

Patogeneza pleuropneumonii świń

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.

Pathogenesis of porcine pleuropneumonia

Summary

Economically important and world-wide distributed, porcine pleuropneumonia is one of the most important diseases of the respiratory tract of pigs. The pathogenesis of the disease is a very complex process, which has not been fully elucidated as yet. This paper presents data currently available on this subject. Pigs are the main and highly specific reservoir of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). It was shown that as little as 10 bacteria can induce the disease. Its spread is facilitated by excessive concentration of animals, increased trade, transport, mixing piglets from different litters and of different immune status, coexisting diseases, and unfavorable environmental conditions. To induce pleuropneumonia, the colonization of the respiratory tract by App is required, which depends on their ability to adhere to epithelial cells. It was demonstrated that App bound very weakly with the cilia and tracheal or bronchial epithelium, but adhered closely to the cilia of bronchioles and alveolar epithelial cells. Virulence factors produced by App, especially Apx toxins, play an important role in the pathogenesis of pleuropneumonia. To induce lesions in tissues, App has to replicate in the host's organism. Replication efficiency depends on their ability to obtain nutrients, especially iron. App synthesized a large number of factors involved in the acquisition and transport of iron ions (transferrin-binding proteins, hemoglobin-binding proteins, siderophores). If App are capable to replicate and survive in a pig's tissues, symptoms and lung lesions typical of pleuropneumonia are observed within few hours after infection.

Keywords: pigs, pleuropneumonia, pathogenesis

Pleuropneumonia jest jedną z najważniejszych bakteryjnych chorób układu oddechowego świń, powodującą znaczne straty ekonomiczne w produkcji trzody chlewnej na całym świecie. W odróżnieniu od innych zapaleń płuc o etiologii bakteryjnej do wywołania choroby nie są dodatkowo potrzebne współistniejące wirusowe lub bakteryjne zakażenia dróg oddechowych (20). Zachorowania występują głównie u młodych, 8-16-tygodniowych świń, ale przy współistniejących niekorzystnych warunkach środowiskowych choroba dotyczy także innych grup wiekowych, włącznie z ssącymi prosiętami (7). Rozprzestrzenianiu się pleuropneumonii sprzyjają czynniki takie, jak: nadmierne zagęszczenie zwierząt, nasilony obrót, transport, mieszanie prosiąt z różnych miotów i o różnym statusie immunologicznym, współistniejące choroby zakaźne czy pasożytnicze, niekorzystne warunki środowiskowe, zwłaszcza mikroklimatyczne (w tym głównie duże dobowe wahania temperatury i nadmierna wilgotność sprzężona z niedostateczną wentylacją) (7).

Czynnikiem etiologicznym choroby jest *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), Gram-ujemna pałeczka należąca do rodziny *Pasteurellaceae*. Na podstawie struktury antygenowej lipopolisacharydu (antygen O) oraz polisacharydu otoczki scharakteryzowano 15 se-

rotypów App, których rozprzestrzenienie uzależnione jest od kontynentu, kraju, a nawet gospodarstwa (14, 20). Ze względu na zależność szczepów App od dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) dzieli się je na dwa biowary. Do biowaru I należą szczepy wymagające do wzrostu NAD, do tej grupy zalicza się szczepy reprezentujące serotypy od 1 do 12 oraz 15. Do biowaru II, obejmującego znacznie mniejszą grupę szczepów niezależnych od NAD, należą serotypy: 13, 14 oraz 2, 4, 7 i 9 (19). Do najbardziej patogennych szczepów App zalicza się bakterie należące do serotypów: 1, 5, 9 i 11 (5).

