

# Étude de la réponse immunitaire anti-FHA du porcelet suite à une infection expérimentale par *Bordetella bronchiseptica*

Laurence HIBRAND-SAINT OYANT, Gwénola TANNEAU, Claire CHEVALEYRE, H. SALMON

Institut National de la Recherche Agronomique,  
Station de Pathologie Infectieuse et Immunologie - 37380 Nouzilly

Avec la collaboration technique de P. Bernardet, R. Delaunay, D. Musset et W. Piémont

## Étude de la réponse immunitaire anti-FHA du porcelet suite à une infection expérimentale par *Bordetella bronchiseptica*

*Bordetella bronchiseptica*, hôte de la cavité nasale, est un candidat potentiel pour l'obtention d'un vecteur vaccinal de la muqueuse respiratoire. Après une infection expérimentale par voie intranasale de *Bordetella bronchiseptica* chez le porcelet, nous montrons que la bactérie persiste 6 semaines après l'inoculation. Une étude par ELISA des anticorps (IgG et IgA), dans le sérum et dans les sécrétions nasales, dirigés contre l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), protéine d'adhésion majeure de la bactérie, a révélé une réponse immunitaire anti-FHA, chez les porcelets infectés. Dans les sécrétions nasales, la réponse immunitaire de type IgA est précoce, dès la 1<sup>ère</sup> semaine qui suit l'inoculation, croissante et durable. Dans les séras, la réponse immunitaire de type IgG est tardive, débutant 4 semaines après l'inoculation, et persistant au moins 10 semaines après l'inoculation. Nous montrons de plus, que la diminution de l'excrétion des bactéries correspond à l'apparition des IgA anti-FHA dans les sécrétions nasales. En conclusion, *Bordetella bronchiseptica*, grâce à la synthèse de la FHA, apparaît comme un vecteur vaccinal capable d'initier et de stimuler une réponse immunitaire locale IgA de la muqueuse respiratoire.

## Study of the anti-filamentous haemagglutinine (FHA) immune response in the piglet, resulting from the experimental infection with *Bordetella bronchiseptica*

*Bordetella bronchiseptica*, which can be found in the nasal cavity, is a potential vaccine vector candidate of the respiratory mucosa. After experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* intra-nasally in piglets, we showed that the bacteria are still present 6 weeks after initial infection. A study by ELISA of the antibodies (IgG and IgA), in serum and nasal secretions, against filamentous haemagglutinine (FHA), a major protein involved in the bacteria's adhesion, revealed an anti-FHA immune response in infected piglets. In nasal secretions, the immune response of IgA isotype was rapid and appeared as early 1 week post-infection (p.i.) and remained high. In sera, the immune response of IgG isotype was seen later, beginning 4 weeks p.i. and remaining present up to 10 weeks p.i. Furthermore, we showed that the reduction in the excretion of bacteria was correlated with the appearance of IgA anti-FHA in nasal secretions. In conclusion, *Bordetella bronchiseptica*, owing to the FHA, appears to be a possible vaccine vector able to initiate and stimulate a local immune response in the respiratory mucosa.

## INTRODUCTION

Les bactéries appartenant au genre *Bordetella* sont capables de coloniser le tractus respiratoire supérieur de leur hôte lorsqu'elles expriment un ensemble de facteurs d'adhésion et de virulence. Parmi les facteurs d'adhésion, on trouve l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), la pertactine, les fimbriae. Les facteurs de virulence regroupent l'adénylatecyclase-hémolyse, la toxine dermonécrotique, la toxine cytotrachéale et le lipopolysaccharide. *Bordetella pertussis*, agent de la coqueluche chez l'homme, exprime une protéine supplémentaire la toxine de pertussis présentant la double fonction de toxine et de facteur d'adhésion. A l'exception de la toxine cytotrachéale synthétisée de manière constitutive, les facteurs de virulence et d'adhésion sont exprimés sous l'action d'un système de régulation sensoriel à deux composants BvgSA (*Bordetella* virulence gene ; ARICO et al, 1989 ; STIBITZ et YANG, 1991).

*Bordetella bronchiseptica* fait partie du genre *Bordetella* défini par MORENO-LOPEZ (1952) dont le membre type est *Bordetella pertussis* agent de la coqueluche chez l'homme.

