

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 138 (1996)

Heft: 3

Artikel: Typisierung der Apx-Toxin-Gene von Actinobacillus pleuropneumoniae mittels PCR

Autor: Frey, J. / Beck, M. / Nicolet, J.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-590218>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 17.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Typisierung der Apx-Toxin-Gene von *Actinobacillus pleuropneumoniae* mittels PCR

J. Frey, M. Beck, J. Nicolet

Zusammenfassung

Zur Toxin-Typisierung von *Actinobacillus pleuropneumoniae*, dem Erreger der Schweinepleuropneumonie, wurden fünf PCR-Reaktionen entwickelt, welche die Aktivator-, Struktur- und Sekretionsgene der drei Toxine ApxI, ApxII und ApxIII spezifisch verstärken. Die Oligonukleotid-Primer wurden so gewählt, dass sie typische Teile der Aktivator- und Strukturgene *apxICA*, *apxIICA* und *apxIIICA* sowie der Sekretionsgene *apxIBD* und *apxIIIBD* als Fragmente unterschiedlicher Längen verstärken. Die fünf unterschiedlichen Reaktionen können mit identischer Hybridisierungstemperatur gleichzeitig verstärkt und dank der unterschiedlichen Länge der Produkte mit einer einzigen Elektrophorese aufgetrennt werden. Die daraus resultierenden Fragmentmuster sind charakteristisch für die fünf verschiedenen Toxin-Gen-Gruppen der *A. pleuropneumoniae* Serotypen 1, 5a, 5b, 9 und 11 (Gruppe 1), Serotypen 2, 4, 6, 8 (Gruppe 2), Serotyp 3 (Gruppe 3), Serotypen 7 und 12 (Gruppe 4) und Serotyp 10 (Gruppe 5). Die Identifikation der Toxin-Gene, welche für die Virulenz von Bedeutung sind, verbessert die Differenzierung von *A. pleuropneumoniae*-Stämmen in der Diagnostik und erlaubt die Charakterisierung von Stämmen mit atypischen Toxin-Mustern.

Schlüsselwörter: *Actinobacillus pleuropneumoniae* – Apx-Toxine – Haemolysine – Virulenz – Zytotoxine

Toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR

For the determination of the *apx* toxin genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains, five PCR reactions were developed which allow the detection of the activator and structural genes and the secretion genes of the toxins ApxI, ApxII and ApxIII. The oligonucleotide primers were chosen in order to amplify characteristic parts of the activator and structural genes *apxICA*, *apxIICA* and *apxIIICA*, and the secretion genes *apxIBD* and *apxIIIBD*. The annealing temperature of all five reaction was identical in order to allow the five reactions in a single PCR run. The differences in length between the individual amplified gene fragments allowed all product fragments to be separated in a single electrophoresis. This way, a typical toxin gene pattern could be obtained which is characteristic for the five toxin gene groups of *A. pleuropneumoniae* including serotypes 1, 5a, 5b, 9 and 11 (group 1), serotypes 2, 4, 6 and 8 (group 2), serotype 3 (group 3), serotypes 7 and 12 (group 4), and serotype 10 (group 5). The identification of the toxin genes, which have significance in virulence, enhance and facilitate differentiation of *A. pleuropneumoniae* and allow the detection of serotypes with an atypical toxin pattern.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae* – Apx toxins – hemolysins – virulence – cytotoxins

Einleitung

Die drei Protein-Toxine, das stark hämolytische ApxI, das schwach hämolytische ApxII und das ahämolytische ApxIII, sind Hauptvirulenzfaktoren des Schweinepathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey et al., 1993b; Frey, 1994; Frey et al., 1994a; Frey und Nicolet, 1990). Die Biosynthese und Sekretion eines oder zwei verschiedener Apx-Toxine charakterisieren im wesentlichen die Virulenz der 12 verschiedenen *A. pleuropneumoniae*-Serotypen (Frey, 1994; Frey et al., 1994a; Reimer et al., 1995).

