

Czynniki zjadliwości *Actinobacillus pleuropneumoniae*

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, KINGA URBANIAK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Markowska-Daniel I., Urbaniak K.

Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Summary

The virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) have been described. The most important among them are: Apx toxins, proteases, lipopolysaccharides (LPS), capsule polysaccharides (CPS), outer membrane proteins and adhesins. All App strains possess CPS, which facilitates their invasion by protecting bacteria from the defense of the host immune system (phagocytosis and lysis). It also prevents the opsonization and removing of bacteria from the respiratory tract. Being a component of the external membrane, LPS induces production of the tumor necrosis factor, interleukins, interferons, activated oxygen compounds, prostaglandins, platelet activating factor and leukotrienes. Proteases released by App have the capacity of IgA cleavage and degradation of hemoglobin. These facilitate mucosal colonization and acquisition of iron ions necessary for the survival of bacteria. *Actinobacillus pleuropneumoniae* synthesizes four toxins: ApxI, ApxII, ApxIII and ApxIV. They have the ability to form pores in biological membranes and stimulate secretion of proinflammatory mediators. They possess hemolytic and cytotoxic capacities. Apx toxins damage endothelial cells and activate the thrombocytes which result in microclot formation leading to necrosis. Apx toxins are also highly immunogenic. They play a dominant role in the pathogenesis of swine pleuropneumonia. The lack of Apx genes definitely causes a loss of bacterial virulence. Nevertheless, other App structures may also significantly affect the course of App infection.

Keywords: swine, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, virulence factors

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) jest czynnikiem etiologicznym pleuropneumonii świń – jednej z najważniejszych bakteryjnych chorób układu oddechowego, powodującej duże straty ekonomiczne w produkcji trzody chlewnej.

Jest to Gram-ujemna bakteria należąca do rodziny *Pasteurellaceae*. Do chwili obecnej zidentyfikowano 15 serotypów App należących do dwóch biowarów – I – obejmującego szczepy zależne od dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) oraz II – obejmującego szczepy NAD-niezależne (22). Bakterie należące do różnych serotypów, ale również szczepy w obrębie tego samego serotypu, z uwagi na mnogość i różnorodność czynników determinujących zjadliwość, mogą wykazywać odmienną wirulencję.

W patogenezie pleuropneumonii bierze udział szereg elementów, decydujących o zjadliwości szczepów App. Do najważniejszych czynników wirulencji App zalicza się: egzotoksyny (toksyny Apx), proteazy, lipopolisacharydy (LPS) oraz struktury występujące na powierzchni komórki, tj. polisacharydy otoczki, białka błony zewnętrznej i adhezyny (2, 6).

Otoczka polisacharydowa

Większość bakterii, w tym także App, wytwarza zewnątrzkomórkowe substancje luźno lub ściśle związane z powierzchnią komórki. Struktury te zwane są otoczkami polisacharydowymi (capsular polysaccharide, CPS), a także bakteryjnymi egzopolimerami, glikokaliksem lub zewnątrzkomórkowymi substancjami polimerycznymi (extracellular polymeric substances, EPS). Zazwyczaj mają one grubość 0,2-1,0 μm oraz zróżnicowaną budowę chemiczną (11).

Wszystkie szczepy App posiadają CPS. Otoczka jest antygenem dominującym, na podstawie którego gatunek App podzielony został na serotypy. Składa się ona z ujemnie naładowanych węglowodanowych polimerów (7).

Otoczka determinuje wirulencję szczepów App. Usprawnia ona inwazję bakteryjną, chroniąc zarazek przed immunologiczną obroną ze strony gospodarza, między innymi przez hamowanie kaskady dopełniacza. Zapobiega ona także fagocytozie oraz lizie komórek App przy udziale dopełniacza oraz opsonizacji

i usuwaniu komórek z układu oddechowego świni (6, 10).

