

Détection de *Mycoplasma hyopneumoniae* par PCR dans les conditions de la pratique

E. VERDIN (1), Marylène KOBISCH (2), Annie LABBÉ (2), P. POMMIER (3),
S. THÉAU-AUDIN (4), J.M. BOVÉ (1), Colette SAILLARD (1).

(1) I.N.R.A et Université de Bordeaux.II, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire
71, avenue Édouard Bourleaux, B.P. 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex

(2) C.N.E.V.A., Unité de Mycoplasmologie - Bactériologie - Zoopôle, Les Croix, B.P. 53, 22440 Ploufragan

(3) C.T.P.A., Zoopôle Développement - Rond-point du Zoopôle, B.P. 7, 22440 Ploufragan

(4) I.N.P.A.Q. - A.R.E.P.S.A. - 6, avenue Louis Sallenave, 64000 Pau

Détection de *Mycoplasma hyopneumoniae* par PCR dans les conditions de la pratique

Mycoplasma hyopneumoniae est l'agent étiologique primaire de la pneumonie enzootique du porc. La détection de *M. hyopneumoniae* est généralement réalisée par la réaction d'immunofluorescence (IF) qui utilise des anticorps polyclonaux. Le diagnostic sérologique à l'échelle du troupeau est effectué par un ELISA faisant intervenir un anticorps monoclonal. Une étude a été entreprise afin d'évaluer un test d'amplification génique (PCR) et le comparer à l'ELISA et à l'IF. Dans cette étude, 80 porcs provenant de 4 élevages ont été suivis individuellement de l'âge de 2 mois à l'abattoir. Des ponctions sanguines et des lavages trachéobronchiques ont été effectués à 2, puis 4, puis 6 mois d'âge pour réaliser le test PCR et l'ELISA. A l'abattoir, 37 poumons ont été examinés et l'IF a été utilisée pour détecter *M. hyopneumoniae*.

L'étude comparative des résultats indique que dans les stades précoces de l'infection à *M. hyopneumoniae* (2 mois d'âge), le test PCR est positif dans 4% des cas, alors que l'ELISA ne fournit un résultat positif que dans un seul cas (positif par les deux techniques). À 4 mois d'âge, le test PCR détecte 51% des porcs et 1% d'entre eux est positif par les deux tests. À la fin de l'essai, 72% des porcs sont positifs par PCR alors que seuls 10% sont positifs par ELISA ($p < 10^{-3}$). Les observations post-mortem (IF) montrent que le test PCR est plus sensible pour détecter *M. hyopneumoniae* ($p < 10^{-3}$).

Ces résultats suggèrent que le test PCR est performant pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae* chez le porc vivant dans les conditions de la pratique.

PCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in field conditions

Mycoplasma hyopneumoniae is the primary agent of enzootic pneumonia in pigs. Detection of *M. hyopneumoniae* in the pig lung is usually performed by an immunofluorescent test (IF) using polyclonal antibodies. The surveillance of the infection in pig herds is conducted by ELISA, using specific monoclonal antibodies. To evaluate the performance of a polymerase chain reaction test (PCR), the authors conducted a comparison of this test with ELISA and IF tests. In this study, 80 pigs belonging to 4 herds were individually followed from 2 months of age to slaughter. Blood samples and tracheobronchiolar washings were collected at 2, 4 and 6 months of age for ELISA and PCR analysis. At slaughter, 37 lungs were examined and IF test was used to detect *M. hyopneumoniae*.

Comparing the results of both tests indicated that, in the early stage of infection (2 months of age), PCR gave positive results in 4% of the samples, whereas ELISA gave 1% positive results. At 4 months of age, PCR test was positive for 51% of the pigs and 1% of them was positive by both tests. At the end of the study, 72% of the pigs were PCR positive whereas 10% were ELISA positive ($p < 10^{-3}$). Post-mortem observations (IF examinations) showed that PCR is the most sensitive assay for detecting *M. hyopneumoniae* ($p < 10^{-3}$).