Patogeneza pleuropneumonii jest procesem złożonym, który nie został jeszcze w pełni poznany. Choroba szerzy się głównie drogą aerogenną (kaszel, kichanie). Trzoda chlewna jest głównym i wysoce specyficznym rezerwuarem zarazka (4, 7). Wykazano, że zakażone w naturalnych warunkach świnię mogą wydalac z wydzieliną z nosa miliardy komórek App. W warunkach eksperymentalnych z wykorzystaniem świń SPF dowiedziono, że zaledwie 10 bakterii może indukować chorobę, natomiast dawka śmiertelna waha się od 10^2 do 10^{10} komórek App (20). Oprócz właściwości osobniczych makroorganizmu, warunków środowiskowych oraz liczby bakterii (dawki zakaźnej) w patogenezie

choroby ważną rolę odgrywają czynniki wirulencji App. Do najważniejszych z nich zalicza się egzotoksyny (toksyny Apx), proteazy, lipopolisacharydy (LPS) oraz struktury występujące na powierzchni komórki, tj. polisacharydy otoczki, białka błony zewnętrznej (outer membrane protein, OMP) i adhezyny (8, 22). Szczegółowy ich opis przedstawiono w odrębnym opracowaniu (13).

Do wywołania pleuropneumonii konieczna jest kolonizacja układu oddechowego przez App, uzależniona od zdolności patogenu do adhezji do komórek nabłonkowych (2). W procesie tym pośredniczą fimbrie. Obecność fimbrii i ich podjednostek u App została po raz pierwszy wykazana przez Zanh i wsp. (22). Są to wyrostki o długości kilku mikrometrów, umiejscowione na powierzchni komórek bakteryjnych. Ze względu na różnorodną morfologię wyróżnić można sześć klas fimbrii. Ich obecność, poza udziałem w adhezji do komórek nabłonkowych, ma również znaczenie w procesie koniugacji (22). Ekspresja genów kodujących fimbrie u App regulowana jest warunkami wzrostowymi, co tłumaczy obecność tych struktur u bakterii po wzroście na agarze z krwią, a brak ich detekcji po hodowli na podłożu sercowo-mózgowym (2).

Badania *in vivo*, polegające na donosowej inokulacji zawiesiny komórek App, wykazały bardzo słabe wiązanie się ich do rzęsek i nabłonka tchawicy lub oskrzeli. Jednakże posiadają one zdolność do ścisłego przylegania do komórek dolnego odcinka układu oddechowego, czyli do rzęsek oskrzelików i komórek nabłonka pęcherzyków płucnych. Stwierdzono, że istnieje zależność pomiędzy zdolnością do zasiedlania dolnych odcinków układu oddechowego świń przez App a naturą inokulum (aerozol, śluzowata wydzielina). Kropelki aerozolu uwalnianego podczas kichania są dostatecznie małe, by przedostać się bezpośrednio do tej części układu oddechowego, dzięki czemu istnieje możliwość pominięcia górnych odcinków podczas zasiedlania dróg oddechowych przez App (2).

W chorobotwórczości szczepów App istotną rolę odgrywają także: otoczka polisacharydowa (capsular polysaccharide, CPS), obecna we wszystkich patogenych szczepach App, oraz lipopolisacharydy (LPS). Otoczka chroni zarazek przed układem immunologicznym gospodarza. Usprawnia ponadto inwazję bakteryjną, między innymi przez hamowanie działania kaskady dopełniacza. Dodatkowo zapobiega ona fagocytozie oraz lizie komórek App przy udziale dopełniacza oraz ich opsonizacji i usuwaniu z układu oddechowego świni (8, 11). Z kolei LPS indukuje produkcję różnych silnych mediatorów m.in.: czynnika martwicy nowotworów (TNF), interleukin (IL-1, 6, 8), interferonu, aktywowanych związków tlenu, prostaglandyn, czynnika aktywującego płytki krwi, leukotrienów i in., powodujących uszkodzenia tkanek gospodarza (18).

W warunkach eksperymentalnych wykazano, że oczyszczony LPS App powoduje zniszczenie tkanki płucnej gospodarza, jednakże obserwowane zmiany

histopatologiczne nie są typowe dla występujących w przebiegu zakażenia App (8).