Lipopolisacharyd

LPS, zwany inaczej endotoksyną, z uwagi na obecność zarówno hydrofobowych, jak i hydrofilowych miejsc, jest molekułą amfipatyczną, wchodzącą w skład zewnętrznej warstwy błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych.

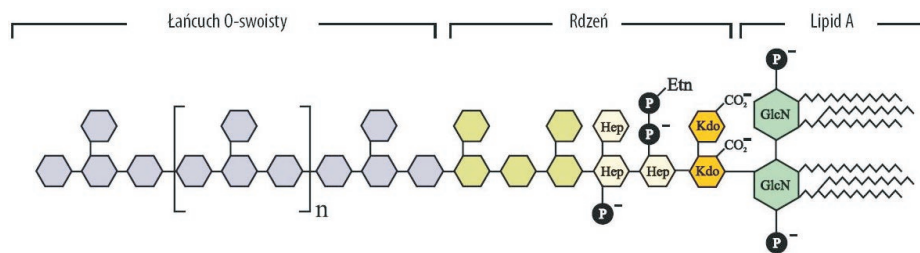
LPS zbudowany jest z części polisacharydowej i lipidowej. Schemat jego budowy przedstawiono na ryc. 1. Składa się on z trzech zasadniczych elementów strukturalnych: lipidu A, oligosacharydu rdzeniowego, zawierającego kwas 2-keto-3-deoksyoktonowy (Kdo) i O-swoistego łańcucha polisacharydowego, nazywanego antygenem O. W błonie zewnętrznej LPS zakotwiczony jest lipid A, zaś odcinek cukrowy skierowany jest na zewnątrz komórki bakterii (3, 8, 13). Spośród elementów budujących LPS, lipid A wraz z Kdo stanowi jej najbardziej konserwatywny element składowy. Toksyczność cząsteczki LPS związana jest z jej częścią lipidową, natomiast immunogenność – głównie z fragmentem cukrowym (13).

Przypuszczalnie każda komórka organizmu wykazuje zdolność do interakcji z LPS, jednakże w rozpoznawaniu LPS przez organizm gospodarza nadrzędną rolę pełnią komórki należące do układu immunologicznego, zwłaszcza monocyty, makrofagi, neutrofile oraz limfocyty B i T (14). Wspomniana endotoksyna indukuje produkcję różnych silnych mediatorów prozapalnych, m.in.: czynnika martwicy nowotworów (Tumor Necrosis Factor), interleukin (IL-1, 6, 8), interferonu, aktywowanych związków tlenowych, prostaglandyn, czynnika aktywującego płytki krwi (Platelet Activating Factor) i leukotrienów, powodujących uszkodzenia tkanek gospodarza (21).

Proteazy

Wiele patogennych gatunków bakterii kolonizujących powierzchnię śluzówki uwalnia enzymy, które rozszczepiają lub całkowicie degradują immunoglobuliny i inne struktury gospodarza, ułatwiając inwazję. Do takich enzymów zalicza się proteazy. Należą one do klasy hydrolaz katalizujących rozpad wiązań peptydowych. Działanie tych enzymów sugeruje ich zaangażowanie w procesie patogenezy zakażeń wywołanych przez chorobotwórcze drobnoustroje (16).

Występowanie uwalnianych przez App proteaz zidentyfikowane zostało po raz pierwszy przez Kiliana i wsp. (12) podczas doświadczenia z degradacją przeciwciał IgA świni. Obecnie wiadomo, iż App serotyp 1 uwalnia proteazy o różnej masie molekularnej, tj. > 200, 200, 90, 80, 70 i 50 kDa. Wykazują one aktywność w szerokim zakresie pH (od 4 do 8). Najbardziej optymalną wartością pH jest dla nich wartość wynosząca 6-7, natomiast przy pH 4 i powyżej 9 proteazy App wykazują aktywność mniejszą o 20-30%.



