

# APPLICAZIONE DI IR BIOTYPER CON SPETTROSCOPIA A INFRAROSSI A TRASFORMATA DI FOURIER (FTIR) PER LA TIPIZZAZIONE DI *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*

## ***APPLICATION OF FOURIER-TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY-BASED IR BIOTYPER SYSTEM FOR TYPING ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

MORONI B.<sup>1</sup>, MUSOLINO N.<sup>1</sup>, CORDOVANA M.<sup>2</sup>, MAUDER N.<sup>2</sup>, MARRA C.<sup>1</sup>,  
ALBORALI G.L.<sup>3</sup>, PITTI M.<sup>1</sup>, DECASTELLI L.<sup>1</sup>, DONDO A.<sup>1</sup>, ZOPPI S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta. Via Bologna 148,  
Turin, Italy;

<sup>2</sup>Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, 28359 Bremen, Germany;

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia-Romagna.

**Parole chiave:** actinobacillosi; machine learning; pleuropolmonite suina

**Keywords:** IR Biotyper; machine learning; porcine pleuropneumonia

### RIASSUNTO

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) è l'agente eziologico della pleuropolmonite suina. Ad oggi sono stati descritti almeno 19 sierotipi che possono essere distinti tramite tecniche biomolecolari con costi relativamente elevati. La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIRS) è stata recentemente utilizzata per identificare batteri a livello di specie e sierogruppo/sierotipo, dimostrandosi uno strumento diagnostico pratico, e garantendo risultati rapidi con dei costi contenuti. L'obiettivo principale di questo studio è quello di valutare l'efficacia dell'IR Biotyper (IRBT, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) nella tipizzazione dei diversi sierotipi di APP, utilizzando un panel di 90 isolati batterici raccolti da suini di allevamenti piemontesi.

Il campionamento è avvenuto presso IZSPLV attraverso coltura batterica in agar sangue da polmoni con lesioni compatibili con pleuropolmonite suina. Le colonie sono state identificate con spettrometria di massa MALDI-TOF, e poi analizzate con IR Biotyper. Sono state effettuate analisi delle componenti principali (PCA) e discriminanti lineari (LDA) utilizzando tutto il dataset di isolati batterici. All'analisi multivariata, PCA e LDA hanno mostrato un buon livello di clusterizzazione con chiara distinzione di 7 sierotipi di APP (2,5,6,7,12,13,14). Inoltre, è risultato chiara anche la distinzione tra APP e non-APP (*A. suis*, *A. lignieresii*, *A. rossii*). I risultati presentati in questo studio rappresentano un'ottima base di partenza per sviluppare un classificatore sui sierotipi di APP.

### ABSTRACT

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) is the causative agent of porcine pleuropneumonia (PP). Currently, 19 APP serotypes have been described, usually determined by molecular analysis, with relatively high costs. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIRS) has been recently proved to be a useful, rapid and cost-effective tool to discriminate bacteria at different taxonomic levels, based on the analysis of the phenotypic microbial cells. The aim of this study was to apply IR Biotyper® system (IRBT, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) to evaluate APP typing at the species and serotype level, in a panel of 90 in field-isolates. All the bacterial collection has been obtained from pig lungs sent to IZPLV for determination of the cause of death. Isolates from lungs were identified by MALDI-TOF MS,

then analyzed with IR Biotyper. Principal components analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) were applied to the whole dataset of isolates. At the multivariate analysis, PCA and LDA showed good clustering with a clear differentiation of seven APP serotypes (2,5,6,7,12,13,14). Moreover, a clear clustering of APP and non-APP (*A. suis*, *A. lignieresii*, *A. rossii*) was highlighted. The results presented in this study may be developed in the future by development of a new classifier for APP serotypes. The use of IRBT as a novel artificial intelligence software was proved successful for the implementation of a new diagnostic tool in differentiating APP serotypes in the laboratory's veterinary diagnostic routine.

