

## Pathogenese van *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infecties bij het varken en het belang ervan voor vaccinontwikkeling

*Pathogenesis of Actinobacillus pleuropneumoniae infections in pigs and its relevance to vaccine development*

G. Van den Wyngaert, E. De Bruyne, F. Boyen, F. Pasmans, F. Haesebrouck

Vakgroep Pathologie, Bacteriologie, Pluimveeziekten, Faculteit Diergeneeskunde, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

freddy.haesebrouck@ugent.be

### SAMENVATTING

*Actinobacillus pleuropneumoniae* veroorzaakt besmettelijke pleuropneumonie bij varkens. Een van de eerste stappen in de pathogenese van deze longaandoening is de adhesie van de kiem aan het epitheel van de diepere ademhalingswegen en longalveolen. Hierbij komen onder andere type IV-fimbriae tussen. Transferrine-bindende proteïnen spelen een rol bij ijzeropname door de kiem, wat noodzakelijk is voor haar vermeerdering. De karakteristieke hemorrhagische tot necrotiserende longletsels ontstaan voornamelijk door de productie van Apx-toxinen. *A. pleuropneumoniae* kan het immuunsysteem van de gastheer omzeilen door biofilmvorming en door de productie van proteasen, Apx-toxinen en ammoniak. Antistoffen tegenover het lipoproteïne PalA kunnen het verloop van een infectie met *A. pleuropneumoniae* verergeren en het beschermend vermogen tegenwerken van antistoffen tegenover Apx-toxinen. Een goede kennis van de kiem-gastheerinteracties kan leiden tot de ontwikkeling van efficiënte vaccins. De bescherming na vaccinatie met bacterins, zoals autovaccins, is serotype-specifiek en wisselvallig. Dit laatste kan te wijten zijn aan variabele hoeveelheden PalA in het vaccin. Tot nu toe werden de beste resultaten bekomen met een experimenteel vaccin dat zowel type IV-fimbriae, transferrine-bindende proteïnen als Apx-toxinen bevatte.

### ABSTRACT

Contagious porcine pleuropneumoniae is caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The agent is able to adhere to the epithelium of the lower respiratory tract and lung alveoli. Type IV fimbriae play, amongst other virulence factors, an important role in the adhesion phase. Transferrin binding proteins mediate the uptake of iron by this bacterium, which is necessary for its multiplication. The typical hemorrhagic to necrotizing lesions in the lungs are primarily caused by the production of Apx toxins. By forming biofilms and producing proteases, Apx toxins and ammonia, *A. pleuropneumoniae* is able to circumvent the immune system of the host. Antibodies directed against the lipoprotein PalA may aggravate the course of infection, and counteract the protective effect of antibodies targeting the Apx toxins. In-depth knowledge on host-pathogen interactions may lead to the development of efficient vaccines. The protection observed after vaccination with bacterins, such as autologous vaccines, is serotype-specific and variable. This may be attributed to variable levels of PalA in these vaccines. Until now, the best results have been obtained using an experimental vaccine containing type IV fimbriae, transferrin binding proteins and Apx toxins.

### INLEIDING

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is een gramnegatieve, omkapselde bacterie die enkel bij varkens voorkomt en contagieuze pleuropneumonie veroorzaakt. Op basis van de behoefte aan nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), wordt *A. pleuropneumoniae*

ingedeeld in twee biotypes. Biotype 1-stammen zijn NAD-afhankelijk, terwijl biotype 2-stammen NAD-onafhankelijk zijn. De meeste biotype 1-stammen zijn virulenter dan de biotype 2-stammen. Tot nu toe werden er 15 serotypes beschreven van *A. pleuropneumoniae*. Deze onderverdeling gebeurt op basis van de antigene eigenschappen van de kapselpolysacchari-



**Figuur 1.** Hemorragische tot necrotiserende pneumonie en fibrineuze pleuritis bij een varken dat stierf na het doormaken van de acute vorm van contagieuze pleuropneumonie.

den en de lipopolysacchariden (LPS) uit de celwand. Biotype 1 bevat 13 serotypes (1-12 en 15), biotype 2 bevat serotypes 2, 4, 7, 9, 13 en 14 (Blackall et al., 2002). Alle serotypes zijn pathogeen, maar bepaalde serotypes zijn virulenter dan andere (Haesebrouck et al., 2004). Haesebrouck et al. (1997) beschreven dat stammen die behoren tot de biotype 1-serotypes 1, 5, 9, 10 en 11 virulenter zijn dan stammen die behoren tot de andere biotype 1-serotypes. Dit verband tussen virulentie enerzijds en serotype-biotype anderzijds, gaat in de praktijk evenwel niet altijd op. Zo worden biotype 1-serotype 2-stammen regelmatig geïsoleerd uit ernstige uitbraken van pleuropneumonie.

Contagieuze pleuropneumonie kan een peracut tot chronisch verloop hebben. Daarnaast kunnen er ook asymptomatische dragers voorkomen, die een infectiebron vormen voor gezonde dieren (Tremblay et al., 2013). Bij de peracute vorm vertonen een of meerdere varkens in hetzelfde of in verschillende hokken erge dyspneu en ze sterven meestal binnen 12 tot 36 uur. Een bloederig schuim kan aanwezig zijn op de muil en neus. Bij de acute vorm vertonen verschillende varkens koorts, sufheid, anorexie en ademhalingsstoornissen. Soms ademen ze met open muil. Ze kunnen uiteindelijk volledig herstellen, de chronische vorm ontwikkelen of sterven. De chronische vorm kan ontstaan na het verdwijnen van de acute ziekte-tekens of kan optreden zonder voorafgaande acute ziekte-tekens. Meestal vertonen de dieren dan geen koorts, maar ze eten minder en hebben een groeiachterstand, wat niet altijd onmiddellijk wordt opgemerkt. Hoest is vrijwel altijd aanwezig (Haesebrouck et al., 1997).