Wykorzystując mikroskopię elektronową oraz cytometrię przepływową wykazano dobrą ekspozycję cząsteczek LPS na powierzchni bakterii, co jest zasadniczym warunkiem kolonizacji tkanek gospodarza. Jako adhezyjna cząsteczka LPS umożliwia przyłączenie się App do komórek układu oddechowego świń. Ustalono ponadto, że adhezja App może być zahamowana przez wolne cząsteczki LPS, LPS pozbawiony lipidu A (pozbawiony toksyczności), a także przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenowi O (9). Ponadto LPS ma właściwości immunogenne, stymuluje on odpowiedź ze strony komórek układu immunologicznego świni, w której udział biorą zarówno monocyty, makrofagi, neutrofile, jak i limfocyty B i T.

Inwazję kolonizującym powierzchnię śluzówki szczepom App ułatwiają także uwalniane przez nie proteazy. Enzymy te rozszczepiają lub całkowicie degradują immunoglobuliny i inne struktury gospodarza. Uwolnione przez komórkę bakteryjną App proteazy posiadają zdolność degradacji żelatyny oraz hemoglobiny (Hb), ponadto potrafią one degradować sekrecyjne i powierzchniowe IgA. Proteazy rozszczepiające IgA mogą ułatwiać App kolonizację śluzówki, natomiast rozkład Hb pozwala im pozyskiwać jony żelaza (15).

Pomimo występowania wielu czynników wirulencji główną rolę w patogenezie pleuropneumonii pełnią toksyny Apx, należące do rodziny RTX toksyn (repeats in the structural toxin – powtórzenia w strukturze toksyny). App posiada cztery toksyny RTX: ApxI, ApxII, ApxIII oraz ApxIV (3, 6). Toksyna ApxI wytwarzana jest przez najbardziej zjadliwe szczepy serotypów: 1, 5, 9, 10, 11 i 14. ApxII jest słabo hemolitycznym i średnio cytotoksycznym białkiem występującym we wszystkich szczepach App, z wyjątkiem reprezentujących serotypy 10 i 14. Najbardziej cytotoksyczną, niehemolityczną toksyną jest ApxIII, wcześniej zwana pleurotoksyną. Jest ona produkowana przez szczepy serotypów: 2, 3, 4, 6, 8 i 15 (2, 5, 12). Z kolei ApxIV jest toksyną specyficzną dla App, antygenowo odmienną od pozostałych trzech Apx toksyn. Występuje w szczepach wszystkich serotypów, jednakże jej ekspresja następuje jedynie *in vivo*, czyli po infekcji świni App (2, 3, 8, 17). 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 (7).

Toksyny App posiadają zdolność tworzenia przepuszczających jony porów w błonach biologicznych, o zróżnicowanej wielkości i selektywności jonowej. Największy wpływ na przewodność błony wywiera ApxI, następnie ApxIII i ApxII, która charakteryzuje się bardzo niską zdolnością aktywacji tworzenia porów w porów-

naniu z pozostałymi dwoma toksynami. W jednakowych warunkach ApxI i ApxII formują pory o zbliżonej wielkości, natomiast ApxIII tworzy kanał o znacznie mniejszej średnicy. Już po 2 min. od momentu dodania toksyny następuje wzrost przewodnictwa błony, wartość plateau zostaje osiągnięta po ok. 30 min. (12).

Toksyny Apx pełnią tak ważną rolę w patogenezie pleuropneumonii świń, ponieważ umożliwiają bakteriom ominięcie pierwszej bariery ochronnej gospodarza. Mogą one wywoływać bezpośredni efekt cytotoksyczny w błonie fagocytów i innych komórek, indukując powstawanie w nich porów, co w konsekwencji prowadzi do osmozy komórek, a następnie śmierci. Z kolei ich działanie pośrednie sprowadza się do stymulacji makrofagów i neutrofilów do produkowania i uwalniania mediatorów zapalnych mających szkodliwy wpływ na komórki gospodarza (reaktywnych form tlenu, enzymów proteolitycznych oraz cytokin – IL-1, 6, 8 i TNF). Ponadto toksyny te, uszkadzając komórki śródbłonna, prowadzą do aktywacji płytek krwi, w wyniku czego powstają mikrozakrzepy, miejscowe niedokrwienia, co w konsekwencji powoduje martwicę (2, 8). Udowodniono, że oczyszczone toksyny Apx, w odróżnieniu od zmutowanego szczepu pozbawionego zdolności syntezy toksyn, powodują charakterystyczne dla pleuropneumonii zmiany patologiczne, co potwierdza rolę Apx w patogenezie choroby (2).