## INTRODUZIONE

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) è stato identificato come agente eziologico della pleuropolmonite contagiosa nel suino dal 1964<sup>1</sup>. Inizialmente denominato *Haemophilus pleuropneumoniae*, è stato successivamente riclassificato nel genere *Actinobacillus* sia su base fenotipica che .. È un batterio Gram-negativo, immobile, anaerobio facoltativo con forma coccobacillare<sup>3</sup>. Se ne distinguono due biovarianti in base alla necessità di Nicotinamide-Adenina-Dinucleotide (NAD) per la crescita: la biovariante 1 è NAD-dipendente, la biovariante 2 è NAD-indipendente poiché in grado di sintetizzarlo autonomamente. Ogni biovariante include differenti sierotipi che si distinguono grazie agli antigeni polisaccaridici<sup>4</sup>, e ad oggi sono almeno 19 i sierotipi conosciuti<sup>5</sup>.

La pleuropolmonite contagiosa del suino presenta una diffusione su scala mondiale, con una distribuzione geografica che varia a seconda delle sierovarianti: le sierovarianti 2 e 9 risultano maggiormente diffuse in Asia ed Europa, le sierovarianti 5 e 7 in Nord America e la 15 in Australia<sup>3</sup>.

E' una patologia endemica negli allevamenti con frequenti introduzioni di suini dall'esterno, tutti i gruppi risultano suscettibili e il livello di morbilità e mortalità è direttamente proporzionale alle condizioni ambientali, allo stress e alle patologie concomitanti<sup>6</sup>.

L'ospite naturale dell'APP è il suino, ma anche i suidi selvatici risultano suscettibili<sup>3,7</sup>. Il tempo di incubazione è variabile ma può durare anche solo 12 ore<sup>7</sup>.

La trasmissione di questa patologia avviene principalmente per contatto diretto tra animali, oppure tramite l'inalazione di aerosol nell'aria favorito dall'elevata densità di capi e dalla sintomatologia respiratoria con tosse e starnuti.

I soggetti con forme croniche o subcliniche possono fungere da reservoir mantenendo il batterio nelle vie respiratorie senza sintomi, e favorendo quindi la sua diffusione nell'allevamento.

Le forme cliniche variano da iperacute a croniche. La forma iperacuta ha un decorso rapido di circa 6 ore, e si manifesta con sintomatologia fulminante, tra cui: ipertermia (fino a 41°C), anoressia, depressione, dispnea, tachicardia ed estremità cianotiche.

Spesso si riscontra morte improvvisa senza segni premonitori ma con una caratteristica perdita di sangue e schiuma dal naso.

La forma acuta, seppur manifestando sintomi analoghi alla forma iperacuta, può avere un decorso di 36 ore<sup>3,4,6</sup>. Queste due forme si riflettono, a livello necroscopico, con il riscontro di lesioni polmonari e pleuriche di tipo fibrino-necrotico-emorragiche<sup>4,6</sup>. I polmoni solitamente presentano lesioni bilaterali maggiormente distribuite sulla faccia dorsale dei lobi caudali<sup>6</sup>.

La forma cronica può essere invece asintomatica, ma è solitamente caratterizzata da tosse associata ad un mancato accrescimento, oltre ad una generalizzata riduzione delle difese immunitarie con maggiore suscettibilità ad altre patologie virali o batteriche<sup>3,6</sup>.

Il decorso della malattia dipende in gran parte dalla virulenza del sierotipo coinvolto, oltre alle condizioni predisponenti dell'animale.

In generale, *Actinobacillus pleuropneumoniae* è dotato di fattori di virulenza che agiscono in diverse fasi della patologia e favoriscono la sopravvivenza dell'agente eziologico.

Il batterio, in seguito al suo ingresso nell'apparato respiratorio profondo, colonizza il tessuto polmonare attraverso l'interazione con proteine, muco e cellule ciliate<sup>9</sup>. I fattori di virulenza coinvolti nella fase di adesione sono molteplici: è stato dimostrato un coinvolgimento delle fimbrie<sup>10</sup>, ma anche un ruolo dei lipopolisaccaridi all'adesione a livello tracheale<sup>11</sup>.