De letsels bij de peracute en acute vorm zijn vrij typisch en worden gekenmerkt door hemorragische tot necrotiserende pneumonie en fibrineuze pleuritis (Figuur 1). Bij de chronische vorm ontstaan er gelocaliseerde longnoduli met necrotisch materiaal, om-



**Figuur 2.** Chronische vorm van contagieuze pleuropneumonie: necrosehaard omgeven door een bindweefsel kapsel en (adhesieve) pleuritis.

geven door een bindweefselkapsel en een adhesieve pleuritis (Haesebrouck et al., 1997) (Figuur 2).

In deze literatuurstudie worden de verschillende stappen in de pathogenese van *A. pleuropneumoniae*-infecties kort besproken. Een goede kennis van de kiem-gastheerinteracties kan leiden tot de ontwikkeling van efficiënte vaccins. Dit wordt bediscussieerd in het laatste deel van dit overzichtsartikel.

## KOLONISATIE VAN HET LONGWEEFSEL

Een longinfectie kan pas tot stand komen indien *A. pleuropneumoniae* aan de epitheelcellen van de diepere ademhalingswegen en alveolen kan adhereren. Hierbij zijn verschillende adhesinen betrokken. De bacterie bindt eerder sporadisch aan de cellen van de hogere ademhalingswegen, zoals de trachea en bronchiën (Dom et al., 1994; Bossé et al., 2002; Chiers et al., 2010).

Type IV-fimbriae werden aangetoond op het celoppervlak van *A. pleuropneumoniae* en de productie ervan wordt geïnduceerd door het contact van de kiem met epitheelcellen. Ze verhogen de interactie tussen bacteriën onderling en spelen een belangrijke rol bij de adhesie aan gastheercellen (Zhang et al., 2000; Chiers et al., 2010). Het *apfA*-gen, dat codeert voor type IV-fimbriae, werd bij alle tot nu toe onderzochte *A. pleuropneumoniae*-serotypes aangetoond (Saldikova et al., 2012).

Het buitenste membraan van de celwand van gramnegatieve bacteriën bestaat voor een groot deel uit LPS, die opgebouwd zijn uit een polysaccharidengedeelte en een lipide A-gedeelte (endotoxine). Het polysaccharidengedeelte bestaat uit O-antigenen en een kern opgebouwd uit oligosacchariden (Haesebrouck et al., 1997). Een schematisch overzicht van de opbouw van de celwand van *A. pleuropneumoniae*,

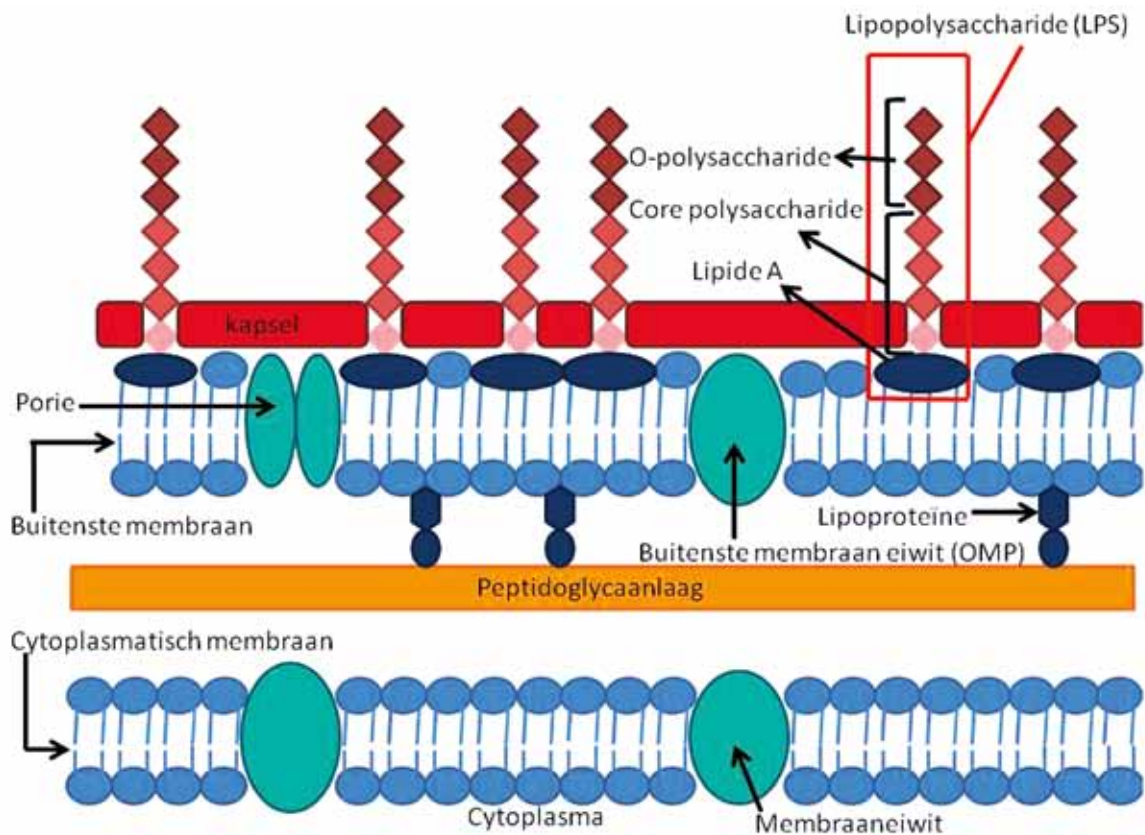
alsook van de opbouw van LPS, wordt weergegeven in Figuur 3. Zowel de O-antigenen en de kern van LPS, alsook sommige eiwitten die eveneens voorkomen in het buitenste membraan van de celwand, i.e. “outer membrane proteins” (OMPs) kunnen een rol spelen bij de adhesie van *A. pleuropneumoniae* (Van Overbeke et al., 2002; Jacques, 2004; Chung et al., 2007). De O-antigenen zijn verantwoordelijk voor een zwakke binding aan fosfolipiden en korte glycolipiden in het plasmamembraan van de gastheercel, terwijl de kern van het LPS, type IV-fimbriae en bepaalde OMPs een sterkere adhesie teweegbrengen (Jeannotte et al., 2003; Chiers et al., 2010).

