

Détection d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* par la technique PCR : Évaluation terrain

B. CHEVALLIER (1), Béatrice BLANCHARD (1) , A. KÉÏTA (2), É. PAGOT (2), P. POMMIER (2)

(1) ADIAGÈNE S.A. - 38 rue de Paris, 22000 Saint-Brieuc
(2) C.T.P.A. - Zoopôle Développement, BP7, 22440 Ploufragan

Détection d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* par la technique PCR : Évaluation terrain

La détection de l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) par les techniques de bactériologie présente des limites, notamment pour des prélèvements effectués sur les porcs vivants. Un test PCR d'une spécificité de 100 % concernant les espèces bactériennes isolées chez le porc, a permis de détecter 98 % des souches d'*A. pleuropneumoniae* biovar 1 et 50 % des souches du biovar 2. Une étude a été menée afin d'évaluer l'utilisation de ce test PCR pour le dépistage et le typage d'*A. pleuropneumoniae* sur des animaux dans différents types d'élevages, en comparaison des méthodes de diagnostics sérologique et bactériologique.

Au cours de cette étude, nous avons observé une plus grande sensibilité pour les analyses PCR effectuées à partir de biopsies d'amygdale par rapport aux écouvillons nasaux. Les résultats des recherches bactériologique et PCR d'*A. pleuropneumoniae* dans les biopsies d'amygdale, ont permis d'observer une sensibilité 2 à 3 fois supérieure en faveur de la technique PCR. Ce test PCR possède, par rapport à la sérologie, une spécificité apparente de 94 %. Une corrélation significative entre le nombre de porcs PCR positifs et l'expression de l'actinobacillose a été observée sur un ensemble 23 élevages.

Ces résultats nous ont permis de confirmer le potentiel de ce test PCR en élevages conventionnels. Sa mise en place en complément de la sérologie, pour un dépistage des porteurs asymptomatiques ou lors de l'entrée de nouveaux animaux dans un élevage, devrait permettre de mieux suivre le niveau sanitaire des élevages et d'approfondir les connaissances épidémiologiques concernant cette pathologie.

Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR : field evaluation

Detection of the etiologic agent of porcine pleuropneumonia, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, is difficult using standard procedure especially when samples are collected from living pigs.

A multiplex PCR test for specific identification and typing of *A. pleuropneumoniae* has been developed in our laboratory. The PCR test evaluated has a specificity of 100 % on porcine bacterial species and can detect 98% of *A. pleuropneumoniae* biovar 1 strains and 50% of biovar 2. We have evaluated this PCR test under field conditions by performing the PCR assay with clinical samples and by comparing the results with those obtained with the same samples using two routinely methods (bacteriological and serological analysis).

First, results indicate that the PCR test is more sensitive with tonsils biopsies than nasal swabs. Second, our PCR test is twice to three time more sensitive than classical bacteriology with tonsils biopsies. We have also observed a specificity of 94 % when the PCR test was compared to the serological results. A good correlation between the clinical expression of the disease in herds and the number of pigs PCR positive for *A. pleuropneumoniae* was also been observed.

Our study demonstrates that this PCR test may be a powerful tool to detect *A. pleuropneumoniae* in subclinical infected herds. Thus, the use of the PCR test in combinaison with the serological screening would greatly contribute to a better understanding of the epidemiology of this important disease and would participate in establishing better surveillance programs.

INTRODUCTION

La pleuropneumonie porcine génère des pertes économiques dans la majorité des pays pratiquant l'élevage intensif porcin (NICOLET, 1992). La présence de l'agent pathogène *Actinobacillus pleuropneumoniae* dans un élevage, est le plus souvent détectée par des analyses sérologiques (GOTTSCHALK et al, 1994) ou par des isolements bactériologiques à partir de lésions pulmonaires caractéristiques et de biopsies d'amygdale (GRAM et al, 1996). La découverte de nouvelles espèces proches (*A. minor*, *A. porcinus*, *A. indolicus*) partageant avec *A. pleuropneumoniae* un grand nombre de caractères biochimiques identiques, rendent parfois difficile l'identification de ces espèces réputées non pathogènes, par les techniques classiques (MOLLER et al, 1996). De plus, le diagnostic sérologique d'*A. pleuropneumoniae* en France ne permet à l'heure actuelle la détection que de 3 sérotypes sur les 14 que comporte l'espèce. Face aux limites de ces techniques, de nouveaux tests de diagnostic utilisant la technologie PCR ont été développés (SIROIS et al, 1991 ; FREY et al, 1995 ; RIGOUT et CHEVALLIER, 1999). Ils permettent un dépistage très sensible et spécifique de l'ADN d'*A. pleuropneumoniae* dans les prélèvements.

