

Développement et intérêt d'un test PCR multiplex permettant la détection et le typage d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

Sophie RIGOUT, B. CHEVALLIER

ADIAGÈNE S.A., 38 rue de Paris, 22000 Saint-Brieuc

Développement et intérêt d'un test PCR multiplex permettant la détection et le typage d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

La détection d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, par les techniques de bactériologie classiques présente des limites, notamment pour des prélèvements effectués sur les porcs vivants. La forte contamination des prélèvements et la présence d'espèces proches sont à l'origine de ces difficultés. Un test PCR multiplex permettant l'identification et le typage d'*A. pleuropneumoniae* a donc été développé. Ce test, qui a été évalué avec une collection de 113 souches, possède une sensibilité de 99 % et une spécificité de 100 %. Le typage des sérotypes de l'espèce *A. pleuropneumoniae* donne 4 groupes : sérotypes 1-9-11 ; sérotypes 5a-5b-10 ; sérotypes 2-4-8-12 ; sérotypes 3-6-7 et biovar 2. La comparaison de quantifications bactériennes réalisées par turbidimétrie, par culture et par PCR, nous a permis d'observer que 90 à 99 % des *A. pleuropneumoniae* présents dans une culture en phase stationnaire ne sont pas cultivables. Ce phénomène est largement accentué par la congélation des bactéries pour cette espèce. Le stade de croissance et les températures de conservation des bactéries n'ont pas d'influence sur le seuil de détection de la PCR.

Development and advantage of a multiplex PCR assay for the detection and typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Classical bacteriological approaches are often unsuitable for the detection and identification of the etiologic agent of swine pleuropneumoniae, *Actinobacillus pleuropneumoniae*. This is specially true with samples collected from live animals as they contain several bacterial contamination including species closed to *A. pleuropneumoniae*. To overcome this difficulty, we have developed a multiplex PCR assay for the specific identification and typing of *A. pleuropneumoniae*. Evaluation of the assay sensitivity and specificity was assessed using a collection composed of 113 bacterial strains and shown to be respectively of 99 % and 100 %. Based on our assay the specie *A. pleuropneumoniae* can be divided in four typing groups i) serotypes 1-9-11, ii) serotypes 5a-5b-10, iii) serotypes 2-4-8-12 and iv) serotype 3-4-6-7 and biovar 2. Quantitative analysis performed in parallel by turbidimetry, cultivation and PCR revealed that 90 to 99 % of *A. pleuropneumoniae* present in a sample is not cultivable. This is particularly true for samples that have been frozen as *A. pleuropneumoniae* is highly sensible to the freezing process. In contrast, sensitivity of the PCR assay is not affected by these parameters, storage temperature and growth phase.

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae, agent étiologique de la pleuropneumonie hémorragique porcine ou actinobacillose, est un coccobacille Gram- pléomorphe appartenant à la famille des *Pasteurellaceae* (BORR, 1991). *A. pleuropneumoniae* est divisé en 2 biovars : le biovar 1, dont les souches sont NAD-dépendantes et le biovar 2, dont les souches sont NAD-indépendantes. Le sérotypage des souches d'*A. pleuropneumoniae* est basé sur les antigènes de la capsule polysaccharidique (MITTAL et al, 1983). Il a permis la distinction de 14 sérotypes, les sérotypes 1 et 5 étant respectivement subdivisés en 1a, 1b et 5a, 5b (JOLIE et al, 1994 ; NIELSEN, 1986).

Le pouvoir pathogène d'*A. pleuropneumoniae* semble homogène au sein des biovars et des sérotypes. D'après des observations faites sur le terrain et des infections expérimentales, les souches du biovar 1 sont plus virulentes que celles du biovar 2. Les sérotypes du biovar 1 les plus virulents sur le terrain sont les sérotypes 1a, 1b, 5a, 5b, 9, 10 et 11 (BECK et al, 1994 ; DOM et HAESEBROUCK, 1992). Au sein de certains sérotypes, comme le sérotype 2, on peut observer des souches plus ou moins pathogènes. Parallèlement, des différences entre souches du même sérotype ont aussi été observées par polymorphisme génomique (CHEVALLIER et al, 1998).