Autotransporters zijn OMPs en gesecreteerde eiwitten die specifieke structurele eigenschappen bezitten, waardoor hun transport naar het celoppervlak wordt bevorderd. Er werd gesuggereerd dat het serine-protease (AasP) en een autotransporter, die overeenkomsten vertoont met “*Haemophilus* surface fibrils” (hsf), een rol kunnen spelen bij de adhesie van *A. pleuropneumoniae* aan gastheercellen (Auger et al., 2009; Chiers et al., 2010).

## OPNAME VAN IJZER

IJzer is enerzijds noodzakelijk voor de bacteriële groei, maar fungeert daarenboven ook als een omgevings signaal, waardoor het de expressie van verschillende virulentiefactoren kan reguleren (Jacques, 2004). Het is niet zomaar beschikbaar in het extracellulaire milieu van de gastheer. Het extracellulaire ijzer is namelijk gebonden aan glycoproteïnen, zoals transferrine en lactoferrine. De meerderheid van het intracellulaire ijzer is gebonden aan heemverbindingen, zoals heem, hemine, hematine en hemoglobine (Deneer en Potter, 1989; Weinberg en Weinberg, 1995; Haesebrouck et al., 1997; Jacques, 2004). *A. pleuropneumoniae* heeft een aantal mechanismen ontwikkeld om toch ijzer te kunnen opnemen (Haesebrouck et al., 1997).

Wanneer *A. pleuropneumoniae* zich in een ijzerarm milieu bevindt, worden er receptoren gevormd op het oppervlak die enkel het porcine transferrine kunnen binden (Baltes et al., 2002). Transferrine van andere diersoorten wordt niet gebonden. Dit verklaart



Figuur 3. Schematische figuur van de verschillende omhulsels van *A. pleuropneumoniae*. Gramnegatieve bacteriën zijn omgeven door een cytoplasmatisch membraan en een buitenste membraan. Daartussen bevindt zich een peptidoglycaanlaag. De buitenste membraan van de celwand van gramnegatieve bacteriën bestaat voor een groot deel uit lipopolysacchariden. Dit zijn complexe moleculen die bestaan uit een polysaccharidengedeelte en een lipide A-gedeelte. Het polysaccharidengedeelte bestaat uit een O-antigen en een kern opgebouwd uit oligosacchariden (Haesebrouck et al., 1997). *A. pleuropneumoniae* is ook omgeven door een kapsel. Het kapsel van elk serotype bestaat uit herhalende oligosaccharideneenheden, polymeren van teichoïnezuur of oligosaccharidenpolymeren (Inzana, 1991). Het buitenste membraan van de celwand van *A. pleuropneumoniae* bevat verschillende eiwitten, namelijk buitenstemembraaneiwitten (“outer membrane proteins” (OMP)) (Chung et al., 2007).

gedeeltelijk de gastheerspecificiteit van de bacterie (Gerlach et al., 1992; D'Silva et al., 1995). Er zijn twee verschillende transferrinebindende proteïnen aangetoond, TbpA eiwit (ook bekend als Tbp1 of TfbB) en het TbpB-eiwit (ook bekend als Tbp2 of TfbA) (Haesebrouck et al., 1997; Bossé et al., 2002). Door een gecoördineerde actie van TbpA en TbpB wordt ijzer gebonden aan het oppervlak van de bacterie en verwijderd van het transferrine. Vervolgens wordt het ijzer getransporteerd doorheen het buitenste membraan via TbpA (Kirby et al., 1995).

Een ander mechanisme om ijzer te bekomen, is door gebruik te maken van sideroforen. Sideroforen cheleren ijzerionen en binden ze vervolgens aan de overeenkomstige receptoren, wat resulteert in de internalisatie van het ligand (Jacques, 2004). Diarra et al. (1996) toonden aan dat *A. pleuropneumoniae* zelf sideroforen kan produceren en bovendien ook gebruik kan maken van exogeen toegediende sideroforen.

*A. pleuropneumoniae* kan gebruik maken van heemverbindingen, zoals hemoglobine, als bron van ijzer (Deneer en Potter, 1989; Bossé et al., 2002). De kiem produceert Apx-toxinen die onder andere erythrocyten lyseren, waardoor hemoglobine kan vrijkomen. Zowel LPS als buitenstemembraaneiwwitten zijn betrokken bij de binding van hemoglobine (Bélanger et al., 1995; Archambault et al., 1999; Bossé et al., 2002).

## WEEFSELBESCHADIGING

De letsels bij pleuropneumonie worden voornamelijk toegeschreven aan de productie van Apx-toxinen (Van De Kerkhof et al., 1996). Dit zijn exotoxinen die behoren tot de familie van de RTX-toxinen (Repeat in ToXins) en poriën vormen in het plasmamembraan van alveolaire epitheelcellen, endotheelcellen, macrofagen en neutrofielen. Dit resulteert in het verlies van het osmotisch evenwicht, waardoor de cellen opzwellen en lyseren. Bij lagere concentratie zetten deze toxinen macrofagen en neutrofielen aan tot de productie van zuurstofradicalen. Deze zuurstofradicalen kunnen eveneens een schadelijk effect hebben op de gastheercellen (Strathdee en Lo, 1989; Dom et al., 1992a,b; Frey, 1995).