A questi fattori di virulenza si accompagnano anche quelli necessari al batterio per acquisire nutrienti: il ferro viene ottenuto grazie alla presenza di transferrine<sup>14</sup>, lipopolisaccaridi e proteine leganti l'emoglobina<sup>15</sup>; mentre il meccanismo di assorbimento di nickel e cobalto è ad oggi ancora sconosciuto<sup>9</sup>.

I fattori di virulenza maggiormente coinvolti, però, nell'evoluzione della forma clinica e, perciò, quelli di maggiore interesse epidemiologico, si identificano nella categoria delle esotossine (Apx).

Le Apx si distinguono in base al grado di citotossicità, capacità emolitica e presenza/assenza tra i sierotipi<sup>7</sup>.

La virulenza dei ceppi di APP dipende in prima linea dal sierotipo coinvolto, ma questo a sua volta manifesta una determinata virulenza a seconda delle Apx prodotte. È possibile, infatti, all'interno dello stesso sierotipo, osservare una differente virulenza in seguito a mutazioni che modificano la capacità di produzione delle tossine<sup>7</sup>.

Il sierotipo 2 risulta essere predominante in Europa con forme cliniche molto virulente<sup>17</sup>, e diffusa anche in Nord America ma con varianti quasi non virulente<sup>18</sup>. In Nord America è possibile riscontrare con maggiore frequenza i sierotipi 5, 7 e 8<sup>18-20</sup>.

In Europa è presente anche il sierotipo 8, con elevata prevalenza in Inghilterra<sup>21</sup>, e i sierotipi 9, 11, 12, 13 e 16<sup>17,22</sup>.

L'elevata mortalità e le spese mediche veterinarie associate alla gestione della patologia in allevamento rappresentano importanti fattori nella decision-making dell'industria suinicola<sup>7,23</sup>. Molti studi hanno dimostrato come la presenza del germe APP possa portare ad una perdita anche in termini di conversione alimentare e scarso accrescimento ponderale dei capi affetti da lesioni croniche polmonari<sup>24,25</sup>.

Se si considera solo il continente americano, l'impatto economico dell'*Actinobacillus pleuropneumoniae* ha raggiunto una perdita di circa 30 milioni di dollari all'economia statunitense già a partire dal 1995<sup>23</sup>.

In considerazione di ciò, risulta essenziale differenziare precocemente i sierotipi circolanti in una determinata area geografica non solo per applicare nei corretti tempi le misure di controllo più efficaci, ma anche per lo sviluppo di vaccini più efficaci nei confronti del sierotipo circolante<sup>26</sup>.

Ad oggi, le tecniche diagnostiche utilizzate per la sierotipizzazione sono di tipo molecolare o sierologico.

La sierotipizzazione sierologica è possibile tramite agglutinazione, emoagglutinazione indiretta o immunodiffusione, ed era di largo utilizzo fino a pochi anni fa, ma la necessità di un titolo anticorpale elevato, laboratori specializzati e il frequente riscontro di cross-reattività tra sierotipi hanno reso indispensabile l'adozione di tecniche diagnostiche più facilmente accessibili ed affidabili<sup>19,27</sup>.

È stata inizialmente descritta una PCR con primer arbitrari (AP-PCR)<sup>28</sup>, successivamente sono state messe a punto PCR con primer sempre più specifici in grado di identificare tutti i sierotipi ad oggi conosciuti<sup>29</sup>. La sierotipizzazione molecolare si può basare, infatti, sulla ricerca di geni dei polisaccaridi capsulari<sup>30-32</sup>, oppure dei geni delle tossine apx<sup>33,34</sup>, o ancora della lipoproteina della membrana esterna<sup>35</sup>, ma anche sulla ricerca di più di queste componenti in associazione<sup>31,34,36</sup>.