Le pouvoir pathogène d'*A. pleuropneumoniae* est principalement dû à la sécrétion d'exotoxines RTX (Repeats in structural Toxin). A ce jour, 3 toxines RTX ont été caractérisées : APX (*A. pleuropneumoniae* RTX Toxin) I, II et III (FREY, 1995). Les toxines APX ont des activités hémolytiques et/ou cytotoxiques plus ou moins importantes. L'organisation génétique des gènes apx est bien conservée au sein de chaque sérotype (FREY, 1995).

Les isollements d'*A. pleuropneumoniae* ont augmenté d'un facteur cinq en France entre 1989 et 1996. Les sérotypes les plus fréquemment rencontrés en France sont les sérotypes 2, 1, 9, 11 (CHEVALLIER et al, 1997). La présence d'un sérotype est fortement lié au site d'isolement ; en effet les porcs infectés au niveau du poumon hébergent en majorité les sérotypes 2, 1-9-11 puis 3-6-8, alors que le portage au niveau des amygdales ne fait pas ressortir de sérotype en particulier.

De nouvelles espèces proches d'*A. pleuropneumoniae* ont été récemment définies. Les souches *Haemophilus minor* group deviennent des *Actinobacillus minor*, *Haemophilus* taxon D et E deviennent des *Actinobacillus porcinus*, *Haemophilus* taxon F devient *Actinobacillus indolicus* (MOLLER et al, 1996). Ces espèces bactériennes, naturellement présentes dans le tractus respiratoire des porcs, possèdent des caractères biochimiques proches d'*A. pleuropneumoniae*, ce qui rend leur identification quelquefois délicate.

L'isolement d'*A. pleuropneumoniae* dans des prélèvements comprenant de nombreuses autres espèces bactériennes comme les biopsies d'amygdale ou les écouvillons nasaux, est aujourd'hui difficile et peu sensible. De nouvelles techniques de biologie moléculaire comme la PCR sont de plus en plus utilisées en diagnostic en raison de leur spécificité et de leur sensibilité (CANDRIAN, 1995). Déjà de nombreux travaux ont permis la mise au point de tests PCR pour la

détection d'*A. pleuropneumoniae* (SIROIS et al, 1991 ; FREY et al, 1995 ; OSAKI et al, 1997 ; GRAM et AHRENS, 1998), mais aussi pour la majorité des pathogènes animaux (PFEFFER et al, 1995). Les travaux les plus récents présentent une détection par PCR spécifique de l'espèce *A. pleuropneumoniae* et la différenciation des sérotypes au sein de l'espèce en utilisant le gène *omlA*. Ce type de test PCR devrait pouvoir apporter de meilleures sensibilité et spécificité dans l'analyse des prélèvements effectués sur des porcs vivants. En partant des données obtenues par ces laboratoires de recherche, nous avons conçu un test PCR commercial simple d'utilisation, permettant la détection et le typage des colonies d'*A. pleuropneumoniae*.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes autres que les souches de référence d'*A. pleuropneumoniae*, les souches de mycoplasmes et *Lawsonia intracellularis*, ont été obtenues auprès du LDA22 et du LVD35. Elles ont été cultivées dans les conditions utilisées par ces laboratoires. Toutes les souches utilisées dans cette étude sont mentionnées dans le tableau 1.

1.2. Préparation des ADN

Des ADN purifiés ont été obtenus auprès du CNEVA-Ploufragan pour les souches de référence d'*A. pleuropneumoniae*, du laboratoire vétérinaire de Copenhague pour les mycoplasmes et de l'Université du Nebraska pour *Lawsonia intracellularis*. L'ADN des autres espèces bactériennes a été préparé selon la technique décrite par FREY et al (1995).

1.3. Analyse PCR

Quatre couples d'amorces PCR ont été définis à partir de la séquence interne des gènes *omlA* d'*A. pleuropneumoniae* (CHEVALLIER et KOBISCH, Genbank, 1997). Chacun des couples d'amorces permet l'amplification spécifique d'une des 4 séquences du gène *omlA* présentes dans l'espèce. Un plasmide, correspondant au contrôle interne d'amplification du test, a été construit de manière à être co-amplifié avec un des quatre couples d'amorces. Cette molécule de contrôle interne valide le bon fonctionnement de la réaction PCR dans chaque tube et confirme les résultats négatifs. Les analyses PCR ont été réalisées en utilisant 1 µl d'ADN bactérien mélangé à 49 µl des réactifs PCR commercialisés par AdiaGène SA. Les réactions ont été effectuées en utilisant un thermocycleur 9700 de chez Perkin-Elmer. Les ADN amplifiés ont été visualisés sous lumière UV, après électrophorèse en gel d'agarose à 2% et coloration au bromure d'éthidium.