Genetische Studien zeigen, dass ApxI auf einem polycistronischen Operon mit den Genen *apxICABD* kodiert ist. Das Operon *apxICABD* ist in den Serotypen 1, 5a, 5b, 9, 10 und 11 vorhanden. Das Gen *apxIC* kodiert für ein Aktivator-Protein, welches das Struktur-Protein, das von *apxIA* kodiert wird, durch eine Fettsäurenmodifikation aktiviert. Die Gene *apxIBD* kodieren für zwei Proteine, welche für die Sekretion des Toxins verantwortlich sind. Das Operon, das ApxII kodiert, enthält nur das Aktivator- und Struktur-Gen *apxIICA* und ist in allen Serotypen ausser in Serotyp 10 vorhanden (Frey et al., 1993b; Jansen et al., 1992). Die Sekretion von ApxII scheint die

Genprodukte *apxIBD* zu benutzen (Frey et al., 1994a; Frey et al., 1993a). Diese Gene sind in den Serotypen 1, 5a, 5b, 9 und 11 im kompletten *apxICABD* Operon enthalten und in den anderen Serotypen, ausgenommen 3, als partielles Operon in Form von *apxIBD* vorhanden. ApxIII ist auf dem Operon *apxIIICABD* kodiert, welches in den Serotypen 2, 3, 4, 6 und 8 vorhanden ist (Frey et al., 1993b; Jansen et al., 1993). Eine kürzliche Studie an allen *A. pleuropneumoniae*-Serotyp-Referenzstämmen und an über 300 Feldstämmen hat gezeigt, dass die Produktion der verschiedenen Apx-Toxine sowie die Verteilung der einzelnen *apx*-Gene in den verschiedenen Stämmen eines gegebenen Serotyps konstant sind und dass die *apx*-Gene im allgemeinen exprimiert werden. Das Vorhandensein der verschiedenen *apx*-Toxingene ist demzufolge ein nützlicher Marker für die Expression und Sekretion der verschiedenen Toxine ApxI, ApxII und ApxIII und ein Hinweis auf die Virulenz eines bestimmten Stammes. Die Identifikation der *apx*-Toxingene ist von grossem diagnostischem und epidemiologischem Wert. Für eine schnelle und sichere Identifikation der *apx*-Toxingene haben wir eine PCR-Methode entwickelt, welche mit fünf Reaktionen das gesamte Toxin-Gen-Muster eines *A. pleuropneumoniae*-Isolates ermittelt.

Material und Methoden

Bakterienstämme

Die folgenden *A. pleuropneumoniae*-Referenzstämme wurden benutzt: Serotyp 1, 4074; Serotyp 2, S1536; Serotyp 3, S1421; Serotyp 4, M62; Serotyp 5a, K17; Serotyp 5b, L20; Serotyp 6, femø; Serotyp 7, WF83; Serotyp 8, 405; Serotyp 9, CVI 13261; Serotyp 10, 13039; Serotyp 11, 56153; Serotyp 12, 8329, (Frey, Nicolet, 1990). *A. pleuropneumoniae*-Feldstämme stammen aus Laboratorien der folgenden Länder: Australien, Belgien, Brasilien, Kanada, Tschechische Republik, Dänemark, Frankreich, Grossbritannien, Italien, Japan, Niederlande, Norwegen, Rumänien, Schweden, Spanien, Schweiz, Taiwan, U.S.A. Die Stämme wurden zur Überprüfung nochmals serotypisiert. *A. pleuropneumoniae* wurde auf Columbia broth agar (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md, USA) mit 0,01% β -NAD-Zusatz (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo, USA) kultiviert.

Zubereitung der bakteriellen Proben für die PCR-Reaktion

Zur Aufbereitung der genomischen DNA wurden Zellen von 4 bis 5 *A. pleuropneumoniae*-Kolonien direkt in 500 μ l PCR-Lysierungspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0,05% Tween 20, 0,24 mg/ml Proteinase K) (Leng et al., 1994) suspendiert, 60 Minuten bei 60 °C lysiert und während 15 Minuten bei 95 °C zur Inaktivierung der Proteinase erhitzt.

