Keystone *et al.*, 1998). Dans cette optique, lorsque l'IL-10 recombinante est administrée dans les voies respiratoires de porcs infectés préalablement par *A. pleuropneumoniae*, via un adénovirus de type 5 déficient pour la réplication, une diminution des signes cliniques, des lésions pulmonaires, de l'activité myéloperoxydase et des niveaux de cytokines (IL-1 et TNF- $\alpha$ ) est observée dans les lavages pulmonaires (Morrison *et al.*, 2000). Ces résultats indiquent que l'activation des macrophages, impliquant la surproduction d'IL-1 et de TNF- $\alpha$ , est un facteur important dans le développement et la sévérité des signes cliniques et des lésions (Morrison *et al.*, 2000).

#### 2.4. L'afflux des neutrophiles et des monocytes et l'amplification de la réaction inflammatoire

Tous ces médiateurs de l'inflammation constituent un signal chémoattractant entraînant un appel rapide et massif de PMNs et de monocytes (figure 2) (Chen, 1997). Les PMNs joueraient un rôle dans la limitation de la diffusion de l'agent pathogène à d'autres tissus en tuant 95% des bactéries phagocytées (Crujisen *et al.*, 1992). Cette activité expliquerait que le germe n'atteint habituellement pas les nœuds lymphatiques (van Leengoed et Kamp, 1989). Les PMNs joueraient ainsi un rôle préventif dans l'établissement d'une septicémie et ce, grâce à une activité bactéricide plus grande que celle des macrophages (Sibille et Reynolds, 1990 ; Crujisen *et al.*, 1992). En effet, les PMNs génèrent deux fois plus de superoxyde et libèrent cinq fois plus de peroxyde d'hydrogène que les macrophages, ces produits de l'oxygène exerçant une activité germicide puissante (Reiss et Roos, 1978). Il a par ailleurs été montré qu'à faible concentration, les toxines Apx stimulaient le

métabolisme oxydatif des PMNs sans qu'il soit inhibé par la suite (Dom *et al.*, 1992b). Les monocytes sont également rapidement recrutés dans les zones d'inflammation et de nécrose et leur principal rôle dans la pleuropneumonie semble être l'élimination des débris cellulaires et acellulaires des poumons (figure 2) (Bertram, 1985 ; 1986).

Au contact des facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* et des cytokines inflammatoires dans le tissu pulmonaire, les PMNs et les macrophages vont s'activer. En effet, plusieurs études ont montré que l'expression du NF- $\kappa$ B, de l'IL-1, de l'IL-6, du TNF- $\alpha$ , des enzymes NOS2 et COX-2 est détectée dans les leucocytes alvéolaires dégénérés (« oat cells ») qui bordent les zones de nécrose de coagulation et dans les leucocytes qui se trouvent dans les espaces alvéolaires des zones pulmonaires atteintes (Choi *et al.*, 1999 ; Cho et Chae, 2002a ; 2002b ; 2003b ; 2003d ; 2004a ; 2004b). Les PMNs et les macrophages activés vont libérer les dérivés toxiques de l'oxygène que sont l'anion superoxyde, le NO et le produit de leur combinaison, le peroxyde d'hydrogène, entraînant une forte altération supplémentaire des cellules pulmonaires (Ischiropoulos *et al.*, 1992 ; Babior, 1995 ; Cho et Chae, 2003b). De plus, la dégranulation des PMNs va également aboutir à la libération de protéases qui dénaturent les protéines tissulaires, et de la myéloperoxydase qui transforme le peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux, l'oxydant le plus cytotoxique généré dans l'inflammation neutrophilique (figure 2) (Sibille et Reynolds, 1990).

Enfin, l'activation de la cascade de la coagulation via l'altération des endothéliocytes et l'activation directe du facteur XII par le LPS (Udeze *et al.*, 1987 ; Serebrin *et al.*, 1991) vont mener à la formation de microthrombi, à une ischémie localisée et à une nécrose supplémentaire consécutive à un processus d'infarctus qui provoquera la formation de foyers hémorragiques (figure 2) (Bertram, 1985).

Nous pouvons conclure que dans la pleuropneumonie porcine à *A. pleuropneumoniae* l'amplification de la réaction inflammatoire, entretenue par la bactérie et ses facteurs de virulence, est un véritable cercle vicieux, lequel constitue le processus central de la pathogénèse (Dom *et al.*, 1992a ; Dom *et al.*, 1992b).

### 3. LES SIGNES CLINIQUES

*A. pleuropneumoniae* n'a pas d'autres hôtes naturels que le porc. La bactérie se transmet entre troupeaux, via différents vecteurs (animaux infectés, aérosols contaminés et fomites) et, classiquement, ne survit pas longtemps dans l'environnement (Lechtenberg *et al.*, 1994 ; Torremorell *et al.*, 1997 ; Jobert *et al.*, 2000 ; Hege *et al.*, 2002 ; Velthuis *et al.*, 2003). Toutefois, protégée par de la matière organique (mucus, déjections...), elle peut persister plusieurs jours, semaines, et peut survivre jusqu'à un mois dans de l'eau propre à 4°C (Gottschalk et Taylor, 2006). Le principal mode d'introduction de la pleuropneumonie dans les élevages est en général lié à l'entrée d'animaux apparemment sains qui portent la bactérie dans leur nasopharynx (Sebunya et Saunders, 1983). L'animal sain se contamine par contact direct ou par l'inhalation de gouttelettes sur de courtes distances. En effet, des cultures pures d'*A. pleuropneumoniae* administrées en aérosols, par voie intranasale ou intratrachéale, reproduisent la maladie (Sebunya et Saunders, 1983). Contrairement à *Pasteurella multocida* et *Bordetella bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae* cause souvent la maladie en l'absence de facteur prédisposant. Cependant, des conditions de stress tel que le transport des porcs ou des changements climatiques peuvent être étroitement associées à une flambée épidémique. De plus, la présence de *Mycoplasma hyopneumoniae* dans un élevage augmente le risque d'infections secondaires par d'autres agents pathogènes. Ainsi, les porcs positifs à *M. hyopneumoniae* seraient plus souvent positifs à *A. pleuropneumoniae* que les animaux négatifs à *M. hyopneumoniae* (Young *et al.*, 1983). Dans les climats tempérés, l'incidence saisonnière de la maladie augmente graduellement depuis son nadir en été à un pic en hiver ou au printemps (Sebunya et Saunders, 1983). Il n'y a pas d'association claire connue avec des infections virales prédisposantes mais la bactérie peut coexister au sein de l'appareil respiratoire du porc avec d'autres agents pathogènes (Sakano *et al.*, 1993 ; Narita *et al.*, 1997 ; Pol *et al.*, 1997 ; Gutierrez-Martin *et al.*, 2000). Une fois que l'infection est établie dans le troupeau, il est difficile d'éliminer l'agent infectieux du fait des porteurs subcliniques (ou porteurs sains). Ces derniers ont été infectés

**Figure 3** : Porcs en détresse respiratoire sévère due à une pneumonie aiguë à *A. pleuropneumoniae* (Fenwick, 2008 ; Intervet/Schering Plough Animal Health, sans date).



**Figure 4** : Jetage nasal sanguinolent et hémoptysie chez un porc atteint de la forme aiguë de la pleuropneumonie à *A. pleuropneumoniae* (Intervet/Schering Plough Animal Health, sans date).



par *A. pleuropneumoniae* sans développer de signes cliniques détectables et conservent la bactérie dans leur tractus respiratoire supérieur, et surtout dans les amygdales (Sidibe *et al.*, 1993). Les porteurs chroniques qui ont fait pleinement la maladie, l'hébergent également dans leurs séquestres pulmonaires (Sebunya et Saunders, 1983).

Quatre formes sont classiquement décrites (Nicolet, 1992) : suraiguë, aiguë, subclinique et chronique. Dans la forme **suraiguë**, les porcs sont subitement très atteints avec de la fièvre, de l'apathie et de l'anorexie. Les animaux sont étendus sur le sol sans signes respiratoires avec des troubles circulatoires et cardiaques. La peau du nez, des oreilles, des membres et, plus tard, du corps entier, est cyanosée. Dans la phase terminale, l'animal respire par la bouche, et montre une dyspnée sévère. Assis avec le cou en extension ou couchés, ils respirent difficilement par la bouche (figure 3). Un jetage sanguinolent et de l'hémoptysie peuvent être observés (figure 4).

La ventilation alvéolaire semble se maintenir jusqu'à la fin puisque la tension en CO<sub>2</sub> artériel demeure stable (Kiorpes *et al.*, 1990). La tension artérielle en O<sub>2</sub> et le pH sanguin diminuent dans les heures qui précèdent la mort (Kiorpes *et al.*, 1990). Les changements du leucogramme comprennent une diminution rapide du nombre total des leucocytes dont les PMNs segmentés, les lymphocytes, les monocytes et les éosinophiles (Kiorpes *et al.*, 1990). Peu avant la mort, des décharges sanguinolentes s'écoulent par la bouche et le groin. La mort survient en 24 à 36 heures. La forme suraiguë ressemble donc plutôt à un choc septique (Kiorpes *et al.*, 1990).

Dans la forme **aiguë**, les porcelets montrent de l'anorexie, une fièvre élevée et une respiration abdominale pénible (Liggett *et al.*, 1987 ; van Leengoed et Kamp, 1989). La mortalité s'observe durant les premiers jours de la maladie. La morbidité et la mortalité peuvent toucher respectivement entre 8,5–40 % et 0,4–24 % du troupeau (Sebunya et Saunders, 1983). La

mortalité au sein des animaux malades peut atteindre les 100 % sans thérapie (Sebunya et Saunders, 1983). La durée de la maladie est variable mais elle se termine en général après cinq semaines (Sebunya et Saunders, 1983).

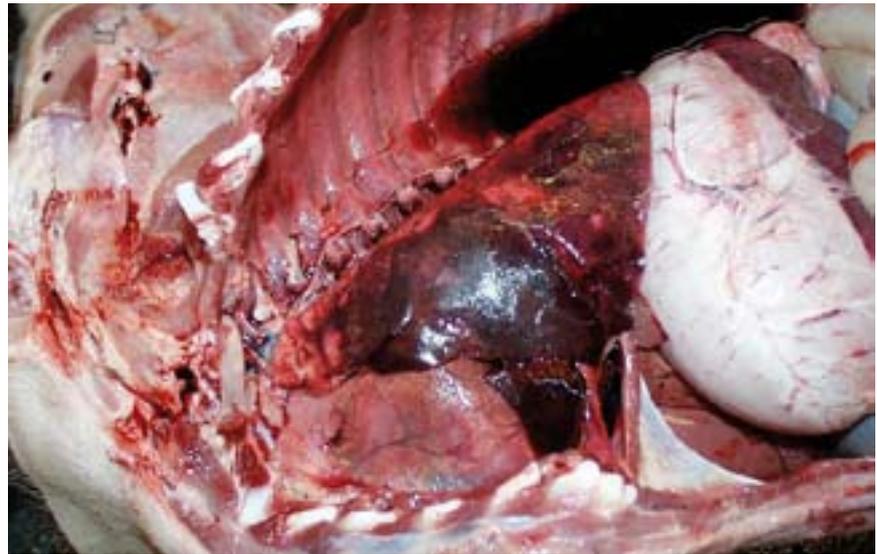
Les animaux qui survivent à la forme aiguë de la maladie vont évoluer vers sa forme **chronique**. Il n'y a pas ou peu de fièvre. Les signes respiratoires sont particulièrement présents : détresse respiratoire et toux. Les animaux sont faibles, montrent peu d'appétit et ont un GQM (Gain Quotidien Moyen) réduit. D'autres complications telles que l'otite, la (poly)arthrite, la péricardite et des abcès dans différents tissus peuvent être observées mais sont rares (Duff *et al.*, 1996 ; Buttenschon *et al.*, 1997 ; Jensen *et al.*, 1999 ; Madsen *et al.*, 2001).

Les épidémies à *A. pleuropneumoniae* sont en général caractérisées par les formes suraiguë et aiguë de la maladie et, bien qu'elles touchent les porcs de tous âges, ceux de deux à six mois sont les plus sensibles (Sebunya et Saunders, 1983 ; Taylor, 1999).

#### 4. LES LÉSIONS MACROSCOPIQUES

Les suivis macroscopique et microscopique de la pleuropneumonie ont été réalisés suite à l'inoculation à des porcs, par voie aérogène, d'une souche du sérotype 5 (tableau 3) (Liggett *et al.*, 1987). La lésion caractéristique est une (pleuro)pneumonie lobaire nécrosante, hémorragique et fibrino purulente qui peut être confondue avec celle causée par *Actinobacillus suis* et, moins fréquemment, par *Salmonella*

**Figure 5 :** La présence d'une pneumonie alvéolaire nécrosante dans les parties dorsales et caudales des poumons et de pleurésie fibrineuse est un élément du diagnostic de la pleuropneumonie à *A. pleuropneumoniae* dans sa forme aiguë. Dans certains cas, la pneumonie alvéolaire est unilatérale (poumon gauche ou droit) (Vyt, 2008).



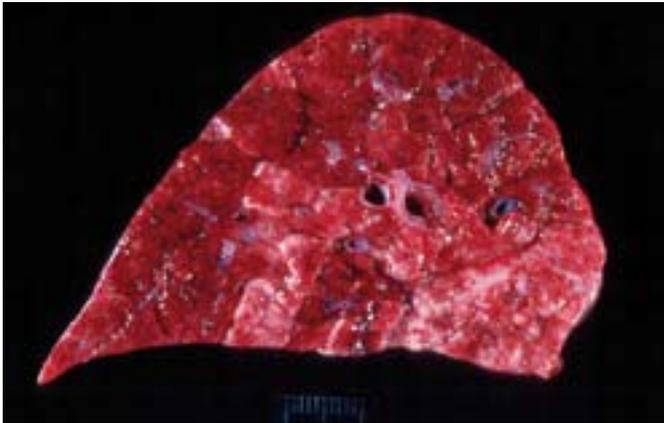
**Figure 6 :** Les lésions induites par *A. pleuropneumoniae* dans la forme aiguë sont rouge foncé, fermes à dures et font protrusion à la surface des poumons (Vyt, 2008).



**Tableau 3 :** Développement des lésions pulmonaires macroscopiques et microscopiques suite à l'inoculation d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Liggett *et al.*, 1987 ; Westfall *et al.*, 1994).

| Temps après inoculation | Lésions macroscopiques  | Lésions microscopiques  |
|-------------------------|---|---|
| 1 heure                 | Pas de lésions  | Pas de lésions  |
| 3-6 heures              | Œdème pulmonaire avec des hémorragies pétéchiales multifocales, bronchiolite et alvéolite diffuse | Bronchiolite et alvéolite neutrophilique  |
| 12-18 heures            | Œdème avec pétéchies et hémorragies lobulaires  | Pneumonie purulonecrosante focale avec pleurésie  |
| 1-2 jours               | Pneumonie lobaire avec pleurésie fibrineuse   | Pleuropneumonie nécrosante aiguë sévère. Zones de nécrose entourées par des bandes denses de leucocytes en dégénérescence (« oat cells ») |
| 4-7 jours               | Abcès pleuraux avec adhérence à la plèvre   | Abcès multiples avec pleurésie fibreuse   |

**Figure 7:** Section dans un poumon de porc à un stade précoce d'infection par *A. pleuropneumoniae* montrant de larges zones de congestion vasculaire, d'œdème et d'hémorragies (Fenwick, 2008).



**Figure 8:** Pleurésie fibrineuse sur la face interne de la cavité thoracique et exsudat sanguinolent dans la forme aiguë de la pleuropneumonie à *A. pleuropneumoniae* (Intervet/Schering Plough Animal Health, sans date).