Les souches de l'espèce *A. pleuropneumoniae*, réparties en deux biovars et 14 sérotypes (JOLIE et al, 1994 ; NIELSEN 1986), possèdent un pouvoir pathogène attribué principalement à l'expression de toxines de type RTX. Aucune de ces bactéries n'exprimant l'ensemble des quatre toxines décrites chez *A. pleuropneumoniae* (FREY 1995 ; SCHALLER et al, 1999), la virulence des souches diffère selon les sérotypes (BECK et al, 1994). Le site d'isolement varie aussi en fonction des sérotypes présents dans l'élevage. En effet, les sérotypes les plus virulents en France représentent 60 % des isolements à partir de poumons, alors qu'il n'y a pas de sérotype majoritaire isolé au niveau des amygdales (CHEVALLIER et al, 1997). Cette observation confirme de nombreuses études concernant le portage asymptomatique des *A. pleuropneumoniae* au niveau des amygdales (GAGNE et al, 1998 ; CHIERS et al, 1999). Ce portage asymptomatique peut entraîner l'introduction du pathogène dans des élevages indemnes lors de l'arrivée de nouveaux animaux. Nous avons donc voulu au cours de notre étude, évaluer l'utilisation d'un test de dépistage et de typage d'*A. pleuropneumoniae* par PCR afin d'identifier les animaux porteurs ou faiblement infectés dans différents types d'élevage, en comparaison des méthodes de diagnostics sérologique et bactériologique.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Choix des élevages

Les élevages de production, de multiplication ou de sélection ont été répartis en quatre classes suivant leur statut vis-à-vis d'*A. pleuropneumoniae* par les vétérinaires qui les suivent.

1.1.1. Définition des classes

Classe 1 : Élevages considérés indemnes d'*A. pleuropneumoniae*.

Aucune sérologie positive, aucun symptôme, aucune mortalité ni de lésion caractéristique d'*A. pleuropneumoniae* n'ont été observés.

Classe 2 : Élevages dont la présence d'*A. pleuropneumoniae* a été soupçonnée, mais probablement indemnes au moment de l'essai.

Les sérologies sont négatives ou douteuses. Il n'y a pas ou peu de symptômes cliniques caractéristiques d'*A. pleuropneumoniae* au moment de l'essai, pas de mortalité ni de lésion observée à l'abattoir. Il n'y a pas eu d'isolement bactériologique d'*A. pleuropneumoniae*.

Classe 3 : Élevages faiblement positifs.

Quelques tests sérologiques sont positifs et des lésions caractéristiques d'*A. pleuropneumoniae* peuvent être observées. Il n'y a pas ou peu de mortalité, mais *A. pleuropneumoniae* a déjà été isolé dans l'élevage.

Classe 4 : Élevages fortement positifs.

La présence d'*A. pleuropneumoniae* dans l'élevage a récemment été mise en évidence par sérologie et bactériologie. Il y a de la mortalité, des symptômes cliniques et des lésions pulmonaires caractéristiques d'*A. pleuropneumoniae*.

1.1.2. Critères de non-inclusion des élevages dans les protocoles

Protocole 1 : Afin d'éviter au maximum toute interférence et toute confusion dans les symptômes, les élevages ayant des symptômes de pathologies respiratoires déclarés autres que l'actinobacillose au moment de l'essai, n'ont pas été retenus. Sont aussi exclus les élevages vaccinés contre l'actinobacillose.

Protocole 2 : Pas de critère de non-inclusion

1.2. Protocoles d'étude

Deux protocoles d'étude ont été menés en parallèle. Au total 362 porcs ont été étudiés.

1.2.1. *Protocole 1 :* Peu après l'entrée en engraissement, dix élevages de porcs ont été suivis par le CTPA. Dans chaque élevage, dix porcs ont été sélectionnés. Ils ont ensuite été suivis jusqu'à leur abattage. Des analyses bactériologiques et PCR ont été réalisées à partir d'écouvillons nasaux et de biopsies d'amygdale. Une recherche sérologique des *A. pleuropneumoniae* sérovar 2 et 9-11 a été effectuée à partir de prise de sang. Ces analyses ont été réalisées sur les animaux âgés d'environ 80 jours, puis de nouveau à 150 jours environ.