Ryc. 1. Schemat budowy LPS

Proteolityczne funkcje proteaz wzmacniane są przez jony Ca^{2+} i Zn^{2+} , podczas gdy związki chelatujące, takie jak EDTA czy EGTA, powodują hamowanie ich aktywności. Dodatkowo skutecznym inhibitorem proteazy 70 kDa jest benzoesan parahydroksyrteciowy. Na skutek jego działania traci ona swoje proteolityczne właściwości. Proteazy nie tracą swoich właściwości w temperaturze -20°C przez okres powyżej miesiąca. W obecności jonów wapnia zachowują one stabilność w 80°C (16, 17).

Uwolnione przez komórkę bakteryjną App proteazy posiadają zdolność degradacji świńskiej żelatyny oraz, choć w mniejszym stopniu, świńskiej, wołowej i ludzkiej hemoglobiny (Hb). Ponadto enzymy te potrafią degradować sekrecyjne i powierzchniowe IgA. Sugeruje się, że proteazy rozszczepiające IgA ułatwiają App kolonizację śluzówki, natomiast rozkład Hb pozwala im pozyskiwać niezbędne do przeżycia jony żelaza (16, 17).

Toksyny Apx

Budowa genotypowa i fenotypowa toksyn Apx.

Pomimo występowania wielu czynników wirulencji główną rolę w patogenezie pleuropneumonii świni pełnią toksyny Apx, należące do rodziny RTX toksyn (repeats in the structural toxin – powtórzenia w strukturze toksyny). Toksyny te występują powszechnie wśród bakterii Gram-ujemnych. Posiadają one zdolność tworzenia porów w błonach biologicznych. Aktywność hemolityczną zwykle wykazują w warunkach *in vitro* (1, 5).

Actinobacillus pleuropneumoniae posiada cztery toksyny RTX: ApxI, ApxII, ApxIII oraz ApxIV (1, 5). Występowanie genów i toksyn Apx oraz ich charakterystykę przedstawiono w tab. 1 i 2.

ApxI jest silnie hemolitycznym i cytotoksycznym białkiem o masie 105 kDa, które powoduje efekt CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen), polegający na wzmacnianiu lizy erytrocytów, wywołanej działaniem sfingomielinazy (β -toksyna) *Staphylococcus aureus*. Wcześniej była ona nazywana hemolizyną I lub cytolizyną I. Wykazuje ona silne podobieństwo do α -hemolizyny (HlyA) *Escherichia coli*. W swojej strukturze posiada silnie hydrofobową domenę oraz 13 powtórzeń odcinków bogatych w glicynę. Toksyna ApxI wytwarzana jest przez najbardziej zjadliwe szczepy serotypów 1, 5, 9, 10, 11 i 14 (4, 15).

ApxII jest słabo hemolitycznym i średnio cytotoksycznym białkiem o masie 105 kDa, nazywanym dawniej hemolizyną II lub cytolizyną II. Występuje ona we

Tab. 1. Występowanie genów i toksyn Apx w szczepach *Actinobacillus pleuropneumoniae* reprezentujących poszczególne serotypy

Geny	Serotypy							
	Biowar I					Biowar II		
	1, 5, 9, 11	10	2, 4, 6, 8, 15	3	7, 12	14	2, 4, 7, 13	9
Geny	apxICABD apxIICA	apxICABD	apxIICA apxIIICABD	apxIICA apxIIICABD	apxIICA	apxICABD	apxIICA	apxICABD apxIICA
Toksyny	ApxI ApxII	ApxI	ApxII ApxIII	ApxIII	ApxII	ApxI	ApxII	ApxI ApxII