1.4. Quantification d'*A. pleuropneumoniae*

Une préculture d'une nuit a été réalisée par ensemencement d'une colonie d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 9 dans 5 ml de milieu PPLO (NICOLET, 1971). Un millilitre de cette culture a été inoculé dans 50 ml de milieu PPLO et l'inoculum a été placé à 37°C sans agitation. La quantification des bac-

Tableau 1 – Résultats PCR obtenus pour 113 souches de 32 espèces bactériennes isolées chez le porc

Espèces bactériennes	Nb de souches	Souches PCR positif
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biovar 1	41	41
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biovar 2	4	3
<i>Actinobacillus suis</i>	3	0
<i>Actinobacillus minor</i> = H. minor group	2	0
<i>Actinobacillus porcinus</i> = H. taxon D et E	2	0
<i>Actinobacillus indolicus</i> = H. taxon F	4	0
<i>Actinobacillus non typable</i>	5	0
<i>Haemophilus parasuis</i>	7	0
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	2	0
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	2	0
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	2	0
<i>Mycoplasma flocculare</i>	2	0
<i>Serpulina hyodysenteriae</i>	2	0
<i>Serpulina pilosicoli</i>	2	0
<i>Serpulina intermediae</i>	2	0
<i>Serpulina Innocens</i>	2	0
<i>Lawsonia intracellularis</i>	2	0
<i>Escherichia coli</i>	2	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	0
<i>Enterobacter intermedium</i>	1	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	0
<i>Clostridium perfringens</i>	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0
<i>Staphylococcus sp</i>	1	0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	0
<i>Pasteurella multocida</i>	2	0
<i>Streptococcus suis</i>	2	0
<i>Campylobacter faecalis</i>	3	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	0
<i>Campylobacter coli</i>	2	0
<i>Actinomyces pyogenes</i>	1	0

téries a été effectuée entre 0 et 24 heures de culture en utilisant les 3 techniques suivantes :

1.4.1. Numération bactérienne

Des dilutions successives (de raison 10) faites à partir de 100 µl de culture ont été réalisées en milieu liquide PPLO. 100 µl de chaque dilution ont été étalés sur une boîte de PPLO solide. Les colonies ont été dénombrées après une incubation d'une nuit à 37°C.

1.4.2. Turbidimétrie

Le trouble des cultures a été mesuré par turbidimétrie (DO à 600 nm) en utilisant un spectrophotomètre Unicam. Toutes les cultures ont été diluées au demi dans du PPLO liquide, avant la mesure.

1.4.3. Numération par PCR

Une gamme de dilutions (de raison 10) allant de 0 à 10⁻⁷ a été réalisée pour chaque mesure. Les bactéries contenues dans 100 µl de dilution ont été centrifugées (10 min à 3 300 g) et lysées dans 100 µl de tampon de lyse selon la technique décrite par FREY et al (1995). Une analyse PCR a été réali-

sée sur 1 µl de chaque lysat bactérien afin de déterminer la limite d'amplification PCR de chaque culture quantifiée.

1.5. Conservation d'*A. pleuropneumoniae* en culture

Une préculture d'une nuit a été réalisée par ensemencement d'une colonie d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 2, 5, 7 ou 9 dans 5 ml de milieu PPLO. Un millilitre de chaque culture a été inoculé dans 30 ml de milieu liquide PPLO et l'inoculum, placé à 37°C sans agitation. Des aliquotes de 1 ml de ces cultures ont été conservées à 20°C, 4°C et -20°C. Une quantification des bactéries présentes dans ces cultures a été réalisée après 1 heure, 6 heures, 12 heures, 24 heures, 48 heures et 96 heures de conservation aux trois températures en utilisant 3 techniques (numération, turbidimétrie et PCR).

2. RÉSULTATS

2.1. Caractéristiques de la PCR

La répartition des souches de référence et des souches de terrain d'*A. pleuropneumoniae* est présentée dans le tableau 2 (p 366).