*A. pleuropneumoniae* produceert vier verschillende Apx-toxinen. Apx I, Apx II en Apx III worden zowel in vivo als in vitro tot expressie gebracht en elk serotype produceert één of twee van deze toxinen (Frey, 1995). Apx IV wordt enkel in vivo tot expressie gebracht en komt voor bij alle serotypes (Cho en Chae, 2001; Schaller et al., 1999). Het is noodzakelijk om de virulentie van *A. pleuropneumoniae* volledig tot uiting te laten komen, maar de exacte rol in de pathogenese is nog onduidelijk (Liu et al., 2009). Apx I bezit, naast een zeer sterke cytotoxische activiteit, ook een sterke hemolytische activiteit. *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 5, 9, 10, 11 en 14 kunnen dit toxine

produceren. Apx II bezit een zwakkere hemolytische en een matige cytotoxische activiteit. Het wordt geproduceerd door alle serotypes van *A. pleuropneumoniae*, met uitzondering van de serotypes 10 en 14. Het Apx III-toxine veroorzaakt geen hemolyse, maar bezit een sterke cytotoxische activiteit. Het wordt geproduceerd door de *A. pleuropneumoniae* serotypes 2, 3, 4, 6, 8 en 15 (Kamp et al., 1994; Frey, 1995; Haesebrouck et al., 1997).

De LPS van *A. pleuropneumoniae* kunnen de werking van Apx-toxinen versterken, maar in afwezigheid van deze toxinen blijkt hun bijdrage tot de ontwikkeling van letsels eerder minimaal te zijn (Udeze et al., 1987; Tascon et al., 1994; Bossé et al., 2002).

*A. pleuropneumoniae* secreteert ook verschillende proteasen die belangrijke weefselcomponenten kunnen afbreken, zoals bijvoorbeeld collageen en extracellulaire matrixcomponenten. Ze kunnen aldus ook bijdragen tot het ontstaan van letsels (Negrete-Abascal et al., 1998; Garcia-Cuellar et al., 2000; Vanden Bergh et al., 2008; Bossé et al., 2002).

## ONTWIJKEN VAN DE AFWEERMECHANISMEN VAN DE GASTHEER

*A. pleuropneumoniae* beschikt over een aantal mechanismen om het immuunsysteem van de gastheer te omzeilen (Zaas en Schwartz, 2005; Chiers et al., 2010). Deze worden hieronder kort toegelicht.

*A. pleuropneumoniae* kan een biofilm vormen op biotische en abiotische oppervlakken (Tremblay et al., 2013). Een biofilm bestaat uit een gestructureerde gemeenschap van micro-organismen die vastgehecht zijn aan een niet-levend of levend oppervlak en ingesloten zijn in een matrix die ze zelf produceren en hoofdzakelijk opgebouwd is uit polysacchariden, proteïnen, lipiden en DNA-fragmenten (Kaplan en Mulks, 2005). Biofilmvorming interfereert met de werking van macrofagen en neutrofielen. Biofilms kunnen ook beletten dat antistoffen het oppervlak van de bacterie kunnen bereiken (Donlan en Costerton, 2002). Biofilms vormen immers een fysische en/of chemische barrière, waardoor externe agentia de bacteriën niet kunnen bereiken. Hierdoor zorgen ze trouwens ook voor een verhoogde weerstand tegenover bepaalde antibiotica (Kaplan et al., 2004).

*A. pleuropneumoniae* vormt proteasen die IgA, IgG en complement factoren afbreken en op die manier de defensiemechanismen van de gastheer verzwakken (Kilian, 1976; Negrete-Abascal et al., 1994; Negrete-Abascal et al., 1998).

Zoals reeds vermeld, kunnen Apx I-, II- en III-toxinen neutrofielen en macrofagen lyseren (Frey et al., 1993; Cullen en Rycroft 1994; Chien et al., 2009; Chiers et al., 2010). Een subletale dosis van Apx-toxinen zorgt bovendien voor de aantasting van de chemotactische en fagocyterende functie van macrofagen (Tarigan et al., 1994; Chiers et al., 2010).

*A. pleuropneumoniae* kan ook reactieve zuurstof-radicalen neutraliseren die geproduceerd worden door macrofagen en neutrofielen. Koolhydraten, die geïncorporeerd zijn in het kapsel en in LPS, spelen een rol bij het vangen van deze vrije zuurstofradicalen (Bilinski, 1991). De kiem beschikt bovendien over een superoxidedismutase, dat de dismutatie katalyseert van het reactieve superoxide radicaalanion tot waterstofperoxide en zuurstof (Langford et al., 1996).

*A. pleuropneumoniae* is resistent tegen complement-gemedieerde lyse, zelfs in aanwezigheid van specifieke antistoffen (Rycroft en Cullen, 1990; Ward en Inzana, 1994). Het kapsel speelt hier een belangrijke rol (Ward et al., 1998; Rioux et al., 2000). Niet alle stammen zonder kapsel blijken evenwel gevoelig te zijn voor doding door het serum (Ward et al., 1998; Rioux et al., 2000). De expressie van lange O-zijketens op LPS draagt eveneens bij tot serumresistentie (Rioux et al., 1999).