Tab. 2. Genotypowa i fenotypowa charakterystyka toksyn Apx

Toksyny	Geny			Właściwości		Masa molekularna (kDa)	Serotypy
	C (aktywator)	A (pretoksyna)	BD (system sekrecji)	cytotoksyczność	hemolityczność		
ApxI	+	+	+	silna	silna	105	1, 5, 9, 10, 11 i 14
ApxII	+	+	-	słaba	średnia	105	wszystkie z wyjątkiem serotypów 10 i 14
ApxIII	+	+	+	brak	silna	120	2, 3, 4, 6, 8 i 15
ApxIV	ORF1	+	-	słaba	nieokreślona	170-202	wszystkie

wszystkich szczepach App, z wyjątkiem należących do serotypów 10 i 14. Posiada wszystkie charakterystyczne dla RTX toksyn domeny, jednak zawiera tylko 8 powtórzeń bogatych w glicynę (4, 15). Opierając się na sekwencji aminokwasowej, toksyna ApxII jest immunologicznie odległa od ApxI, ale blisko spokrewniona z leukotoksyną (Lkt) *Pasteurella haemolytica* (4).

Najbardziej cytotoksyczna, niehemolityczna toksyna ApxIII, wcześniej zwana pleurotoksyną, o masie cząsteczkowej 120 kDa, produkowana jest przez szczepy serotypów 2, 3, 4, 6, 8 i 15. Wykazuje ona znaczące podobieństwo aminokwasowe do ApxI oraz HlyA, i podobnie jak toksyna I zawiera 13 powtórzeń bogatych w glicynę (4, 15).

Toksyny ApxI, ApxII i ApxIII produkowane są również przez inne gatunki *Actinobacillus*, takie jak: *A. rosii*, *A. suis*, *A. lignieresii* i *A. porcitonisillarum* (5, 18). Innymi bakteriami produkującymi RTX toksyny, które wykazują reakcję krzyżową z Apx App, są: *A. seminis*, *A. equuli*, *Pasteurella aerogenes*, *P. multocida*, *Haemophilus parasuis* i *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (15, 19, 20).

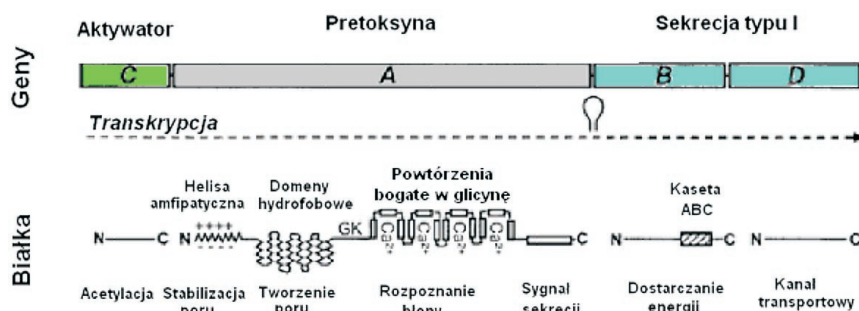
ApxIV jest toksyną specyficzną dla App, kodowaną przez gen apxIVA. Jest ona odmienna antygenowo od pozostałych trzech Apx toksyn. Występuje w szcze-

pach wszystkich serotypów, jednakże jej ekspresja następuje jedynie *in vivo*, czyli po infekcji świni App (1, 6, 18, 19). Z uwagi na specyficzność gatunkową genu apxIVA App w Zakładzie Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach opracowano test PCR do amplifikacji fragmentu tego genu (23).

Rekombinant ApxIV produkowany przez *E. coli* wykazywał słabą aktywność hemolityczną oraz hemolityczną synergicznie ze sfingomielinazą *Staphylococcus aureus* (19) (tab. 2).