These results suggest that PCR is very useful to detect *M. hyopneumoniae* infection in living pigs under field conditions and can be used in current diagnosis.

INTRODUCTION

Les maladies respiratoires du porc, et les pneumopathies en particulier, sont à l'origine de pertes économiques considérables au sein des élevages porcins. Pour l'éleveur, ces pertes se traduisent notamment par des baisses de performances, une augmentation de l'indice de consommation et des frais vétérinaires élevés. Ces affections pulmonaires sont de nature multifactorielle et, sur le plan infectieux, font intervenir des virus, des bactéries et des mycoplasmes. *Mycoplasma hyopneumoniae* joue un rôle capital et on le considère comme l'agent étiologique primaire de la pneumonie enzootique (MARE et SWITZER, 1965, GOODWIN et al., 1965, ROSS, 1992) qui peut se compliquer par l'intervention de bactéries comme *Pasteurella multocida* (KOBISCH et al., 1990) et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (KOBISCH et al., 1993a), de virus, comme ceux de la maladie d'Aujeszky (FUENTES et PIJOAN, 1975) ou de la grippe (BACHMANN, 1989).

Le contrôle et la prévention de l'infection à *M. hyopneumoniae* nécessitent en premier lieu un diagnostic de certitude. Ainsi, plusieurs méthodes de détection ont été mises au point. L'isolement de *M. hyopneumoniae* en culture nécessite un délai de réponse de plusieurs semaines et des milieux complexes (FRIIS, 1975). À l'heure actuelle, la détection individuelle du microorganisme est réalisée en routine par la réaction d'immunofluorescence à partir du tissu pulmonaire de porcs morts, en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre *M. hyopneumoniae* (MEYLING, 1971, KOBISCH et al., 1978). Le diagnostic est effectué à l'échelle du troupeau chez les porcs de différentes classes d'âge, en recherchant les anticorps anti-*M. hyopneumoniae* dans les prélèvements sanguins, grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal par un ELISA de blocage (FELD et al., 1992, LE POTIER et al., 1993).

L'utilisation de sérum polyclonal anti-*M. hyopneumoniae* révèle l'existence d'antigènes communs entre les différents mycoplasmes rencontrés chez le porc en particulier *M. hyorhinis* et *M. flocculare* (YOUNG et ROSS, 1987, BÖLSKE et al., 1987). Des techniques de détection par hybridation ADN/ADN, plus sensibles et plus spécifiques, ont donc été mises au point (STEMKE, 1989, AHRENS et FRIIS, 1991, ABIVEN et al., 1992, JOHANSSON et al., 1992). Des sondes moléculaires ont ainsi été préparées, par clonage de fragments d'ADN de *M. hyopneumoniae* qui ne présentent pas d'homologies de séquences avec l'ADN génomique d'espèces bactériennes ou mycoplasmiques fréquemment isolées de l'appareil respiratoire du porc. Le séquençage nucléotidique d'une de ces sondes (BLANCHARD et al., 1996a), a permis de choisir des couples d'amorces afin de mettre en oeuvre une technique d'amplification de gènes. La mise au point de cette technique a été réalisée à partir d'ADN purifié, puis à partir de lavages trachéobronchiques, effectués à l'autopsie, chez des porcs infectés expérimentalement par *M. hyopneumoniae*. Cette technique s'est révélée plus spécifique et plus sensible que le test d'immunofluorescence (BLANCHARD et al., 1996b).

Afin de valider la technique d'amplification de gènes dans les conditions de la pratique, nous avons mené une étude dans quatre élevages de la région Bretagne, première région française productrice de porcs.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Choix des élevages

Quatre élevages sont retenus pour participer à cette étude : 3 naisseurs-engraisseurs (J, S et T) et 1 post-sevreur-engraisseur (G). L'effectif des élevages naisseurs-engraisseurs est d'environ 150 truies. Trois de ces élevages (G, J et S) sont connus pour être infectés par *M. hyopneumoniae* alors que dans l'élevage T, le mycoplasme n'a pas été mis en évidence; l'existence de troubles respiratoires dans ce dernier étant principalement attribuée à une contamination par *A. pleuropneumoniae*.