*Bordetella bronchiseptica* est responsable de pneumonies aiguës, subaiguës et chroniques chez le porc (MARTINEAU et al, 1982 ; GOODNOW, 1980 ; KOBISCH et al, 1979) et peut favoriser le rôle pathogène de *Pasteurella multocida* dans la rhinite atrophique porcine (DEEB et al, 1990 ; ACKERMAN et al, 1991). *B. bronchiseptica* est aussi impliquée dans l'apparition de trachéobronchite chez le chien mais aussi de pathologies respiratoires chez le chat, le lapin, le cobaye et le rat (GOODNOW, 1980 ; WOOLFREY et MODDY, 1991 ; SWITZER et al, 1966).

Des études réalisées chez l'homme infecté naturellement et chez des souris infectées expérimentalement, ont montré que la FHA (pour revue LOCHT et al, 1993) de *B. pertussis* induisait, à l'instar de la toxine cholérique, la production d'anticorps d'isotype IgA (AMSBAUG et al, 1993). De plus, le travail réalisé par RENAULD-MONGÉNIE et al (1996) montre que l'utilisation de *Bordetella pertussis* exprimant une protéine recombinante en fusion avec la FHA induit une réponse immunitaire mucoale contre les deux constituants protéiques. Les études de réponse immunitaire contre la bactérie entière suite à une infection expérimentale de *B. bronchiseptica* chez le porc, ont montré la présence d'anticorps dans le nez (KONO et al, 1994) et dans les sera (SMITH et al 1982 ; KONO et al, 1994) mais les antigènes reconnus par ces anticorps n'ont pas été identifiés.

Afin de développer l'obtention d'un vecteur potentiellement vaccinal de la muqueuse respiratoire chez le porcelet, nous avons étudié la capacité de la FHA, produite par *B. bronchiseptica*, à induire une réponse immunitaire dans le nez et dans le sérum après une infection expérimentale.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Bactéries

#### *Origine de la souche et conditions de culture*

*Bordetella bronchiseptica* NL1013 a été isolée d'un porc infecté (ANTOINE et LOCHT, 1992).

Les bactéries sont cultivées à 37°C dans un milieu de culture solide Bordet Gengou (BG) (DIFCO laboratories) supplémenté avec 15% de sang de mouton hépariné en présence d'ampicilline à la concentration finale de 50 µg/ml pendant 48 h ou dans les mêmes conditions sous agitation dans un milieu de culture liquide Stainer-Scholte (STAINER et SCHOLTE, 1970).

Pour l'infection expérimentale, les bactéries sont cultivées en milieu liquide jusqu'à la phase exponentielle. La densité optique déterminée à 600 nm permet, après centrifugation, d'ajuster le culot bactérien à la concentration désirée (unité formant colonie (UCF)/ ml) dans du PBS.

### 1.2. Animaux

Les porcs utilisés dans cette expérience sont des mini-porcs histocompatibles (haplotype d/d) (SACHS et al, 1976) élevés au laboratoire. Afin d'éviter une influence d'anticorps préexistants sur l'induction de la réponse immunitaire, comme décrit par KONO et al (1994), les porcs ont été choisis avec un minimum d'anticorps préexistants anti-FHA. Les animaux infectés par *Bordetella bronchiseptica* ont été placés en porcherie étanche de type 3. Les truies sont maintenues près des porcelets pendant la lactation (environ 25 jours).

### 1.3. Infections expérimentales

#### 1.3.1. Inoculations

Quatre porcelets issus de deux portées, différents suivant l'âge (respectivement 7 jours et 10 jours) ont été inoculés avec  $10^7$  UCF de *Bordetella bronchiseptica* NL1013 dans 100 µl de PBS, ceux d'une troisième portée inoculés intranasalement avec 100 µl de PBS ont servi de témoin.

#### 1.3.2. Prélèvements et traitement des échantillons

Des prélèvements de sang et de sécrétions nasales ont été effectués avant l'inoculation puis à raison de une ou deux fois par semaine jusqu'à la fin des expériences, comme indiqué dans le tableau 1.