1.2.2. *Protocole 2 :* Vingt-trois élevages, représentant 262 porcs ont été sélectionnés par des vétérinaires praticiens, qui les ont répartis en quatre classes suivant les critères définis précédemment. Dans chaque élevage, une biopsie d'amygdale a été prélevée sur 10 porcs âgés d'environ 150 jours. Pour 3 élevages, 18 porcs ont été prélevés. Ces biopsies d'amygdale ont été uniquement analysées par PCR.

1.3. Recherches bactériologique et sérologique d'*A. pleuropneumoniae*

Les isolements d'*A. pleuropneumoniae* à partir des écouvillons nasaux ou des biopsies d'amygdales ont été réalisés

par les laboratoires LDA22 et LVD 35. Après traitement pour l'analyse bactériologique, ces mêmes échantillons ont été transmis à Adiaène pour réaliser l'analyse PCR.

La détection des anticorps circulants anti- *A. pleuropneumoniae* serovar 2 ou 9-11 a été effectuée au LVD35 en utilisant la trousse ELISA commercialisée par Vétoquinol diagnostics.

1.4. Les souches bactériennes

Des ADN purifiés utilisés pour les tests PCR ont été obtenus auprès du AFSSA-Ploufragan pour les souches de référence d'*A. pleuropneumoniae*. Les autres souches d'*Actinobacillus* ont été achetées auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) ou obtenues auprès de différents laboratoires d'analyses vétérinaires. L'ADN des différentes espèces bactériennes testées a été préparé selon la technique décrite par FREY et al (1995).

1.5. Recherche d'*A. pleuropneumoniae* par PCR

Les analyses par PCR ont été réalisées selon le protocole décrit pour le kit PCR ADIAVET™ APP*.

Ce test permet de différencier les souches d'*A. pleuropneumoniae* (tableau 1) en 4 groupes selon leur sérotype.

Tableau 1 - Répartition des souches d'*A. pleuropneumoniae* en 4 groupes par PCR

Groupe PCR	Sérotypes	Virulence
I	1, 9, 11	Forte 
II	5a, 5b, 10	Forte 
III	2, 4, 7, 8, 12	Intermédiaire 
IV	3, 4, 6, 7 et Biovar 2	Faible 

Les biopsies d'amygdale ou les écouillons nasaux sont placés dans 1 ml de sérum physiologique et vortexés 20 secondes. L'ensemble du sérum physiologique est repris dans un microtube puis centrifugé à 3300 g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans

200 µl de tampon de lyse L1 auquel est ajouté 1 µl de réactif L2 (réactifs inclus dans le kit). Les tubes sont incubés pendant 1 heure à 37 °C puis placés à 95°C pendant 5 minutes.

Deux microlitres du lysat ainsi obtenu sont mélangés à 48 µl de réactif PCR.

Pour les souches bactériennes, 2 µl de lysat sont également analysés par PCR.

À l'issue de la réaction PCR, 10 µl d'amplifiats sont visualisés sous lumière UV, après migration dans un gel d'agarose additionné de bromure d'éthidium.

1.6. Tests statistiques

L'analyse statistique des corrélations entre les différentes recherches d'*A. pleuropneumoniae* (PCR sur biopsie / PCR sur écouillon – PCR / bactériologie - PCR / sérologie) a été réalisée en utilisant le test de symétrie de Mac Nemar. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel SYSTAT (WILKINSON, 1990). La comparaison entre les résultats des analyses PCR et la classe des élevages a été analysée en utilisant le test du Chi 2 de Pearson.

2. RÉSULTATS

2.1. Spécificité du test PCR

Les résultats PCR obtenus à partir de 232 souches appartenant à 33 espèces bactériennes différentes sont présentés dans le tableau 2.

Parmi les 27 espèces d'*Actinobacillus* testées proches d'*A. pleuropneumoniae* (*A. minor*, *A. indolicus*, *A. porcinus*, *A. non typable*, et *A. lignieresii*) seules 3 souches *A. lignieresii*, isolées sur des bovins ont donné un signal PCR positif dans le groupe PCR IV (3,4,6,7,et B2). Les quelques souches d'*A. lignieresii* isolées chez le porc se sont révélées négatives.

Le test PCR possède une spécificité de 100 % concernant les souches d'origine porcine. Trois souches appartenant au biovar 1 se sont révélées PCR négatives portant la sensibilité du test à 98 %. Cependant, deux de ces souches n'ont pas pu être cultivées dans les conditions standard pour être identifiées une seconde fois.