Alle serotypes van *A. pleuropneumoniae* zijn in staat om ammoniak te produceren door de aanwezigheid van het urease-enzym (Bossé en MacInnes, 1997). Ammoniak onderdrukt de fagosoom-lysoosoomfusie en verhoogt bovendien ook de intralysosomale pH in macrofagen, wat interfereert met hun antimicrobiële activiteit (Gordon et al., 1980; Bossé et al., 2002). Mutante stammen, die geen ureaseactiviteit bezitten, kunnen toch nog ziekte veroorzaken, maar enkel wanneer dieren worden blootgesteld aan een hoge infectiedosis.

Het zogenaamde 'met peptidoglycaan geassocieerd lipoproteïne A' (PalA) is een OMP dat een rol speelt bij het verankeren van het buitenste membraan van de celwand met peptidoglycaan en komt voor bij alle serotypes van *A. pleuropneumoniae*. Het is een immunopredominant antigen, wat wil zeggen dat varkens een sterke antistoffenrespons tegenover dit eiwit vertonen. In een studie van van den Bosch en Frey (2003) waarin varkens gevaccineerd werden met gezuiverd PalA en antistoffen opbouwden tegenover dit eiwit, vertoonden na een experimentele infectie met een *A. pleuropneumoniae* serotype 1-stam, ernstigere klinische tekens dan niet-gevaccineerde dieren. Ook het sterftcijfer lag hoger bij de gevaccineerde dieren en deze trad vroeger op na infectie. Bij autopsie werd vastgesteld dat ook de longletsels ernstiger waren bij de gevaccineerde varkens. Vaccinatie met een toxoïde vaccin op basis van ApxI en ApxII resulteerde in de bescherming tegen experimentele infectie met de *A. pleuropneumoniae* serotype 1-stam. Deze bescherming werd evenwel volledig tenietgedaan wanneer het gezuiverd PalA toegevoegd werd aan het toxoïde vaccin, alhoewel de dieren antistoffen opbouwden tegenover ApxI en ApxII. Antistoffen tegenover PalA verergeren dus niet enkel het verloop van een infectie met *A. pleuropneumoniae*, maar werken ook het beschermend vermogen tegen van antistoffen tegenover de Apx-toxinen (van den Bosch en Frey, 2003; Haesebrouck et al., 2004). Het mechanisme hiervan is

niet bekend. Het is evenmin bekend in welke mate dit effect optreedt bij de opbouw van immuniteit na een infectie met *A. pleuropneumoniae*.

## PERSISTENTIE

Verschillende genen zijn noodzakelijk voor de kiem opdat ze gedurende langere perioden kan overleven in de gastheer. In het chronisch stadium van de infectie worden onder andere genen tot expressie gebracht die betrokken zijn bij het transport van nutriënten, de stressreactie, het energiemetabolisme en de synthese van nucleïnezuren en andere celcomponenten (Baltes et al., 2007; Chiers et al., 2010). *A. pleuropneumoniae* kan persisteren in necrotisch longweefsel, waar het zuurstofgehalte laag is. Als gevolg hiervan schakelt *A. pleuropneumoniae* over naar een anaerobe respiratie (Baltes et al., 2003; Baltes et al., 2005; Jacobsen et al., 2005; Baltes et al., 2007; Chiers et al., 2010). Ook biofilmvorming wordt gestimuleerd onder anaerobe omstandigheden.

Verder speelt ook de natuurlijke transformatie van bepaalde stammen een belangrijke rol in de persistentie van *A. pleuropneumoniae*. Dit proces zorgt ervoor dat de bacterie DNA, dat bijvoorbeeld codeert voor de hierboven beschreven eigenschappen, uit de omgeving kan opnemen en zijn genetisch materiaal kan aanpassen aan veranderende omstandigheden. Dit kan ertoe bijdragen dat de kiem gedurende langere tijd overleeft in de gastheer (Mullen et al., 2008; Bossé et al., 2009; Chiers et al., 2010).

*A. pleuropneumoniae* kan ook persisteren ter hoogte van de tonsillen. Dit kan aanleiding geven tot dragers die geen klinische tekenen vertonen (Sidibé et al., 1993). Vermoedelijk zijn de LPS van *A. pleuropneumoniae* betrokken bij het vasthechten van deze bacterie aan de mucuslaag van de tonsillen (Bélanger et al., 1994). Daarnaast kan *A. pleuropneumoniae* zich vasthechten aan tonsillaire epitheelcellen (Chiers et al., 1999). Aangezien de bacteriën zich in de diepere gedeelten van de crypten bevinden en de tonsillen bedekt zijn met een mucuslaag, is het zuurstofgehalte op deze plaatsen laag. Er wordt daarom vermoed dat dezelfde mechanismen hierbij een rol spelen als bij de persistentie van *A. pleuropneumoniae* in necrotisch longweefsel (Baltes et al., 2003; Jacobsen et al., 2005; Chiers et al., 2010).

## DISCUSSIE

### Pathogenese en vaccinatie

De pathogenese van *A. pleuropneumoniae*-infecties is complex. Zowel bij de kolonisatie, de kiemvermeerdering, het ontstaan van de letsels en de overleving van *A. pleuropneumoniae* in de gastheer spelen verschillende virulentiefactoren een rol. Voor

de bestrijding van pleuropneumonie kan geprobeerd worden om in te grijpen in de verschillende stappen in de pathogenese door bijvoorbeeld gebruik te maken van vaccins. Daarvoor is een grondige kennis van de kiem-gastheerinteracties en de moleculaire basis van pathogeniciteit vereist. De bacteriële antigenen en genen die een rol spelen bij de kolonisatie van de gastheer en het overleven van de bacterie in dit vijandig milieu dienen geïdentificeerd te worden. Dit geldt ook voor antigenen en genen die verantwoordelijk zijn voor schadelijke effecten in de gastheer (Haesebrouck et al., 2004). Zoals blijkt uit dit literatuuroverzicht is er over klinische *A. pleuropneumoniae*-infecties reeds heel veel bekend, wat een rationele ontwikkeling van vaccins mogelijk maakt. Over hoe de kiem persisteert in de tonsillen en op welke manier ze interageert met tonsillaire cellen zijn er evenwel nog veel onduidelijkheden en het is niet bekend hoe de kolonisatie van de tonsillen kan tegengegaan worden. Varkens die de kiem dragen ter hoogte van de tonsillen, vertonen meestal geen klinische tekenen maar kunnen een belangrijke rol spelen als bron voor endogene infectie en bij de verspreiding van de ziekte (Sidibé et al., 1993; Tobias et al., 2013; Klinkenberg et al., 2014). Verder onderzoek is nodig naar de kiem-gastheerinteracties ter hoogte van dit weefsel.