**Tableau 1** - Conditions d'inoculation expérimentale des porcelets

Portée (n porcelets)	Inoculation intranasale	Âge des porcelets (jours)	Durée de l'expérience (semaines p.i.)
Témoin (3)	100 µl de PBS	5	8
I (2)	$10^7$ UCF de <i>B. bronchiseptica</i> dans 100 µl de PBS	10	10
II (2)	$10^7$ UCF de <i>B. bronchiseptica</i> dans 100 µl de PBS	7	10

Les sécrétions nasales ont été récupérées sur une mèche de coton stérile puis extraites dans un ml de PBS contenant 0,05% de Tween-20. Les extraits ont été centrifugés à 6000g pendant 15 minutes. Les surnageants ont été congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation en ELISA et les culots ont permis le suivi bactérien.

Le sérum extrait à partir du sang, conservé à -20°C, est utilisé dans les titrages ELISA.

#### 1.4. Numération bactérienne

Les culots obtenus après centrifugation des sécrétions nasales, ont été resuspendus dans 1 ml de PBS, puis déposés avec ou sans dilution sur des boîtes de Pétri de BG supplémentées avec de l'ampicilline à la concentration finale de 50 µg/ml, du fungizone à la concentration finale de 25 µg/ml (GIBCO BRL) et 15% du sang de mouton hépariné. Après 48 heures de croissance à 37°C, l'identification des bactéries a été réalisée par gram et galerie API 20 NE (Biomérieux). La concentration bactérienne a été ensuite exprimée en log<sub>10</sub> d'UCF / ml de sécrétion nasale.

#### 1.5. Détermination de la réponse immunitaire anti-FHA par ELISA

Pour déterminer le titre des anticorps anti-FHA de classe IgG et IgA, nous avons utilisé la technique ELISA indirecte. Cent µl d'une solution de FHA, purifiée par la technique de MENOZZI et al (1991), à 5 µg/ml de tampon carbonate 0,05M pH 9,6 ont été fixés dans les puits d'une plaque NUNC Maxisorb pendant 2h à 37°C. Après quatre lavages avec une solution de PBS-0,05% Tween-20, chaque puits de la plaque ELISA a été saturé avec une solution de PBS-0,05%Tween-20-5% BSA pendant 1h à 37°C. Après des lavages comme précédemment décrits, 100 µl des échantillons, dilués dans PBS-0,05% Tween-20 ou non dilués a été ajouté et incubé la nuit à 4°C. Après les lavages et l'ajout de 100 µl de conjugué, la plaque a été incubée 2 h à 37°C. Pour révéler les IgG, nous avons utilisé des anticorps de lapins anti-IgG de porc marqué à la peroxydase (Sigma). Les IgA ont été révélés à l'aide d'un monoclonal anti-IgA de porc conjugué à la peroxydase par la technique de NAKANE et KAWAOI (1974).

Après lavages, la présence des anticorps a été mise en évidence par l'ajout de 100 µl de substrat [solution de 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après 1 heure à température ambiante, la mesure de l'intensité de la réaction a été mesurée par absorbance à 415 nm (modèle CANBERRA, Bio-Tek intruments). Pour définir les unités ELISA, un échantillon positif, de sérum ou de sécrétion nasale prélevé sur un animal infecté, a été utilisé comme gamme de référence.

## 2. STATISTIQUES

L'ensemble des analyses statistiques, les moyennes d'unités ELISA ± l'erreur standard (sem) et des graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Prism 2.01 software, inc, San Diego, CA). Les unités ELISA des deux portées, I et II, de porcelets inoculés avec *B. bronchiseptica* NL1013 ne montrant pas de diffé-

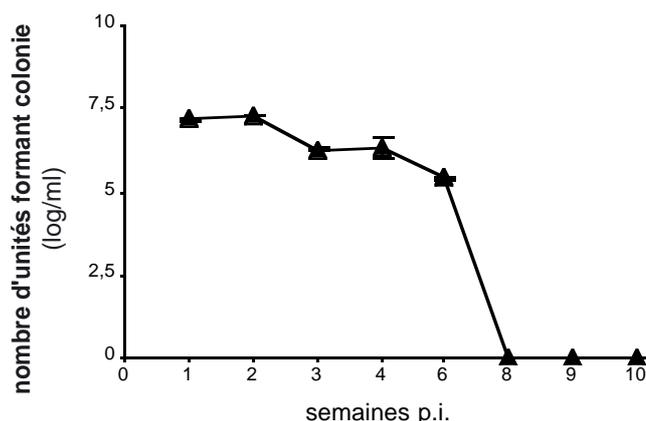
rences significatives par le test t, les valeurs individuelles ont été rassemblées en un seul groupe (infecté).