Oligonukleotid-Primer und PCR Reaktion

Die spezifischen Oligonukleotid-Primer zur Verstärkung der Gene *apxICA*, *apxIIICA*, *apxIIICA*, *apxIBD* und *apxIIIBD* basieren auf den publizierten DNA-Sequenzen (Frey et al., 1994b; Chang et al., 1989; Chang et al., 1993; Jansen et al., 1993) und wurden mit dem Programm OLIGO (National Biosciences, Plymouth, MN, USA) berechnet, damit für alle fünf Reaktionen die gleichen Parameter des Thermozyklers benutzt werden können. Zur Berechnung der Primer für *apxICA* wurden die Sequenzunterschiede zwischen *apxIA* und dem varianten Gen *apxI_{var}* der Serotypen 5a, 5b und 10 (Nagai et al., 1993; Frey et al., 1993a) berücksichtigt. Für die spezifischen Primer von *apxIIICA* wurden die Sequenzunterschiede von *apxIIIA* der Serotypen 3, 4, 6 und 8 und der Genvariante *apxIIIA_{var}* im Serotyp 2 (Jansen et al., 1993; Chang et al., 1993) miteinbezogen. Die Oligonukleotid-Primer für die verschiedenen Gene, ihre Lokalisation auf den betreffenden Gensequenzen und die erwarteten Längen der synthetisierten DNA-Fragmente sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die PCR Reaktionen wurden mit dem Thermocycler Gene Amp 9600 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) durchgeführt. Zwei μ l lysierte Zellen oder 5 ng reine genomische bakterielle DNA wurden zu 48 μ l Taq-PCR Mix gegeben (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,005% Tween 20, 0,005% NP-40 Detergens, 170 μ M von jedem der vier dNTP, 0,25 μ M der betreffenden Oligonukleotid-Primer). Pro Reaktion wurden 0.5 Einheiten Taq Polymerase (Böhringer Mannheim, Deutschland) zugegeben. Die Proben (50 μ l Totalvolumen) wurden 35 Verstärkungszyklen von je 30 Sek. 95 °C, 30 Sek. 55 °C, 2 Min. 72 °C unterworfen. Pro Test wurden je 4 μ l aller 5 PCR-Produkte gemischt und gemeinsam auf einem 0,7% Agarose-Gel (Ausubel et al., 1990) analysiert. *Hind*III verdaute DNA von Bakteriophage Lambda wurde als Standard für Molekulargewichte benutzt.

Resultate

Die PCR-Reaktionen wurden zuerst mit reiner genomischer DNA der *A. pleuropneumoniae*-Referenzstämme der Serotypen 1 und 2 analysiert. Serotyp 1 DNA ergab positive Reaktionen für die Gene *apxICA*, *apxIBD* und *apxIIICA*, und Serotyp 2 DNA verstärkte die Gene *apxIBD*, *apxIIICA*, *apxIIICA* und *apxIIIBD*, was den Toxin-Gen-Profilen dieser Referenzstämme entspricht (Beck et al., 1994). Die PCR-Fragmente der Gene *apxICA*, *apxIBD* und *apxIIICA* von Serotyp 1 sowie *apxIIICA* und *apxIIIBD* von Serotyp 2 wurden als Standard benutzt (Abbildung 1). DNA verschiedenster bakterieller Stämme, die Toxin-Gene enthalten welche mit den *apx*-Genen nahverwandt sind, wie *Pasteurella haemolytica*, *E. coli* pHLX, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Bordetella pertussis*, ergaben in allen 5 PCR-Reaktionen negative Resultate. DNA von *Actinobacillus suis*-Stamm ATCC15558, der wie *A. pleuropneumoniae*