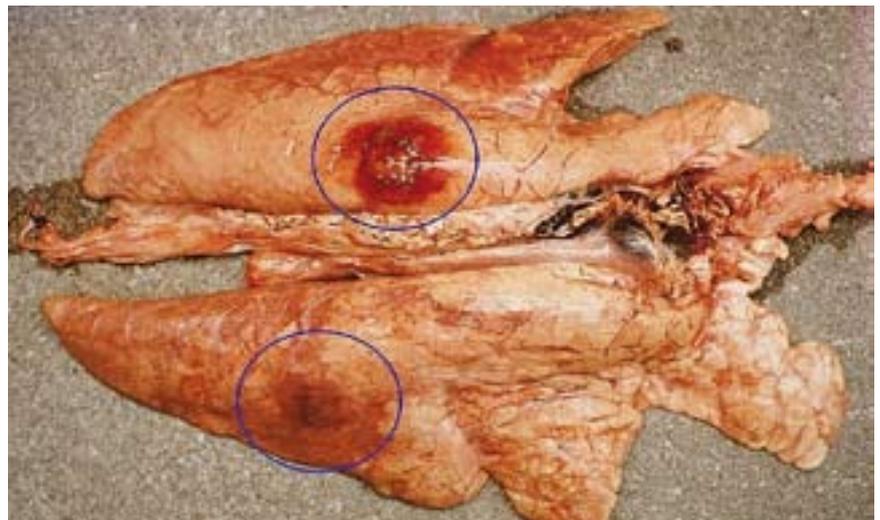


*enterica*.

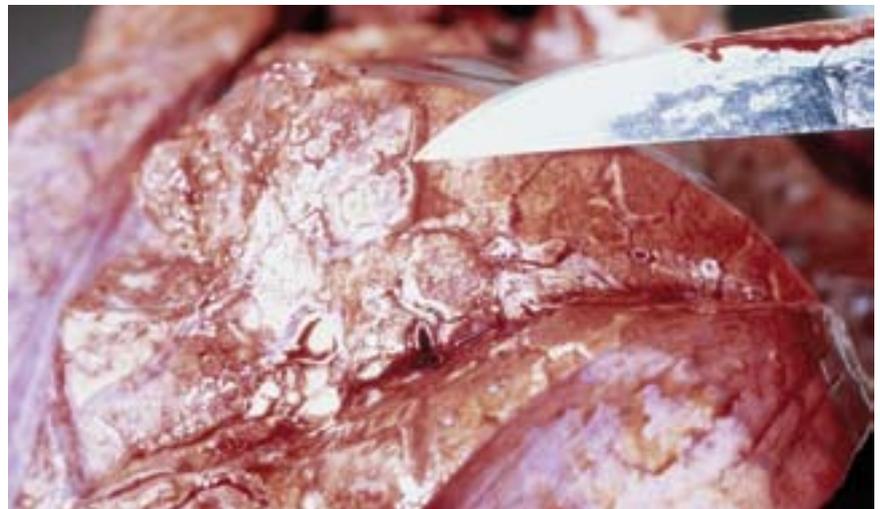
Dans la forme **suraiguë**, les lobules pulmonaires sont démarqués par de larges septa interlobulaires qui sont distendus par de l'œdème (van Leengoed et Kamp, 1989). La forme **aiguë** est caractérisée par une pleuropneumonie fibrinohémorragique à nécrosante qui est le plus souvent bilatérale avec atteinte des lobes apicaux et cardiaques et au moins d'une partie des lobes diaphragmatiques (figure 5) (van Leengoed et Kamp, 1989 ; Taylor, 1999). Les lésions sont rouge foncé, fermes à dures et font protrusion à la surface des poumons (figure 6). À la coupe, elles constituent des foyers de nécrose de coagulation de 1 à 10 cm, friables et dont les contours sont nets et irréguliers (figure 7). Un exsudat jaunâtre fibrineux teinté de sang est présent à la surface de la plèvre (pleurésie) (figure 8). Un fluide sanguinolent peut être présent dans la cavité pleurale (figure 8). La trachée et les bronches peuvent être remplies d'un exsudat muqueux sanguinolent formant de l'écume. Le foie et les reins des porcs sont pâles et montrent des signes de dégénérescence (van Leengoed et Kamp, 1989). Une adénite satellite des ganglions bronchiques est présente, ces derniers étant augmentés en taille, oedémateux et congestionnés (Liggett *et al.*, 1987).

Dans les cas **chroniques**, les animaux qui survivent à l'infection peuvent voir régresser entièrement leurs lésions mais, dans la majorité des cas, celles-ci persistent. Des nodules fermes de différentes tailles sont surtout palpables dans les lobes diaphragmatiques

**Figure 9:** Poumons typiques du stade chronique de la pleuropneumonie porcine à *A. pleuropneumoniae* (Intervet/Schering Plough Animal Health, sans date). Des nodules fermes de différentes tailles (encadrés) correspondent à des séquestres formant de larges foyers de nécrose de coagulation, des zones de fibrose pulmonaire ou des abcès.



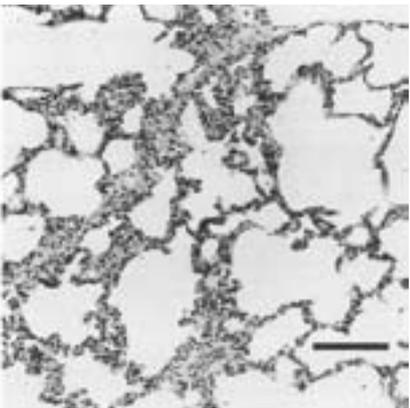
**Figure 10** Abscès dans un poumon dû à une infection chronique à *A. pleuropneumoniae* (Intervet/Schering Plough Animal Health, sans date).



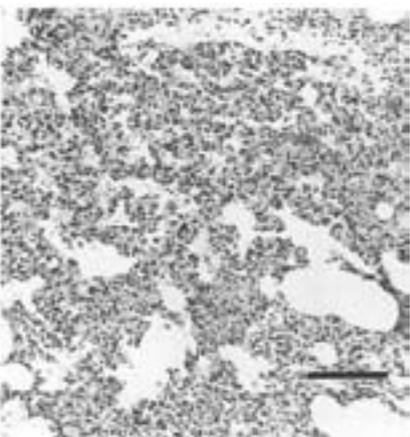
**Figure 11:** Adhérences fibreuses de la plèvre viscérale à la plèvre pariétale dues à une infection chronique à *A. pleuropneumoniae* (Intervet/Schering Plough Animal Health, sans date).



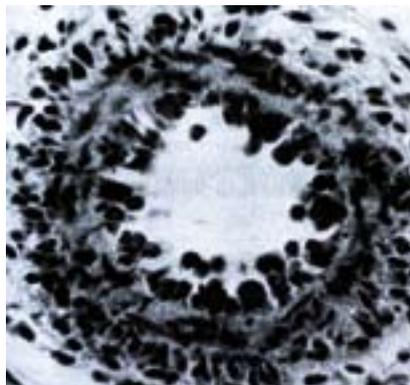
**Figure 12:** Section dans une lésion focale du poumon d'un porc 90 minutes après inoculation du sérotype 2 d'*A. pleuropneumoniae*. Cette zone est caractérisée par un épaissement des septa alvéolaires (Dom *et al.*, 1994a). Barre = 100 µm.



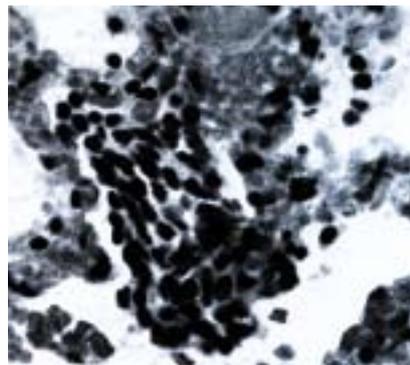
**Figure 13:** Section dans une lésion du poumon d'un porc trois heures après inoculation du sérotype 2 d'*A. pleuropneumoniae*. Les septa alvéolaires sont sévèrement épaissis et les alvéoles contiennent des cellules et de l'exsudat (Dom *et al.*, 1994a). Barre = 100 µm.



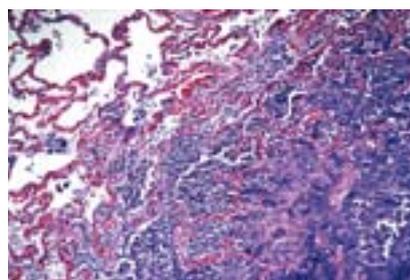
**Figure 14:** Image d'un poumon de porc 12 heures après inoculation du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* (x450) : vasculite sévère (Liggett *et al.*, 1987).



**Figure 15:** Image d'un poumon de porc un jour après inoculation du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* (x575) : masse de cellules dans l'exsudat d'une alvéole. Un vaisseau pulmonaire contient un thrombus de fibrine (Liggett *et al.*, 1987).



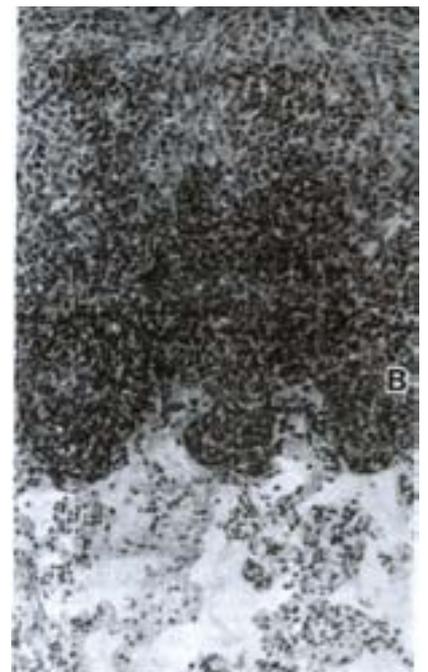
**Figure 16:** Les alvéoles, dont l'épithélium s'est exfolié, sont remplies d'un exsudat contenant de la fibrine, des érythrocytes, des pneumocytes, des macrophages et des PMNs à divers stades de dégénérescence (Fenwick, 2008).



**Figure 17:** Image d'un poumon de porc deux jours après inoculation du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* (x12) : zones irrégulières de nécrose de coagulation encadrées par des bandes denses de cellules inflammatoires (Liggett *et al.*, 1987).



**Figure 18:** Image du poumon d'un porc sept jours après inoculation du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* (x180). La marge d'une zone de nécrose de coagulation révèle trois zones distinctes : une couche externe de granulation (A), une bande médiane de cellules inflammatoires dégénérées (B), et une zone interne de nécrose de coagulation (C) (Liggett *et al.*, 1987).



**Figure 19:** *Actinobacillus pleuropneumoniae* sur gélose au sang supplémentée en β-NAD (incubation 24h à 37°C).



des poumons fermes et pâles (figure 9). Ils correspondent à des séquestres formant de larges foyers de nécrose de coagulation encapsulés et grisâtres, des zones de fibrose pulmonaire ou des abcès (figure 10). Des adhérences de la plèvre à la cavité thoracique, dues à de la fibrose, sont aussi présentes (figure 11).

## 5. LES LÉSIONS MICROSCOPIQUES

Dans la phase **aiguë**, la constitution des lésions est très rapide et se développe selon un processus ressemblant à l'infarctus (Liggett *et al.*, 1987). Elles sont caractérisées par une dégénérescence des cellules épithéliales des alvéoles et un épaississement des septa interalvéolaires dû à la congestion des capillaires, à l'œdème interstitiel et à l'infiltration neutrophilique importante (figures 12 et 13) (Bertram, 1985 ; Liggett *et al.*, 1987 ; Bertram, 1988 ; Ajito *et al.*, 1996). Par la suite, une vasculite nécrosante sévère mène à la formation de thrombi dans les capillaires et à la rupture de la barrière alvéolo-capillaire, ce qui cause des hémorragies pulmonaires (figures 14 et 15) (Rosendal *et al.*, 1985 ; Liggett *et al.*, 1987 ; Bertram, 1988 ; van Leengoed et Kamp, 1989 ; Serebrin *et al.*, 1991). Le parenchyme pulmonaire est infiltré de PMNs et de cellules mononucléées (Bertram, 1988 ; Idris *et al.*, 1993). Les alvéoles, dont l'épithélium s'est exfolié, sont remplies d'un exsudat contenant de la fibrine, des érythrocytes, des pneumocytes, des macrophages et des PMNs à divers stades de dégénérescence (figure 16) (Bertram, 1988 ; van Leengoed et Kamp, 1989 ; Idris *et al.*, 1993 ; Westfall *et al.*, 1994 ; Chen, 1997). Les zones irrégulières de nécrose de coagulation n'adoptent pas la structure anatomique suggérant une origine toxique (figure 17) (Liggett *et al.*, 1987).

En microscopie électronique, les PMNs, les macrophages alvéolaires et les érythrocytes sont les seuls types cellulaires identifiables dans les exsudats alvéolaires et la majorité de ces cellules sont arrondies ou allongées et montrent des signes de dégénérescence sévères (Liggett *et al.*, 1987). Ces cellules sont caractérisées par de la karyolyse, une perte de l'organisation cytoplasmique, des pseudopodes raccourcis ou absents et des ruptures occasionnelles des membranes cellu-

lares (Van Leengoed *et al.*, 1989). Le cytoplasme contient des vésicules claires de taille variable, peu ou pas de lysosomes et peu ou pas d'activité phagocytaire (Liggett *et al.*, 1987 ; Van Leengoed *et al.*, 1989). Quelques cellules contiennent des granules denses de la même densité que les granules neutrophiliques et des PMNs à différents états de dégénérescence sont observés (Liggett *et al.*, 1987). Les sinus des nœuds lymphatiques sont distendus et remplis de PMNs (Liggett *et al.*, 1987).

Enfin, l'inoculation à des souris et des porcs du surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* peut entraîner l'apparition de foyers de nécrose lymphocytaire dans le cortex thymique et dans les follicules ganglionnaires et les manchons périartériolaires spléniques (Stine *et al.*, 1991).

Dans la phase **chronique** de la maladie, les zones coalescentes de nécrose de coagulation caractéristiques de la pleuropneumonie porcine, appelées « séquestres », sont constituées d'une couche externe de granulation, d'une bande intermédiaire de cellules inflammatoires dégénérées au contact du foyer de nécrose, et d'une zone interne de nécrose de coagulation (figure 18) (Sanford et Josephson, 1981 ; Bertram, 1985 ; Liggett *et al.*, 1987 ; Ajito *et al.*, 1996). Des études d'hybridation *in situ* utilisant une sonde d'ADN spécifique des gènes *apxI*, *apxII* et *apxIII*, montrent qu'une grande quantité d'*A. pleuropneumoniae* est phagocytée dans les macrophages et les PMNs des bandes denses encerclant les foyers de nécrose de coagulation (Choi *et al.*, 2001). *A. pleuropneumoniae* peut se retrouver dans les fluides alvéolaires et interlobulaires et peut se disperser du parenchyme pulmonaire à la plèvre et aux ganglions bronchiques, donnant en plus de la pneumonie nécro-hémorragique, de la pleurésie et une lymphadénite bronchique sévère et supprimée.