1.2. Protocole d'étude

Quatre vingts porcs issus des quatre élevages sont suivis individuellement à trois stades de la production : la fin du post sevrage (porcelets âgés de 2 mois environ), le milieu de l'engraissement (porcs âgés de 4 mois environ) et avant l'abattage (porcs âgés de 6 mois environ). Des ponctions sanguines, pour la recherche des anticorps circulants anti-*M. hyopneumoniae*, et des lavages trachéobronchiques, pour réaliser la technique d'amplification de gènes, sont effectués à chaque stade, chez tous les animaux. À l'abattoir, les poumons de chaque porc sont prélevés et la sévérité de la pneumonie évaluée selon la grille établie par HANNAN et al., 1984. La recherche de *M. hyopneumoniae* par immunofluorescence (IF) a été réalisée à partir de coupes de tissu pulmonaire congelé (KOBISCH et al., 1978).

1.3. Lavages trachéobronchiques (LTB)

1.3.1. Prélèvement des LTB

La contention de l'animal étant obtenue, une sonde est introduite par voie nasale, dans la trachée et les bronches, selon le protocole décrit par POMMIER et ABIVEN, 1993. L'extrémité libre de la sonde est munie d'une seringue contenant du tampon phosphate 0,1 M (pH7), NaCl 1,5 M, injecté sous un volume de 10 ml chez les porcelets âgés de 2 mois, ou de 20 ml pour les porcs âgés de 4 et 6 mois. Une aspiration permet de récupérer environ 2ml de liquide qui est immédiatement stocké à -20°C.

1.3.2. Traitement des LTB

Après décongélation, les LTB sont centrifugés (20 000g pendant 30 min.) et les culots sont repris dans 1ml de tampon d'extraction [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH7), 4,5 mM MgCl₂, 0,45 % Nonidet P-40, 0,45 % Tween 20] additionné de protéinase K (200 µg/ml). Après une heure d'incubation à 55°C, l'enzyme est inactivée 10 minutes à 90°C.

1.4. Réaction d'amplification génique ou de polymérisation en chaîne (PCR)

Les quatre amorces de 20 nucléotides utilisées pour le test PCR ont été choisies sur la séquence spécifique de *M. hyopneumoniae* (BLANCHARD et al., 1996a). Les séquences des oligonucléotides et les conditions utilisées pour le test PCR sont décrites par VERDIN et al., 1997. A l'issue du test PCR, un fragment d'ADN d'une taille de 0,7 kpb, spécifique de *M. hyopneumoniae*, est visualisé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium, sous lumière U.V.

1.5. Test immunoenzymatique (ELISA)

La détection des anticorps circulants anti-*M. hyopneumoniae* est réalisée par un ELISA de blocage décrit par LE POTIER et al., 1993.

1.6. Analyses statistiques

L'analyse statistique des corrélations entre les différentes méthodes de diagnostic, PCR sur les LTB et ELISA d'une part, PCR sur les LTB et IF sur coupes de tissu pulmonaire d'autre part, a été réalisée par le test de symétrie de McNemar. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel statistique SYSTAT (WILKINSON, 1990).

2. RÉSULTATS

2.1. Comparaison des résultats obtenus par PCR et ELISA

Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

La plupart des porcelets de 2 mois d'âge (entre 90 et 100%) sont négatifs vis à vis de *M. hyopneumoniae*, par les deux tests (PCR et ELISA). Un seul animal (d'ailleurs négatif par le test PCR) est positif par ELISA. Le test PCR détecte la présence de *M. hyopneumoniae* dans 3 des 4 élevages (1 ou 2 porcs par élevage). L'élevage S n'a pas d'animaux positifs à ce stade.