La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIRS) è una tecnica diagnostica storicamente utilizzata in ambito chimico, e solo recentemente applicata in campo microbiologico per la caratterizzazione dei ceppi batterici in base alle differenze fenotipiche. La FTIRS è stata recentemente applicata per discriminare batteri e lieviti a livello di specie, sierogruppo/sierotipo e anche per analisi di outbreaks, dimostrandosi uno strumento diagnostico pratico, e garantendo risultati rapidi con dei costi contenuti.

Infatti, questa metodologia è risultata essere in grado di discriminare le cellule microbiche in relazione alla specifica composizione nelle loro componenti lipidiche, proteiche e polisaccaridiche, in base alla capacità di assorbimento delle molecole stesse<sup>37</sup>. Per ogni ceppo batterico è possibile ottenere uno spettro di assorbimento unico che rappresenta l'impronta digitale ottenuta sulla base delle componenti della membrana cellulare esterna<sup>38,39</sup>. Pertanto, la spettroscopia IR permette di classificare i microorganismi a diversi livelli tassonomici, dal genere al sierotipo, fino anche a distinguere i singoli ceppi<sup>40</sup>.

In Italia non sono disponibili informazioni aggiornate sui ceppi APP più diffusi sul territorio. Considerando la variabilità clinica della patologia e le perdite economiche che ne conseguono, risulta essenziale avere un quadro epidemiologico territoriale ben chiaro per poter adottare le migliori misure di prevenzione e controllo.

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare i sierotipi maggiormente circolanti nel territorio piemontese attraverso metodiche accreditate, e validare il sistema IR Biotyper (IRBT – Bruker Daltonics GmbH & Co. KG), un metodo analitico di nuova generazione basato sulla tecnologia di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR), al fine di ottenere un quadro epidemiologico chiaro e offrire un'alternativa diagnostica più rapida e intuitiva.

## **MATERIALI E METODI**

Gli isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* analizzati sono stati ottenuti a partire da campioni di polmoni di suini sottoposti a necropsia presso la S.S. Patologia Animale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta con sede a Torino.

I polmoni caratterizzati da lesioni tipiche di pleuropolmonite contagiosa, sono stati sottoposti ad esame batteriologico: è stato effettuato un prelievo tramite tampone all'interno della lesione sospetta, previa sterilizzazione/cauterizzazione della superficie esterna e taglio profondo nello spessore della lesione, o tramite semina diretta di un'aliquota di polmone su terreno di crescita Agar sangue di montone defibrinato 5% (Columbia Agar).

Per permettere una crescita ottimale di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, il ceppo è stato seminato su terreno agar sangue di montone defibrinato 5%, e successivamente una *Staphylococcus aureus* è stato seminato linearmente per sfruttare il principio della crescita satellite (Figura 1): questa tecnica facilita la crescita di APP lungo la linea di *S. aureus* che, producendo un'emolisi completa del terreno, libera fattori nutrizionali come NAD. Le piastre seminate sono state poi incubate a 37°C in condizioni di microaerofilia per 24 ore.

Successivamente, le colonie sospette sono state sottoposte ad identificazione MALDI-TOF secondo le istruzioni dell'azienda produttrice (Bruker Daltonics, Bremen, Germania).

I ceppi identificati come *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Actinobacillus* spp. sono stati trapiantati su terreno agar cioccolato e incubati a 37°C in condizioni di microaerofilia per 24 ore.

Tutti i ceppi provenivano da allevamenti suini piemontesi.

I campioni analizzati e utilizzati per il seguente studio sono stati collezionati a partire dal 2019 fino al 2022.

Tutti i ceppi batterici sono stati poi sierotipizzati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna attraverso multiplex PCR.



**Figura 1.** Ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* seminati su agar sangue con la crescita satellite. In prossimità della semina di *Staphylococcus aureus* (crescita batterica lineare di colore bianco), sulla linea di emolisi, è possibile osservare la crescita di colonie di piccole dimensioni del ceppo APP.