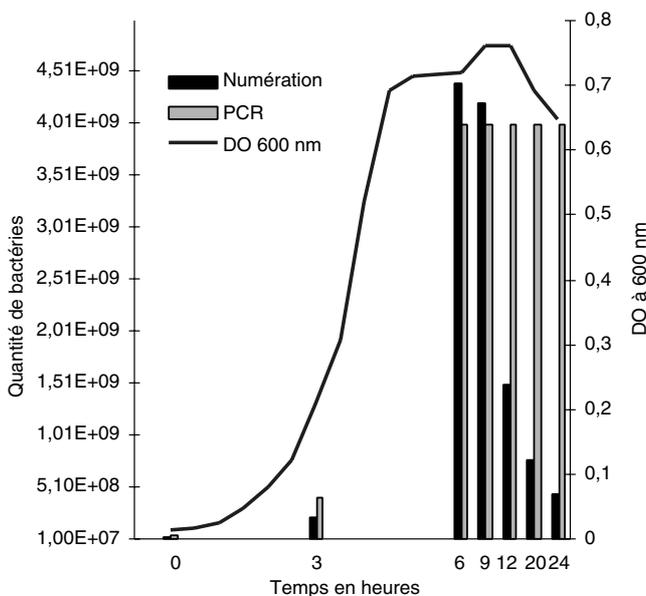
Les souches de terrain des sérotypes 4 et 12 n'appartiennent pas au même groupe PCR que les souches de référence des mêmes sérotypes.

Une collection de 113 souches de 32 espèces bactériennes isolées chez le porc a été utilisée pour évaluer le test PCR (tableau 1). 44 souches d'*A. pleuropneumoniae* sont positives en PCR sur les 45 testées. Une seule souche appartenant au biovar 2 est PCR négative. Les 68 souches des autres espèces testées sont PCR négatives. La sensibilité du test est de 99 % et la spécificité de 100 %. Le seuil de détection du test PCR est de $4 \cdot 10^4$ bactéries par ml de culture.

2. 2. Quantification d'*A. pleuropneumoniae* en culture au cours du temps

La courbe de croissance d'une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 9 est présentée figure 1. La numération bactérienne permet d'observer une diminution du nombre de colonies cultivables à partir de 12 heures de culture. Après 24 heures de culture, il y a 10 fois moins de colonies qu'après 6 heures. Cette diminution du nombre de bactéries cultivables a aussi été observée chez toutes les autres souches que nous avons testées (sérotypes 2, 5 et 7). Après plus de 30 heures à 37 °C, le nombre de bactéries cultivables peut ne représenter que 1 à 5 % des bactéries quantifiées en fin de phase exponentielle de croissance (6 heures). Parallèlement, la turbidité de la culture et la quantité de bactéries détectées par PCR restent globalement stationnaires à partir de 5 heures de culture et pendant toute la durée de l'expérience (24 heures).

Figure 1 - Quantification d'une culture d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* par turbidimétrie, numération bactérienne et PCR



2. 3. Conservation d'*A. pleuropneumoniae* en milieu liquide

La culture d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 9, quantifiée et aliquotée après 12 heures à 37°C, avait une DO à 600 nm de 0,706 et titrait $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml (numération bactérien-

ne sur milieu solide). $4 \cdot 10^9$ bactéries ont été mises en évidence par PCR.

La comparaison des numérations bactériennes réalisées sur les aliquotes entre 1 à 96 heures de conservation à 20°C, 4°C et -20°C, est présentée figure 2. Le nombre de bactéries cultivables varie peu à 20°C et baisse progressivement d'un facteur 10 en 96 heures à 4°C. À -20°C, le nombre de bactéries cultivables baisse brutalement d'un facteur 400 après 6 heures et perd un facteur 10⁷ sur la totalité des 96 heures d'expérience. Le même phénomène a été observé pour des souches de sérotype 2, 5 et 7.

Après 6 heures de conservation à -20°C, une baisse brutale de la turbidité a été observée (figure 3). Aucune influence de la température de conservation n'a été observée pour la numération des bactéries par PCR (figure 4). Le nombre de bactéries quantifiées par PCR reste stable pendant les 96 heures.