À l'âge de 4 mois, au milieu de la période d'engraissement, le nombre d'animaux positifs augmente dans les 4 élevages, en particulier dans les élevages G et J. Seul le test PCR détecte *M. hyopneumoniae* chez plus de 50% des animaux (22 à 82%, selon les élevages), alors qu'un seul animal sur les 73 contrôlés (1%) est positif par les deux techniques. Quarante-huit pour cent des animaux restent négatifs, quelle que soit la méthode utilisée. Aucun animal n'est négatif par le test PCR et positif par ELISA.

Au total, 67 porcs ont pu être observés à l'âge de 6 mois. Soixante-trois pour cent des porcs répondent positivement uniquement au test PCR. Les anticorps sériques sont détectés chez 10% seulement des animaux. L'un d'entre eux (élevage T) se révèle positif par ELISA mais négatif par le test PCR. À la fin de l'étude, dans chacun des quatre élevages, plus de 65% des animaux sont positifs vis à vis de *M. hyopneumoniae* par l'une ou l'autre des techniques.

L'analyse statistique qui compare les résultats obtenus tous âges confondus, par le test PCR et l'ELISA, montre une différence significative entre les taux de détection ($p < 10^{-3}$), au profit du premier. La comparaison des résultats, par classe d'âge, révèle une différence significative à partir de 4 mois d'âge.

Tableau 1 - Comparaison des résultats obtenus par PCR et ELISA

	Élevage G				Élevage J				Élevage S				Élevage T				Total			
	E+P+	E-P-	E-P+	E+P-	E+P+	E-P-	E-P+	E+P-	E+P+	E-P-	E-P+	E+P-	E+P+	E-P-	E-P+	E+P-	E+P+	E-P-	E-P+	E+P-
Nombre de porcs à 2 mois	0	19	1	0	0	18	2	0	0	20	0	0	0	19	1	1	0	76	3	1
	0%	95%	5%	0%	0%	90%	10%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	90%	5%	5%	0%	95%	4%	1%
Nombre de porcs à 4 mois	1	2	14	0	0	6	13	0	0	14	4	0	0	13	6	0	1	35	37	0
	6%	12%	82%	0%	0%	32%	68%	0%	0%	78%	22%	0%	0%	68%	32%	0%	1%	48%	51%	0%
Nombre de porcs à 6 mois	2	5	10	0	2	4	13	0	1	3	9	0	1	6	10	1	6	18	42	1
	12%	29%	59%	0%	11%	21%	68%	0%	8%	23%	69%	0%	5%	33%	56%	5%	9%	27%	63%	1%

E+P+ : ELISA positif, PCR positive E-P- : ELISA négatif, PCR négative E-P+ : ELISA négatif, PCR positive E+P- : ELISA positif, PCR négative

2.2. Comparaison des résultats obtenus par PCR et IF

Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 - Comparaison des résultats obtenus par PCR et IF.

	I+P+	I-P-	I-P+	I+P-
Élevage G	6 60%	3 30%	1 10%	0 0%
Élevage J	3 23%	2 15%	8 62%	0 0%
Élevage T	2 14%	6 43%	6 43%	0 0%
Total	11 30%	11 30%	15 40%	0 0%

I+P+ : IF positive, PCR positive I-P- : IF négative, PCR négative
I-P+ : IF négative, PCR positive I+P- : IF positive, PCR négative

Au total, seuls 37 poumons, provenant de 3 élevages (G, J et T) ont pu être examinés à l'abattoir. Plus de 70% des animaux, dont les poumons ont été contrôlés, sont porteurs de *M. hyopneumoniae*. Moins de la moitié de ces animaux ont pu être détectés par IF, alors que le test PCR s'est révélé positif sur tous.

L'analyse statistique montre une différence significative entre les taux de détection ($p < 10^{-3}$) en faveur du test PCR.