Tableau 2 - Résultats PCR obtenus pour 232 souches de 33 espèces bactériennes

Espèces bactériennes	Nombre de souches	Souches PCR positif
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biovar 1	150	147
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biovar 2	6	3
<i>Actinobacillus</i> proches	19	0
<i>A. lignieresii</i> isolés chez les bovins	3	3
<i>A. lignieresii</i> isolés chez les porcins	2	0
Autres espèces	52	0

(*) Commercialisé par Adiaène SA, 38 rue de Paris – 22000 St-Brieuc

Seulement la moitié des souches du biovar 2 sont positives en PCR

2.2. Comparaison entre les résultats d'analyses PCR obtenues à partir des biopsies d'amygdales et des écouvillons nasaux sur des animaux de 80 et 150 jours : protocole 1

Les résultats sont présentés dans le tableau 3. Le nombre d'analyses PCR positives réalisées à partir des biopsies d'amygdale est supérieur à celui obtenu à partir des écouvillons nasaux à 80 jours et 150 jours ($p < 10^{-3}$). Le même nombre d'animaux PCR positif à partir des biopsies d'amygdale a été observée à 80 et 150 Jours.

Tableau 3 - Comparaison entre les tests PCR sur les biopsies d'amygdales et les écouvillons nasaux, obtenus à partir d'animaux de 80 et 150 jours (protocole2)

Prélèvements	80 jours	150 jours
Nombre de tests PCR positifs sur biopsies d'amygdale	35/100	35/98
Nombre de tests PCR positifs sur écouvillons nasaux	11/98	3/98

2.3. Comparaison entre les recherches d'*A. pleuropneumoniae* par bactériologie et par PCR : protocole 1

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 - Comparaison entre les isollements *A. pleuropneumoniae* par bactériologie et PCR à partir des biopsies d'amygdales de porcs de 80 et 150 jours

a- Porcs de 80 jours

		Bactériologie		
		+	-	
PCR	+	10	25	35
	-	4	61	65
		14	86	100

Sensibilité de la bactériologie : $10/35 = 28,6\%$
Spécificité de la bactériologie : $61/65 = 93,8\%$

b- Porcs de 150 jours

		Bactériologie		
		+	-	
PCR	+	4	31	35
	-	6	56	62
		10	87	97

Sensibilité de la bactériologie : $4/35 = 11,4\%$
Spécificité de la bactériologie : $56/62 = 90,3\%$

Quel que soit l'âge de l'animal, le nombre d'animaux positifs par PCR est 2 à 3 fois supérieur à celui observé en bactériologie ($p < 10^{-3}$). En comparaison avec la PCR, la sensibilité de la bactériologie est de 28,6 % à 80 jours et 11,4 % à 150 jours. Par contre, sa spécificité est supérieure à 90 %.

2.4. Comparaison entre les résultats sérologiques et PCR à 80 et 150 jours, protocole 1

Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Comme la sérologie ne permet de rechercher que les sérotypes 2 et 9-11, seuls les résultats PCR positifs identifiant un groupe I ou III ont été conservés positifs pour cette comparaison. A 80 jours la moitié des porcs positifs en sérologie sont négatifs en PCR ($p < 2.10^{-3}$). Cette proportion augmente à 65 % pour 150 jours ($p < 10^{-3}$). Par rapport à la sérologie, la PCR a une spécificité apparente de 94 % et une sensibilité apparente évoluant de 47,2 % à 34,9 % de 80 à 150 jours. Lors de ces analyses, les termes de sensibilité et spécificité ont été utilisés par "souci de simplification". Il ne s'agit pas de spécificité, ni de sensibilité vraie puisque la comparaison porte sur des éléments différents : la recherche d'antigène par la technique PCR d'une part et la recherche d'anticorps par la sérologie d'autre part.

2.5. Comparaison des résultats PCR en fonction de la classe d'élevage, protocole 2

Nous avons voulu observer les résultats PCR obtenus à partir de porcs présents dans des élevages plus au moins contaminés par *A. pleuropneumoniae*. Les résultats présentés

Tableau 5 - Comparaison entre la recherche d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 2 et 9-11 par sérologie et PCR à partir de porcs de 80 et 150 jours

a- Porcs de 80 jours

		Sérologie		
		+	-	
PCR	+	17	4	21
	-	19	60	79
		36	64	100

Sensibilité de la PCR : $17/36 = 47,2\%$
Spécificité de la PCR : $60/64 = 93,7\%$

b- Porcs de 150 jours

		Sérologie		
		+	-	
PCR	+	22	2	24
	-	41	34	75
		63	36	99

Sensibilité de la PCR : $22/63 = 34,9\%$
Spécificité de la PCR : $34/36 = 94,4\%$