Toksyny Apx są jednocześnie silnie immunogenne. Pobudzają one układ odpornościowy do produkcji znacznej ilości swoistych przeciwciał, biorąc udział w indukcji odporności nabytej skierowanej przeciwko App (8).

Warunkiem wywołania zmian patologicznych w tkankach zakażonego zwierzęcia, typowych dla pleuropneumonii, jest replikacja patogennych drobnoustrojów w organizmie świni. Namnażanie mikroorganizmu w tkankach gospodarza jest konieczne do efektywnej infekcji i zależy, między innymi, od zdolności patogenu do pozyskiwania składników odżywczych ze środowiska. Jednym z najbardziej istotnych z nich jest żelazo, jako ważny składnik wielu enzymów. Żelazo niezbędne jest do wzrostu, a także działa jako sygnał regulujący ekspresję wielu czynników wirulencji. Ilość żelaza w płynach ustrojowych organizmu jest niewystarczająca, na skutek wiązania go przez glikoproteiny gospodarza: transferynę i laktoferynę. Ponadto większość wewnątrzkomórkowego żelaza wchodzi w skład białek zawierających hem w swej strukturze (Hb). W efekcie wiązania wolnego żelaza zmniejsza się jego stężenie molowe do wartości $\sim 10^{-18}$ M, a zatem znaczne poniżej ilości wymaganej i umożliwiającej wzrost bakterii wynoszącej od $\sim 10^{-6}$ do $\sim 10^{-8}$ M (8, 10).

Mechanizmy pozwalające przezwyciężyć niedobór żelaza są złożone. *Actinobacillus pleuropneumoniae* syntetyzuje dużą ilość czynników biorących udział w pozyskiwaniu i transporcie jonów żelaza, takich jak: białka wiążące transferynę, białka wiążące Hb czy siderofory. Jest on zdolny pobierać je ze świńskiej transferyny i związków hemowych, tj. wolnego hemu, he-

miny, hematyny i Hb, a także z różnych egzogennych bakteryjnych sideroforów (10). W warunkach niedoboru jonów żelaza App posiada zdolność do ich pozyskiwania przez bezpośrednie wiązanie transferyny do receptorów powierzchniowych (8). Produkuje on dwa białka wiążące transferynę – TbpB i TbpA (transferrin binding protein). Zazwyczaj białka te wykazują znaczną specyficzność gatunkową, np. białka Tbp App umożliwiają wykorzystanie jedynie świńskiej transferyny jako źródła żelaza (1).

TbpB jest lipoproteiną o masie ok. 60 kDa zakotwiczoną w błonie zewnętrznej za pomocą N-terminalnych reszt kwasów tłuszczowych. TbpA posiada masę ok. 100 kDa. Jako białko transmembranowe stanowi ono kanał transportujący jony żelaza w poprzek błony zewnętrznej. Pozyskiwanie żelaza polega na związaniu go na powierzchni bakteryjnej transferyny i odłączeniu od niej jonów żelaza, dzięki skoordynowanemu działaniu TbpB i TbpA. Współdziałanie tych dwóch białek prowadzi do transportu żelaza poprzez błonę zewnętrzną i wiązania go z białkami przestrzeni periplazmatycznej (8, 10).