3. DISCUSSION-CONCLUSION

Le test PCR multiplex développé a été évalué avec une collection de 113 souches : il possède une spécificité de 100 % et une sensibilité de 99 %. Ce test est particulièrement intéressant pour les espèces *A. minor*, *A. porcicus* et *A. indolicus* récemment décrites et qui sont souvent difficiles à différencier de l'espèce *A. pleuropneumoniae*. Ce test PCR permet aussi la répartition des souches de l'espèce en 4 groupes. L'ensemble des souches d'un même sérotype appartient au même groupe PCR à l'exception des souches de référence des sérotypes 4 et 12 qui sont différentes des souches de terrain. En ce qui concerne les souches de terrain, nous pouvons remarquer un regroupement des sérotypes les plus virulents (BECK et al, 1994 - DOM et HAESBROUCK, 1992) dans les deux premiers groupes. Ce typage PCR permet, contrairement au typage par coagglutination de séparer clairement les sérotypes 3 et 8 (MITTAL et al, 1988).

Tableau 2 – Répartition des souches d'*A. pleuropneumoniae* en 4 groupes par PCR

Groupe PCR	Les souches de référence	Les souches de terrain
	sérotype	sérotype
I	1, 9, 11, 12	9, 11
II	5a, 5b, 10	5, 10
III	2, 8	2, 8, 4, 12
IV	3, 4, 6, 7	3, 7, Biovar 2

L'isolement d'*A. pleuropneumoniae* est réalisé en routine sur gélose chocolat, gélose PPLO (Nicolet, 1971) ou sur gélose sélective de base au sang additionnée de lincomycine et bacitracine (Cofrac, BA160 & BA 180 – GRAM et al, 1996). Les colonies repiquées sont identifiées par référence aux caractères biochimiques de l'espèce. Cependant, même sur milieu sélectif, des souches d'*Escherichia coli* ou différentes pasteurelles peuvent croître facilement et masquer le développement des *A. pleuropneumoniae* recherchés. Le test PCR peut être utilisé pour la détection d'*A. pleuropneumoniae* à

Figure 2 - Numération bactérienne d'une culture d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* conservée à 20°C, 4°C et -20°C

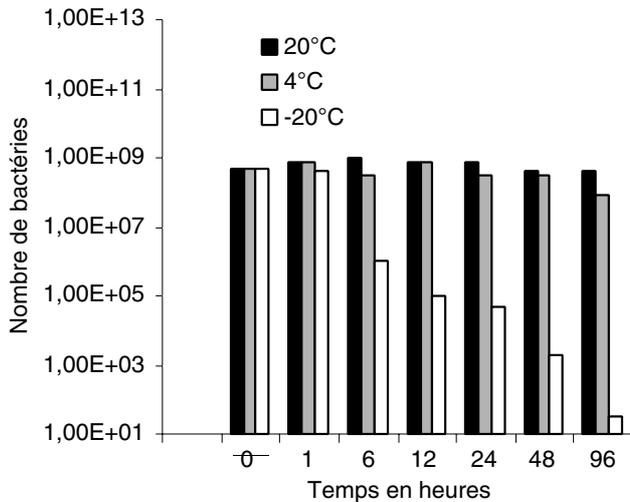


Figure 3 - Turbidité d'une culture d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* conservée à 20°C, 4°C et -20°C

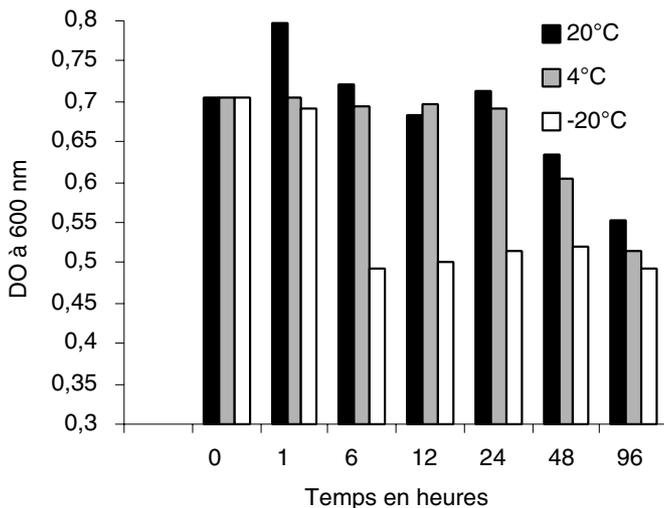
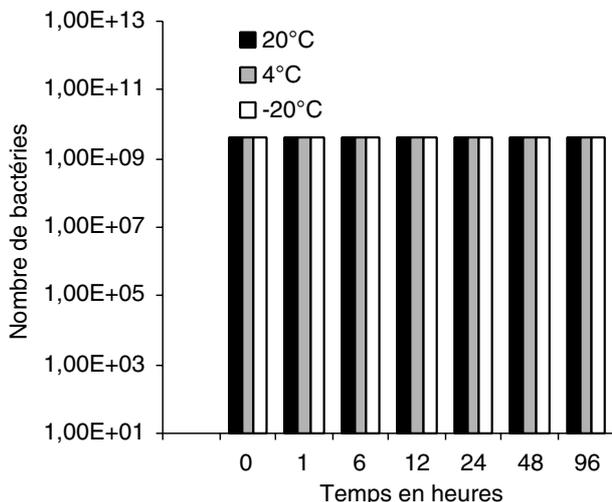