Tableau 6 – Comparaison entre la classe des élevages et le nombre de tests PCR positifs

Classe d'élevages	1	2	3	4
Porcs positifs en PCR	3 (6%)	8 (8%)	18 (27%)	22 (47%)
Porcs négatifs en PCR	47 (94%)	90 (92%)	49 (73%)	25 (53%)
Total	50	98	67	47
Nbre d'élevages	4	7	7	5
Répartition des sérotypes (cf tableau 1)				

dans le tableau 6, montrent une différence significative entre les classes d'élevages par rapport aux analyses PCR ($p < 10^{-3}$). Sur les 23 élevages étudiés et parmi les 11 élevages déterminés comme exempts d'*A. pleuropneumoniae* (classe 1 et 2), seuls 6 à 8 % des animaux ont été trouvés positifs en PCR. De plus, aucun de ces animaux ne portait une souche d'un des sérotypes les plus virulents classés dans les groupes PCR I et II. Les élevages présentant une pathologie de type chronique (classe 3) possédaient 27 % de porcs positifs et 40 % des animaux portaient des sérotypes très virulents. Les élevages en phase clinique présentaient 47 % de porcs positifs, dont 62 % portaient des sérotypes très virulents.

DISCUSSION

Le test PCR, d'une spécificité de 100 % concernant les espèces bactériennes isolées chez le porc, permet de détecter 98 % des souches d'*A. pleuropneumoniae* biovar 1 et 50 % des souches du biovar 2. La sélection d'une cible génétique la plus spécifique possible de l'espèce permettant d'écarter l'ensemble des espèces d'*Actinobacillus* proches non pathogènes, a généré une sensibilité beaucoup plus faible du test pour les souches du biovar 2. Même si certaines souches du biovar 2 sont pathogènes, elles sont généralement moins virulentes que les souches du biovar 1 (DOM et HAESBROUCK, 1992 ; FREY, 1995). Ces souches positives du biovar 2 sont d'ailleurs classées dans le groupe PCR IV avec les sérotypes les moins virulents du biovar 1 (RIGOUT et CHEVALLIER, 1999).

Notre essai scindé en deux protocoles, nous a permis d'une part de comparer la recherche d'*A. pleuropneumoniae* par PCR, bactériologie et sérologie et d'autre part d'observer les résultats PCR obtenus dans différents élevages classés en fonction de leur statut vis-à-vis de l'actinobacillose.

Au cours d'un suivi de 100 porcs appartenant à 10 élevages, nous avons pu constater une plus grande sensibilité des analyses PCR effectuées à partir de biopsies d'amygdale par rapport aux écouvillons nasaux. La présence plus faible de ces bactéries dans les cavités nasales

des porcs confirme les études réalisées sur l'implantation d'*A. pleuropneumoniae* dans les amygdales (SIDIBÉ et al, 1993). En effet, lors d'une infection expérimentale, CHIERS et al (1999) ont pu observer qu'il ne faut que 30 minutes à *A. pleuropneumoniae* pour adhérer à la muqueuse épithéliale des amygdales et quelques heures pour atteindre les cryptes amygdaliennes. Au regard de ces observations et de nos résultats, la biopsie d'amygdale semble donc être le prélèvement approprié pour le dépistage des animaux porteurs.

Lors de la comparaison entre les résultats des recherches bactériologiques et PCR d'*A. pleuropneumoniae* dans les biopsies d'amygdale, nous avons pu constater une sensibilité 2 à 3 fois supérieure en faveur de la technique PCR. Des résultats similaires ont déjà été décrits pour la comparaison entre deux techniques bactériologiques, montrant le manque de sensibilité de la technique de bactériologie classique par rapport à une capture sur billes immunomagnétiques avant la mise en culture (GAGNÉ et al, 1998). Ce manque de sensibilité de la technique bactériologique classique peut être expliqué par la forte contamination des amygdales par de nombreuses bactéries d'espèces parfois très proches d'*A. pleuropneumoniae*. Si la présence de ces nombreux contaminants bactériens n'a quasiment aucun effet sur l'analyse par PCR, les milieux de culture utilisés pour l'analyse bactériologique sont très souvent envahis, limitant le développement des *A. pleuropneumoniae* recherchés. Par rapport à la PCR, la sensibilité de la bactériologie est de 28,6 % pour des porcs de 80 jours et 11,4 % pour des porcs de 150 jours. La bactériologie reste cependant une technique spécifique (spécificité supérieure à 90 %).