Tabelle 1: Sequenzen und Positionen der Oligonukleotid-Primer die in der PCR-Reaktion benutzt werden. L bezeichnet die Vorwärts-Primer, R die Rückwärts-Primer

verstärkte Gene	Primer Name	Sequenz	GenBank Zugriffs nr.	Position	Fragment Länge (bp)
<i>apxICA</i>	XICA-L	TTGCCTCGCTAGTTGCGGAT	X68595	440-459	2420
	XICA-R	TCCCAAGTTCGAATGGGCTT	X68595	2860-2841	
<i>apxIIICA</i>	XIIICA-L	CCATACGATATTGGAAGGGCAAAT	M30602	599-621	2088
	XIIICA-R	TCCCGCCATCAATAACGGT	M30602	2651-2631	
<i>apxIIIICA</i>	XIIIICA-L	CCTGGTTCTACAGAAGCGAAAATC	L12145	595-619	1755
	XIIIICA-R	TTTCGCCCTTAGTTGGATCGA	L12145	2351-2331	
<i>apxIBD</i>	XIBD-L	GTATCGGCGGGATTCCGT	X68595	4986-5003	1447
	XIBD-R	ATCCGCATCGGCTCCCAA	X68595	6433-6416	
<i>apxIIIIBD</i>	XIIIIBD-L	TCCAAGCATGTCTATGGAACG	L12145	5655-5675	968
	XIIIIBD2-R	AACAGAATCAAATCAGCTTGGTT	L12145	6623-6600	

ApXI und ApXII produziert (Burrows, Lo, 1992), ergab positive Reaktionen für *apxICA* und *apxIIICA*, hingegen nicht für die anderen Toxin-Gene. Dies zeigt, dass die Aktivator- und Strukturgene von ApXI und ApXII in *A. suis* mit denjenigen von *A. pleuropneumoniae* sehr ähnlich sind, nicht aber die Gene der Sekretionsproteine.

Um zu überprüfen, ob die PCR-Reaktion auch mit lysierten Zellen benutzt werden kann, was für eine rationelle diagnostische Methode wichtig ist, wurden die PCR-Reaktionen mit Zell-Lysaten aller 12 *A. pleuropneumoniae*-Serotyp-Referenzstämme durchgeführt. Die Resultate der Gelanalysen dieser PCR-Produkte sind in Abbildung 1 dargestellt. Sie entsprechen den Längen der verschiedenen *apx*-Gensegmente (in Tab. 1), die in den entsprechenden Serotypen vorhanden sind (Abb. 1). Anhand dieser Resultate lassen sich die 12 Serotypen in 5 Toxin-Gen-Gruppen einteilen (Tab. 2), wie dies schon bei den Hybridisierungen mit den individuellen *apx*-Genen der Fall war (Beck et al., 1994). Zur Validierung der PCR Methode für die Analyse von Feldisolaten wurden gesamthaft 130 Stämme (mindestens jedoch je 8 Stämme pro Serotyp) untersucht, die von verschiedensten Labo-

ratorien aus verschiedensten Regionen weltweit isoliert wurden. Alle Stämme waren früher auf das Vorhandensein der verschiedenen individuellen *apx*-Gene mittels DNA:DNA Hybridisierungen untersucht worden (Beck et al., 1994). Alle PCR-Reaktionen zeigten die erwarteten DNA-Fragmente für die spezifischen Gene der betreffenden Serotypen, wie sie bei den Serotyp-Referenzstämmen vorhanden sind (Abb. 1). Die verschiedenen *apx*-Gene scheinen deshalb in den Segmenten, die für die Berechnungen der Oligonukleotid-Primer verwendet wurden, keine wesentlichen Variationen aufzuweisen. Die Stabilität der Zell-Lysate wurde durch wiederholte Analysen einiger Proben nach 3 und 8 Wochen Lagerung bei Zimmertemperatur untersucht. Alle Proben ergaben nach 8 Wochen Lagerung die gleichen Resultate wie direkt nach der Zell-Lyse. Zudem haben wir mehrere Lysate von *A. pleuropneumoniae*-Stämmen untersucht, die uns von verschiedensten Laboratorien weltweit ohne Kühlung zugesandt wurden, und von denen wir gute PCR-Produkte erhielten.