**Figure 1.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* culture in blood agar with *Staphylococcus aureus* (white line in the centre) and beta haemolysis surrounding it.

I ceppi di APP del presente studio sono stati analizzati con il sistema IR Biotyper® (IRBT, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG). La preparazione dei campioni è stata eseguita secondo le indicazioni del produttore <sup>41</sup>: 50 µL di etanolo al 70% vengono aggiunti alla provetta di sospensione contenente cilindri metallici inerti (Bruker IR Biotyper Kit). Utilizzando un'ansa da 1µL si preleva del materiale batterico dalla piastra e si stempera nella provetta di sospensione fino ad ottenere una sospensione di colore lattiginoso opaco, si vortexa e si aggiungono 50 µL di acqua deionizzata. Successivamente, 15 µL della sospensione vengono depositi su un totale di cinque pozzetti sulla piastra specifica in silicio (Figura 5). Insieme ai campioni, sulla piastra vengono depositi, su due pozzetti ciascuno, due Bruker Infrared Test Standards (IRTS 1, IRTS 2) come controllo di qualità.

La piastra viene messa ad essiccare a 37 °C per circa 10-30 minuti, fino al completo asciugamento dei pozzetti seminati.

L'acquisizione degli spettri è stata effettuata tramite l'utilizzo dello spettrometro IRBT e il software OPUS (Bruker Optics GmbH & Co. KG). Il software IR Biotyper Client (Bruker Daltonics) (V3.1) è stato utilizzato per processare e analizzare gli spettri acquisiti. Per le analisi di similarità sono state applicate a tutti gli isolati le tecniche PCA (principal components analysis) e LDA (linear discriminant analysis).

## RISULTATI

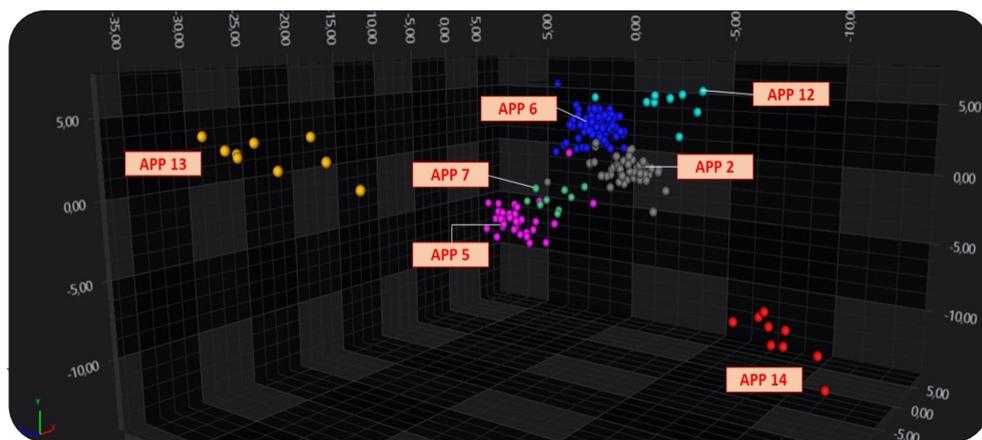
Sono stati ottenuti in totale 90 ceppi confermati di *Actinobacillus* spp., di cui 1 *A. lignieresii*, 3 *A. rossii*, 8 *A. suis*, 1 *Actinobacillus* spp. (Tabella 1).

Bacterial species	APP Serotype	N (field strain)
<i>A. pleuropneumoniae</i>	2	17
<i>A. pleuropneumoniae</i>	5	6
<i>A. pleuropneumoniae</i>	6	37
<i>A. pleuropneumoniae</i>	7	1
<i>A. pleuropneumoniae</i>	9-11	9
<i>A. pleuropneumoniae</i>	12	1
<i>A. pleuropneumoniae</i>	13	1
<i>A. pleuropneumoniae</i>	14	1
<i>A. pleuropneumoniae</i>	ND	2
<i>Actinobacillus</i> spp.	ND	1
<i>A. rossii</i>	-	3
<i>A. suis</i>	-	8
<i>A. lignieresii</i>	-	1

**Tabella 1.** Isolati batterici inclusi nello studio suddivisi per specie e sierotipo.

**Table 1.** Bacterial isolates included in this study, classified by species and serotype.

All'analisi multivariata esplorativa, sia PCA che LDA hanno mostrato un buon grado di suddivisione dei diversi sierotipi di APP (Figura 2), ed una netta suddivisione tra specie APP e non-APP (*A. Suis*, *A. lignieresii*, *A. rossii*).