Geny kodujące toksyny Apx App występują w operonach policistronowych. ApxI kodowana jest w operonie apxICABD, ApxII w apxIICA, natomiast ApxIII w apxIIICABD. W operonach tych gen A koduje pretoksynę, gen C białko związane z potranslacyjną aktywacją pretoksyny, zaś białka kodowane przez geny B i D uczestniczą w aktywnym transporcie toksyn Apx, jako sekrecyjny aparat typu I (20) (ryc. 2). W przypadku toksyny ApxII, której operon nie posiada genów B i D, transport możliwy jest przy wykorzystaniu systemu sekrecyjnego ApxI. Wyjątek stanowi serotyp 3 pozbawiony genów apxIBD. Wśród różnych serotypów App gen toksyny ApxIV charakteryzuje się zmienianą wielkością (18). Do swej aktywacji wymaga ona obecności dodatkowego genu – ORF1, położonego bezpośrednio za strukturalnym genem ApxIV (19).

Genotypowa i fenotypowa analiza dużej liczby szczepów wszystkich serotypów i serowarów, izolowanych z różnych obszarów geograficznych, z nielicznymi wyjątkami, wykazywała podobieństwo genetyczne i fenotypowe poszczególnych serotypów i odpowiadających im szczepów referencyjnych (4).



Ryc. 2. Schemat genetycznej i strukturalnej organizacji RTX toksyny

Biofizyczne właściwości toksyn ApxI, II i III.

Oprócz rozległej wiedzy o genotypowej i fenotypowej budowie, znane są biofizyczne i fizykochemiczne parametry toksyn ApxI, ApxII i ApxIII. Toksyny te charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością tworzenia porów, ich wielkością oraz selektywnością jonową. Spośród toksyn produkowanych przez App największy wpływ na przewodność błony wywiera ApxI, następnie ApxIII i ApxII. Już po 2 minutach od momentu podania toksyny następuje wzrost przewodnictwa błony, wartość plateau zostaje osiągnięta po ok. 30 min. (15).

Aktywność toksyn App spowodowana jest przez ich zdolność do tworzenia kanałów przepuszczających jony. W jednakowych warunkach ApxI i ApxII formują pory o zbliżonej wielkości, natomiast ApxIII tworzy kanał o znacznie mniejszej średnicy. Jednakże toksyna ApxII charakteryzuje się bardzo niską zdolnością aktywacji tworzenia porów, w porównaniu z pozostałymi dwoma toksynami. Kanały tworzone przez toksyny Apx App wykazują selektywność w stosunku do kationów. Szybkość przepływu poszczególnych kationów przez pory jest następująca: $Cs^+ \approx Rb^+ \approx K^+ > Na^+ > Li^+ > Tris^+$ oraz $NH_4^+ > N(CH_3)_4^+ > N(C_2H_5)_4^+$ (15).

Udział toksyn Apx w wirulencji *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Wśród szczepów App wyróżnić można szczepy o zróżnicowanej zjadliwości. Badania na świniach i myszach zakażanych szczepami referencyjnymi potwierdziły dane uzyskane w badaniach terenowych, wskazujące na wysoką patogenność szczepów reprezentujących serotypy 1, 5, 9 i 11. Szczepy produkujące tylko jedną Apx toksynę są mniej wirulentne od uwalniających dwie toksyny. Możliwe jest również występowanie odmiennej wirulencji w obrębie danego serotypu, np.: szczepy serotypu 2 zaliczane do biowaru I, występujące na obszarze Europy, syntetyzując toksynę ApxI i ApxII, wykazują wyższą zjadliwość niż szczepy serotypu 2 biowaru II izolowane w Ameryce Północnej, produkujące jedynie ApxII (4).

Określając różnice w wirulencji między serotypami i szczepami App nie można wykluczyć innych niż Apx toksyny czynników wirulencji, tj. LPS czy otoczki polisacharydowej (4).