2.3. Évaluation de l'étendue des lésions pulmonaires

Sur l'ensemble des 37 poumons examinés, le score moyen de pneumonie est de 7,29 (35 étant l'étendue maximale). Parmi les animaux chez lesquels *M. hyopneumoniae* a été détecté par le test PCR, à 6 mois d'âge, le score moyen de pneumonie est de 8,91. Ce score n'est que de 3,46 chez les animaux de 6 mois d'âge, pour lesquels le test PCR s'est révélé négatif.

DISCUSSION - CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons effectué une évaluation du test PCR dans 4 élevages de porcs, à différents stades de la vie des animaux, en comparant ce test à l'ELISA et à l'IF.

Les résultats montrent que le test PCR peut détecter *M. hyopneumoniae* chez les porcelets dès l'âge de 2 mois, bien qu'un faible pourcentage d'animaux soit déclaré positif (moins de 10% dans les 4 élevages contrôlés). Ceci confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs (ROSS, 1992, KOBISCH et FRIIS, 1996) qui indiquent que jusqu'à 4-6 semaines d'âge, les porcelets sont protégés par les anti-

corps colostraux. Ainsi, la présence de l'animal positif par ELISA et négatif par le test PCR (à 2 mois d'âge dans l'élevage T), pourrait s'expliquer par la persistance des anticorps d'origine maternelle. L'absence d'anticorps anti-*M. hyopneumoniae*, observée à 4 et 6 mois d'âge chez cet animal, confirme cette hypothèse. De plus, notre étude montre que *M. hyopneumoniae* est présent dans l'élevage T, pourtant réputé indemne du mycoplasme, puisque celui-ci est détecté par PCR et ELISA dès l'âge de 2 mois.

Au cours de la période d'engraissement, le test PCR décèle les animaux infectés avant que les anticorps sériques ne soient induits. Ceci peut s'expliquer à la fois par la grande sensibilité du test PCR et par sa capacité de détection précoce. En effet, le test PCR permet la détection directe du mycoplasme par l'amplification de l'ADN; celle-ci étant en théorie possible dès l'infection, alors qu'un délai de 2 à 4 semaines est nécessaire pour l'induction des anticorps sériques par ELISA (KOBISCH et al., 1993b).

La spécificité du test PCR a été vérifiée vis à vis de cultures, de lysats cellulaires et d'ADN purifié provenant de différentes bactéries et mycoplasmes isolés chez le porc, ainsi que de l'ADN de porc lui-même. L'absence d'amplification observée, quand le test est réalisé sur les échantillons autres que les souches de *M. hyopneumoniae* isolées de terrain, permet de considérer ce test comme étant spécifique de *M. hyopneumoniae* (VERDIN et al., 1997). Ainsi, le test PCR rend compte de façon fiable de l'état sanitaire d'un troupeau vis à vis d'une infection à *M. hyopneumoniae*.

Au moment de l'abattage, le test PCR reste plus sensible que ELISA. Les résultats montrent qu'au total, 10% sont séropositifs (1% l'était à 4 mois d'âge), ce qui est significativement en deçà du pourcentage d'animaux chez lesquels *M. hyopneumoniae* a été détecté par le test PCR (72%). Ainsi, dans les 4 élevages que nous avons étudiés et dans lesquels l'infection était en évolution, l'ELISA ne s'est pas révélé performant, en particulier lorsque les porcs étaient âgés de 6 mois, ce qui correspond souvent au moment du contrôle des futurs reproducteurs.

L'ensemble de ces résultats confirme ceux que nous avons obtenus lors d'une précédente étude effectuée dans une autre région française et qui portait sur 43 porcs répartis dans trois élevages (VERDIN et al., 1996). En effet, à 4 mois d'âge, le mycoplasme était détecté uniquement dans les LTB par le test PCR dans 51% des cas, alors que 6% des animaux étaient négatifs par les deux tests. Quarante-trois pour cent étaient positifs simultanément par les deux techniques.