Wśród szczepów App reprezentujących różne serotypy występują trzy różne TbpB (o masie 60, 62 i 65 kDa). Ich znaczna rozbieżność strukturalna przyczynia się do indukcji serotypowo-specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Dla przykładu, immunizacja świń białkiem TbpB o masie 60 kDa skutkowałą ograniczoną stymulacją układu immunologicznego, niewystarczającą do indukcji efektywnej ochrony przed infekcją App (8, 10). Wskazuje to, iż białka Tbp nie są jedynym elementem niezbędnym do wywołania skutecznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko zakażeniom App.

Powszechnym sposobem pozyskiwania niezbędnego dla bakterii żelaza jest także uwalnianie Hb z erytrocytów przy udziale hemolizyny. Uwolniona Hb lub inne związki hemowe wiązane są następnie przez specyficzne struktury bakteryjne umożliwiające ich pochłanianie. App posiada dwa białka wiążące hemoglobinę (hemoglobin-binding protein, Hbp) o masie ok. 75 i 105 kDa, wchodzące w skład OMP. Białko o masie 75 kDa ma jednocześnie zdolność wiązania heminy. Białko o masie 105 kDa charakteryzuje się wysoką homologią z białkiem wiążącym hemoglobinę HbpA innych bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*. Wykazano obecność genu kodującego to białko u wszystkich serotypów App (9).

Niektóre bakterie wydzielają do środowiska związki zwane sideroforami. Są to niskocząsteczkowe substancje, wiążące żelazo z bardzo wysokim powinowactwem i swoistością. Ze względu na budowę chemiczną siderofory można zaliczyć do związków fenolowych lub hydroksamatów. System pozyskiwania jonów żelaza przy udziale sideroforów kodowany jest przez cztery geny *fuhC*, *fhuD*, *fhuB* i *fhuA* umiejscowione w pojedynczym operonie. Białko *FhuA*, o masie molekularnej 77 kDa, zaliczane jest do OMP i stanowi receptor sideroforu. *FhuD* (35,6 kDa) to periplazmatyczna pro-

teina odpowiedzialna za translokację sideroforu związanego z jonami żelaza, z zewnętrznej na wewnętrzną błonę. Ostatnie dwa geny kodują białka o masie 28,5 kDa (FhuC) i 69,4 kDa (FhuB). Stanowią one elementy systemu transportu typu ABC biorącego udział w pobieraniu żelaza (10). U wszystkich serotypów App zidentyfikowano wszystkie wymienione powyżej geny. Synteza FhuA nie jest regulowana obecnością żelaza, oznacza to, że niewielka ilość tego pierwiastka nie zaburza ekspresji fhuA App (10).

Jeśli komórki App zdolne są do przeżycia i replikacji w tkankach świni, już po kilku godzinach od zakażenia drogą aerogenną dochodzi do rozprzestrzenienia się zarazka w ustroju, głównie drogą naczyń limfatycznych. Z tchawicy zakażonej świni App można izolować już między 3. a 6. godziną po infekcji, zaś z płuc po 9 godzinach od doświadczonego zakażenia zwierząt. Wskazuje to, że działanie znajdujących się w tchawicy czynników hamujących proces zakaźny zostaje przełamane dużą zjadliwością zarazków, które mają silne właściwości antyfagocytarne.

Replikacja App w układzie oddechowym świni skutkuje powstaniem zmian patologicznych w płucach. Ostra postać choroby charakteryzuje się gwałtownym przebiegiem z wysiękiem włóknikowym w jamie opłucnowej, natomiast przebieg chroniczny cechuje włóknikowe zapalenie opłucnej oraz zmiany martwicowe, zlokalizowane głównie w płatach przeponowych płuc (7, 20).

Z czasem choroba przechodzi w formę endemiczną, przy której świni stają się nosicielami bakterii, co sprzyja rozprzestrzenianiu się infekcji w stadzie i utrzymywaniu się patogenu w środowisku. U tych świń App umiejscawia się głównie w płucach i/lub migdałkach, rzadziej w jamie nosowej (7).