De eerste vaccins tegen pleuroneumonie bestonden uit volledige kiemen die geïnactiveerd werden en waar eventueel een adjuvans aan toegevoegd werd (bacterins). Ook autovaccins, die regelmatig gebruikt worden in de praktijk, zijn bacterins. Het autovaccin wordt bekomen door het opgroeien van de kiem uit stalen van varkens op een besmet bedrijf en daarna door de inactivatie van deze kiem. Een autovaccin mag enkel gebruikt worden op het bedrijf waar de kiem geïsoleerd werd. Het is verboden om het op andere bedrijven te gebruiken. Na vaccinatie van varkens met een bacterin, bouwen de dieren voornamelijk antistoffen op tegen oppervlakte-antigenen. Deze vaccins bevatten in de regel geen Apx-toxinen. Ook andere virulentiefactoren, zoals type IV-fimbriae en transferrine-bindende proteïnen, ontbreken meestal, omdat deze enkel tot expressie gebracht worden onder bepaalde milieu-omstandigheden. Bacterins kunnen een gedeeltelijke bescherming induceren tegen het homologe serotype. De resultaten bekomen met bacterins zijn evenwel wisselvallig. Dit zou onder andere kunnen te wijten zijn aan de variatie in de hoeveelheid PalA die ze bevatten. Zoals hoger vermeld, kunnen antistoffen tegenover PalA het verloop van een infectie met *A. pleuropneumoniae* verergeren en ze kunnen ook het beschermend vermogen van andere antigenen tegenwerken (van den Bosch en Frey, 2003; Haesebrouck et al., 2004). Een bijkomend nadeel van autovaccins is dat er minder gegevens beschikbaar zijn op het vlak van veiligheid en efficaciteit dan de in Europa geregistreerde commerciële vaccins, die onderworpen zijn aan een strenge regelgeving. Indien in de praktijk een autovaccin gebruikt wordt op een

bedrijf, is het aan te raden dit eerst uit te testen op een klein aantal dieren en deze goed op te volgen en te controleren op het voorkomen van nevenreacties. Pas daarna kan het autovaccin op grotere schaal in het bedrijf gebruikt worden (Haesebrouck et al., 2004).

Vaccins op basis van geïnactiveerde of genetisch gemodificeerde Apx-toxinen die niet meer toxisch maar wel nog antigenisch zijn, kunnen bescherming induceren tegen meerdere serotypes. Gevaccineerde dieren ontwikkelen mildere klinische tekenen na infectie en groeien ook beter dan niet-gevaccineerde dieren, op voorwaarde dat de infectiedosis niet te hoog is (Chiers et al., 1998). Deze bescherming is evenwel onvolledig en gevaccineerde dieren kunnen nog, meestal mildere, longletsels ontwikkelen na infectie. Dergelijke vaccins bevatten geen adhesinen en kunnen dus niet beletten dat de kiem zich vasthecht aan gastheercellen. Dit kan ertoe leiden dat Apx-toxinen rechtstreeks afgezet worden ter hoogte van het plasmamembraan van de gastheercel zodat deze vernietigd wordt, zelfs in aanwezigheid van neutraliserende antistoffen (Haesebrouck et al., 2004).

Een vaccin moet bij voorkeur een immunorespons opwekken die interfereert met de verschillende stappen in de pathogenese. Er werd aangetoond dat parenterale vaccinatie van varkens met een experimenteel “subunitvaccin” op basis van de vier Apx-toxinen, transferrinebindende proteïnen (TbpB) en type IV-fimbriae (Apfa) kan resulteren in een volledige bescherming tegen een experimentele infectie met *A. pleuropneumoniae* (Sadilkova et al., 2012). Er kan verwacht worden dat, na vaccinatie van varkens met een dergelijk vaccin, antistoffen opgewekt worden die zowel interfereren met adhesie (tegenover de type IV-fimbriae), vermeerdering (tegenover transferrinebindende proteïnen) en inductie van letsels (tegenover Apx-toxinen). Een dergelijk vaccin is nog niet commercieel beschikbaar.

Naast een goede kennis van de pathogenese is ook het inzicht in de immunorespons van de gastheer heel belangrijk voor de ontwikkeling van efficiënte vaccins. Uitdagingen vanuit immunologisch standpunt zijn onder andere een verbeterde kennis van hoe de immuniteit ter hoogte van mucosae kan gestimuleerd worden, bijvoorbeeld om de initiële adhesie van de kiem te verhinderen, het bekomen van betere inzichten in hoe specifieke antigenen opgenomen, verwerkt en gepresenteerd worden door antigenpresenterende cellen, alsook de ontwikkeling van adjuvantia die een langdurige, beschermende immuniteit induceren (Haesebrouck et al., 2004; Cox et al., 2006).

## DANKWOORD

De auteurs danken L. Van Brantegem, K. Chiers en R. Ducatelle voor het bezorgen van de foto's van longletsels van varkens gestorven aan contagieuze pleuropneumonie (Figuur 1 en 2).