**Figura 2.** 3D Scatter Plot, analisi LDA. I cluster sono stati colorati in base al sierotipo: APP 2 (grigio), APP 5 (fucsia), APP 6 (blu), APP 7 (verde), APP 12 (azzurro), APP 13 (giallo), APP 14 (rosso).

**Figure 2.** 3D Scatter Plot, LDA analysis. Serotypes clusters are characterized as follow: APP 2 (grey), APP 5 (pink), APP 6 (blue), APP 7 (green), APP 12 (light blue), APP 13 (yellow), APP 14 (red).

## DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno evidenziato una buona suddivisione dei ceppi batterici di APP in base al sierotipo. Inoltre, è stato possibile differenziare anche ceppi APP da non-APP

(*A. Suis*, *A. lignieresii*, *A. rossii*), e l'isolamento dei sierotipi 6, 9-11,13,14 è stato riportato per la prima volta sul territorio piemontese.

Il monitoraggio epidemiologico dei vari sierotipi circolanti in territori ad elevata densità di allevamenti suini è fondamentale non solo per la prevenzione di nuovi focolai, ma anche per l'allestimento precoce di vaccini più efficaci e mirati al sierotipo target<sup>26</sup>.

Ad oggi, la diagnosi di pleuropolmonite contagiosa è effettuata da una parte a seguito di sospetto clinico- anamnestico, dall'altra attraverso l'esame anatomopatologico che permette di evidenziare le lesioni tipiche polmonari, ma la conferma dell'agente eziologico avviene esclusivamente tramite isolamento batterico ed identificazione molecolare o fenotipica. Le metodiche adoperate per la sierotipizzazione sono invece quelle di amplificazione di alcune regioni di DNA specifiche per i vari sierotipi, e sono effettuate esclusivamente da laboratori specializzati e con costi relativamente alti<sup>30-32</sup>.

L'utilizzo di una nuova metodica di sierotipizzazione più rapida e user-friendly è dunque cruciale per favorire l'intervento negli allevamenti colpiti da pleuropolmonite contagiosa in tempo reale, e promettente in termini di prevenzione vaccinale più mirata<sup>33-35</sup>.

I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato una buona clusterizzazione in particolar modo dei sierotipi 6 e 2, i più frequenti sul territorio piemontese. La numerosità campionaria più scarsa di altri sierotipi, come il 7,12,13,14 può invece rappresentare un limite nell'analisi di machine learning. Inoltre, sono state riscontrate delle difficoltà nella distinzione dei sierotipi 9 e 11 che non hanno permesso una suddivisione sufficiente a discriminare gli stessi, ed è stato pertanto ritenuto opportuno considerare i due sierotipi un'unica entità-cluster.

D'altra parte, è stata riscontrata una buona suddivisione tra specie diverse di *Actinobacillus* spp. (*A. Suis*, *A. lignieresii*, *A. rossii*), garantendo un risultato migliore rispetto a quello ottenuto nella routine tramite identificazione fenotipica su MALDI-TOF.

Infine, grazie a questo studio, l'IR-Biotyper è stato applicato per la prima volta come strumento diagnostico sperimentale nel settore suinicolo, e in generale in ambito veterinario, rappresentando quindi una tecnologia innovativa e promettente nel campo della sanità animale<sup>38</sup>.