Diskussion

Die Serotypisierung ist die meistbenutzte Methode zur Subtypisierung von *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Stämmen in Diagnostik und Epidemiologie der Schweinepleuropneumonie. Zur Zeit sind 12 Serotypen mit unterschiedlicher Virulenz bekannt. Zudem wird der Serotyp 5 in Subtypen 5a und 5b unterschieden. Die Analyse der *ApX*-Gene einer grossen Anzahl von Feldstämmen aus verschiedensten Ländern hat kürzlich ergeben, dass die verschiedenen *ApX*-Toxin-Genotypen und Phenotypen für die Serotypen konstant und charakteristisch sind (Beck et al., 1994). Die hier beschriebene PCR-Methode ergibt die gleichen Typisierungsresultate wie die DNA:DNA-Hybridisierungen, ist aber bedeutend einfacher und schneller zu handhaben. Da die Analysen durch Hybridisierungen mit den 10 individuellen *apx*-Genen zeigte, dass bei den *apx*-Genen die benachbarten C- und A-Gene und die B- und D-Gene immer zusammen vorkamen (Beck et al., 1994), wurden diese Gene in dieser PCR Methode zusammen verstärkt, um die Anzahl der Reaktionen zu vermindern. Die auf PCR-Verstärkung aufgebaute *apx*-Toxin-Gen-Analyse von *A. pleuropneumo-*

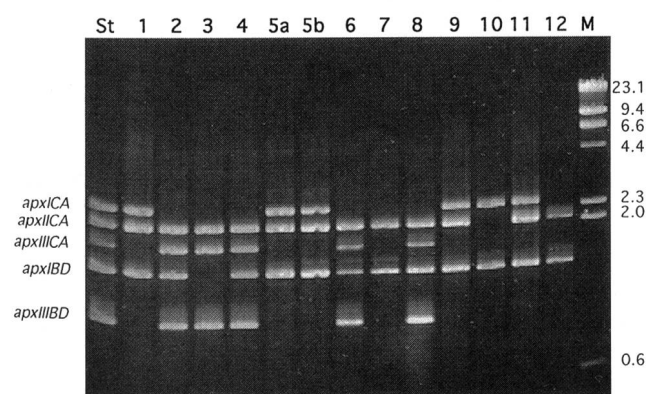


Abbildung 1: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Fragmente der 5 Reaktionen, die mit Lysaten von allen Serotyp-Referenzstämmen 1 bis 12 erhalten wurden. St, Standard PCR-Fragmente der Gene *apxICA*, *apxIBD* und *apxIICA* von Serotyp 1 und *apxIIICA* und *apxIIIIBD* von Serotyp 2, die mit reiner DNA verstärkt wurden. M, *HindIII* verdaute DNA von Bakteriophag Lambda, die Standardlängen sind in Kilobasenpaaren angegeben.

Tabelle 2: PCR Resultate der *apx*-Toxin-Gene in den verschiedenen *A. pleuropneumoniae* Serotyp-Referenzstämmen.

Serotypen	<i>apxICA</i>	<i>apxIIA</i>	<i>apxIIIA</i>	<i>apxIBD</i>	<i>apxIIIBD</i>
1, 5a, 5b, 9, 11	+	+	-	+	-
2, 4, 6, 8	-	+	+	+	+
3	-	+	+	-	+
7, 12	-	+	-	+	-
10	+	-	-	+	-

niae stellt deshalb eine einfache, schnelle und sichere Typisierungsmethode dar, die wertvolle Informationen über die potentielle Virulenz eines isolierten Stammes ermittelt. Die zwölf verschiedenen Serotypen können in 5 Toxin-Gen-Gruppen unterteilt werden (Tab. 2). Die Typisierung von *A. pleuropneumoniae* durch die *apx*-Gene erlaubt ebenfalls eine eindeutige Unterscheidung zwischen den serologisch schwierig trennbaren Serotypen 3 und 8. Die Methode erlaubt deshalb, die Resultate der Serotypisierung zu einem gewissen Grad zu bestätigen. Zudem kann die Methode auch atypische Stämme eines bekannten Serotyps erörtern, welche gewisse *apx*-Gene verloren und dadurch ihre Virulenz verändert haben. Solche Resultate können in Diagnose, Epidemiologie und Überwachungsprogrammen der Pleuropneumonie der Schweine eine wichtige Rolle spielen. Die PCR-Methode wurde jedoch nicht so ausgelegt, dass mit ihr das Spezies *A. pleuropneumoniae* von anderen bakteriellen Spezies unterschieden werden kann, weil festgestellt wurde, dass andere Spezies der Familie der Pasteurellaceae ebenfalls gewisse *apx*-Toxin-Gene enthalten (Burrows und Lo, 1992; Beck et al., 1994; Beck, 1994). Die hohe Homologie zwischen den DNA-Sequenzen *ashCA* von *A. suis* und *apxIIA* von *A. pleuropneumoniae* sagt voraus, dass die PCR-Methode das entsprechende *ashCA*-Fragment von *A. suis* verstärken wird. Wir haben mit dieser PCR-Methode in *A. suis* aber nicht nur *ashCA* (*apxIIA*), sondern auch analoge Gene zu *apxICA* verstärkt (J. Frey und J. MacInnes, unpublizierte Resultate). Zusammenfassend stellen wir hier eine PCR-Methode vor, die mit fünf Reaktionen erlaubt, das *apx*-Genprofil von *A. pleuropneumoniae*-Stämmen zu etablieren. Sie erweist sich nebst der Serotypisierung als wertvolle ergänzende Methode zur Routine-Typisierung von *A. pleuropneumoniae*-Stämmen und erlaubt eine Einschätzung der potentiellen Virulenz von *A. pleuropneumoniae*-Isolaten.