Na zakończenie należy dodać, że infekcja App może przenosić się z zakażonej lochy na potomstwo. Niemniej jednak, ponieważ z siarą przekazywany jest zazwyczaj wysoki poziom odporności biernej, tą drogą zakażeniu ulega tylko część prosiąt z miotu. W tym kontekście warto podkreślić, że App jest dobrym immunogenem i nawet jeśli locha nie była szczepiona, ale zetknęła się z patogenem w okresie prośności, to może przekazać potomstwu wysoki poziom odporności biernej (7, 21).

Jak wspomniano powyżej, zakażenie App stymuluje układ immunologiczny. Oprócz odpowiedzi nieswoistej (pobudzenia makrofagów i neutrofilii), pobudzana jest odpowiedź swoista (humoralna i komórkowa). Wydzielane immunoglobuliny skierowane są przeciwko szerokiej gamie struktur bakteryjnych, tj.: otoczce, LPS, toksynom, OMP, dysmutazie ponadtlenkowej i białkom wiążącym żelazo (7). Istotną rolę w obronie przeciwko App odgrywają przeciwciała klasy G, a także sekretoryjne IgA, które zapobiegają kolonizacji powierzchni śluzówki (16). Krążące immunoglobuliny wykrywane są ok. 10.-14. dnia po infekcji, a maksymalny poziom osiągają one w 4.-6. tygodniu. Mogą się one utrzymywać przez kilka miesięcy (7).

Podsumowując, patogeniza pleuropneumonii jest procesem złożonym, który nie został jeszcze w pełni poznany. Nie ulega wątpliwości, że rozwój choroby uzależniony jest, z jednej strony, od patogenności szczepów, a z drugiej – od właściwości osobniczych organizmu, w tym przede wszystkim od sprawności funkcjonowania układu immunologicznego.

Piśmiennictwo

- Baltes N., Hennig-Pauka I., Gerlach G. F.: Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 209, 283-287.
- Bossé 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. *Mikrobes Infec.* 2002, 4, 225-235.
- Cho W. S., Chae C.: Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 2001, 125, 34-40.
- Frey J.: RTX-toxins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their potential role in virulence, [w:] Cado C. J., Crosa J. H.: *Molecular mechanisms of bacterial virulence*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 1994, 325-340.
- Frey J.: Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 1995, 3, 257-261.
- Frey J., Kuhnert P.: RTX toxins in Pasteurellaceae. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002, 292, 149-158.
- Gottschalk M., Taylor D. J.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, [w:] Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D. J.: *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA 2006, 563-576.
- Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I., Ducatelle R.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* 1997, 58, 239-249.
- Jacques M.: Role of lipooligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* 1996, 4, 408-410.
- Jacques M.: Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* 2004, 68, 81-85.
- 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.
- 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.
- Markowska-Daniel I., Urbaniak K.: Czynniki zjadliwości *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Medycyna Wet.* 2010 – w druku.
- Møller K., Nielsen R., Andersen L. V., Kilian M.: Clonal analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* population in a geographically restricted area by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 623-627.
- Negrete-Abascal E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., García R. M., de la Garza 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.
- Rycroft A. N., Garside L. H.: *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *Vet. J.* 2000, 159, 18-36.
- 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.
- Stanislawska J., Interewicz B., Olszewski W. L.: Odpowiedź leukocytów gospodarza na antygeny bakteryjne. *Post. Mikrobiol.* 2003, 42, 301-317.
- Sthitmatee N., Sirinarumit 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.
- Tarasiuk K.: Charakterystyka szczepów *Actinobacillus pleuropneumoniae* przy użyciu metod fenotypowych. *Praca hab., PIWet, Puławy* 1997.
- Vigre H., Angen Ø., Barfod K., Lavritsen D. T., Sørensen V.: Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Vet. Microbiol.* 2002, 89, 151-159.
- Zhang Y., Tennent J. M., Ingham A., Beddome G., Prideaux C., Michalski W. P.: Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 189, 15-18.