## 6. LE DIAGNOSTIC

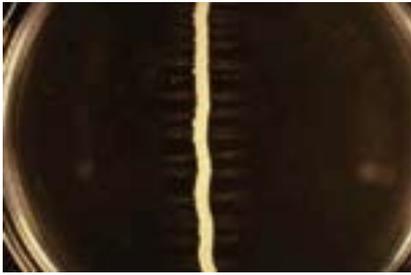
### 6.1. Bactériologique

*A. pleuropneumoniae* peut être isolé à partir des cavités nasales (jetage nasal), des amygdales, de l'oreille moyenne et des poumons de porcs (exsudat bronchique ou lésions), l'isolement pouvant rester infructueux au départ de lésions pulmonaires chroniques (Jacques *et al.*, 1991 ; Dom *et*

*al.*, 1994a) où lorsqu'une antibiothérapie a été mise en place (Jacobsen et Nielsen, 1995). Dans les cas suraigus, la bactérie peut être isolée d'autres organes (septicémie). L'isolement primaire peut se faire sur gélose au sang de mouton (5 %) supplémentée en -NAD (0,01 %) en 1 ou 2 jours (figure 19). Toutefois, l'ajout de -NAD dans la gélose au sang n'est pas nécessaire si une souche *Staphylococcus aureus* ou *intermedius* est inoculée en même temps car ces dernières produisent ce co-facteur qui diffuse dans l'agar. Les souches du biotype 1 (NAD-dépendantes) poussent alors en formant de grandes colonies au voisinage de la souche nourissante (satellitisme) tandis que celles du biotype 2 (NAD-indépendantes) poussent indépendamment (figure 20). En routine, l'identification sur milieu de culture peut être renforcée par la mise en évidence d'une activité uréase, la fermentation du mannitol et la réalisation du test de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) dont le résultat positif consiste en une augmentation de l'hémolyse sur gélose au sang, due à une synergie entre l'hémolysine de l'organisme que l'on teste et la sphingomyélinase de *Staphylococcus aureus* (figure 21) (Perfumo *et al.*, 1983 ; Frey *et al.*, 1989 ; Frey *et al.*, 1994 ; Jansen *et al.*, 1995 ; Schaller *et al.*, 1999). Il faut noter que les quatre toxines Apx d'*A. pleuropneumoniae* donnent un résultat positif au test de CAMP (Perfumo *et al.*, 1983 ; Frey *et al.*, 1994 ; Jansen *et al.*, 1995 ; Schaller *et al.*, 1999). Dans le cas de la contamination du milieu de culture par la flore bactérienne commensale de l'hôte (prélèvements à partir des cavités nasales ou des amygdales) ou par d'autres bactéries pathogènes (surtout *Pasteurella multocida*), des milieux sélectifs peuvent être utilisés (Gilbride et Rosendal, 1983 ; Moller *et al.*, 1993 ; Jacobsen et Nielsen, 1995) mais l'identification visuelle des colonies d'*A. pleuropneumoniae* est moins aisée.

D'autres techniques de diagnostic direct existent : (i) la séparation immunomagnétique où des billes magnétisées sont coatées avec des immunoglobulines (Ig) G spécifiques d'un sérotype d'*A. pleuropneumoniae* (Gagne *et al.*, 1998), (ii) l'agglutination en tube (Gunnarsson *et al.*, 1977 ; Mittal *et al.*, 1982 ; Dubreuil *et al.*, 1996), (iii) l'agglutination sur lame (Mittal *et al.*, 1982 ; Mittal *et*

**Figure 20 :** Satellitisme d'une souche dépendante du  $\beta$ -NAD (biotype 1) d'*A. pleuropneumoniae* (colonies horizontales) avec *Staphylococcus aureus* (colonies verticales).

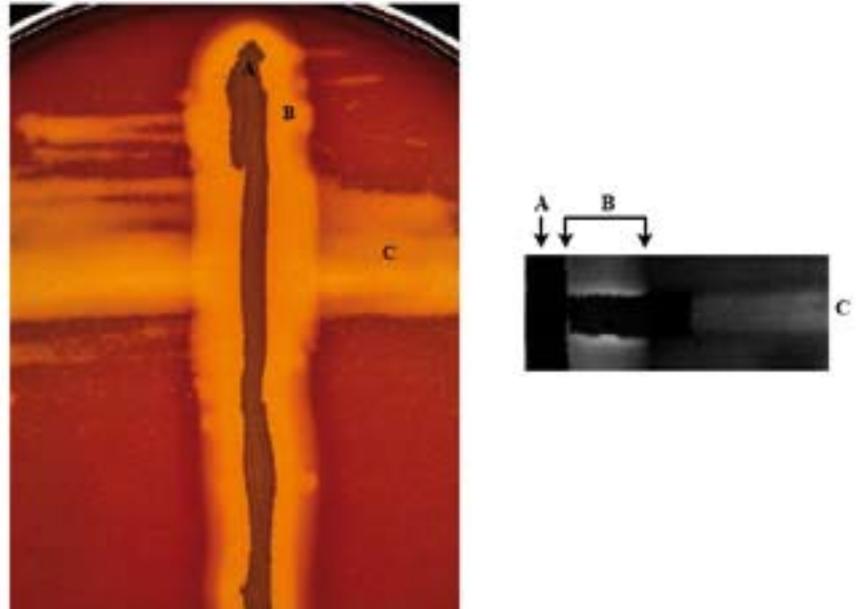


*al.*, 1993b), (iv) l'hémagglutination indirecte (Mittal *et al.*, 1983c ; Mittal *et al.*, 1993b), (v) l'immunodiffusion (Nicolet, 1971 ; Mittal *et al.*, 1993b), (vi) la coagglutination (Mittal *et al.*, 1983a ; 1983b; Mittal *et al.*, 1993b), (vii) l'immunofluorescence (Nicolet, 1971 ; Rosendal *et al.*, 1981), (viii) la précipitation en anneau (Mittal *et al.*, 1982), (ix) la contre-immunoelectrophorèse (Piffer *et al.*, 1986 ; Mittal *et al.*, 1993a ; Mittal *et al.*, 1993b), et (x) la précipitation sur lame (Hommez *et al.*, 1990). L'hybridation *in situ* des gènes *apxIBD*, *apxIICA*, *apxIIICA*, *apxIIIBD* ou *apxIVA* permet la détection des différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* dans les tissus fixés au formol (Choi *et al.*, 2001 ; Cho *et al.*, 2002). Enfin, de nombreuses techniques de PCR alliant rapidité et sensibilité ont été développées mais leur spécificité est variable (tableau 4).

## 6.2. Sérologique

Les tests de fixation du complément ont l'avantage d'une bonne spécificité mais ils sont peu sensibles, lourds à mettre en œuvre et difficiles à standardiser (Lombin *et al.*, 1982 ; Hoffman, 1989 ; Euzéby, 1998). Plus récemment, de nombreux tests ELISA basés sur les polysaccharides ou les toxines Apx ont été développés (tableau 5). Les anticorps circulant peuvent être détectés environ 10-14 jours après l'infection, avec un pic à 4-6 semaines et le maintien pendant plusieurs mois d'une faible immunoglobulinémie (Euzéby, 1998). La spécificité des tests ELISA est variable. Ils se basent surtout sur les antigènes O lipopolysaccharidiques et K capsulaires. Or, il a été démontré, au moins pour l'antigène O, qu'il pouvait exister une variabilité entre sérotypes mais aussi au sein d'une classe sérotypique pouvant mener à la détection

**Figure 21 :** Test de CAMP sur gélose au sang dont le résultat positif correspond à une augmentation de l'hémolyse dans la zone où les colonies d'*A. pleuropneumoniae* (horizontales) sont à proximité de celles d'une souche *Staphylococcus aureus* (verticales) (Schaller *et al.*, 1999 ; Fenwick). L'augmentation de l'activité hémolytique résulte de la synergie entre l'hémolysine d'*A. pleuropneumoniae* et la sphingomyélinase du staphylocoque. A. *Staphylococcus aureus* ; B. Zone de diffusion de la sphingomyélinase ; C. *A. pleuropneumoniae*.



de faux-négatifs (Saito *et al.*, 1992 ; Stenbaek et Hovind-Haugen, 1996 ; Jacques *et al.*, 2005). Des réactions croisées sont décrites entre les sérotypes 3, 6 et 8, entre les sérotypes 1, 9 et 11 et entre les sérotypes 4 et 7 (Euzéby, 1998 ; Klausen *et al.*, 2001 ; 2002). De plus, la présence de toxines Apx et de protéines d'autres *Pasteurellaceae* porcines (*A. suis*, *A. rossii*, *A. seminis* et *Pasteurella aerogenes*) qui montrent une réaction immunologique croisée avec leurs homologues d'*A. pleuropneumoniae*, peut interférer avec le diagnostic sérologique de la pleuropneumonie porcine (Bosse *et al.*, 1990 ; Van Ostaaijen *et al.*, 1997 ; Lebrun *et al.*, 1999 ; Schaller *et al.*, 2000). Ainsi, il a été démontré que des sera provenant de porcs sains vis-à-vis de l'actinobacillose réagissaient fréquemment et fortement vis à vis des toxines ApxIA, ApxIIA et ApxIIIA purifiées (Schaller *et al.*, 2000 ; Dreyfus *et al.*, 2004). Par ailleurs, dans les cas de portage et d'infection subclinique, la sensibilité n'est pas toujours bonne car la synthèse d'anticorps n'est pas suffisante pour être détectée (Euzéby, 1998).

Pratiquement, la majorité des tests ELISA sont du type LPS (chaînes longues, « LC ») mais des ELISA basés sur les toxines Apx existent aussi

(tableau 5). L'ELISA ApxIVA a l'avantage de détecter tous les sérotypes car cette toxine est produite par toutes les souches d'*A. pleuropneumoniae* et de permettre la distinction des animaux vaccinés avec les vaccins sous-unitaires ne contenant pas cette valence. La nécessité d'utilisation d'un test ELISA du type LPS-LC ou ApxIVA pour l'identification d'*A. pleuropneumoniae* dépend de la situation (Gottschalk *et al.*, 2005) (tableau 6).

En conclusion, en cas d'apparition d'une épidémie, la réalisation d'une autopsie des porcs atteints et d'un isolement bactérien (satellitisme) à partir des lésions permettra d'identifier l'agent pathogène tandis que la réalisation consécutive d'un antibiogramme donnera les informations nécessaires à la mise en place d'une antibiothérapie efficace. Une identification biochimique plus poussée peut être obtenue en réalisant un test de CAMP ou une étude de l'activité uréase. Par la suite, le sérotypage confirmera l'identité d'*A. pleuropneumoniae*. Enfin, pour les isolats qui ne parviennent pas à être typés, il est alors recommandé de réaliser un test PCR. Dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la maladie, les tests sérologiques sont utilisés mais donnent parfois des résultats ambigus.

**Tableau 4 :** Différentes techniques de PCR mises en place pour le diagnostic direct d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

| Type de PCR   | Gène(s) cible(s)   | Spécificité du diagnostic  | Références                                |
|---------------|--|--|---|
| PCR-RFLP      | <i>tbpA</i> et <i>tbpB</i>                                 | Différencie de <i>Haemophilus parasuis</i> et <i>A. suis</i> , distingue 10 groupes différents pour <i>A. pleuropneumoniae</i> | de la Puente-Redondo <i>et al.</i> , 2000 |
| PCR-RFLP      | <i>apxIVA</i>  | Méthode utile comme outil de diagnostic additionnel au sérotypage  | Turni et Blackall, 2007                   |
| PCR-RFLP      | <i>apxIVA</i> et ribotypage                                | Les isolats montrant une réaction croisée S9, 11 et/ou 1 ne sont différenciés par aucune de ces méthodes                       | Jaglic <i>et al.</i> , 2004               |
| PCR           | <i>apxIVA</i> et séquençage ADN <sub>r</sub> 16S           | Permet la distinction entre <i>A. pleuropneumoniae</i> et <i>A. minor</i> , <i>A. porcinus</i> et <i>Pasteurella</i> sp.       | da Costa <i>et al.</i> , 2004             |
| Multiplex-PCR | <i>apxIVA</i> et ARN <sub>r</sub> 16S                      | Différencie de <i>A. lignieresii</i> , permet de faire le diagnostic avec de faibles quantités d' <i>A. pleuropneumoniae</i>   | Li <i>et al.</i> , 2005                   |
| Multiplex-PCR | <i>cps</i>   | Permet la distinction de S1, 2 et 8  | Schuchert <i>et al.</i> , 2004            |
| Multiplex-PCR | <i>cps</i> et <i>omlA</i>                                  | Identification spécifique d' <i>A. pleuropneumoniae</i> et différenciation de S2, 5 et 6                                       | Jessing <i>et al.</i> , 2003              |
| PCR           | <i>cps2AB</i>  | Permet le diagnostic spécifique du S2 d' <i>A. pleuropneumoniae</i>  | Hussy <i>et al.</i> , 2004                |
| PCR           | <i>cps</i>   | Hautement sensible pour le diagnostic de <i>A. pleuropneumoniae</i>  | Klein <i>et al.</i> , 2003                |
| Multiplex-PCR | <i>apxI</i> , <i>apxII</i> , <i>apxIII</i> et <i>apxIV</i> | Ne permet pas de distinguer le S2 du 8, le S5a du 5b et le S9 du 11  | Sthitmatee <i>et al.</i> , 2003           |
| PCR-RFLP      | <i>omlA</i>  | Différenciation des 12 sérotypes d' <i>A. pleuropneumoniae</i> à l'exception des groupes (1, 9 et 11) et (2 et 8)              | Cho et Chae, 2003c                        |
| PCR           | <i>omlA</i>  | Amplification région conservée du gène et diagnostic d'espèce d' <i>A. pleuropneumoniae</i>                                    | Gram et Ahrens, 1998                      |
| PCR           | <i>dsbE-like</i>   | Diagnostic d' <i>A. pleuropneumoniae</i> mais réaction avec <i>A. lignieresii</i>  | Chiers <i>et al.</i> , 2001               |
| PCR           | <i>apxIVA</i>  | Permet le diagnostic spécifique d' <i>A. pleuropneumoniae</i>  | Schaller <i>et al.</i> , 2001             |
| PCR           | <i>omlA</i> , <i>apx</i>                                   | Permet la distinction de la majorité des sérotypes du biotype 1 sauf les groupes (1, 9 et 11) et (2 et 8)                      | Gram <i>et al.</i> , 2000                 |
| PCR           | <i>aroA</i>  | Diagnostic d' <i>Actinobacillus</i> mais pas de différenciation des sérotypes  | Hernanz Moral <i>et al.</i> , 1999        |

PCR : polymerase chain reaction, RFLP : restriction fragment length polymorphism, S : sérotype.

