

Influence d'une exposition aux poussières sur l'appareil respiratoire du porc

Interaction avec l'ammoniac

B. URBAIN (1), J. MAST (2), B. GODDEERIS (2), M. ANSAY (1), P. GUSTIN (1)

(1) Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pharmacologie-Pharmacothérapie et Toxicologie
Boulevard de Colonster, B41, B-4000 Liège, Belgique

(2) Katholieke Universiteit Leuven, Immunologie der Huisdieren
K. Mercierlaan 92, B-3001 Heverlee, Belgique

avec la collaboration technique de D. Beerens et T.Q. Nguyen

Influence d'une exposition aux poussières et à l'ammoniac sur l'appareil respiratoire du porc

Afin de rechercher les effets de l'inhalation de poussières et d'ammoniac sur l'appareil respiratoire, des porcelets ont été exposés pendant 6 jours à des poussières de farine mises artificiellement en suspension dans l'air (environ 15 mg/m³), à de l'ammoniac (environ 50 ppm), ou aux deux polluants à la fois. Les effets biologiques ont été recherchés par l'analyse de la composition cellulaire et biochimique des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire. L'ammoniac seul provoque un appel cellulaire dans les cavités nasales. L'exposition concomitante aux poussières ne modifie pas la réponse de la muqueuse nasale à l'ammoniac. En revanche, dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, si le nombre de cellules totales est significativement augmenté suite à l'inhalation de poussières, l'exposition simultanée à l'ammoniac va inhiber cette réponse cellulaire. En conclusion, l'ammoniac et les poussières n'interagissent pas au niveau des cavités nasales. Par contre, il existe une interaction négative entre ces deux polluants au niveau intrathoracique.

Effects of ammonia and feed flour dust inhalation on the respiratory tract in pigs

To assess the effects of ammonia and dust inhalation on the respiratory tract, piglets have been exposed for 6 days in an environmental chamber to ammonia (around 50 ppm) or feed flour dust (around 15 mg/m³) or to both pollutants at levels liable to be encountered in pig buildings. Biological effects have been evaluated by analysing the cellular and biochemical composition of nasal lavage (NAL) and broncho-alveolar lavage (BAL) liquids. Ammonia alone induced an increase in the number of cells in NAL liquid. Dust exposure had no effect on the NAL liquid composition and did not interact with nasal response to ammonia. In contrast, increases in the total cell counts in BAL liquid were recorded in dust exposed group, but not in piglets exposed to both pollutants. It was concluded (1) that feed flour dust inhalation had no effect on the nasal ammonia-induced injuries, (2) that ammonia is able to inhibit the cellular lung dust-induced response.

INTRODUCTION

Les poussières et l'ammoniac figurent parmi les polluants de l'air les plus importants dans les porcheries. Les premières sont suspectées par les épidémiologistes d'être potentiellement pathogènes, au vu des corrélations étroites établies entre les concentrations en poussières dans les exploitations porcines et la prévalence des maladies chez l'homme et l'animal (DONHAM et al, 1989; ROBERTSON et al, 1990). Les données épidémiologiques concernant l'ammoniac sont peu nombreuses, mais ce gaz est considéré comme un facteur favorisant le développement de la rhinite atrophique progressive (ROBERTSON et al, 1990; HAMILTON et al, 1996). Des travaux récents ont montré que, pris individuellement, l'ammoniac exerce un tropisme particulier pour les voies respiratoires extrathoraciques (URBAIN et al, 1994, 1996b, 1996c), tandis que les poussières ont plutôt des effets pulmonaires (URBAIN et al., 1997). Les interactions entre ces polluants ne sont pas connues. Etant donné la présence ubiquitaire de ceux-ci en porcherie, les effets combinés de ces agents sur l'appareil méritent d'être explorés.