Literatur

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1990): Current protocols in molecular biology, vol. 1, New York: Wiley Interscience.

Beck M. (1994): Analyse der Apx Toxine in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Feldstämmen und Untersuchung ihrer

Korrespondenzadresse: Dr. Joachim Frey, Institut für Veterinärbakteriologie, Universität Bern, Länggassstrasse 122, CH-3012 Bern

potentiellen Rolle als Virulenzfaktoren bei der Schweinepleuropneumonie. Dissertation. Medizinische Fakultät, Universität Bern.

Beck M., van den Bosch J.F., Jongenelen I.M.C.A., Loeffen P.L.W., Nielsen R., Nicolet J., Frey J. (1994): RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. J. Clin. Microbiol. 32, 2749-2754.

Burrows L.L., Lo R.Y. (1992): Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. Infect. Immun. 60, 2166-2173.

Chang Y.F., Young R., Struck D.K. (1989): Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. DNA 8, 635-647.

Chang Y.F., Shi J.R., Ma D.P., Shin S.J., Lein D.H. (1993): Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. DNA Cell Biol. 12, 351-362.

Frey J., Beck M., Stucki U., Nicolet J. (1993a): Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Gene 123, 51-58.

Frey J., Bosse 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., Vandenbosch J.F., Willson P.J., Young R. (1993b): *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins - Uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. J. Gen. Microbiol. 139, 1723-1728.

Frey J. (1994). RTX-toxins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their potential role in virulence. In Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence, pp. 325-340. Edited by C.I. Kado & J.H. Crosa. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.

Frey J., Beck M., Nicolet J. (1994a). RTX-Toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In Bacterial Protein Toxins, pp. 322-332. Edited by J. Freer, R. Aitken, J.E. Alouf, G. Boulnois, P. Falmagne, F. Fehrenbach, C. Montecucco, Y. Piemont, R. Rappouli, T. Wadstrom & B. Witholt. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer.

Frey J., Haldimann A., Nicolet J., Boffini A., Prentki P. (1994b): Sequence analysis and transcription of the *apxI* operon (hemolysin D) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Gene 142, 97-102.

Frey J., Nicolet J. (1990): Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 28, 232-236.

Jansen R., Briaire J., Kamp E.M., Smits M.A. (1992): Comparison of the cytolysin II genetic determinants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. Infect. Immun. 60, 630-636.

Jansen R., Briaire J., Kamp E.M., Gielkens A.L.J., Smits M.A. (1993): Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-Toxin III (ApxIII) gene. Infect. Immun. 61, 947-954.

Nagai S., Yagibashi T., Ishibama A. (1993): DNA sequence analysis of an allelic variant of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-Toxin-I (ApxIA) from serotype-10. Microb. Pathog. 15, 485-495.

Reimer D., Frey J., Jansen R., Veit H.P., Inzana T. (1995): Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. Microb. Pathog. 18, 197-209.

Dank

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Gesuch # 3100.39123.93, unterstützt.