**Tableau 5 :** Techniques ELISA mises en place pour le diagnostic indirect d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

| Type d'ELISA                         | Cible antigénique                      | Réaction croisée   | sensibilité                 | spécificité                 | Références                           |
|--------------------------------------|--|--|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| ELISA                                | LPS S1                                 | S9 et 11   | 0.81                        | 0.99                        | Radacovici <i>et al.</i> , 1994      |
| ELISA bloquant (Ac mono anti-LPS S2) | LPS S2                                 | non  | 1.0                         | 0.99                        | Stenbaek et Schirmer, 1994           |
| ELISA                                | LPS S5                                 | -  | 0.79                        | 0.97                        | Gottschalk <i>et al.</i> , 1994      |
| ELISA                                | LPS et CP S5b (L20)                    | S7, 12   | 1.0                         | 0.98                        | Klausen <i>et al.</i> , 2002         |
| ELISA                                | Antigènes S2, S3 et S9                 | non  | -                           | -                           | Maes <i>et al.</i> , 2001            |
| ELISA bloquant (Ac poly anti S6)     | LPS S6                                 | S3 et 8  | 1.0                         | 0.97                        | Klausen <i>et al.</i> , 2001         |
| ELISA                                | LPS S7                                 | -  | -                           | -                           | Klausen <i>et al.</i> , 2007         |
| ELISA bloquant (Ac poly anti S12)    | LPS S12                                | non  | 0.77                        | 1.0                         | Andresen <i>et al.</i> , 2002        |
| ELISA                                | LPS et CP S1, 5 et 7                   | -  | 0.96                        | 0.99                        | Bosse <i>et al.</i> , 1993           |
| ELISA                                | CP S1, 5 et 7                          | non  | 1.94 (S1 et 7)<br>0.87 (S5) | 1.94 (S1 et 5)<br>0.94 (S7) | Inzana et Fenwick, 2001              |
| ELISA                                | LPS et molécules > 50 kDa S2, 6 et 12  | S8   | 0.98                        | 0.95                        | Grondahl-Hansen <i>et al.</i> , 2003 |
| ELISA                                | ApxIA, -IIA, -IIIA                     | Tous   | -                           | -                           | Nielsen <i>et al.</i> , 2000         |
| ELISA                                | ApxIIA S1                              | Tous sauf S10  | 0.98                        | 0.9                         | Ma et Inzana, 1990                   |
| ELISA                                | ApxIIA                                 | Tous sauf S10  | -                           | -                           | Leiner <i>et al.</i> , 1999          |
| ELISA                                | Partie N-terminale ApxIVA recombinante | Tous (ne réagit pas aux porcs vaccinés par <i>porcilis APP</i> ) | 1.0                         | 0.94                        | Dreyfus <i>et al.</i> , 2004         |

Ac : anticorps, CP : capsule polysaccharidique, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, LPS : lipopolysaccharide, S : sérotype.

Lors de telles situations, l'isolement bactérien et la PCR sont recommandés afin d'établir précisément la présence ou l'absence de la bactérie (Broes *et al.*, 2007). Il convient de souligner que des souches virulentes du bio-

type 2 semblent émerger et que les laboratoires de diagnostic ne doivent donc plus seulement rechercher les souches « classiques » du biotype 1 (Gottschalk *et al.*, 2005).

## 7. LE TRAITEMENT

Les traitements sont uniquement efficaces dans la phase initiale de la maladie étant donné la rapidité du développement des lésions. Comme les

**Tableau 6 :** Utilisation des tests ELISA LPS-LC et ApxIVA (Gottschalck *et al.*, 2005).

| Situation   | ELISA LC-LPS | Commentaires   | ELISA ApxIVA | Commentaires  |
|---|--------------|--|--------------|---|
| <b>Diagnostic de l'infection à <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (présence de signes cliniques)</b>                              | Oui          | Dans le cas où on procède à l'isolement (fortement recommandé), la sérologie n'est pas nécessaire. Cependant, dans les rares cas où l'isolement n'est pas disponible, la sérologie pourrait confirmer que le problème est App en utilisant 2 prélèvements sanguins à 3-4 semaines d'intervalle. Par contre, il faudrait tester plusieurs sérotypes pour avoir une confirmation (très onéreux). | Oui          | Ne permet pas de préciser les sérotypes présents dans l'élevage. Cependant, dans les rares cas où l'isolement n'est pas disponible, il pourrait confirmer que le problème est App en utilisant 2 prélèvements sanguins à 3-4 semaines d'intervalle. |
| <b>Diagnostic de l'infection à <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (absence de signes cliniques; surveillance épidémiologique)</b> | Oui          | Il faut cibler les sérotypes importants (exemple sérotypes 2 et 9/11 en France)  | Non          | La présence fréquente de sérotypes «non pathogènes» complique le diagnostic   |
| <b>Surveillance des troupeaux réputés négatifs à tous les sérotypes</b>   | Oui (mais)   | Très onéreux, car il faut plusieurs tests pour chaque sérum; de plus, le test n'est pas disponible pour tous les sérotypes   | Oui (mais)   | Principale indication de ce test; il devrait cependant être validé au préalable sur un nombre suffisant de troupeaux et d'animaux   |
| <b>Réponse sérologique à la vaccination (bactérines)</b>  | Oui          | Certains vaccins n'induisent toutefois qu'une faible réponse sérologique avec ce test.   | Non          | Les bactérines n'induisent pas d'anticorps contre apxIV.  |
| <b>Réponse sérologique à la vaccination (vaccins sous-unitaires à base de toxines)</b>  | Non          | Ce test ne détecte pas les anticorps dirigés contre les toxines.   | Non          | Les vaccins sous-unitaires actuels commercialisés ne contiennent pas de toxine ApxIV.   |
| <b>Interférence des anticorps maternels à la vaccination (bactérines)</b>   | Oui          | Le sérotype doit être ciblé.   | ?            | Pas assez de données disponibles  |
| <b>Interférence des anticorps maternels à la vaccination (vaccins sous-unitaires à base de toxines)</b>                               | Non          | L'ELISA LPS ne détecte pas les anticorps dirigés contre les toxines  | ?            | Pas assez de données publiques disponibles  |
| <b>Programme d'éradication</b>  | Oui (mais)   | On doit cibler le (ou les) sérotype(s) concerné(s)   | Oui (mais)   | Il n'est pas possible de cibler un (ou plusieurs) sérotype(s)   |

App : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, LPS-LC : lipopolysaccharides à chaîne longue.

animaux malades consomment peu d'eau et d'aliments, il est indispensable d'administrer le traitement par injection. Les antibiotiques qui peuvent être utilisés sont les céphalosporines (ceftiofur), les fluoroquinolones (danofloxacin et enrofloxacin), le florphénicol, l'amoxicilline, la pénicilline et l'ampicilline, l'association triméthoprim/sulfamidé, la tétracycline, la doxycycline, la tiamuline, mais aussi l'association lincomycine/spectinomycine et la gentamicine (Dom *et al.*, 1994c ; Ueda et Suenaga, 1995 ; Burton *et al.*, 1996 ; Salmon *et al.*, 1996 ; Bousquet *et al.*, 1997 ; Norcia *et al.*, 1999 ; Wallgren *et al.*, 1999a ; 1999b; Stipkovits *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2002a ; Tanigawa et Sawada, 2002 ; Yoshimura *et al.*, 2002 ; Shin *et al.*, 2005a). Ces antimicrobiens réduisent le taux de mortalité et permettent de récupérer un gain de poids

mais ils ne suppriment pas le portage (Fittipaldi *et al.*, 2005).

D'autres analyses, visant à suivre biochimiquement l'effet du traitement antimicrobien, ont été proposées tel que le dosage de biomarqueurs. En effet, la pleuropneumonie à *A. pleuropneumoniae* entraîne une augmentation des protéines plasmatiques CRP (*C-Reactive Protein*), IL-6, SAA (*Serum Amyloid A*) et haptoglobine tandis qu'elle diminue le zinc plasmatique, l'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol (Heegaard *et al.*, 1998 ; Hulten *et al.*, 2003 ; Lauritzen *et al.*, 2003). Dès lors, un traitement antibiotique réduisant efficacement l'infection, réduira aussi potentiellement la durée des réponses de ces marqueurs (Hulten *et al.*, 2003).

L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire (Spits et de Waal Malefyt, 1992 ;

Rennick *et al.*, 1997), a été utilisée à titre thérapeutique dans le cadre de la pleuropneumonie à *A. pleuropneumoniae* et a donné des résultats intéressants, montrant que l'exacerbation de la réaction inflammatoire via les macrophages et les PMNs activés au sein du poumon infecté jouait un rôle important dans le développement de la maladie (Morrison *et al.*, 2000). En effet, comme exposé dans le chapitre sur l'initiation de la réaction inflammatoire, l'administration intratrachéale de cette cytokine recombinante, intégrée dans un adénovirus, à des porcs infectés au préalable par *A. pleuropneumoniae*, a diminué les signes cliniques, les lésions pulmonaires et la réaction inflammatoire au sein des poumons (Morrison *et al.*, 2000).

## 8. LA PROPHYLAXIE

La prophylaxie passe par : (i) le contrôle des facteurs environnementaux (densité de population, aération, propreté, stress, température...) ; (ii) la mise en quarantaine des nouveaux porcs et la réalisation de tests de diagnostic (combinaison de l'isolement, de la sérologie et de la PCR) avant leur entrée dans l'exploitation afin d'éviter l'introduction de porteurs sains (Broes *et al.*, 2007) ; (iii) la vaccination des porcs indemnes ; et enfin, (iv) la mise en place d'un système de production avec des unités séparées dans les maternités et du « *all-in/all-out* » dans les unités d'engraissement.

Des antibiotiques ont été utilisés en prévention (oxytétracycline, doxycycline, florfenicol, enrofloxacin, tilmicosine, triméthoprim-sulfamidé et amoxicilline) afin d'éliminer, ou au moins de réduire, la charge en *A. pleuropneumoniae* dans l'élevage. Cette approche avait aussi pour but de diminuer les risques de transmission et d'atténuer les signes cliniques lors du développement de l'infection (Nicolet, 1992 ; Hunneman *et al.*, 1994 ; Ueda *et al.*, 1995 ; Moore *et al.*, 1996 ; Wallgren *et al.*, 1999a ; Luque *et al.*, 2000 ; Mengelers *et al.*, 2000 ; Palacios-Arriaga *et al.*, 2000 ; Shryock *et al.*, 2002 ; Tanigawa et Sawada, 2002 ; Herradora et Martinez-Gamba, 2003 ; Paradis *et al.*, 2004 ; Fittipaldi *et al.*, 2005). Cependant, elle n'est plus à conseiller car, en plus des problèmes de temps d'attente et de résidus qu'elle pose, elle a abouti au développement d'antibiorésistances multiples, limitant fortement les gains de cette pratique (Wasteson *et al.*, 1996 ; Aarestrup et Jensen, 1999 ; Ito *et al.*, 2004 ; Blanco *et al.*, 2007 ; Matter *et al.*, 2007).

La répartition géographique de ces antibiorésistances varie en fonction du mode d'utilisation des antibiotiques et de la capacité des bactéries à acquérir des facteurs de résistance, notamment à la tétracycline, la pénicilline, l'ampicilline, l'association triméthoprim-sulfamidé, la tiamuline, la tilmicosine, l'acide nalidixique, le chloramphenicol, la flumequine, la streptomycine et l'érythromycine (Dom *et al.*, 1994c ; Wasteson *et al.*, 1996 ; Chang *et al.*, 2002b ; Gutierrez-Martin *et al.*, 2006 ; Matter *et al.*, 2007). Des gènes plasmidiques de résistance aux sulfamidés (*sul2*), à la tétracycline (*tet(B)* et *tet(H)*) et à l'ampicilline (*bla(ROB-1)*) ont été mis en évidence (Kawahara *et al.*, 1990 ; Juteau *et al.*, 1991 ; Chang *et*

*al.*, 1992 ; Chang *et al.*, 2002b ; Matter *et al.*, 2007). De même, des plasmides de résistance à la streptomycine-sulfamidé (pMS260) (Ito *et al.*, 2004) et à la tétracycline (p9956, p12494, p11745, p9555) ont été retrouvés récemment dans des isolats cliniques d'*A. pleuropneumoniae* (Blanco *et al.*, 2006 ; 2007). Ces plasmides ont en général une structure modulaire comprenant des gènes impliqués dans la mobilisation, la résistance à l'antibiotique et la réplication (Blanco *et al.*, 2006 ; 2007).

L'utilisation d'antibiotiques et de la vaccination dans le contrôle de la maladie sont coûteuses, le meilleur moyen pour éradiquer l'organisme étant la dépopulation totale et la repopulation avec des animaux indemnes (Taylor, 1999 ; Stark *et al.*, 2007). L'immunité colostrale (IgG) peut perdurer jusqu'à huit semaines dans le sérum et les fluides de lavage bronchoalvéolaire, et ne semble pas contrarier le développement d'une réponse immune primaire spécifique par les porcelets (Vigre *et al.*, 2003 ; Krejci *et al.*, 2005). Les porcs qui survivent à l'infection par un sérotype d'*A. pleuropneumoniae* sont protégés d'une réinfection par une souche homologue mais ne sont protégés que partiellement contre l'infection par les souches hétérologues et ne sont donc pas à l'abri d'une nouvelle atteinte (Crujisen *et al.*, 1995).

Les trois types de stratégies vaccinales sont étudiées : les vaccins inactivés, sous-unitaires et atténués (Bei *et al.*, 2005). De nombreux essais ont été réalisés afin de produire un vaccin efficace mais, jusqu'à présent, ceux mis en place n'apportent qu'une protection partielle en réduisant la mortalité et la morbidité. D'autre part, malgré leur utilisation, les porcs qui survivent à l'infection restent porteurs asymptomatiques et continuent à disséminer la bactérie. Enfin, une vaccination efficace contre cette pleuropneumonie n'est pas évidente du fait de l'existence de 15 sérotypes différents et du manque de réaction croisée entre bactéries. Les stratégies vaccinales développées s'orientent donc vers l'utilisation d'un immunogène efficace et commun à tous les sérotypes.

### 8.1. Les vaccins inactivés

Du fait du manque de réaction croisée entre les différents sérotypes, les vaccins inactivés ne confèrent qu'une protection limitée, restreinte aux séroty-

pes dont les antigènes sont inclus dans la préparation vaccinale (Tarasiuk *et al.*, 1994). Plusieurs stratégies de mise au point ont été menées, jouant sur les conditions de culture des bactéries introduites dans le vaccin, le type d'inactivation ou encore la voie d'administration.

Les conditions de culture sont importantes puisque l'inoculation de bactéries provenant du sérotype 2 d'*A. pleuropneumoniae*, cultivé en conditions restreintes en  $\beta$ -NAD (haute capacité d'adhérence à des cultures de cellules épithéliales alvéolaires), a un impact plus important sur la diminution des lésions et de la charge bactérienne pulmonaire que des bactéries issues de la même souche mais cultivée dans des conditions enrichies en  $\beta$ -NAD (faible capacité d'adhérence aux cellules épithéliales alvéolaires) (van Overbeke *et al.*, 2003).

Le type d'inactivation a également un impact sur l'immunité mise en place par le vaccin puisque des porcs immunisés par aérosol avec des fantômes (enveloppes bactériennes) d'*A. pleuropneumoniae* inactivés soit génétiquement, soit par irradiation, développent une réponse immune locale différente (Katinger *et al.*, 1999). Toutefois, dans les deux cas, une réponse IgG spécifique, un influx net de plasmocytes et de lymphocytes et une protection contre l'inoculation par aérosol d'une souche homologue se produisent (Katinger *et al.*, 1999). Des porcs immunisés avec des enveloppes cellulaires vides d'*A. pleuropneumoniae*, obtenues via l'expression d'un gène lytique mis en œuvre par un bactériophage, ou via des bactéries inactivées au formol sont, quant à eux, protégés des signes cliniques de la maladie (Hensel *et al.*, 2000 ; Huter *et al.*, 2000). Toutefois, seuls les porcs vaccinés par les fantômes bactériens voient la colonisation de leurs poumons entravée (Hensel *et al.*, 2000 ; Huter *et al.*, 2000). L'avantage de ce type de vaccin réside dans le fait que, contrairement aux bactéries tuées au formol, ces fantômes bactériens ne subissent pas d'étapes dénaturantes durant leur production et sont potentiellement plus immunogènes. Enfin, la vaccination orale des porcs, sur base de multiples administrations de microsphères sur lesquelles sont fixés des antigènes du sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*, inactivé au formol, a donné une meilleure protection que la vaccination intramusculaire avec ce même sérotype adjuvé avec de

l'hydroxyde d'aluminium (Liao *et al.*, 2003).