La comparaison entre les résultats obtenus par le test PCR et l'IF, est favorable au premier. En effet, sur les prélèvements effectués à l'abattoir, l'IF n'a pas confirmé la présence de *M. hyopneumoniae*, chez des animaux révélés positifs par le test PCR lorsqu'ils étaient dans l'élevage. Il faut cependant signaler que l'étude finale n'a porté que sur 37 poumons. Des études précédentes ont évalué la sensibilité du test PCR entre 5 à 50 organismes (VERDIN et al., 1997) alors que celle de l'IF est estimée à 10^4 (ROSS et al., 1993). Cette différence de sensibilité peut expliquer les résultats que nous

avons obtenus durant cette étude. En effet, *M. hyopneumoniae* est détecté par le test PCR dans 70% des porcs examinés avant l'abattage alors que 30% d'entre eux sont positifs par IF. De plus, l'intérêt du test PCR est augmenté par sa plus grande spécificité. Un autre avantage, attribué à la technique d'amplification génique, est que l'IF est effectuée sur des prélèvements de porcs morts alors que le test PCR peut être réalisé sur des animaux vivants.

Les observations post-mortem montrent aussi des cas d'animaux atteints de pneumonie et qui se révèlent négatifs par IF et par PCR vis à vis du mycoplasme. Dans ce cas, il ne faut pas exclure l'intervention d'autres agents pathogènes dans l'apparition de ces lésions. En effet, *P. multocida* est capable d'induire des lésions de pneumonies irréversibles du même type (KOBISCH et al., 1990).

Des études précédentes décrivent la mise au point de tests PCR spécifiques pour détecter *M. hyopneumoniae* en culture à partir d'ADN purifié (HARASAWA et al., 1991, ARTIUSHIN et al., 1993). MATTSON et al. (1995) ont évalué un test PCR effectué à partir d'écouvillonnages nasaux effectués sur 31 porcs d'élevage. Ils ont également comparé cette technique au test ELISA. Le test PCR n'a pas détecté le mycoplasme avant l'apparition des anticorps sériques, un cas excepté. Dans notre étude, la grande sensibilité du test PCR permet la mise en évidence du microorganisme avant que la réponse humorale n'intervienne.