Toksyny Apx pełnią ważną rolę w patogenezie pleuropneumonii świń. Przede wszystkim umożliwiają one bakteriom ominięcie pierwszej bariery ochronnej gospodarza. Działają one w dwojaki sposób: albo wywołują bezpośredni efekt cytotoksyczny, albo oddziałują pośrednio, stymulując sekrecję mediatorów prozapalnych. Przy wysokim stężeniu toksyn Apx w błonie fagocytów i innych komórek powstają liczne pory, co w konsekwencji prowadzi do osmozy komórek, a następnie ich śmierci. Z kolei mechanizm działania pośredniego polega na stymulacji makrofagów i neutrofilek do produkowania i uwalniania mediatorów zapalnych, czyli reaktywnych form tlenu, enzymów proteolitycznych oraz cytokin (IL-1, IL-6, IL-8, TNF),

mających silnie szkodliwy wpływ na komórki gospodarza. Na przykład aktywowane neutrofile uwalniają mieloperoksydazę, która uczestniczy w przekształcaniu nadtlenu wodoru w kwas podchlorawy, będący najsilniejszym cytotoksycznym utleniaczem indukowanym w reakcji zapalnej. Ponadto toksyny, uszkadzając komórki śródbłonna, prowadzą do aktywacji płytek krwi, w wyniku czego powstają mikrozakrzepy, miejscowe niedokrwienia, co w konsekwencji powoduje martwicę (6).

Udowodniono, że oczyszczone toksyny Apx, w odróżnieniu od zmutowanego szczepu pozbawionego zdolności syntezy toksyn, powodują charakterystyczne dla pleuropneumonii zmiany patologiczne, co potwierdza rolę toksyn Apx w patogenezie choroby (6).

Rolę różnych toksyn Apx App w patogenezie pleuropneumonii badano wykorzystując mutanty z delecją w genie *apx*. Jansen i wsp. (9) wykorzystali silnie wirulentny szczep App 4074 należący do serotypu 1. Bakterie niezmutowane (ApxI i ApxII) oraz mutanty syntetyzujące ApxI lub ApxII indukowały wybuch tlenowy i powodowały śmierć świńskich neutrofilek, w odróżnieniu od szczepów pozbawionych zdolności do produkcji omawianych toksyn.

Immunogenność toksyn Apx. Toksyny Apx są silnie immunogenne. Pobudzają one układ odpornościowy do produkcji znacznej ilości swoistych przeciwciał, biorąc udział w indukcji odporności nabytej, skierowanej przeciwko App (6). Jednakże, w związku z faktem, że oprócz App zdolność produkcji ApxI, ApxII i ApxIII posiadają również inne gatunki bakterii należące do rodzaju *Actinobacillus*, diagnostyka serologiczna ukierunkowana na wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko ww. toksynom App może być obciążona błędem. Nie dotyczy to jedynie ApxIV, ponieważ jest ona specyficznym białkiem App. Z tego powodu wykrycie przeciwciał skierowanych przeciwko wymienionemu białku wskazuje na kontakt zwierzęcia z patogennym szczepem App.

Dzięki swej immunogenności toksyny Apx badane były jako potencjalny składnik szczepionki przeciwko pleuropneumonii świń. Udział toksyn Apx w indukcji odpowiedzi immunologicznej potwierdzono badając awirulentny, niehemolityczny, zmutowany szczep App serotypu 5 (brak sekrecji ApxI i ApxII). Szczep pozbawiony zdolności do produkcji toksyn nie indukował odporności przeciwko szczepom dzikim serotypu 5, uwalniającym ApxI i ApxII. Dla porównania, immunizacja awirulentnym, zmutowanym szczepem pozbawionym otoczki polisacharydowej pobudzała limfocyty B do produkcji swoistych przeciwciał, co dowodzi, że toksyny są istotne w indukcji pamięci immunologicznej (4). W wielu badaniach z użyciem toksyn Apx, w kombinacji z innymi składnikami bakteryjnymi, wykazano, że obecność toksyn jest niezbędna do indukcji odporności na poziomie zapewniającym skuteczną ochronę. Niemniej jednak udowodniono, że toksyny Apx nie są jedynymi czynnikami bio-

racymi udział w stymulacji układu immunologicznego (6).