Figure 4 - Quantification PCR d'une culture d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* conservée à 20°C, 4°C et -20°C



partir de cultures de mélanges bactériens issus des amygdales de porcs et présents sur différents milieux de culture sélectifs (GRAM et al, 1996). Durant ces études, le test PCR a été utilisé comme test de référence pour le choix du milieu de culture (JACOBSEN et NIELSEN, 1995 – GRAM et al, 1996). Le seuil de détection de ce test PCR a été déterminé à 10^3 CFU par analyse. Le seuil de détection de notre test PCR ($4 \cdot 10^4$ bactéries par ml de culture) doit donc permettre de détecter la présence d'une petite colonie, même sur une boîte de milieu gélosé fortement contaminée. Un test PCR effectué sur le raclage des colonies obtenues sur milieu gélosé, qui est en fin de développement chez Adia-gène, devrait présenter un grand intérêt pour les prélèvements fortement contaminés comme les biopsies d'amygdale et les écouvillons nasaux.

Le fort polymicrobisme de ces prélèvements est très probablement à l'origine de la faible sensibilité de l'isolement d'*A. pleuropneumoniae*. C'est ce qu'a pu constater une équipe canadienne en utilisant une technique comprenant des billes immunomagnétiques (IMS) pour extraire *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 des amygdales, avant les mettre en culture (GAGNE et al, 1998). La technique IMS a un seuil de détection 1000 fois inférieur aux techniques de cultures classiques (10^1 CFU/0,1g d'amygdales pour IMS, 10^4 CFU/0,1g d'amygdales pour les techniques classiques). La détection d'*A. pleuropneumoniae* dans les amygdales d'animaux infectés en utilisant ces billes est 3 fois plus efficace (68% des prélèvements positifs) que par les cultures classiques (22% de prélèvements positifs). Cette étude met en évidence un portage d'*A. pleuropneumoniae*, au niveau des amygdales, jusqu'alors difficile à observer. Cependant même si, comme la technique des billes immunomagnétiques, la PCR devrait permettre la détection de très faibles quantités de bactéries, aujourd'hui nous ne connaissons pas le devenir chez le porc de ces quelques bactéries et la probabilité qu'elles puissent engendrer une pathologie.

Par ailleurs, il est probable que le nombre de colonies obtenues sur les milieux de culture gélosé, soit inférieur à la quantité de bactéries présentes dans le prélèvement. En effet, nous avons pu observer une diminution du nombre de bactéries cultivables dans des cultures pures d'*A. pleuropneumoniae* en phase stationnaire. Des travaux récents réalisés en utilisant la cytométrie de flux montrent qu'une partie des bactéries de différentes espèces, prélevées dans un environnement hostile, sont viables mais non cultivables (CARO et al, 1998). Après 30 heures de culture, seulement 1 à 10 % des *A. pleuropneumoniae* donnent une colonie sur milieu gélosé. Il est donc possible que le nombre de bactéries présentes dans un prélèvement de porc soit 100 fois supérieur aux CFU dénombrées par les analyses bactériologiques classiques. Dans ce cas, l'analyse par PCR présente l'avantage de détecter l'ensemble des bactéries présentes, y compris les bactéries viables mais non-cultivables.

Le manque de sensibilité de la numération bactérienne est probablement dû à la fragilité des *A. pleuropneumoniae*. Cette fragilité des bactéries à la congélation a pu être mise en évidence en comparant une même culture conservée à 20°C, 4°C et -20°C. Il semble que lors de la solidification du milieu liquide (après plus d'une heure à -20°C) plus de 99 % des bactéries soient fragilisées au point de ne plus être cultivables. Le choc engendré par la décongélation peut entraî-

ner la lyse de nombreuses bactéries libérant ainsi son ADN génomique dans le milieu. Cet ADN libéré est alors exposé aux nucléases et peut être rapidement détruit, si la température est supérieure à 4°C. Seule une préparation rapide de l'ADN bactérien après décongélation, telle que nous l'avons réalisé, permet de bloquer les activités de dégradation de l'ADN. Ceci explique les résultats PCR identiques que nous avons observés pour trois températures de conservation.