## 8.2. Les vaccins sous-unitaires

Plusieurs molécules d'*A. pleuropneumoniae* ont été étudiées du point de vue de leur immunogénicité afin de les intégrer dans des vaccins sous-unitaires, seules ou en association : les toxines Apx (Devenish *et al.*, 1990 ; Haga *et al.*, 1997 ; Van Overbeke *et al.*, 2001 ; Burdychova *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2006 ; Mei *et al.*, 2006 ; Yan *et al.*, 2006), des protéines de membrane externe (Gerlach *et al.*, 1993 ; Bunka *et al.*, 1995 ; Van Overbeke *et al.*, 2001 ; van den Bosch et Frey, 2003) et des antigènes polysaccharidiques (Andresen *et al.*, 1997 ; Rioux *et al.*, 1997 ; Rioux *et al.*, 1998). Si plusieurs de ces antigènes sont conservés entre les différentes souches, ils devraient théoriquement générer une protection contre tous les sérotypes s'ils sont associés dans la préparation vaccinale. Ainsi, un vaccin commercialisé contenant les valences ApxIA, -IIA, IIIA et une protéine de membrane externe, devrait donner une protection relative contre l'infection par tous les sérotypes. Cependant, il a récemment été montré qu'un vaccin de ce genre ne donnait pas de protection contre le sérotype 15 d'*A. pleuropneumoniae*, peut-être du fait de différences significatives entre la toxine ApxIIIA du sérotype 15 et du vaccin (Tumamao *et al.*, 2004a ; 2004b).

Du fait que la toxine ApxIIA est quasiment ubiquitaire parmi les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (excepté le sérotype 10), elle est une cible privilégiée tant pour le diagnostic que pour la vaccination (Wang *et al.*, 2007). Une équipe a eu l'idée originale de développer un tabac transgénique exprimant ApxIIA et de l'utiliser lyophilisé en administration orale afin d'étudier la réponse sérologique à l'égard de cette toxine dans le sang de souris. L'expérience montra une augmentation des IgG anti-ApxIIA et la mise en place d'une protection immune des souris à l'encontre d'une injection d'une dose létale d'*A. pleuropneumoniae* (Lee *et al.*, 2006). Une autre équipe a obtenu le même résultat en administrant à des souris (via la nourriture) une souche de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant ApxIIA (Shin *et al.*, 2005b).

Quant à l'utilisation de protéines de la membrane externe pour la réalisa-

tion de vaccins sous-unitaires, il a été démontré que la vaccination des porcs avec le surnageant de culture d'*A. pleuropneumoniae* traité au déoxycholate de sodium, enrichi en lipoprotéines du type TbpB (*Transferrin-Binding Protein B*), confère une forte réponse en anticorps et diminue les signes cliniques et les lésions associées (Goethe *et al.*, 2000). Une autre équipe a mis en évidence le développement d'une réponse immune relative de la muqueuse respiratoire (IgA) et systémique (IgG) conférée par l'inoculation intratrachéale à des porcelets de TbpB recombinante associée à du chitosan comme adjuvant (Kim *et al.*, 2007). Maas et ses collaborateurs (2006a) ont développé un vaccin DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) utilisant des protéines de membrane externe comme valences vaccinales et la toxine ApxIIA, présente dans 14 des 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Les sérotypes 1, 2 et 5 furent délétés pour la toxine ApxIIA et leurs protéines de membrane externe, récupérées par lavage des bactéries avec un détergent, furent utilisées comme antigènes pour immuniser des porcs par voie intramusculaire. Tous ceux-ci développèrent une forte réponse humorale aux antigènes vaccinaux et ne montrèrent pas de réactivité dans un test ELISA ApxIIA permettant la distinction entre animaux infectés et vaccinés (Maas *et al.*, 2006a). Ces porcs immunisés sont protégés des symptômes cliniques lorsqu'ils sont inoculés avec une souche homologue (sérotype 2) ou une souche hétérologue (sérotype 9). La colonisation de la souche inoculée est quant à elle réduite mais pas abolie (Maas *et al.*, 2006a).

Enfin, l'utilisation de molécules bactériennes comme valences vaccinales dans le but d'apporter une protection immunitaire à l'animal ne donne pas toujours le résultat escompté. En effet, van den Bosch et Frey (2003) montrèrent que des porcs immunisés avec la protéine de membrane externe PalA d'*A. pleuropneumoniae* ont développé des signes respiratoires plus sévères et un taux de mortalité plus élevé que des porcs vaccinés avec des toxoïdes d'ApxIA et ApxIIA et que, lorsque les trois valences étaient associées lors de l'immunisation, l'effet protecteur normalement apporté par les toxines ApxIA et -IIA était aboli (van den Bosch et Frey, 2003).

## 8.3. Les vaccins vivants atténués

L'avantage de ces vaccins est qu'ils fournissent, en général, une meilleure réponse immunitaire et une meilleure protection que les vaccins inactivés et sous-unitaires puisque la grande majorité des immunogènes bactériens, non dénaturés, sont présents. Par contre, les risques dans l'utilisation d'une souche vivante atténuée pour la vaccination sont de reproduire la maladie de façon atténuée chez l'animal vacciné et/ou de ne pas contrôler la réversion de la souche atténuée en une souche virulente et la dissémination de cette dernière (Inzana *et al.*, 1993).

La souche d'*A. pleuropneumoniae* du sérotype 7 présente un intérêt d'un point de vue de la réalisation d'un vaccin atténué car elle ne possède que la toxine ApxIIA. Ainsi, une souche mutante du sérotype 7, HB04C(-)  $\Delta$ apxIIC, a donné des taux de protection immunitaire significatifs contre l'infection par des souches homologues et hétérologues d'*A. pleuropneumoniae* lorsqu'elle a été inoculée par voie intranasale ou intramusculaire à des porcs (Bei *et al.*, 2005 ; 2007). Prideaux et collaborateurs ont également obtenu une protection des souris et des porcs lors d'une inoculation homo- et hétérologue, vaccinés au préalable par voie intranasale par une autre souche du sérotype 7 (HS93), mutée pour *apxIIC* et produisant la toxine ApxIIA inactivée (Prideaux *et al.*, 1998 ; 1999). Elle a donc été choisie par cette équipe comme candidate à la production d'un vaccin atténué. Récemment, il a été montré qu'un double mutant  $\Delta$ apxIIC $\Delta$ apxIVA, moins virulent que sa souche parentale HB04C(-), gardait son immunogénicité et conférait aux porcs des niveaux de protection immunitaire similaires par rapport à une souche standard pleinement virulente du sérotype 1 (Liu *et al.*, 2007). Les résultats de leur étude de virulence tendent à montrer que ApxIVA serait un facteur de virulence important mais pas nécessaire pour une vaccination efficace (Liu *et al.*, 2007). De plus, ce double mutant permettrait, sur base de l'expression de la toxine ApxIVA, une différenciation sérologique entre les animaux vaccinés et infectés (Liu *et al.*, 2007). Cette même équipe a étudié un autre candidat à la production d'un vaccin vivant atténué : la souche SLW03 du sérotype 1, délétée pour les gènes *apxIC* et *apxIIC*, capable de sécréter les toxines ApxIA et ApxIIA non activées (Lin *et al.*, 2007). Cette souche, ne produisant pas

d'effets toxiques sur des porcs jusqu'à des doses de  $10^9$  CFU (*Colony Forming Unit*)/mL, fut capable d'induire une réponse immune significative et de fournir une protection clinique complète (meilleure par voie intranasale que par voie intramusculaire) contre l'inoculation de souches homologues et hétérologues (sérotypage 9) d'*A. pleuropneumoniae* (Lin *et al.*, 2007). Une autre équipe développa un vaccin vivant atténué sur base d'une souche mutante du sérotypage 10 de référence (D13039), possédant une délétion correspondant à la partie C-terminale de la toxine ApxIA et l'insertion d'une cassette de gènes de résistance au chloramphénicol (Xu *et al.*, 2006). Cette souche mutante produit la partie N-terminale de ApxIA (48 kDa), n'exerce aucune activité hémolytique et est moins virulente que sa souche parentale. Des porcs vaccinés par voie intranasale par ce mutant développent une réaction sérologique significative et montrent une diminution des signes cliniques et du score lésionnel pulmonaire lorsqu'ils sont inoculés avec les sérotypes 1 ou 2, ce qui suggère une protection immunitaire croisée relative (Xu *et al.*, 2006). Tonpitak et collaborateurs (2002) ont proposé l'utilisation d'un vaccin vivant atténué marqué basé sur une souche du sérotypage 2 mutée pour les gènes *apxIIA* et *ureC*, permettant donc de différencier, du fait de la non production de la toxine ApxIIA, les porcs vaccinés non-infectés des porcs infectés et porteurs asymptomatiques (Tonpitak *et al.*, 2002). Ce double mutant, administré par aérosol, protège les porcs de l'inoculation d'une souche homologue (Tonpitak *et al.*, 2002) mais est encore capable de produire une maladie cliniquement explicite dans une petite fraction des porcs. Par la suite, Maas et collaborateurs (2006) ont repris ce double mutant et y ont introduit des délétions successives dans des gènes de virulence (Maas *et al.*, 2006b) : les gènes *dmsA*, *hybB* et *aspA*, codant pour trois enzymes impliquées dans la respiration anaérobie et le gène *fur* régulateur de l'acquisition du fer. Ce nouveau mutant hautement atténué est encore capable de coloniser le tractus respiratoire profond, évoque une réponse immune significative et, administré une seule fois en aérosol, fournit une protection contre les symptômes cliniques lors de l'infection par une souche hétérologue du sérotypage 9 (Maas *et al.*, 2006b).

## 9. CONCLUSION

La pleuropneumonie porcine à *A. pleuropneumoniae* est une affection majeure, fréquente et répandue mondialement dans les élevages porcins. Elle est responsable de pertes économiques conséquentes et d'un usage intensif d'antibiotiques. L'étude des facteurs de virulence de la bactérie et une meilleure compréhension des mécanismes de défense mis en place par l'hôte au cours de la maladie sont donc d'une importance majeure pour l'établissement d'une thérapie et d'une prophylaxie optimales. Les armes les plus destructrices d'*A. pleuropneumoniae* sont ses exotoxines Apx car, à elles seules, elles parviennent à reproduire la maladie et les lésions. Les LPS semblent également jouer un rôle dans la pathogenèse, mais de moindre importance. Ils vont contribuer à la colonisation de l'hôte, à l'altération de sa clairance respiratoire, à l'initiation et à l'amplification de la réaction inflammatoire, concrétisée par un afflux continu de neutrophiles et de macrophages dans les poumons. Il est reconnu que l'exacerbation du processus inflammatoire, entretenue par la bactérie et ses facteurs de virulence, constitue un véritable cercle vicieux qui est au centre de la pathogenèse. Le diagnostic de la pleuropneumonie à *A. pleuropneumoniae* passe par la caractérisation des lésions nécropsiques et l'isolement de la bactérie à partir de celles-ci (satellisme, test de CAMP). La sérologie (ELISA) permet alors d'identifier la souche responsable mais dans les cas litigieux, le diagnostic doit être complété par la mise en place d'un test PCR. À côté du traitement classique de l'antibiothérapie prenant en compte les antibiorésistances, de nouvelles pistes thérapeutiques visent à inhiber l'inflammation paroxystique en utilisant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10. Toutefois, lorsque l'élevage est touché par la maladie, la dépopulation totale suivie d'une période de vide sanitaire reste le moyen le plus efficace de s'en débarrasser. Enfin, plus importantes en soi que le traitement curatif, les mesures prophylactiques classiques passent par (i) le contrôle des facteurs environnementaux, (ii) la mise en quarantaine des nouveaux porcs et la réalisation de tests de diagnostic (sérologie, isolement et PCR) avant introduction, (iii) la vaccination des porcs indemnes, et enfin (iv) la mise en place d'un système de pro-

duction avec des unités séparées dans les maternités et du « all-in/all-out » dans les unités d'engraissement. Ces mesures se renforceront par l'optimisation des tests de diagnostic (ELISA et PCR) et par l'élaboration de nouvelles stratégies vaccinales.

**Title : *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathogenesis, diagnostic, treatment and prophylaxy**

### Summary

Porcine pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a frequent and highly infectious disease generating significant economic losses related to deficiency in zootechnical profits and intensive use of antibiotics. The purpose of this review is to describe the various stages of pathogenesis: colonisation of the host respiratory tract, deterioration of respiratory clearance mechanisms, initiation and exacerbated amplification of the inflammatory reaction which plays a central role in the development of the pulmonary lesions. The clinical signs, and the macroscopic and microscopic lesions associated to the various pleuropneumonia forms are pointed out and the recent diagnostic, medical and prophylactic advances are approached.

## BIBLIOGRAPHIE

- AARESTRUP F.M., JENSEN N.E. Susceptibility testing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. Evaluation of three different media of MIC-determinations and tablet diffusion tests. *Vet. Microbiol.*, 1999, **64**, 299-305.
- AJITO T., HAGA Y., HOMMA S., GORYO M., OKADA K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.*, 1996, **58**, 297-303.
- ANDRESEN L.O., JACOBSEN M.J., NIELSEN J.P. Experimental vaccination of pigs with an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5b capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate. *Acta Vet. Scand.*, 1997, **38**, 283-293.
- ANDRESEN L.O., KLAUSEN J., BARFOD K., SORENSEN V. Detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 12 in pig serum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.*, 2002, **89**, 61-67.
- BAARSCH M.J., SCAMURRA R.W., BURGER K., FOSS D.L., MAHESWARAN S.K., MURTAUGH M.P. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 3587-3594.
- BABIOR B.M. The respiratory burst oxidase. *Curr. Opin. Hematol.*, 1995, **2**, 55-60.
- BECK M., VAN DEN BOSCH J.F., JONGENELEN I.M., LOEFFEN P.L., NIELSEN R., NICOLET J., FREY J. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 2749-2754.
- BEI W., HE Q., YAN L., FANG L., TAN Y., XIAO S., ZHOU R., JIN M., GUO A., LV J., HUANG H., CHEN H. Construction and characterization of a live, attenuated *apxIIICA* inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking a drug resistance marker. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **243**, 21-27.
- BEI W., HE Q., ZHOU R., YAN L., HUANG H., CHEN H. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* HB04C(-) mutant lacking a drug resistance marker in the pigs. *Vet. Microbiol.*, 2007, **125**, 120-127.
- BELANGER M., RIOUX S., FOIRY B., JACQUES M. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, **76**, 119-125.
- BELANGER M., DUBREUIL D., JACQUES M. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 868-873.
- BENDIXEN P.H., SHEWEN P.E., ROSENDAL S., WILKIE B.N. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *Infect. Immun.*, 1981, **33**, 673-676.
- BERTRAM T.A. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.*, 1985, **22**, 598-609.
- BERTRAM T.A. Intravascular macrophages in lungs of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.*, 1986, **23**, 681-691.
- BERTRAM T.A. Pathobiology of Acute Pulmonary Lesions in Swine Infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.*, 1988, **29**, 574-577.
- BESKOW P., NORQVIST M., WALLGREN P. Relationships between selected climatic factors in fattening units and their influence on the development of respiratory diseases in swine. *Acta Vet. Scand.*, 1998, **39**, 49-60.
- BILINSKI T. Oxygen toxicity and microbial evolution. *Biosystems*, 1991, **24**, 305-312.
- BLACKALL P.J., BOWLES R., PAHOFF J.L., SMITH B.N. Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in 1993 to 1996. *Aust. Vet. J.*, 1999, **77**, 39-43.
- BLANCO M., GUTIERREZ-MARTIN C.B., RODRIGUEZ-FERRI E.F., ROBERTS M.C., NAVAS J. Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, **50**, 702-708.
- BLANCO M., KADLEC K., GUTIERREZ MARTIN C.B., DE LA FUENTE A.J., SCHWARZ S., NAVAS J. Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene *tet(H)*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, **60**, 864-867.
- BOEKEMA B.K., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., SMITH H.E., KAMP E.M., VAN PUTTEN J.P., VERHEIJDEN J.H. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet. Microbiol.*, 2003, **93**, 133-144.
- BOSSE J.T., JOHNSON R.P., ROSENDAL S. 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.*, 1990, **54**, 427-431.
- BOSSE J.T., FRIENDSHIP R., ROSENDAL S., FENWICK B.W. Development and evaluation of a mixed-antigen ELISA for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 5, and 7 infections in commercial swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 359-362.
- BOSSE J.T., MACINNES J.I. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can. J. Vet. Res.*, 2000, **64**, 145-150.