Podsumowanie

Nadrzędną rolę w patogenezie pleuropneumonii świń odgrywają toksyny Apx. Brak genów apx powoduje nieodwracalne pozbawienie zarazka wirulencji. Niemniej jednak także inne struktury App mogą znacząco wpływać na przebieg zakażenia App.

Piśmiennictwo

1. Cho W. S., Chae C.: Expression of the apxIV gene in pig naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Comp. Path. 2001, 125, 34-40.
2. Costa da M. M., Klein C. S., Balestrin R., Schrank A., Piffer I. A., Silva da 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.
3. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I. R.: Structure and function of lipopolysaccharides. Microb. Infect. 2002, 4, 837-851.
4. Frey J.: Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. Trends Microbiol. 1995, 3, 275-261.
5. Frey J., Kuhnert P.: RTX toxins in Pasteurellaceae. Int. J. Med. Microbiol. 2002, 292, 149-158.
6. Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I., Ducatelle R.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet. Microbiol. 1997, 58, 239-249.
7. Inzana T. J., Ma J., Workman T., Gogolewski R. P., Andersen P.: Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun. 1988, 56, 1880-1889.
8. Jacques M.: Surface polysaccharides and iron-systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. J. Vet. Res. 2004, 68, 81-85.
9. Jansen R., Briaire J., Smith H. E., Dom P., Haesebrouck F., Kamp E. M., Gielkens A. L. J., Smith M. A.: Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. Infect. Immun. 1995, 63, 27-37.
10. Jessing S. G., Ahrens P., Inzana T. J., Angen Ø.: The genetic organization of capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7, and 12. Vet. Microbiol. 2008, 129, 350-359.
11. Kaplan J. B., Velliyagounder K., Ragunath Ch., Rohde H., Mack D., Knobloch J. K. M., Ramasubbu N.: Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. J. Bacteriol. 2004, 186, 8213-8220.
12. Kilian M., Mestecky J., Schrohenloher R.: Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. Infect. Immun. 1998, 56, 1096-1100.
13. Lodowska J., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z.: Heterogenność strukturalna lipidu A bakterii Gram-ujemnych. Post. Hig. Med. Dośw. 2007, 61, 106-121.
14. Lukaszewicz J., Ługowski C.: Biologiczna aktywność lipopolisacharydu. Post. Hig. Med. Dośw. 2003, 57, 33-53.
15. Maier E., Reinhard N., Benz R., Frey J.: Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. 1996, 64, 4415-4423.
16. Negrete-Abascal E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., Garcia R. M., Garza de la M.: Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. Can. J. Vet. Res. 1998, 62, 183-190.
17. Negrete-Abascal E., Tenorio V. R., Serrano J. J., Garza de la C. G. C., Garza de la M.: Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. Can. J. Vet. Res. 1994, 58, 83-86.
18. Rayamajhi N., Shin S. J., Kang S. G., Lee D. Y., Ahn J. M., Yoo H. S.: Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. J. Vet. Diagn. Invest. 2005, 17, 359-362.
19. 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*. Microbiol. 1999, 145, 2105-2116.
20. Schaller A., Kuhnert P., Puente-Redondo de la V. A., Nicolet J., Frey J.: Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. Vet. Microbiol. 2000, 74, 365-376.
21. Stanisławska J., Interewicz B., Olszewski W. L.: Odpowiedź leukocytów gospodarza na antygeny bakteryjne. Post. Mikrobiol. 2003, 42, 301-317.
22. Sthitmatee N., Sirinarumit T., Makonkewkeyoon L., Sakpuaram T., Tesaprateep T.: Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-apx gen. Mol. Cell. Probes 2003, 17, 301-305.
23. Urbaniak K., Markowska-Daniel I.: Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs' lung and bacterial culture by the mean of developed PCR assay. Bull. Vet. Inst. Pulawy – w druku.

Adres autora: prof. dr hab. Iwona Markowska-Daniel, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: iwonamd@piwet.pulawy.pl