## CONCLUSIONI

L'utilizzo di nuove tecnologie non basate sull'amplificazione di acidi nucleici per la sierotipizzazione di APP risulta vantaggiosa da numerosi punti di vista, tra cui: i) la rapidità dell'esame, ii) il costo relativamente contenuto, iii) la possibilità di fare diagnosi direttamente dalla colonia batterica isolata senza l'utilizzo di metodiche molecolari.

In futuro, sarà necessario implementare non solo il numero di ceppi batterici APP per rendere più robusta l'analisi di machine-learning, ma anche la multidisciplinarietà dell'approccio alla diagnosi di malattie respiratorie del suino lungo la filiera, dalla clinica all'esame anatomopatologico, dalla diagnosi molecolare fino all'utilizzo di tecnologie innovative come l'IR-biotyper.

## BIBLIOGRAFIA

1. Shope RE. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology, and pathology. *J Exp Med.* 1964;119(3):357-368. doi:10.1084/jem.119.3.357
2. Pohl S, Bertschinger HU, Frederiksen W, Mannheim\* W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1983;33(3):510-514. doi:https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-510

3. Stringer OW, Li Y, Bossé JT, Langford PR. JMM Profile: *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a major cause of lung disease in pigs but difficult to control and eradicate. *J Med Microbiol.* 2022;71(3). doi:10.1099/jmm.0.001483
4. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 2002;4(2):225-235. doi:10.1016/s1286-4579(01)01534-9
5. Stringer OW, Bossé JT, Lacouture S, et al. Proposal of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars. *Vet Microbiol.* 2021;255:109021. doi:10.1016/j.vetmic.2021.109021
6. Helke KL, Ezell PC, Duran-Struuck R, Swindle MM. *Biology and Diseases of Swine.* Lab Anim Med. Published online 2015:695-769. doi:10.1016/B978-0-12-409527-4.00016-X
7. Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65 Suppl 1:72-90. doi:10.1111/tbed.12739
8. Cohen LM, Grøntvedt CA, Klem TB, et al. A descriptive study of acute outbreaks of respiratory disease in Norwegian fattening pig herds. *Acta Vet Scand.* 2020;62(1):35. doi:10.1186/s13028-020-00529-z
9. Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res.* 2010;41(5):65. doi:10.1051/vetres/20100037
10. Utrera V, Pijoan C. Fimbriae in *A pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet Rec.* 1991;128(15):357-358. doi:10.1136/vr.128.15.357
11. Bélanger M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun.* 1990;58(11):3523-3530. doi:10.1128/iai.58.11.3523-3530.1990
12. Abul-Milh M, Paradis SE, Dubreuil JD, Jacques M. Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infect Immun.* 1999;67(10):4983-4987. doi:10.1128/IAI.67.10.4983-4987.1999
13. Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V, et al. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res.* 2010;41(1):3. doi:10.1051/vetres/2009051
14. Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach G-F. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;209(2):283-287. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11145.x
15. Archambault M, Rioux S, Jacques M. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;173(1):17-25. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13479.x
16. Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S, et al. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet Microbiol.* 2004;99(3-4):227-238. doi:10.1016/j.vetmic.2004.01.004
17. Schuwerk L, Hoeltig D, Waldmann K-H, Valentin-Weigand P, Rohde J. Sero- and apx-typing of German *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates from 2010 to 2019 reveals a predominance of serovar 2 with regular apx-profile. *Vet Res.* 2021;52(1):10. doi:10.1186/s13567-020-00890-x
18. Gottschalk M, Lacouture S. Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. *Can Vet J = La Rev Vet Can.* 2015;56(10):1093-1094.
19. Gottschalk M, Lacouture S. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 3, 6, 8 and 15