## 3. RÉSULTATS

### 3.1 Cinétique d'excrétion de *Bordetella bronchiseptica* NL1013 de la muqueuse nasale des porcelets

Après l'inoculation intranasale des porcelets, la cinétique d'excrétion de *Bordetella bronchiseptica* NL1013 a été suivie dans les sécrétions nasales (figure 1). On constate que jusqu'à la deuxième semaine p.i., la concentration bactérienne dans les sécrétions nasales ne diffère pas significativement de celle de l'inoculum puis cette concentration diminue jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine pour disparaître à la 8<sup>ème</sup> semaine. Cette cinétique montre la persistance de *Bordetella bronchiseptica* NL1013 dans la muqueuse respiratoire du porcelet pendant 40 jours.

**Figure 1** - Cinétique d'excrétion de *Bordetella bronchiseptica* NL1013 dans les sécrétions nasales de porcelets infectés



### 3.2. Étude de la réponse immunitaire anti-FHA chez les truies au cours de la lactation

Afin de déceler une éventuelle contamination de la truie par les porcelet infectés expérimentalement, nous avons recherché les bactéries et les anticorps anti-FHA dans les sécrétions nasales et dans le sérum des truies (résultats non montrés).

Aucune bactérie de type *Bordetella* n'a pu être détectée dans les sécrétions nasales des trois truies testées. De même, aucune valeur significative d'anticorps anti-FHA, de type IgA ou IgG, n'a été trouvée dans les sécrétions nasales.

Bien qu'il existe des anticorps préexistants anti-FHA dans le lait et les séras des truies de classe IgG et IgA et dont le titre varie de 350 à 4130 unités ELISA, nous n'avons pas observé de variation significative. Durant la lactation, la quantité d'unité ELISA d'IgG sériques pour les truies des séries I et II, IgA sériques et IgG lactosériques pour les trois truies, détectée est inférieure à 350.

Les valeurs les plus importantes d'unités ELISA ont été trouvées pour les IgG sériques de la truie témoin (1450), IgA lactosériques de la truie de la série I (1020) et II (4130).

Ces anticorps n'augmentent pas de manière significative au cours de la lactation et ne traduisent donc pas la présence d'une infection systémique par *Bordetella bronchiseptica*. Il apparaît donc que les truies ne sont pas contaminées par leurs contacts avec les porcelets infectés, puisqu'aucune colonie de type *Bordetella bronchiseptica* et aucune réponse immunitaire anti-FHA n'a été mise en évidence.

### 3.3. Étude de la réponse immunitaire anti-FHA chez les porcelets

Par rapport aux témoins, une réponse immunitaire de type IgA anti-FHA est observée dans les sécrétions nasales des porcelets infectés par *Bordetella bronchiseptica* (infecté, figure 2). Cette réponse immunitaire débute la deuxième semaine p.i. pour atteindre un pic à la quatrième semaine p.i. On observe un deuxième pic 3 semaines plus tard (7 semaines p.i.) et un troisième pic à la 10ème semaines p.i. Ces pics apparaissent avec des intensités d'unités ELISA croissantes ( $1700 \pm 390$ ,  $2550 \pm 355$ ,  $>3680 \pm 600$  respectivement).

La réponse immunitaire anti-FHA observée dans les sérum des porcelets infectés par *Bordetella bronchiseptica* est de type IgG, sans augmentation significative d'IgA anti-FHA (figure 3). Par rapport aux témoins, la quantité d'IgG commence à augmenter 4 semaines pour atteindre un plateau de  $1464 \pm 464$  de la 7ème semaine à la 10ème semaine p.i. Il