Ces observations ont des conséquences directes sur la conservation d'un prélèvement avant l'analyse. En effet, si la PCR ne nécessite pas une température de conservation particulière des bactéries, il est impératif de ne pas congeler les prélèvements avant une recherche d'*A. pleuropneumoniae* par culture bactériologique.

Notre test PCR peut être adapté à l'analyse directe des biopsies d'amygdale et écouvillons nasaux. Mais nous travaillons aussi pour améliorer la capacité d'analyse de la

PCR. En effet, par PCR nous pouvons estimer la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon. Ces travaux feront l'objet d'une étude devant permettre de corréler la quantité d'*A. pleuropneumoniae* présents dans les amygdales des porcs et la pathologie observée dans l'élevage. La détermination de seuils critiques de portage, pourrait permettre de classer les élevages et de prévoir les risques d'apparition de la pathologie.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ANVAR et la Région Bretagne pour le financement de ce projet, le LDA22 et le LVD35 pour leur collaboration, la Société de Développement Régionale de Bretagne, la société Financière de Brocéliande et la Banque de Bretagne pour leur soutien financier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BECK M., VAN DEN BOSCH J., JONGENELEN I.M.C.A., LOEFFEN P.L.W., NIELSEN R., et al., 1994. J. Clin. Microbiol. 32, 2749-2754.
- BORR J.D., RYAN D.A., MACINNES J.I., 1991. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 121-129.
- CARO A., GOT P., BALEUX B., 1998. 5ème Congrès de la Société Française de Microbiologie.
- CANDRIAN U., 1995. J. Microbiol. Meth. 23, 89-103.
- CHEVALLIER B., MORVAN H., GUZYLACK S., KOBISCH M., 1997. Journées Rech. Porcine en France. 29, 23-30.
- CHEVALLIER B., DUGOURD D., TARASIUK K., HAREL J., GOTTSCHALK M., et al., 1998. FEMS Microbiol. Lett. 160, 209-216.
- DOM P., HAESBROUCK F., 1992. Zentralbl. Veterinarmed. 39, 303-306.
- FREY J., 1995. Trends Microbiol. 3, 257-261.
- FREY J., BECK M., VAN DEN BOSCH J.F., SEGERS R.P.A.M., NICOLET J., 1995. Molec. Cell. Probes. 9, 277-282.
- GAGNE A., LACOUTURE S., BROES A., D'ALLAIRE S., GOTTSCHALK M., 1998. J. Clin. Microbiol. 36, 251-254.
- GRAM T., AHRENS P., NIELSEN J.P., 1996. Vet. Microbiol. 51, 95-104.
- GRAM T., AHRENS P., 1998. J. Clin. Microbiol. 36, 443-448.
- JACOBSEN M.J., NIELSEN J.P., 1995. Vet. Microbiol. 47, 191-197.
- JOLIE R.A., MULKS M.H., THACKER B.J., 1994. Vet. Microbiol. 38, 329-349.
- MITTAL K.R., HIGGINS R., LARIVIÈRE S., 1983. J. Clin. Microbiol. 18, 1355-1357.
- MITTAL K.R., HIGGINS R., LARIVIÈRE S., 1988. J. Clin. Microbiol. 26, 985-989.
- MOLLER K., FUSSING V., GRIMONT P. A. D., PASTER B. J., DEWHIRST F. E., KILIAN M., 1996. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 951-956.
- NIELSEN R., 1986. Acta Vet. Scand. 27, 453-455.
- NICOLET J., 1971. Zentabl. Backteriol. Hyg. 216, 487-195.
- OSAKI M., SATO Y., TOMURA H., ITO H., SEKIZAKI T., 1997. J. Vet. Med. Sci. 59, 213-215.
- PFEFFER M., WIEDMANN M., BATT C.A., 1995. Vet. Res. Com. 19, 375-407.
- SIROIS M., LEMIRE E.G., LEVESQUE R.C., 1991. J. Clin. Microbiol. 29, 1183-1187.