## LITERATUUR

- Archambault M., Rioux S., Jacques M. (1999). Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiology Letters* 173, 17-25.
- Auger E., Deslandes V., Ramjeet M., Contreras I., Nash J.H.E., Harel J., Gottschalk M., Olivier M., Jacques M. (2009). Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infection and Immunity* 77, 1426-1441.
- Baltes N., Buettner F.F.R., Gerlach G.F. (2007). Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein. *Veterinary Microbiology* 123, 110-121.
- Baltes N., Hennig-Pauka I., Gerlach G.F. (2002). Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiology Letters* 209, 283-287.
- Baltes N., Hennig-Pauka I., Jacobsen I., Gruber A.D., Gerlach G.F. (2003). Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection. *Infection and Immunity* 71, 6784-6792.
- Baltes N., N'diaye M., Jacobsen I.D., Maas A., Buettner F.F.R., Gerlach G.F. (2005). Deletion of the anaerobic regulator HlyX causes reduced colonization and persistence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine respiratory tract. *American Society for Microbiology* 73, 4614-4619.
- Bélanger M., Begin C., Jacques M. (1995). Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infection and Immunity* 63, 656-662.
- Bélanger M., Dubreuil D., Jacques M. (1994). Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and immunity* 62, 868-873.
- Bilinski T. (1991). Oxygen toxicity and microbial evolution. *Biosystems* 24, 305-312.
- Blackall P.J., Klaasen H.L.B.M., van den Bosch H., Kuhnert P., Frey J. (2002). Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Veterinary Microbiology* 84, 47-52.
- Bossé J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R. (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and infection* 4, 225-235.
- Bossé J.T., MacInnes J.I. (1997). Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. *American Society for Microbiology* 65, 4389-4394.
- Bossé J.T., Sinha S., Schippers T., Kroll J.S., Redfield R.J., Langford P.R. (2009). Natural competence in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 298, 124-130.
- Chien M.S., Chan Y.Y., Chen Z.W., Wu C.M., Liao J.W., Chen T.H., Lee W.C., Yeh K.S., Hsuan S.L. (2009). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived Apx I induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 135, 327-333.
- Chiers K., De Waele T., Pasmans F., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2010). Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Veterinary Research* 41, 65-80.
- Chiers K., Haesebrouck F., Van Overbeke I., Charlier G., Ducatelle R. (1999). Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Veterinary Microbiology* 68, 301-306.
- Chiers K., Van Overbeke I., De Leander P., Ducatelle R., Carel S., Haesebrouck F. (1998). Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. *Veterinary Quarterly* 20, 65-69.
- Cho W.S., Chae C. (2001). Expression of the *apx IV* gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 125, 34-40.
- Chung J.W., Ng-Thow-Hing C., Budman L.I., Gibbs B.F., Nash J.H.E., Jacques M., Coulton J.W. (2007). Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate *in silico* predictions. *Proteomics* 7, 1854-1865.
- Cox E., Verdonck F., Vanrompuy D., Goddeeris B. (2006). Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Veterinary Research* 37, 511-539.
- Cullen J.M., Rycroft A.N. (1994). Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype-2 mutant strains defective in hemolysin-II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology* 140, 237-244.
- Deneer H.G., Potter A.A. (1989). Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 57, 798-804.
- Diarra M.S., Dolence J.A., Dolence E.K., Darwish I., Miller M.J., Malouin F., Jacques M. (1996). Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *American Society for Microbiology* 62, 853-859.
- Dom P., Haesebrouck F., De Baetselier P. (1992a). Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *American Journal of Veterinary Research* 53, 1113-1118.
- Dom P., Haesebrouck F., Ducatelle R., Charlier G. (1994). *In vivo* association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infection and Immunity* 62, 1262-1267.
- Dom P., Haesebrouck F., Kamp E.M., Smits M.A. (1992b). Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolytins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infection and Immunity* 60, 4328-4334.
- Donlan R.M., Costerton J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 167-193.
- D'Silva C.G., Archibald F.S., Niven D.F. (1995). Comparative study of iron acquisition by biotype 1 and biotype 2 strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 44, 11-23.
- Frey J. (1995). Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiology* 3, 257-261.
- Frey J., Bossé J.T., Chang Y.F., Cullen J.M., Fenwick B., Gerlach G.F., Gygi D., Haesebrouck F., Inzana T.J., Jansen R., Kamp E.M., Macdonald J., MacInnes J.I., Mittal K.R., Nicolet J., Rycroft A.N., Segers R.P.A.M., Smits M.A., Stenbaek E., Struck D.K., van den Bosch J.F., Willson P.J., Young R. (1993). *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemo-

- lysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology* 139, 1723-1728.
- García-Cuellar C., Montanez C., Tenorio V., Reyes-Esparza J., Durán M.J., Negrete E., Guerrero A., de la Garza M. (2000). A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin *in vitro*. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 64, 88-95.
- Gerlach G.F., Klashinsky S., Anderson C., Potter A.A., Willson P.J. (1992). Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infection and Immunity* 60, 3253-3261.
- Gordon A.H., Hart P.D., Young M.R. (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286, 79-80.
- Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I., Ducatelle R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology* 58, 239-249.
- Haesebrouck F., Pasmans F., Chiers K., Maes D., Ducatelle R., Decostere A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary Microbiology* 100, 255-268.
- Inzana T.J. (1991). Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 11, 305-316.
- Jacobsen I., Hennig-Pauka I., Baltes N., Trost M., Gerlach G.F. (2005). Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. *American Society for Microbiology* 73, 226-234.
- Jacques M. (2004). Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 68, 81-85.
- Jeannotte M.E., Abul-Milh M., Dubreuil J.D., Jacques M. (2003). Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to Phosphatidylethanolamine. *Infection and Immunity* 71, 4657-4663.
- Kamp E.M., Vermeulen T.M., Smits M.A., Haagsma J. (1994). Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infection and Immunity* 62, 4063-4065.
- Kaplan J.B., Mulks M.H. (2005). Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 108, 89-95.
- Kaplan J.B., Velliyagounder K., Raganath C., Rohde H., Mack D., Knobloch J.K.M., Ramasubbu N. (2004). Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *American Society for Microbiology* 186, 8213-8220.
- Kilian M. (1976). The haemolytic activity of *Haemophilus* species. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 84B, 339-341.
- Kirby S.D., Ogunnariwo J.A., Schryvers A.B. (1995). Receptor-mediated iron acquisition from transferrin in the *Pasteurellaceae*. In: Donachie W., Lainson F.A., Hodgson J.C. (editors). *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*, Plenum press, New York, p. 115-127.
- Klinkenberg D., Tobias T.J., Bouma A., van Leengoed L.A., Stegeman J.A. (2014). Simulation study of the mechanisms underlying outbreaks of clinical disease caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in finishing pigs. *Veterinary Journal* 202, 99-105.
- Langford P.R., Loynds B.M., Kroll J.S. (1996). Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 64, 5035-5041.
- Liu J., Chen X., Tan C., Guo Y., Chen Y., Fu S., Bei W., Chen H. (2009). *In vivo* induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 137, 282-289.
- Mullen L.M., Bossé J.T., Nair S.P., Ward J.M., Rycroft A.N., Robertson G., Langford P.R., Henderson B. (2008). *Pasteurellaceae* ComE1 proteins combine the properties of fibronectin adhesins and DNA binding competence proteins. *Plos ONE* 3, e3991.
- Negrete-Abascal E., Tenorio V.R., Guerrero A.L., García R.M., Reyes M.E., de la Garza M. (1998). Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 62, 183-190.
- Negrete-Abascal E., Tenorio V.R., Serrano J.J., García C., de la Garza M. (1994). Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 58, 83-86.
- Rioux S., Galarneau C., Harel J., Frey J., Nicolet J., Kobisch M., Dubreuil J.D., Jacques M. (1999). Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 1017-1026.
- Rioux S., Galarneau C., Harel J., Kobisch M., Frey J., Gottschalk M., Jacques M. (2000). Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microbial Pathogenesis* 28, 279-289.
- Rycroft A.N., Cullen J.M. (1990). Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *American Journal of Veterinary Research* 51, 1449-1453.
- Sadilkova L., Nepereny J., Vrzal V., Sebo P., Osicka R. (2012). Type IV fimbrial subunit protein ApxA contributes to protection against porcine pleuropneumonia. *Veterinary Research* 43, 2-13.
- Schaller A., Kuhn R., Kuhnert P., Nicolet J., Anderson T.J., MacInnes J.I., Segers R.P.A.M., Frey J. (1999). Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145, 2105-2116.
- Sidibé M., Messier S., Larivière S., Gottschalk M., Mittal K.R. (1993). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 57, 204-208.
- Strathdee C.A., Lo R.Y.C. (1989). Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin determinant. *Journal of Bacteriology* 171, 5955-5962.
- Tarigan S., Slocombe R.F., Browning G.F., Kimpton W. (1994). Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat-labile, hemolytic, cytotoxic substance produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research* 55, 1548-1557.
- Tascon R.I., Vazquez-Boland J.A., Gutierrez-Martin C.B., Rodriguez-Barbosa I., Rodriguez-ferri E.F. (1994). The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence



- factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Molecular Microbiology* 14, 207-216.
- Tobias T.J., Bouma A., Daemen A.J., Wagenaar J.A., Stegeman A., Klinkenberg D. (2013). Association between transmission rate and disease severity for *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Veterinary Research* 11, 44-42.
- Tremblay Y.D.N., Lévesque C., Segers R.P.A.M., Jacques M. (2013). Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Veterinary Research* 9, 213-219.
- Udeze F.A., Latimer K.S., Kadis S. (1987). Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysacchariden endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research* 48, 768-773.
- Van De Kerkhof A., Haesebrouck F., Chiers K., Ducatelle R., Kamp E.M., Smits M.A. (1996). Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity* 64, 3905-3907.
- Vanden Bergh P., Fett T., Zecchinon L., Desmecht D. (2008). Les facteurs de virulence d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. *Annales de Médecine Vétérinaire* 152, 71-93.
- Van den Bosch H., Frey J. (2003). Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine* 21, 3601-3607.
- Van Overbeke I., Chiers K., Charlier G., Vandenberghe I., Van Beeumen J., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2002). Characterization of the *in vitro* adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 88, 59-74.
- Ward C.K., Inzana T.J. (1994). Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking specific for lipopolysacchariden. *The Journal of Immunology* 153, 2110-2121.
- Ward C.K., Lawrence M.L., Veit H.P., Inzana T.J. (1998). Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: Concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *American Society for Microbiology* 66, 3326-3336.
- Weinberg E.D., Weinberg G.A. (1995). The role of iron in infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* 8, 164-169.
- Zaas A.K., Schwartz D.A. (2005). Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. *Trends in Cardiovascular Medicine* 15, 195-202.
- Zhang Y., Tennent J.M., Ingham A., Beddome G., Prideaux C., Michalski W.P. (2000). Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 189, 15-18.

## Veterinair ziektekundig woordenboek

Th. Elsinghorst

Eerste uitgave, 2015. Uitgever Euroscience, Postbus 408, NL-3720 AK Bilthoven  
288 blz. - ISBN: 978-90-809041-0-1, Prijs: 39 euro

Th.Elsinghorst@inter.nl.net