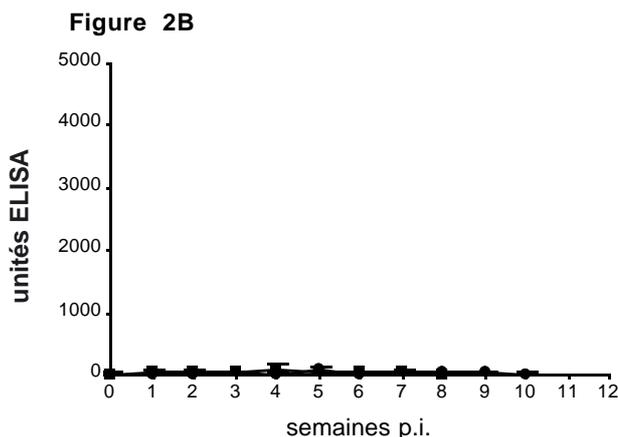
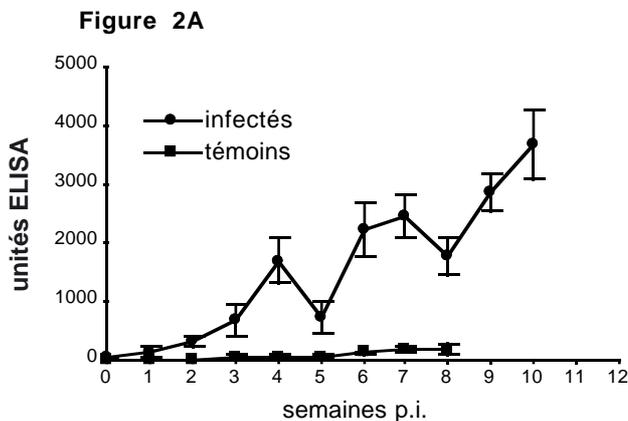
est à noter que cette réponse immunitaire est d'intensité variable selon les porcelets contrairement à la réponse locale (résultats non montrés).

En conclusion, ces résultats montrent qu'une infection intranasale de *Bordetella bronchiseptica* induit chez le porcelet une réponse locale précoce (2ème semaine) et d'isotype IgA anti-FHA suivie d'une réponse systémique tardive (4ème semaine) et d'isotype IgG anti-FHA.

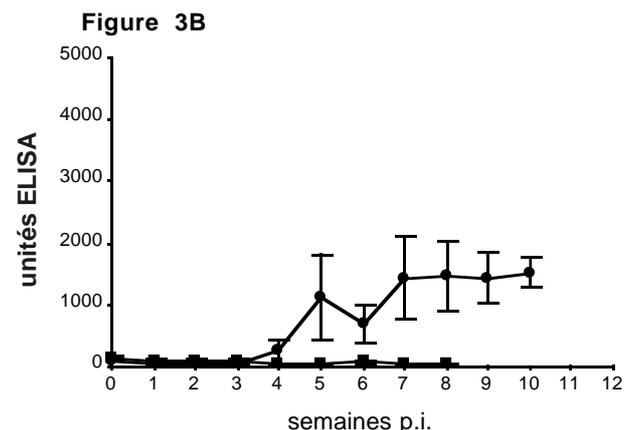
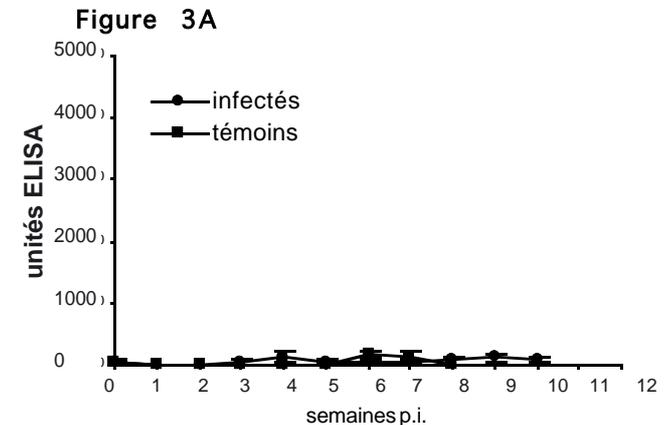
### DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons déterminé la cinétique d'expression locale et sérique des IgG et des IgA anti-FHA, protéine majeure de l'adhésion de *B. bronchiseptica*, suite à une infection expérimentale. Ces infections ont été réalisées sur des porcelets présentant, avant l'inoculation, les plus faibles taux d'unités ELISA anti-FHA. En effet, KONO et al (1994) ont montré que la présence d'anticorps maternels influence la cinétique et la production des anticorps par les porcelets infectés. Néanmoins une éventuelle contamination et influence de la truie-mère a été suivie durant la lactation. Aucune variation des anticorps maternels n'a été corrélée à une infection par *B. bronchiseptica* et la présence d'anticorps anti-FHA avant l'infection chez les truies peut être expliquée par une infection ancienne à *B. bronchiseptica* ou une réaction croisée avec des protéines exprimés par d'autres agents bactériens tel que *Proteus mirabilis* (LOCHT et al, 1993).