L'emploi du test PCR apparaît judicieux pour détecter une infection à *M. hyopneumoniae* chez l'animal vivant. Sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité d'exécution (une journée est nécessaire à la réalisation du test) en font un outil performant pour être utilisé dans un laboratoire d'analyses. Il pourrait être utilisé avec profit, en particulier à l'échelle de l'élevage, dans le cas d'une prévalence faible, ou au niveau individuel, dans le cas de contrôles sanitaires effectués lors de transfert d'animaux. Il convient toutefois de respecter des règles strictes de manipulation afin d'éviter le risque de contamination des échantillons à analyser par les produits d'amplification des tests PCR précédents (KWOCK et HIGUCHI, 1989). De plus en plus la filière porcine s'engage dans une politique de qualité destinée à apporter des garanties aux consommateurs. Le diagnostic par le test PCR, plus sensible que les autres techniques, pourrait contribuer à améliorer le statut sanitaire des cheptels vis à vis de la pathologie respiratoire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les techniciens et vétérinaires du CTPA (Allassane KEÏTA, Alain PHILIPPE, Sabine WESSEL-ROBERT) qui ont participé à cette étude, ainsi que la région Bretagne, la région Aquitaine et la direction générale du CNEVA qui financent ces travaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABIVEN P., BLANCHARD B., SAILLARD C., KOBISCH M., BOVE J.M., 1992. Mol. Cell. Probes, 6, 423-429.
- AHRENS P., FRIIS N.F., 1991. Lett. Appl. Microbiol., 12, 249-253.
- ARTIUSHIN S., STIPKOVITS L., MINION F.C., 1993. Mol. Cell. Probes, 7, 381-385.
- BACHMANN P.A., 1989. Swine influenza Virus. In : "Virus infection of vertebrates : virus infections of porcines." (MB. Pensaert editor). Elsevier Science Publishers B.V. The Netherlands. Chap. 14, 193-207.
- BLANCHARD B., SAILLARD C., KOBISCH M., BOVE J.M., 1996a. Microbiology, 142, 1855-1862.
- BLANCHARD B., KOBISCH M., BOVE J.M., SAILLARD C., 1996b. Mol. Cell. Probes, 10, 15-22.
- BÖLSKE G., STRANDBERG M.L., BERGSTRÖM K., JOHANSSON K.E., 1987. Curr. Microbiol., 15, 233-239.
- FELD N.C., QUIST P., AHRENS P., FRIIS N.F., MEYLING A., 1992. Vet. Microbiol., 30, 35-46.
- FRIIS N.F., 1975. Nord. Vet. Med., 27, 337-339.
- FUENTES M., PIJOAN C., 1975. Proc. IPVS, Ghent., 28p.
- GOODWIN R.F.W., POMEROY A.P., WHITTLESTONE P., 1965. Vet. Rec., 77, 1247-1249.
- HANNAN P.C.T., BANKS R.M., BHOGAL B.S., BLANCHFLOWER S.E., DONALD A.C., FISCH J.P., SMITH D., 1984. Res. Vet. Sci., 36, 153-163.
- HARASAWA R., KOSHIMUZU K., TAKEDA O., UEMORI T., ASADA K., KATO I., 1991. Mol. Cell. Probes, 5, 103-109.
- JOHANSSON K.E., MATTSON J.G., JACOBSSON K., FERNANDEZ C., BERGSTRÖM K., BÖLSKE G., WALLGREN P., 1992. Res. Vet. Sci., 52, 195-204.
- KOBISCH M., TILLON J.P., VANNIER P., 1978. Rec. Med. Vet., 154, 847-852.
- KOBISCH M., BLANCHARD B., MORVAN P., LAGADIC M., 1990. Journées. Rech. Porcines en France, 22, 291-296.
- KOBISCH M., LABBÉ A., MORVAN P., LE MOINE M.M., BEAUREPAIRE B., CARIOLET R., PANSART J.F., 1993a. Journées. Rech. Porcines en France, 25, 339-343.
- KOBISCH M., BLANCHARD B., LE POTIER M.F., 1993b. Vet. Res., 24, 67-77.
- KOBISCH M., FRIIS N.F., 1996. Swine mycoplasmoses. In : "Review. science. tech. Off. int. Epiz.", 15 (4), 1569-1605.
- KWOCK S., HIGUCHI R., 1989. Nature, 339, 237-238.
- LE POTIER M.F., ABIVEN P., KOBISCH M., CREVAT D., DESMETTRE P., 1993. Res. Vet. Sci., 56, 338-345.
- MARE C.J., SWITZER W.P., 1965. Vet. Med., 60, 841-846.
- MATTSON J.G., BERGSTRÖM K., WALLGREN P., JOHANSSON K.E., 1995. J. Clin. Microbiol., 33, 893-897.
- MEYLING A., 1971. Acta. Vet. Scand., 12, 137-141.
- POMMIER P., ABIVEN P., 1993. Journées. Rech. Porcines en France, 25, 335-339.
- ROSS R.F., 1992. Mycoplasmal diseases. In : "Diseases of swine." 7ème ed. (Leman A.D., Straw, B., Glock, R.D., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J.), Iowa State University Press, 537-551.
- ROSS R.F., CLARK K., GILLEPSIE T., HOEFLING D., LOULA T., ROTH R., SNELSON H., 1993. Agri-practice, 14, 20-23 et 32-37.
- STEMKE G.W., 1989. Mol. Cell. Probes, 3, 225-232.
- VERDIN E., BLANCHARD B., KOBISCH M., BOVE J.M., SAILLARD C., 1996. IOM Lett. (4), 11 th IOM Congress, Orlando, 101-102.
- VERDIN E., KOBISCH M., BOVE J.M., SAILLARD C., 1997. (Soumis à publication).
- WILKINSON L., 1990. Evanston II, SYSTAT, Inc.
- YOUNG T.F., ROSS R.F., 1987. Am. J. Vet. Res., 48, 651-656.