Dans le but de rechercher les effets de l'inhalation concomitante de poussières et d'ammoniac sur l'appareil respiratoire, des porcelets ont été exposés pendant 6 jours à des poussières de farine mises artificiellement en suspension dans l'air dans une chambre d'inhalation, à de l'ammoniac ou aux deux polluants simultanément. Les effets biologiques ont été recherchés par l'analyse de la composition cytologique et biochimique des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux

Vingt-neuf porcelets Landrace Belge ont été sélectionnés pour cette étude. Les animaux, pesant en moyenne 10 kg, ont été préalablement introduits dans un local constitué d'un caillebotis surélevé par rapport au sol (40 cm), dépourvu de litière et où le lisier était éliminé quotidiennement. Les animaux ont été nourris exclusivement avec des granulés. Ces conditions d'hébergement particulières visaient à maintenir les concentrations en poussières et en ammoniac à un niveau minimal avant l'expérimentation.

1.2. Méthode d'exposition aux poussières et à l'ammoniac

Chaque animal, dont le poids corporel était de $18,2 \pm 2,6$ kg, a été introduit dans une chambre permettant l'exposition aux poussières et à l'ammoniac décrite précédemment (URBAIN et al, 1993, 1996a). Brièvement, il s'agit d'un isolateur d'une capacité de $1,9 \text{ m}^3$ où les conditions microclimatiques et la charge en polluants sont contrôlées. Une farine alimentaire commerciale a été utilisée comme source de poussières. Après tamisage pour éliminer les grosses particules, la farine a été introduite dans un réservoir cylindrique de 150 cm de hauteur connecté à une source d'air comprimé afin de produire des turbulences et un nuage de poussières. Ce dernier

était entraîné dans l'isolateur par le système de ventilation. Le débit d'air dans le réservoir, ainsi que la hauteur à laquelle le nuage de poussières peut s'en échapper pouvaient être modulés de façon à obtenir différents niveaux de concentrations en poussières dans l'isolateur. L'enrichissement en ammoniac (NH_3) a été réalisé en connectant une bonbonne contenant 15 % de ce gaz au système de ventilation.

Les concentrations en poussières inhalables ont été mesurées de manière gravimétrique à l'aide d'un échantillonneur d'air composé d'une cassette portant un filtre de polycarbonate et d'une pompe maintenant un débit constant de 2 L/min. Les filtres ont été pesés immédiatement avant et après l'échantillonnage et les concentrations en poussières exprimées en mg/m^3 . Les concentrations en poussières respirables ont été mesurées de manière indirecte à l'aide d'un appareil de mesure optique de poussière fine (TM digital μP respirable dust-measuring instrument) convertissant la mesure optique en valeur gravimétrique avec une sensibilité de $0,01 \text{ mg}/\text{m}^3$. Les concentrations instantanées et moyennes en NH_3 ont été mesurées à l'aide de tubes à diffusion.

1.3. Protocole expérimental

Quatre groupes d'animaux ont été constitués. Les animaux du groupe témoin ($n=8$) ont séjourné dans l'isolateur sans être exposés aux poussières ou à l'ammoniac. Le groupe I a été exposé aux poussières, le groupe II à l'ammoniac et le groupe III à la combinaison des deux agents. Les conditions d'exposition sont résumées au tableau 1. La durée d'exposition a été de 8 heures par jour pendant 6 jours pour les poussières et de 24 heures par jour pour l'ammoniac. Des échantillons sanguins ont été prélevés dans la veine auriculaire avant et après exposition et collectés dans des tubes contenant de l'EDTA. Les animaux ont subi un lavage nasal avant et après l'exposition. Ils ont ensuite été euthanasiés afin de prélever les poumons et de pratiquer un lavage broncho-alvéolaire.

1.4. Lavage nasal

Le lavage nasal a été réalisé sur des porcelets anesthésiés en instillant dans chaque narine 2,5 ml de tampon phosphate à 37°C (PBS) à l'aide d'une seringue (URBAIN et al, 1994). Le liquide récolté dans les deux cavités nasales a été centrifugé (800 g à 4°C pendant 15 minutes). Chaque culot a été suspendu dans 0,9 ml de PBS contenant 16 % de N-acétyl-L-cystéine afin de dissoudre le mucus. Ensuite, les cellules ont été colorées avec 0,1 ml de violet de gentiane à 1 % et un comptage a été effectué sur une cellule de Thoma. Les résultats ont été exprimés en nombre de leucocytes par millilitre de liquide récolté.