Lors de la comparaison entre les résultats des recherches sérologiques et PCR d'*A. pleuropneumoniae*, nous avons pu constater une sensibilité 1,5 à 2,5 fois supérieure en faveur de la sérologie. La sérologie ne permet le dépistage d'une séroconversion que vis-à-vis des sérotypes 2, 9-11, ce qui nous a imposé de limiter le nombre de porcs PCR positif pris en compte pour cette comparaison.

Ces résultats nous permettent de confirmer la très bonne spécificité du test PCR (94 %) par rapport à la sérologie. La sérologie semble plus sensible que la PCR surtout chez les animaux de 150 jours. Cette observation peut être expliquée par l'augmentation au cours du temps des porcs ayant séroconverti. Effectivement, alors que les animaux restent séropositifs durant plusieurs mois, la présence d'*A. pleuropneumoniae* détectée par PCR au niveau des amygdales peut évoluer rapidement entre la contamination ou l'élimination. La PCR présente donc l'avantage d'identifier rapidement les porcs redevenus négatifs après un traitement.

Dans la deuxième partie de notre essai, nous avons pu constater sur 23 élevages, une bonne corrélation entre le nombre de porcs PCR positifs et l'expression de l'actinobacillose. La présence des sérotypes les plus virulents appartenant aux groupes PCR I et II, n'a été observée que dans les élevages exprimant la maladie. Outre la nécessité de réaliser un typage des souches détectées, le nombre d'animaux PCR positifs doit pouvoir nous renseigner sur l'importance de la pathologie dans l'élevage. Cette valence quantitative pourra,

dans le cas de la PCR et contrairement au suivi sérologique, être particulièrement appréciée lors de la mise en place et du suivi d'un traitement ou d'une vaccination.

Les résultats de notre étude nous ont permis d'évaluer le potentiel d'un test PCR dans le cadre d'un essai en élevage conventionnel. Ce test est plus sensible que la bactériologie classique tout étant spécifique. Sa mise en place pour un dépistage des porteurs asymptomatiques ou lors de l'entrée de nouveaux animaux dans un élevage, devrait permettre, en complément des techniques sérologiques, de mieux suivre le niveau sanitaire des élevages vis-à-vis de l'infection à *A. pleuropneumoniae*.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ensemble des vétérinaires et des groupements ayant participé à cette étude, A. PHILIPPE et M. GOUEDARD pour leur participation technique ainsi que l'ANVAR et la Région Bretagne pour le financement de ce projet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BECK M., VAN DEN BOSCH J., JONGENELEN I.M.C.A. et al, 1994. J. Clin. Microbiol., 32, 2749-2754.
- CHEVALLIER B., MORVAN H., GUZYLACK S., KOBISCH M., 1997. Journées Rech. Porcine en France, 29, 23-30.
- CHIERS K., HAESBROUCK F., VAN OVERBEKE I., CHARLIER G., DUCATELLE R., 1999. Vet. Microbiol., 68, 301-306.
- 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.
- GOTTSCHALK M., ALTMAN E., CHARLAND N., DE SALLE F., DUBREUIL J. D., 1994. Vet. Microbiol., 42, 91-104.
- GRAM T., AHRENS P., NIELSEN J.P., 1996. Vet. Microbiol., 51, 95-104.
- JOLIE R.A., MULKS M.H., THACKER B.J., 1994. Vet. Microbiol., 38, 329-349.
- MOLLER K., FUSSING V., GRIMONT P. A. D. et al, 1996. Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 951-956.
- NIELSEN R., 1986. Acta Vet. Scand., 27, 453-455.
- NICOLET J., 1992. In "Diseases of swine", 7ème édition, 401-408. Iowa State University Press, Ames, 401-403.
- RIGOUT S., CHEVALLIER B., 1999. Journées Rech. Porcine en France, 31, 365-370.
- SCHALLER A., KUHN R., KUHNERT P. et al, 1999, Microbiology, 2105-2116.
- SIDIBÉ S., MESSIER S., LARIVIÈRE S., GOTTSCHALK M., MITTAL K. R., 1993. Can. J. Vet. Res., 57, 204-208.
- SIROIS M., LEMIRE E.G., LEVESQUE R.C., 1991. J. Clin. Microbiol., 29, 1183-1187.
- WILKINSON L., 1990. Evanston II, SYSTAT.