**Figure 2** - Cinétique des IgA (2A) et des IgG (2B) anti-FHA dans les sécrétions nasales des porcelets infectés par *Bordetella bronchiseptica* (infectés) et non infectés (témoins)



**Figure 3** - Cinétique des IgA (3A) et IgG (3B) dans le sérum des porcelets infectés par *Bordetella bronchiseptica* (infectés) ou non-infectés (témoins)



La cinétique des bactéries excrétées est comparable à celle observée par KONO et al (1994) qui note une diminution des bactéries 6 semaines après l'infection ; et nous ajoutons dans notre étude que la disparition totale des bactéries excrétées de la muqueuse nasale intervient 8 semaines p.i.

Notre étude montre qu'au moins une partie des IgA induit précocement par *B. bronchiseptica* dans la cavité nasale des porcelets est dirigé contre la FHA, en revanche nous n'avons pas détecté d'anticorps d'isotype IgG anti-FHA localement. La situation inverse est observée dans les sera dans lesquels la réponse immunitaire anti-FHA, uniquement de type IgG, apparaît tardivement, 7 semaines p.i. La réponse locale anti-bactérie entière de type IgG et sérique de type IgA observée dans l'étude de KONO et al (1994) est donc induite par d'autre(s) facteur(s) bactérien(s).

Nos résultats concordent avec les observations des modèles d'infection expérimentale utilisant *B. pertussis* chez la souris concernant la présence d'IgA locaux et d'IgG anti-FHA sériques mais différent dans l'observation d'une synthèse d'IgG dans les lavages broncho-alvéolaires (AMSBAUGH et al, 1993 ; RENAULD-MONGÉNIE et al, 1996) de souris infectées, absente dans la cavité nasale de porc infecté. Néanmoins la cinétique d'IgA anti-FHA dans les sécrétions nasales de porcs est plus précoce que celle observée dans les lavages broncho-alvéolaires de souris. Une étude de la présence d'anticorps anti-FHA dans les lavages broncho-alvéolaires est en cours chez les porcs infectés.

Dans notre étude, nous observons (i) la synthèse d'IgA, 2 semaines p.i., dans la muqueuse nasale coïncidant avec la diminution des bactéries excrétées ce qui suggère, compte-tenu de l'absence des IgG anti-FHA, que les IgA anti-FHA peuvent être responsables de l'élimination des bactéries dans la cavité nasale (ii) un premier pic d'IgA apparaît 4 semaines p.i. (iii) le deuxième pic d'IgA précède d'une semaine la disparition totale des bactéries (iv) une augmentation dans la synthèse d'IgA, d'intensité supérieure aux deux pics précédents malgré la disparition des bactéries.

Comme le cycle d'infection des *Bordetella* fait intervenir un cycle d'internalisation des cellules cibles (macrophages, cellules dendritiques et cellules épithéliales), ce troisième pic d'IgA peut donc correspondre à une restimulation du système immunitaire local par cette fraction bactérienne ; néanmoins nous ne pouvons pas exclure (i) une détection insuffisante des bactéries (ii) une éventuelle sous-estimation des anticorps par la présence de complexe Ig-bactéries dans la cavité nasale avant la 8<sup>ème</sup> semaine p.i.

Cette étude complète les résultats obtenus sur les modèles murins montrant l'importance de la FHA dans les premières étapes de l'infection, que constitue l'adhésion. En effet, dans un modèle *B. pertussis* /souris, des expériences de protection passive et active ont montré que la FHA est un antigène protecteur contre l'infection (SATO et SATO, 1988 ; KIMURA et al, 1990 ; KHELEF et al, 1993). La vaccination par voie intranasale de FHA purifiée confère une bonne protection en favorisant l'élimination de la bactérie de la trachée et des poumons de souris infectées (CAHILL et al, 1995, 1993 ; ROBERTS et al, 1993).