- isolated from diseased pigs in North America. *Vet Rec.* 2014;174(18):452. doi:<https://doi.org/10.1136/vr.102470>
20. Lacouture S, Gottschalk M. Distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2015 to June 2020) and *Glaesserella parasuis* (from 2017 to June 2020) serotypes isolated from diseased pigs in Quebec. *Can Vet J = La Rev Vet Can.* 2020;61(12):1261-1263.
  21. Li Y, Bossé JT, Williamson SM, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 8 predominates in England and Wales. *Vet Rec.* 2016;179(11):276. doi:10.1136/vr.103820
  22. Sárközi R, Makrai L, Fodor L. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes in Hungary. *Acta Vet Hung.* 2018;66(3):343-349. doi:10.1556/004.2018.031
  23. Losinger WC. Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on grower/finisher swine operations in the United States. *Prev Vet Med.* 2005;68(2-4):181-193. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.12.004
  24. Hoflack G, Maes D, Mateusen B, Verdonck M, de Kruif A. Efficacy of tilmicosin phosphate (Pulmotil premix) in feed for the treatment of a clinical outbreak of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in growing-fattening pigs. *J Vet Med B, Infect Dis Vet public Heal.* 2001;48(9):655-664. doi:10.1046/j.1439-0450.2001.00492.x
  25. Holmgren N, Lundeheim N, Wallgren P. Infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in fattening pigs. Influence of piglet production systems and influence on production parameters. *Zentralblatt für Vet R B J Vet Med Ser B.* 1999;46(8):535-544. doi:10.1111/j.1439-0450.1999.tb01246.x
  26. Gale C, Velazquez E. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a review of an economically important pathogen. *Livestock.* 2020;25(6):308-314. doi:10.12968/live.2020.25.6.308
  27. Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Heal Res Rev.* 2000;1(2):73-93. doi:10.1017/s1466252300000074
  28. Hennessy KJ, Iandolo JJ, Fenwick BW. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993;31(5):1155-1159. doi:10.1128/jcm.31.5.1155-1159.1993
  29. Gottschalk M. The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet J.* 2015;206(1):30-38. doi:10.1016/j.tvjl.2015.06.016
  30. Schuchert JA, Inzana TJ, Angen Ø, Jessing S. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4344-4348. doi:10.1128/JCM.42.9.4344-4348.2004
  31. Angen O, Ahrens P, Jessing SG. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. *Vet Microbiol.* 2008;132(3-4):312-318. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.010
  32. Bossé JT, Li Y, Fernandez Crespo R, et al. Comparative sequence analysis of the capsular polysaccharide loci of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1-18, and development of two multiplex PCRs for comprehensive capsule typing. *Vet Microbiol.* 2018;220:83-89. doi:10.1016/j.vetmic.2018.05.011
  33. Frey J, Beck M, van den Bosch JF, Segers RP, Nicolet J. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol Cell Probes.* 1995;9(4):277-282. doi:10.1016/s0890-8508(95)90158-2
  34. Gram T, Ahrens P, Andreasen M, Nielsen JP. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes--evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol.* 2000;75(1):43-57. doi:10.1016/s0378-1135(00)00206-6
  35. Osaki M, Sato Y, Tomura H, Ito H, Sekizaki T. Genetic diversity of the genes encoding the outer membrane lipoprotein (*omlA*) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Med Sci.* 1997;59(3):213-215. doi:10.1292/jvms.59.213

36. Zhou L, Jones SCP, Angen Ø, et al. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross- reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):800-803. doi:10.1128/JCM.01787-07
37. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc.* 2014;9(8):1771-1791. doi:10.1038/nprot.2014.110
38. Cordovana M, Mauder N, Kostrzewa M, et al. Classification of *Salmonella enterica* of the (Para-)Typhoid Fever Group by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Microorganisms.* 2021;9(4). doi:10.3390/microorganisms9040853
39. Cordovana M, Mauder N, Join-Lambert O, et al. Machine learning-based typing of *Salmonella enterica* O-serogroups by the Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy-based IR Biotyper system. *J Microbiol Methods.* 2022;201:106564. doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106564
40. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature.* 1991;351(6321):81-82. doi:10.1038/351081a0
41. Bruker Daltonics GmbH % Co. KG. IR Biotyper User Manual. Revision C.(December 2021), Doc. no. 5025119.