- BOSSE J.T., JANSON H., SHEEHAN B.J., BEDDEK A.J., RYCROFT A.N., KROLL J.S., LANGFORD P.R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.*, 2002, **4**, 225-235.
- BOUSQUET E., MORVAN H., AITKEN I., MORGAN J.H. Comparative in vitro activity of doxycycline and oxytetracycline against porcine respiratory pathogens. *Vet. Rec.*, 1997, **141**, 37-40.
- BROES A., MARTINEAU G.-P., GOTTSCHALK M. Dealing with unexpected *Actinobacillus pleuropneumoniae* serological results. *J. Swine Health Prod.*, 2007, **15**, 264-269.
- BUNKA S., CHRISTENSEN C., POTTER A.A., WILLSON P.J., GERLACH G.F. Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 2797-2800.
- BURDYCHOVA R., RYCHTERA M., HORVATH R., DENDIS M., BARTOS M. Expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* gene coding for Apx I protein in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, **230**, 9-12.
- BURTON P.J., THORNSBERRY C., CHEUNG YEE Y., WATTS J.L., YANCEY R.J., JR. Interpretive criteria for antimicrobial susceptibility testing of ceftiofur against bacteria associated with swine respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1996, **8**, 464-468.
- BUTTENSCHON J., FRIIS N.F., AALBAEK B., JENSEN T.K., IBURG T., MOUSING J. Microbiology and pathology of fibrinous pericarditis in Danish slaughter pigs. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 1997, **44**, 271-280.
- CHANG C.F., CHANG L.C., CHANG Y.F., CHEN M., CHIANG T.S. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis* recovered from Taiwanese swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2002a, **14**, 153-157.
- CHANG C.F., YEH T.M., CHOU C.C., CHANG Y.F., CHIANG T.S. Antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Taiwan. *Vet. Microbiol.*, 2002b, **84**, 169-177.
- CHANG S.W., WESTCOTT J.Y., PICKETT W.C., MURPHY R.C., VOELKEL N.F. Endotoxin-induced lung injury in rats: role of eicosanoids. *J. Appl. Physiol.*, 1989, **66**, 2407-2418.
- CHANG Y.F., SHI J., SHIN S.J., LEIN D.H. Sequence analysis of the ROB-1 beta-lactamase gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 1992, **32**, 319-325.
- CHEN S.D. Characterization of polymorphic mononuclear cell in porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B*, 1997, **21**, 1-7.
- CHIERS K., HAESBROUCK F., VAN OVERBEKE I., CHARLIER G., DUCATELLE R. Early *in vivo* interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Vet. Microbiol.*, 1999, **68**, 301-306.
- CHIERS K., VAN OVERBEKE I., DONNE E., BAELE M., DUCATELLE R., DE BAERE T., HAESBROUCK F. 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.*, 2001, **83**, 147-159.
- CHO W.S., CHAE C. Expression of the *apxIV* gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.*, 2001, **125**, 34-40.
- CHO W.S., CHOI C., CHAE C. In situ hybridization for the detection of the *apxIV* gene in the lungs of pigs experimentally infected with twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Vet. Res.*, 2002, **33**, 653-660.
- CHO W.S., CHAE C. Expression of nitric oxide synthase 2 and tumor necrosis factor alpha in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.*, 2002a, **39**, 27-32.
- CHO W.S., CHAE C. Immunohistochemical detection and distribution of inducible nitric oxide synthase in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.*, 2002b, **126**, 109-114.
- CHO W.S., CHAE C. *In vitro* effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in porcine alveolar macrophages. *Am. J. Vet. Res.*, 2003a, **64**, 1514-1518.
- CHO W.S., CHAE C. Evidence of nitric oxide synthase 2 activity in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.*, 2003b, **40**, 276-282.
- CHO W.S., CHAE C. Differentiation of twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes by outer membrane lipoprotein gene-based restriction fragment length polymorphism. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2003c, **50**, 90-94.
- CHO W.S., CHAE C. Expression of cyclooxygenase-2 in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.*, 2003d, **40**, 25-31.
- CHO W.S., CHAE C. Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.*, 2004a, **41**, 666-672.
- CHO W.S., CHAE C. Detection of nuclear factor- $\kappa$ B and inducible nitric oxide synthase in the lungs of pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.*, 2004b, **130**, 112-116.
- CHOI C., KWON D., MIN K., CHAE C. *In-situ* hybridization for the detection of inflammatory cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$  and IL-6) in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.*, 1999, **121**, 349-356.
- CHOI C., KWON D., MIN K., CHAE C. Detection and localization of ApxI, -II and -III genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in natural porcine pleuropneumonia in natural porcine pleuropneumonia by *in situ* hybridization. *Vet. Pathol.*, 2001, **38**, 390-395.

- CROW J.P., BECKMAN J.S. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv. Pharmacol.*, 1995, **34**, 17-43.
- CRUIJSEN T., VAN LEENGOED L.A., HAM-HOFFIES M., VERHEIJDEN J.H. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 2341-2343.
- CRUIJSEN T.L., VAN LEENGOED L.A., DEKKER-NOOREN T.C., SCHOEVERS E.J., VERHEIJDEN J.H. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 4867-4871.
- CULLEN J.M., RYCROFT A.N. Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology*, 1994, **140**, 237-244.
- DA COSTA M.M., KLEIN C.S., BALESTRIN R., SCHRANK A., PIFFER I.A., DA SILVA S.C., SCHRANK I.S. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. *Curr. Microbiol.*, 2004, **48**, 189-195.
- DE LA PUENTE-REDONDO V.A., DEL BLANCO N.G., GUTIERREZ-MARTIN C.B., MENDEZ J.N., RODRIQUEZ FERRI E.F. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Res. Microbiol.*, 2000, **151**, 669-681.
- DEVENISH J., ROSENDAL S., BOSSE J.T. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 3829-3832.
- DOM P., HAESEBROUCK F., DE BAETSELIER P. Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *Am. J. Vet. Res.*, 1992a, **53**, 1113-1118.
- DOM P., HAESEBROUCK F., KAMP E.M., SMITS M.A. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolytic toxins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect. Immun.*, 1992b, **60**, 4328-4334.
- DOM P., HAESEBROUCK F. Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 1992, **39**, 303-306.
- DOM P., HAESEBROUCK F., DUCATTELL R., CHARLIER G. In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect. Immun.*, 1994a, **62**, 1262-1267.
- DOM P., HAESEBROUCK F., KAMP E.M., SMITS M.A. NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. *Vet. Microbiol.*, 1994b, **39**, 205-218.
- DOM P., HOMMEZ J., CASTRYCK F., DEVRIESE L.A., HAESEBROUCK F. Serotyping and quantitative determination of in vitro antibiotic susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium (July 1991-August 1992). *Vet. Q.*, 1994c, **16**, 10-13.
- DREYFUS A., SCHALLER A., NIVOLLET S., SEGERS R.P., KOBISCH M., MIELI L., SOERENSEN V., HUSSY D., MISEREZ R., ZIMMERMANN W., INDERBITZIN F., FREY J. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet. Microbiol.*, 2004, **99**, 227-238.
- DUBREUIL J.D., LETELLIER A., STENBAEK E., GOTTSCHALK M. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 strains using a monoclonal-based polystyrene agglutination test. *Can. J. Vet. Res.*, 1996, **60**, 69-71.
- DUBREUIL J.D., JACQUES M., MITTAL K.R., GOTTSCHALK M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim. Health Res. Rev.*, 2000, **1**, 73-93.
- DUFF J.P., SCOTT W.A., WILKES M.K., HUNT B. Otitis in a weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Rec.*, 1996, **139**, 561-563.
- EUZÉBY J.P. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [en ligne] (07/06/1998) Adresse URL : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdict/aa/pleuropneumoniae.html>, consulté le 01/12/2007.
- FALES W.H., MOREHOUSE L.G., MITTAL K.R., BEAN-KNUDSEN C., NELSON S.L., KINTNER L.D., TURK J.R., TURK M.A., BROWN T.P., SHAW D.P. Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1989, **1**, 16-19.
- FENWICK B. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [en ligne] Adresse URL : [http://microgen.ouhsc.edu/a\\_pleuro/a\\_pleuro\\_home.htm](http://microgen.ouhsc.edu/a_pleuro/a_pleuro_home.htm), consulté le 15/05/2008.
- FITTIPALDI N., KLOPFENSTEIN C., GOTTSCHALK M., BROES A., PARADIS M.A., DICK C.P. Assessment of the efficacy of tilmicosin phosphate to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from carrier pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 2005, **69**, 146-150.
- FREY J., PERRIN J., NICOLET J. Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 2050-2056.
- FREY J., BOSSE J.T., CHANG Y.F., CULLEN J.M., FENWICK B., GERLACH G.F., GYGI D., HAESEBROUCK F., INZANA T.J., JANSEN R., ET AL. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytic toxins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, **139**, 1723-1728.

- FREY J., KUHN R., NICOLET J. Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, **124**, 245-251.
- FREY J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.*, 1995, **3**, 257-261.
- FUKUYASU T., SAITO K., ASHIDA K. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs with pneumonia. *J. Jpn Vet. Med. Assoc.*, 1996, **49**, 528-532.
- FULLER T.E., MARTIN S., TEEL J.F., ALANIZ G.R., KENNEDY M.J., LOWERY D.E. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb. Pathog.*, 2000, **29**, 39-51.
- GAGNE A., LACOUTURE S., BROES A., D'ALLAIRE S., GOTTSCHALK M. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 251-254.
- GERLACH G.F., ANDERSON C., KLASHINSKY S., ROSSI-CAMPOS A., POTTER A.A., WILLSON P.J. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 565-572.
- GILBRIDE K.A., ROSENDAL S. Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.*, 1983, **47**, 445-450.
- GOETHE R., GONZALES O.F., LINDNER T., GERLACH G.F. A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine*, 2000, **19**, 966-975.
- GOLDBLUM S.E., HENNIG B., JAY M., YONEDA K., MCCLAIN C.J. Tumor necrosis factor alpha-induced pulmonary vascular endothelial injury. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 1218-1226.
- GOTTSCHALK M., DE LASALLE F., RADACOVICI S., DUBREUIL J.D. Evaluation of long chain lipopolysaccharides (LC-LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.*, 1994, **38**, 315-327.
- GOTTSCHALK M., MORVAN H., BROES A., DESROSIERS R., KOBISCH M. Actualités sur la pleuropneumonie porcine. *Journées Recherche Porcine*, 2005, **37**, 341-346.
- GOTTSCHALK M., TAYLOR D.J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In : Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds), Diseases of swine. 9th ed. Blackwell: Ames, 2006, 563-576.
- GRAM T., AHRENS P. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 443-448.
- GRAM T., AHRENS P., ANDREASEN M., NIELSEN J.P. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes--evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet. Microbiol.*, 2000, **75**, 43-57.
- GRONDAHL-HANSEN J., BARFOD K., KLAUSEN J., ANDRESEN L.O., HEEGAARD P.M., SORENSEN V. Development and evaluation of a mixed long-chain lipopolysaccharide based ELISA for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 6 and 12 in pig herds. *Vet. Microbiol.*, 2003, **96**, 41-51.
- GUNNARSSON A., BIBERSTEIN E.L., HURVELL B. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus paraahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.*, 1977, **38**, 1111-1114.
- GUTIERREZ C.B., RODRIGUEZ BARBOSA J.I., TASCÓN R.I., COSTA L., RIERA P., RODRIGUEZ FERRI E.F. Serological characterisation and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Spain. *Vet. Rec.*, 1995, **137**, 62-64.
- GUTIERREZ-MARTIN C.B., RODRIGUEZ-DELGADO O., ALVAREZ-NISTAL D., DE LA PUENTE-REDONDO V.A., GARCIA-RIOJA F., MARTIN-VICENTE J., RODRIGUEZ FERRI E.F. Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS, Aujeszky's disease and influenza viruses in Spanish finishing pigs. *Res. Vet. Sci.*, 2000, **68**, 9-13.
- GUTIERREZ-MARTIN C.B., DEL BLANCO N.G., BLANCO M., NAVAS J., RODRIGUEZ-FERRI E.F. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Vet. Microbiol.*, 2006, **115**, 218-222.
- HAGA Y., OGINO S., OHASHI S., AJITO T., HASHIMOTO K., SAWADA T. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *J. Vet. Med. Sci.*, 1997, **59**, 115-120.
- HAMER-BARRERA R., GODINEZ D., ENRIQUEZ V.I., VACA-PACHECO S., MARTINEZ-ZUNIGA R., TALAMAS-ROHANA P., SUAREZ-GUEMEZ F., DE LA GARZA M. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Can. J. Vet. Res.*, 2004, **68**, 33-41.
- HART P.H., AHERN M.J., SMITH M.D., FINLAY-JONES J.J. Comparison of the suppressive effects of interleukin-10 and interleukin-4 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. *Immunology*, 1995a, **84**, 536-542.
- HART P.H., JONES C.A., FINLAY-JONES J.J. Monocytes cultured in cytokine-defined environments differ from freshly isolated monocytes in their responses to IL-4 and IL-10. *J. Leukoc. Biol.*, 1995b, **57**, 909-918.
- HEEGAARD P.M., KLAUSEN J., NIELSEN J.P., GONZALEZ-RAMON N., PINEIRO M., LAMPREAVE F., ALAVA M.A. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 1998, **119**, 365-373.
- HEGE R., ZIMMERMANN W., SCHEIDEGGER R., STARK K.D. Incidence of reinfections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig farms located in respiratory-disease-free regions of Switzerland: identification and quantification of risk factors. *Acta Vet. Scand.*, 2002, **43**, 145-156.
- HENSEL A., HUTER V., KATINGER A., RAZA P., STRNISTSCHIE C., ROESLER U., BRAND E., LUBITZ W. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. *Vaccine*, 2000, **18**, 2945-2955.
- HERNANZ MORAL C., CASCON SORIANO A., SANCHEZ SALAZAR M., YUGUEROS MARCOS J., SUAREZ RAMOS S., NAHARRO CARRASCO G. Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 1575-1578.
- HERRADORA L.M., MARTINEZ-GAMBA R. Effect of oral enrofloxacin and florfenicol on pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2003, **50**, 259-263.
- HOFFMAN L.J. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*: use of coagglutination and complement fixation to determine the relationship between presence of organism and antibody titer in slaughterhouse pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1989, **1**, 12-15.
- HOMMEZ J., DEVRIESE L.A., CASTRYCK F., CASSIMON P. Slide precipitation: a simple method to type *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 1990, **24**, 123-126.
- HUANG H., POTTER A.A., CAMPOS M., LEIGHTON F.A., WILLSON P.J., HAINES D.M., YATES W.D. Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*, part II: roles of proinflammatory cytokines. *Can. J. Vet. Res.*, 1999, **63**, 69-78.
- HUANG H., ZHOU R., FAN H., DAN H., CHEN M., YAN L., BEI W., CHEN H. Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Immunol.*, 2006, **43**, 2130-2134.
- HUIE R.E., PADMAJA S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.*, 1993, **18**, 195-199.
- HULTEN C., JOHANSSON E., FOSSUM C., WALLGREN P. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2003, **95**, 75-89.
- HUNNEMAN W.A., PIJERS A., LOMMERSE J., CRAUWELS A.P., VERHEIJDEN J.H. Prophylaxis of pleuropneumonia in pigs by in-feed medication with oxytetracycline and the subsequent transmission of infection. *Vet. Rec.*, 1994, **134**, 215-218.
- HUSSY D., SCHLATTER Y., MISEREZ R., INZANA T., FREY J. PCR-based identification of serotype 2 isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars I and II. *Vet. Microbiol.*, 2004, **99**, 307-310.
- HUTER V., HENSEL A., BRAND E., LUBITZ W. Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine. *J. Biotechnol.*, 2000, **83**, 161-172.
- IDRIS U.E., HARMON B.G., UDEZE F.A., KADIS S. Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide. *Vet. Pathol.*, 1993, **30**, 234-241.
- INTERVET/SCHERING PLOUGH ANIMAL HEALTH Porcine pleuropneumonia. (sans date) [en ligne] Adresse URL : <http://www.respig.com/diseases/app.asp>, consulté le 15/05/2008.
- INZANA T.J., MA J., WORKMAN T., GOGOLEWSKI R.P., ANDERSON P. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 1880-1889.
- INZANA T.J., TODD J., VEIT H.P. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 1682-1686.
- INZANA T.J., FENWICK B. Serologic detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine by capsular polysaccharide-biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 1279-1282.
- ISCHIROPOULOS H., ZHU L., CHEN J., TSAI M., MARTIN J.C., SMITH C.D., BECKMAN J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **298**, 431-437.
- ITO H., ISHII H., AKIBA M. Analysis of the complete nucleotide sequence of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* streptomycin-sulfonamide resistance plasmid, pMS260. *Plasmid*, 2004, **51**, 41-47.
- JACOBSEN M.J., NIELSEN J.P. Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils. *Vet. Microbiol.*, 1995, **47**, 191-197.
- JACQUES M., FOIRY B., HIGGINS R., MITTAL K.R. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 1988, **170**, 3314-3318.
- JACQUES M., BELANGER M., ROY G., FOIRY B. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet. Microbiol.*, 1991, **27**, 133-143.
- JACQUES M., LABRIE J., ST MICHAEL F., COX A.D., PARADIS M.A., DICK C.P., KLOPFENSTEIN C., BROES A., FITTIPALDI N., GOTTSCHALK M. Isolation of an atypical strain of

- Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 with a truncated lipopolysaccharide outer core and no O-antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 3522-3525.
- JAGLIC Z., SVASTOVA P., RYCHLIK I., NEDBALCOVA K., KUCEROVA Z., PAVLIK I., BARTOS M. Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR-REA based on sequence variability of the *apxIVA* gene and by ribotyping. *Vet. Microbiol.*, 2004, **103**, 63-69.
- JANSEN R., BRIAIRE J., KAMP E.M., GIELKENS A.L., SMITS M.A. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995, **126**, 139-143.
- JENSEN A.E., BERTRAM T.A. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 1986, **51**, 419-424.
- JENSEN T.K., BOYE M., HAGEDORN-OLSEN T., RIISING H.J., ANGEN O. *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent *in situ* hybridization. *Vet. Pathol.*, 1999, **36**, 258-261.
- JESSING S.G., ANGEN O., INZANA T.J. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 4095-4100.
- JOBERT J.L., SAVOYE C., CARIOLET R., KOBISCH M., MADEC F. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 2000, **64**, 21-26.
- JOLIE R.A., MULKS M.H., THACKER B.J. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.*, 1994, **38**, 329-349.
- JUTEAU J.M., SIROIS M., MEDEIROS A.A., LEVESQUE R.C. Molecular distribution of ROB-1 beta-lactamase in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, **35**, 1397-1402.
- KAMP E.M., POPMA J.K., VAN LEENGOED L.A. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: with emphasis on heterogeneity within serotype 1 and (proposed) serotype 9. *Vet. Microbiol.*, 1987, **13**, 249-257.
- KATINGER A., LUBITZ W., SZOSTAK M.P., STADLER M., KLEIN R., INDRA A., HUTER V., HENSEL A. Pigs aerogenously immunized with genetically inactivated (ghosts) or irradiated *Actinobacillus pleuropneumoniae* are protected against a homologous aerosol challenge despite differing in pulmonary cellular and antibody responses. *J. Biotechnol.*, 1999, **73**, 251-260.
- KAWAHARA K., KAWASE H., NAKAI T., KUME K., DANBARA H. Drug resistance plasmids of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 2 strains isolated from swine. *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 1990, **63**, 131-136.
- KEYSTONE E., WHERRY J., GRINT P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1998, **24**, 629-639.
- KIM T.J., KIM K.H., LEE J.I. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against recombinant transferrin-binding protein B of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with chitosan after tracheal administration in piglets. *J. Vet. Med. Sci.*, 2007, **69**, 535-539.
- KIROPES A.L., MACWILLIAMS P.S., SCHENKMAN D.I., BACKSTROM L.R. Blood gas and hematological changes in experimental peracute porcine pleuropneumonia. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, 164-169.
- KLAUSEN J., ANDRESEN L.O., BARFOD K., SORENSEN V. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 6 in pig serum. *Vet. Microbiol.*, 2001, **79**, 11-18.
- KLAUSEN J., ANDRESEN L.O., BARFOD K., SORENSEN V. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 in pig herds. *Vet. Microbiol.*, 2002, **88**, 223-232.
- KLAUSEN J., EKEROTH L., GRONDAHL-HANSEN J., ANDRESEN L.O. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 in pig serum. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2007, **19**, 244-249.
- KLEIN C.S., PIFFER I.A., CERONI DA SILVA S., SCHRANK A., FAVERO M.B., SCHRANK I.S. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR on field strains from healthy and diseased pigs. *Curr. Microbiol.*, 2003, **46**, 443-447.
- KOMAL J.P., MITTAL K.R. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.*, 1990, **25**, 229-240.
- KOPPENOL W.H., MORENO J.J., PRYOR W.A., ISCHIROPOULOS H., BECKMAN J.S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 1992, **5**, 834-842.
- KOYAMA T., TO H., NAGAI S. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15-like strain from a field case of porcine pleuropneumonia in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 2007, **69**, 961-964.
- KREJCI J., NECHVATALOVA K., KUDLACKOVA H., FALDYNA M., KUCEROVA Z., TOMAN M. Systemic and local antibody responses after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in piglets with passive or active immunity. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2005, **52**, 190-196.
- KUCEROVA Z., JAGLIC Z., ONDRIASOVA R., NEDBALCOVA K. Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003-2004. *Vet. Med.*, 2005, **50**, 355-360.
- LANGFORD P.R., LOYNDS B.M., KROLL J.S. Cloning and molecular characterization of

- Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 5035-5041.
- LAURITZEN B., LYKKESFELDT J., SKAANILD M.T., ANGEN O., NIELSEN J.P., FRIIS C. Putative biomarkers for evaluating antibiotic treatment: an experimental model of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Res. Vet. Sci.*, 2003, **74**, 261-270.
- LAUWERYNS J.M., BAERT J.H. Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1977, **115**, 625-683.
- LEBRUN A., LACOUTURE S., COTE D., MITTAL K.R., GOTTSCHALK M. 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.*, 1999, **65**, 271-282.
- LECHTENBERG K.F., SHRYOCK T.R., MOORE G. Characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* seeder pig challenge-exposure model. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1703-1709.
- LEE K.Y., KIM D.H., KANG T.J., KIM J., CHUNG G.H., YOO H.S., ARNTZEN C.J., YANG M.S., JANG Y.S. Induction of protective immune responses against the challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the oral administration of transgenic tobacco plant expressing ApxIIA toxin from the bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006, **48**, 381-389.
- LEINER G., FRANZ B., STRUTZBERG K., GERLACH G.F. A novel enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxII antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999, **6**, 630-632.
- LI S.Q., YI J.P., CHEN Z.F., WANG Q.Q., ZHOU X.H., LUO M.L., FANG Y., CHEN M., XIA Q. [Development and application of multiplex-PCR for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2005, **45**, 966-969.
- LIAO C.W., CHIOU H.Y., YEH K.S., CHEN J.R., WENG C.N. Oral immunization using formalin-inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens entrapped in microspheres with aqueous dispersion polymers prepared using a co-spray drying process. *Prev. Vet. Med.*, 2003, **61**, 1-15.
- LIGGETT A.D., HARRISON L.R., FARRELL R.L. Sequential study of lesion development in experimental *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.*, 1987, **42**, 204-212.
- LIN G., PEARSON A.E., SCAMURRA R.W., ZHOU Y., BAARSCH M.J., WEISS D.J., MURTAUGH M.P. Regulation of interleukin-8 expression in porcine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 77-85.
- LIN L., BEI W., SHA Y., LIU J., GUO Y., LIU W., TU S., HE Q., CHEN H. Construction and immunogenicity of a *DeltaapxIC/DeltaapxIIC* double mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, **274**, 55-62.
- LIU J., CHEN X., LIN L., TAN C., CHEN Y., GUO Y., JIN M., GUO A., BEI W., CHEN H. Potential use an *Actinobacillus pleuropneumoniae* double mutant strain *DeltaapxIICDeltaapxIVA* as live vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, 2007, **25**, 7696-7705.
- LOEFFEN W.L., KAMP E.M., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., VAN NIEUWSTADT A.P., BONGERS J.H., HUNNEMAN W.A., ELBERS A.R., BAARS J., NELL T., VAN ZIJDERVELD F.G. Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 123-129.
- LOMBIN L.H., ROSENDAL S., MITCHELL W.R. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.*, 1982, **46**, 109-114.
- LOSINGER W.C. Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on grower/finisher swine operations in the United States. *Prev. Vet. Med.*, 2005, **68**, 181-193.
- LUQUE I., TARRADAS C., CARRASCO L., TORROELLA E., ARTIGAS C., PEREA A. Effectiveness of doxycycline in the prevention of an experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2000, **47**, 445-451.
- MA J.N., INZANA T.J. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to a 110,000-molecular-weight hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 1356-1361.
- MAAS A., MEENS J., BALTES N., HENNIG-PAUKA I., GERLACH G.F. Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vaccine*, 2006a, **24**, 7226-7237.
- MAAS A., JACOBSEN I.D., MEENS J., GERLACH G.F. Use of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiple mutant as a vaccine that allows differentiation of vaccinated and infected animals. *Infect. Immun.*, 2006b, **74**, 4124-4132.
- MACFADYEN L.P., REDFIELD R.J. Life in mucus: sugar metabolism in *Haemophilus influenzae*. *Res. Microbiol.*, 1996, **147**, 541-551.
- MADSEN L.W., BOYE M., JENSEN T.K., SVENSMARK B. *Actinobacillus pleuropneumoniae* demonstrated *in situ* in exudative meningitis and nephritis. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 746-747.
- MAES D., CHIERS K., HAESEBROUCK F., LAEVENS H., VERDONCK M., DE KRUIF A. Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Vet. Res.*, 2001, **32**, 409-419.
- MAES D.G., CHIERS K., HAESEBROUCK F., LAEVENS H., VERDONCK M., DE KRUIF A. Seroprevalence of

- Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from Belgian fattening farms. *Vet. Rec.*, 2002, **151**, 206-210.
- MATTER D., ROSSANO A., LIMAT S., VORLET-FAWER L., BRODARD I., PERRETEEN V. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitonisillarum*. *Vet. Microbiol.*, 2007, **122**, 146-156.
- MCDOWELL S.W., BALL H.J. Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the British Isles. *Vet. Rec.*, 1994, **134**, 522-523.
- MEI L., ZHOU R., LU H.S., BEI W.C., LIU W.H., LIN L.W., HONG W.Z., CHEN H.C. [Study on immunogenicity of the N-terminal polypeptide of RTX toxin I of *Actinobacillus pleuropneumoniae*]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2006, **22**, 39-45.
- MENGELERS M.J., KUIPER H.A., PIJPERS A., VERHEIJDEN J.H., VAN MIERT A.S. Prevention of pleuropneumonia in pigs by in-feed medication with sulphadimethoxine and sulphamethoxazole in combination with trimethoprim. *Vet. Q.*, 2000, **22**, 157-162.
- MIN K., CHAE C. Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 251-254.
- MITTAL K.R., HIGGINS R., LARIVIERE S. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1982, **15**, 1019-1023.
- MITTAL K.R., HIGGINS R., LARIVIERE S. Detection of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae*-infected pigs by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 1983a, **18**, 1355-1357.
- MITTAL K.R., HIGGINS R., LARIVIERE S. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 1983b, **18**, 1351-1354.
- MITTAL K.R., HIGGINS R., LARIVIERE S. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 1983c, **17**, 787-790.
- MITTAL K.R., HIGGINS R., LARIVIERE S., NADEAU M. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.*, 1992, **32**, 135-148.
- MITTAL K.R., BOURDON S., BERROUARD M. Evaluation of counterimmunoelectrophoresis for serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates and detection of type-specific antigens in lungs of infected pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 1993a, **31**, 2339-2342.
- MITTAL K.R., KAMP E.M., KOBISCH M. Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. *Res. Vet. Sci.*, 1993b, **55**, 179-184.
- MOLLER K., ANDERSEN L.V., CHRISTENSEN G., KILIAN M. Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Vet. Microbiol.*, 1993, **36**, 261-271.
- MOORE G.M., MOWREY D.H., TONKINSON L.V., LECHTENBERG K.F., SCHNEIDER J.H. Efficacy dose determination study of tilmicosin phosphate in feed for control of pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 220-223.
- MORRISON D.F., FOSS D.L., MURTAUGH M.P. Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 4752-4758.
- NARITA M., KAWASHIMA K., MOROZUMI T., TAKASHIMA H. Effect of physical defenses of the respiratory tract on the development of pneumonia in pigs inoculated endobronchially with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.*, 1995, **57**, 839-844.
- NARITA M., KAWASHIMA K., NAKAGAWA H., UCHIMURA A., OHASHI T., KIMURA K., TANIMURA N. Immunohistopathological characterization of pig pneumonia caused by a combined Aujeszky's disease virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *J. Comp. Pathol.*, 1997, **117**, 25-33.
- NATHAN C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb. J.*, 1992, **6**, 3051-3064.
- NICOLET J. [*Haemophilus* infection in pigs. 3. Serological studies on *Haemophilus paraahaemolyticus*]. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1971, **216**, 487-495.
- NICOLET J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In : Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds), Diseases of swine. 7th ed. Wolfe : London, 1992, 401-408.
- NIELSEN R. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes: cross protection experiments. *Nord. Vet. Med.*, 1984, **36**, 221-234.
- NIELSEN R. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.*, 1988, **29**, 580-582.
- NIELSEN R., VAN DEN BOSCH J.F., PLAMBECK T., SORENSEN V., NIELSEN J.P. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2000, **71**, 81-87.
- NORCIA L.J., SILVIA A.M., HAYASHI S.F. Studies on time-kill kinetics of different classes of antibiotics against veterinary pathogenic bacteria including *Pasteurella*, *Actinobacillus* and *Escherichia coli*. *J. Antibiot.*, 1999, **52**, 52-60.
- PABST R. The respiratory immune system of pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1996, **54**, 191-195.
- PALACIOS-ARRIAGA J.M., GUTIERREZ-PABELLO J.A., CHAVEZ-GRIS G., HERNANDEZ-CASTRO R. Efficacy of florphenicol premix in weanling pigs experimentally infected with *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 2000, **42**, 27-33.
- PAMPUSCH M.S., BENNAARS A.M., HARSCH S., MURTAUGH M.P. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **61**, 279-289.
- PARADIS M.A., VESSIE G.H., MERRILL J.K., DICK C.P., MOORE C., CHARBONNEAU G., GOTTSCHALK M., MACINNES J.I., HIGGINS R., MITTAL K.R., GIRARD C., ARAMINI J.J., WILSON J.B. Efficacy of tilmicosin in the control of experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Can. J. Vet. Res.*, 2004, **68**, 7-11.
- PERFUMO C.J., REHBINDER C., KARLSSON K. Swine pleuropneumonia produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. III. An electron microscopic study. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 1983, **30**, 678-684.
- PERRY M.B., ALTMAN E., BRISSON J.R., BEYNON L.M., RICHARDS J.C. Structural characteristics of the antigen capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.*, 1990, **4**, 299-308.
- PHELPS D.T., FERRO T.J., HIGGINS P.J., SHANKAR R., PARKER D.M., JOHNSON A. TNF-alpha induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. *Am. J. Physiol.*, 1995, **269**, L551-559.
- PIFFER I.A., CARTER G.R., BOTOVCHENCO A.A. Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet. Rec.*, 1986, **118**, 292-294.
- PIJOAN C. Effect of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus pleuropneumoniae* toxins on swine alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1986, **13**, 141-149.
- PLAGEMANN P.G. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, **9**, 903-908.
- POL J.M., VAN LEENGOED L.A., STOCKHOFF N., KOK G., WENSVOORT G. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet. Microbiol.*, 1997, **55**, 259-264.
- PRIDEAUX C.T., PIERCE L., KRYWULT J., HODGSON A.L. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr. Microbiol.*, 1998, **37**, 324-332.
- PRIDEAUX C.T., LENGHAUS C., KRYWULT J., HODGSON A.L. 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.*, 1999, **67**, 1962-1966.
- RADACOVICI S., GOTTSCHALK M., DUBREUIL J.D. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotype 1): a readily obtainable antigen for ELISA serodiagnosis of pig pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.*, 1994, **39**, 219-230.
- RAMJEET M., DESLANDES V., ST MICHAEL F., COX A.D., KOBISCH M., GOTTSCHALK M., JACQUES M. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 39104-39114.
- REISS M., ROOS D. Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1978, **61**, 480-488.
- RENNICK D.M., FORT M.M., DAVIDSON N.J. Studies with IL-10<sup>-/-</sup> mice: an overview. *J. Leukoc. Biol.*, 1997, **61**, 389-396.
- RIOUX S., DUBREUIL D., BEGIN C., LAFERRIERE C., MARTIN D., JACQUES M. Evaluation of protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997, **20**, 63-74.
- RIOUX S., GIRARD C., DUBREUIL J.D., JACQUES M. Evaluation of the protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 detoxified lipopolysaccharides or O-polysaccharide-protein conjugate in pigs. *Res. Vet. Sci.*, 1998, **65**, 165-167.
- RIOUX S., GALARNEAU C., HAREL J., KOBISCH M., FREY J., GOTTSCHALK M., JACQUES M. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathog.*, 2000, **28**, 279-289.
- RODRIGUEZ BARBOSA J.I., GUTIERREZ MARTIN C.B., TASCÓN R.I., SUAREZ J., RODRIGUEZ FERRI E.F. Evidence obtained with monoclonal antibodies that O antigen is the major antigen responsible for the cross-reactivities between serotypes 4 and 7 of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1995, **2**, 563-568.
- RODRIGUEZ BARBOSA J.I., GUTIERREZ MARTIN C.B., TASCÓN R.I., GONZALEZ O.R., MITTAL K.R., RODRIGUEZ FERRI E.F. Characterization of monoclonal antibodies that recognize common epitopes located on O antigen of lipopolysaccharide of serotypes 1, 9 and 11 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996, **16**, 173-181.
- ROGERS R.J., EAVES L.E., BLACKALL P.J., TRUMAN K.F. The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Aust. Vet. J.*, 1990, **67**, 9-12.
- ROSENDAL S., LOMBIN L., DEMOOR J. Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, **45**, 271-274.
- ROSENDAL S., MITCHELL W.R. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: a survey of Ontario Pork

- Producers, 1981. *Can. J. Comp. Med.*, 1983, **47**, 1-5.
- ROSENDAL S., BOYD D.A., GILBRIDE K.A. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. *Can. J. Comp. Med.*, 1985, **49**, 68-74.
- ROSENDAL S., MACINNES J.I. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 711-717.
- SAITO K., SAKPUARAM T., FUKUYASU T., ASHIDA K. Serological heterogeneity of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains. *J. Vet. Med. Sci.*, 1992, **54**, 349-350.
- SAKANO T., SHIBATA I., SAMEGAI Y., TANEDA A., OKADA M., IRISAWA T., SATO S. Experimental pneumonia of pigs infected with Aujeszky's disease virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.*, 1993, **55**, 575-579.
- SALMON S.A., WATTS J.L., YANCEY R.J., JR. *In vitro* activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfuroylceftiofur, against organisms of veterinary importance. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1996, **8**, 332-336.
- SALVEMINI D., MANNING P.T., ZWEIFEL B.S., SEIBERT K., CONNOR J., CURRIE M.G., NEEDLEMAN P., MASFERRER J.L. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. *J. Clin. Invest.*, 1995, **96**, 301-308.
- SANFORD S.E., JOSEPHSON G.K. Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* epizootic in southwestern Ontario: clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, **45**, 2-7.
- SATRAN P., NEDBALCOVA K. Prevalence of serotypes, production of Apx toxins, and antibiotic resistance in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Czech Republic. *Vet. Med.*, 2002, **47**, 92-98.
- SCAMURRA R., ARRIAGA C., SPRUNGER L., BAARSCH M.J., MURTAUGH M.P. Regulation of interleukin-6 expression in porcine immune cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1996, **16**, 289-296.
- SCHALLER A., KUHN R., KUHNERT P., NICOLET J., ANDERSON T.J., MACINNES J.I., SEGERS R.P., FREY J. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, **145**, 2105-2116.
- SCHALLER A., KUHNERT P., DE LA PUENTE-REDONDO V.A., NICOLET J., FREY J. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet. Microbiol.*, 2000, **74**, 365-376.
- SCHALLER A., DJORDJEVIC S.P., EAMENS G.J., FORBES W.A., KUHN R., KUHNERT P., GOTTSCHALK M., NICOLET J., FREY J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet. Microbiol.*, 2001, **79**, 47-62.
- SCHIMMEL D., HASS R. [Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains]. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 1983, **37**, 549-551.
- SCHUCHERT J.A., INZANA T.J., ANGEN O., JESSING S. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 4344-4348.
- SEBUNYA T.N., SAUNDERS J.R. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1983, **182**, 1331-1337.
- SEBUNYA T.N., SAUNDERS J.R., OSBORNE A.D. Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Can. J. Comp. Med.*, 1983, **47**, 54-56.
- SEREBRIN S., ROSENDAL S., VALDIVIESO-GARCIA A., LITTLE P.B. Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.*, 1991, **50**, 18-22.
- SHIN S.J., KANG S.G., NABIN R., KANG M.L., YOO H.S. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. *Vet. Microbiol.*, 2005a, **106**, 73-77.
- SHIN S.J., BAE J.L., CHO Y.W., LEE D.Y., KIM D.H., YANG M.S., JANG Y.S., YOO H.S. Induction of antigen-specific immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005b, **43**, 155-164.
- SHRYOCK T.R., STAPLES J.M., DEROSA D.C. Minimum inhibitory concentration breakpoints and disk diffusion inhibitory zone interpretive criteria for tilmicosin susceptibility testing against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* associated with porcine respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2002, **14**, 389-395.
- SIBILLE Y., REYNOLDS H.Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, **141**, 471-501.
- SIDIBE M., MESSIER S., LARIVIERE S., GOTTSCHALK M., MITTAL K.R. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Can. J. Vet. Res.*, 1993, **57**, 204-208.
- SPITS H., DE WAAL MALEFYT R. Functional characterization of human IL-10. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1992, **99**, 8-15.
- STARK K.D., MISEREZ R., SIEGMANN S., OCHS H., INFANGER P., SCHMIDT J. A successful national control programme for enzootic respiratory diseases in pigs in Switzerland. *Rev. Sci. Tech.*, 2007, **26**, 595-606.
- STENBAEK E.I., SCHIRMER A.L. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in pig sera by an inhibition enzyme immuno assay (EIA). *Vet. Microbiol.*, 1994, **39**, 231-244.
- STENBAEK E.I., HOVIND-HAUGEN K. Detection of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 lipopolysaccharide (LPS) variant. *Vet. Microbiol.*

- 1996, **52**, 285-292.
- STEPHENS K.E., ISHIZAKA A., WU Z.H., LARRICK J.W., RAFFIN T.A. Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988, **138**, 1300-1307.
- STHITMATEE N., SIRINARUMITR T., MAKONKEWKEYOON L., SAKPUARAM T., TESAPRATEEP T. Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-*apx* genes. *Mol. Cell Probes*, 2003, **17**, 301-305.
- STINE D.L., HUETHER M.J., MOXLEY R.A., SRIKUMARAN S. *Actinobacillus pleuropneumoniae*-induced thymic lesions in mice and pigs. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 2885-2891.
- STIPKOVITS L., MILLER D., GLAVITS R., FODOR L., BURCH D. Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*, 2001, **65**, 213-222.
- TANIGAWA M., SAWADA T. Effects of subminimal inhibitory concentrations of amoxicillin against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2002, **49**, 513-518.
- TARASIUK K., PEJSKAK Z., HOGG A., CARLSON M.P. Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin against serotypes 1, 3, 5 and 9. *Can. Vet. J.*, 1994, **35**, 233-238.
- TARIGAN S., SLOCOMBE R.F., BROWNING G.F., KIMPTON W. Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat-labile, hemolytic, cytotoxic substance produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1548-1557.
- TAYLOR D.J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In : Straw B.E., D'allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (Eds), Diseases of Swine. 8<sup>th</sup> ed. Blackwell : London, 1999, 343-354.
- THOMASSEN M.J., DIVIS L.T., FISHER C.J. Regulation of human alveolar macrophage inflammatory cytokine production by interleukin-10. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1996, **80**, 321-324.
- TONPITAK W., BALTES N., HENNIG-PAUKA I., GERLACH G.F. Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 7120-7125.
- TORREMORELL M., PIJOAN C., JANNI K., WALKER R., JOO H.S. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, **58**, 828-832.
- TUMAMAO J.Q., BOWLES R.E., VAN DEN BOSCH H., KLAASEN H.L., FENWICK B.W., BLACKALL P.J. An evaluation of the role of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 and 15 in the protection provided by sub-unit and live streptomycin-dependent pleuropneumonia vaccines. *Aust. Vet. J.*, 2004a, **82**, 773-780.
- TUMAMAO J.Q., BOWLES R.E., VAN DEN BOSCH H., KLAASEN H.L., FENWICK B.W., STORIE G.J., BLACKALL P.J. Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Aust. Vet. J.*, 2004b, **82**, 370-374.
- TURNI C., BLACKALL P.J. An evaluation of the *apxIVA* based PCR-REA method for differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2007, **121**, 163-169.
- UDEZE F.A., LATIMER K.S., KADIS S. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**, 768-773.
- UEDA Y., SUENAGA I. *In vitro* antibacterial activity of florfenicol against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.*, 1995, **57**, 363-364.
- UEDAY., OHTSUKIS., NARUKAWA N. Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Vet. Med. Sci.*, 1995, **57**, 261-265.
- VAN DE KERKHOF A., HAESBROUCK F., CHIERS K., DUCATELLE R., KAMP E.M., SMITS M.A. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 3905-3907.
- VAN DEN BOSCH H., FREY J. Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine*, 2003, **21**, 3601-3607.
- VAN LEENGOED L.A., KAMP E.M. Endobronchial inoculation of various doses of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, **50**, 2054-2059.
- VAN LEENGOED L.A., KAMP E.M., POL J.M. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* to porcine lung macrophages. *Vet. Microbiol.*, 1989, **19**, 337-349.
- VAN OSTAAIJEN J., FREY J., ROSENDAL S., MACINNES J.I. *Actinobacillus suis* strains isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry *apxICABDvar. suis* and *apxIICavar. suis* toxin genes. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 1131-1137.
- VAN OVERBEKE I., CHIERS K., DUCATELLE R., HAESBROUCK F. 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*, 2001, **48**, 15-20.
- VAN OVERBEKE I., CHIERS K., CHARLIER G., VANDENBERGHE I., VAN BEEUMEN J., DUCATELLE R., HAESBROUCK F. Characterization of the *in vitro* adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Vet. Microbiol.*, 2002, **88**, 59-74.
- VAN OVERBEKE I., CHIERS K., DONNE E., DUCATELLE R., HAESBROUCK F. Effect of

- endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 of pigs vaccinated with bacterins consisting of *A. pleuropneumoniae* serotype 10 grown under NAD-rich and NAD-restricted conditions. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2003, **50**, 289-293.
- VELTHUIS A.G., DE JONG M.C., KAMP E.M., STOCKHOFF N., VERHEIJDEN J.H. Design and analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* transmission experiment. *Prev. Vet. Med.*, 2003, **60**, 53-68.
- VIGRE H., ERSBOLL A.K., SORENSEN V. Decay of acquired colostral antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2003, **50**, 430-435.
- WALLGREN P., SEGALL T., PEDERSEN MORNER A., GUNNARSSON A. Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs--II. Comparison of antibiotics for oral strategic treatment. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 1999a, **46**, 261-269.
- WALLGREN P., SEGALL T., PEDERSEN MORNER A., GUNNARSSON A. Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs--I. Comparison of five different parenteral antibiotic treatments. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 1999b, **46**, 249-260.
- WANG C., LIU S., PENG Y., SHAO M., WANG Y., GONG Q., CHANG Y., LIU J., LIU H., LIU D., KONG X. Renaturation and purification of ApxII toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Protein Expr. Purif.*, 2007, **52**, 441-445.
- WARD C.K., LAWRENCE M.L., VEIT H.P., INZANA T.J. 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.*, 1998, **66**, 3326-3336.
- WASTESON Y., ROE D.E., FALK K., ROBERTS M.C. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 1996, **48**, 41-50.
- WESTFALL J.A., CHATTERJEE A., ANDERSON N.V. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in gnotobiotic piglets: ultrastructural changes in the pulmonary alveoli with dose and time. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 1994, **26**, 41-50.
- XU F., CHEN X., SHI A., YANG B., WANG J., LI Y., GUO X., BLACKALL P.J., YANG H. Characterization and immunogenicity of an *apxIA* mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2006, **118**, 230-239.
- YAN K.X., LIU J.J., ZHOU R., WU B., LIU W.H., CHEN H.C. [Acute toxicity and immunoprotection of recombinant ApxI toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2006, **22**, 65-70.
- YOSHIMURA H., TAKAGI M., ISHIMURA M., ENDOH Y.S. Comparative in vitro activity of 16 antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res. Commun.*, 2002, **26**, 11-19.
- YOUNG T.F., ROSS R.F., DRISKO J. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in Iowa swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 1946-1948.
- ZINGARELLI B., O'CONNOR M., WONG H., SALZMAN A.L., SZABOC. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 1996, **156**, 350-358.