L'intérêt du modèle porcin par rapport au modèle murin pour l'étude de cette bactérie réside dans la possibilité d'étudier la réponse immunitaire propre au tractus respiratoire supérieur. De plus, notre travail montre que de par son tropisme et la capacité de la FHA à induire une réponse locale de type IgA, *Bordetella bronchiseptica* constitue un candidat potentiel pour l'obtention d'un vecteur vaccinal des muqueuses.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat CEE FAIR3-CT96-1339. Les auteurs remercient D. RAZE et C. LOCHT (Laboratoire Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM, Lille) pour nous avoir fourni l'hémagglutinine filamenteuse purifiée ainsi que Fatima SAHLI pour sa contribution technique.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACKERMANN M. R., RIMLER R. B., THURSTON J. R., 1991. Infect Immun., 59, 3626-3629.
- AMSBAUGH D. F., LI Z. M., SHAHIN R. D., 1993. Infect Immun., 61, 1447-1452.
- ANTOINE R. LOCHT C., 1992. Mol Microbiol., 6, 1785-1799.
- ARICO B., MILLER J. F., ROY, C. et al, 1989. Proc.Natl.Acad Sci U.S.A., 86, 6671-6675.
- CAHILL E. S., O'HAGAN D. T., ILLUM L. et al, 1995. Vaccine, 13, 455-462.
- CAHILL E. S., O'HAGAN D. T., ILLUM L., REDHEAD K., 1993. FEMS Microbiol. Lett., 107, 211-216.
- DEEB B. J., DIGIACOMO R. F., BERNARD B. L., SILBERNAGEL S. M., 1990. J. Clin. Microbiol., 28, 70-75.
- GOODNOW R. A., 1980. Microbiol. Rev., 44, 722-738.
- KHELEF N., ZYCHLINSKY A., GUISO N., 1993. Infect. Immun., 61, 4064-4071.
- KIMURA A., MOUNTZOUROS K. T., RELMAN D. A., FALKOW S., COWELL J. L., 1990. Infect. Immun., 58, 7-16.
- KOBISCH M., TILLON J.P., GERRIN G., 1979. Rec. Méd. Vét., 155, 225-232.
- KONO Y., SUZUKI S., MUKAI T. et al, 1994. J. Vet. Med. Sci., 56, 249-253.
- LOCHT C., BERTIN P., MENOZZI F. D., RENAULD. G., 1993. Mol. Microbiol., 9, 653-660.
- MARTINEAU G. P., BROES A., MARTINEAU-DOIZÉ B., 1982. Can. J. Comp. Med., 46, 376-381.
- MENOZZI F. D., GANTIEZ C., LOCHT C., 1991. FEMS Microbiol. Lett., 62, 59-64.
- MORENO-LOPEZ, M., 1952. El genero Bordetella. Microbiol.esp., 5, 177-181
- NAKANE P.K., KAWAOI A. 1974. J Histochem.Cytochem., 22,1084.
- RENAULD-MONGÉNIE G., MIELCAREK N., CORNETTE J. et al, 1996. Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 93, 7944-7949.

- ROBERTS M., CROPLEY I., CHATFIELD S., DOUGAN G., 1993. *Vaccine*, 11, 866-872.
- SACHS D. H., LEIGHT G., CONE J. et al, 1976. *Transplantation*, 22, 559-567.
- SATO Y. SATO H., 1988. *Tokai.J. Exp. Clin. Med.*, 13, Suppl:79-88, 79-88.
- SMITH, I. M., GILES C.J., BASKERVILLE A.J., 1982. *Vet. Rec.*, 22, 488-494.
- STAINER D. W., SCHOLTE M. J., 1970. *J. Gen. Microbiol.*, 63, 211-220.
- STIBITZ S., YANG M. S., 1991. *J. Bacteriol.*, 173, 4288-4296.
- SWITZER W. P., MARE C. J., HUBBARD E. D., 1966. *Am. J. Vet. Res.*, 27, 1134-1136.
- WOOLFREY B. F., MOODY J. A., 1991. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4, 243-255.