1.5. Lavage broncho-alvéolaire

Après le prélèvement des poumons, un tube trachéal (3,5 mm) a été introduit dans la bronche principale du lobe diaphragmatique droit. Ce dernier a alors été lavé 3 fois avec 20 ml d'une solution saline (9‰) (volume total 60 ml). Le pourcentage de volume récolté était de 67,5 %. Le liquide

Tableau 1 - Conditions expérimentales d'exposition aux poussières et à l'ammoniac dans l'isolateur

Paramètres	Groupes			
	Témoin	I (Poussières)	II (Ammoniac)	III (Poussières-Ammoniac)
Poussières inhalables (mg/m ³)	1,0 ± 0,2 (5)	15,4 ± 8,7 (14)	0,8 ± 0,3 (5)	13,3 ± 3,6 (8)
Poussières respirables (mg/m ³)	0,14 ± 0,09 (5)	1,06 ± 0,54 (14)	0,11 ± 0,06 (5)	1,32 ± 0,42 (8)
Ammoniac (ppm)	< 5 ppm	< 5 ppm	49,2 ± 5,6 (7)	56,6 ± 6,4 (5)

Les valeurs sont des moyennes ± l'écart-type.

Le nombre d'échantillons est indiqué entre parenthèses.

a été transvasé dans des tubes de polycarbonate et conservé sur glace à 4°C.

1.6. Différenciation cellulaire par cytométrie de flux

Les différents types cellulaires présents dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et le sang ont été identifiés par l'analyse fluorocytométrique des cellules préalablement conjuguées à des anticorps monoclonaux. Des anticorps monoclonaux anti-CD14 spécifiques des macrophages porcins, anti-CD4 et anti-CD8 spécifiques des sous-populations de lymphocytes T porcins, produits sur hybridomes de souris et conjugués à la fluorescéine, ont été utilisés comme marqueurs spécifiques. Pratiquement, 100 µl de liquide de lavage ou de sang total sont incubés en présence de 20 µl d'une solution d'anticorps monoclonaux pendant 45 minutes à 4 °C. De façon à obtenir une suspension leucocytaire disponible pour l'analyse fluorocytométrique, les globules rouges sont ensuite éliminés par lyse à l'acide formique (600 µl à 0,12%) pendant 7 secondes. La réaction est stoppée par l'addition de 260 µl d'un tampon stabilisateur (Na₂CO₃ 56,6 mM; NaCl 248 mM; Na₂SO₄ 220 mM). Les leucocytes sont ensuite directement fixés par l'addition de 135 µl de paraformaldéhyde à 1%. Le nombre total de cellules est déterminé en ajoutant à la suspension cellulaire une quantité connue de billes de polystyrène. La suspension cellulaire est alors analysée par un cytomètre de flux FACSan (Becton-Dickinson) qui permet de différencier, lors de l'interaction avec un rayon laser, les cellules en fonction de leur volume, de leur granularité et de leur fluorescence. Les proportions des différents types cellulaires identifiables, à savoir les polymorphonucléaires, les macrophages alvéolaires ou les monocytes sanguins, les lymphocytes et leurs sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ ont été déterminés à l'aide d'un programme informatique WinMDI.

1.7. Concentrations en albumine et en lactate-déshydrogénase dans les liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire.

Les liquides de lavage ont été centrifugés (800 g à 4°C pendant 15 minutes) et le surnageant récolté. Un dosage

radioimmunologique de l'albumine a alors été réalisé (URBAIN et al, 1996b) et les résultats ont été exprimés en ng/ml dans le liquide de lavage nasal et par µg/ml dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Les concentrations en lactate déshydrogénase (LDH) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ont été déterminées à l'aide d'un kit Sigma et exprimées en unités (U) par millilitre.

1.8. Analyse statistique

Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes ± un écart-type. Les résultats ont été soumis à un test d'analyse de variance (ANOVA). Quand l'anova était significative (p < 0,05), les moyennes ont été comparées par un test non paramétrique de Mann-Whitney quand les écarts-types étaient inégaux.

2. RÉSULTATS

2.1. Réponse clinique à l'inhalation de poussières et d'ammoniac

Aucun signe clinique spécifique n'a été observé dans les différents groupes. Toutefois, de la toux a été occasionnellement observée. Les animaux exposés à l'ammoniac en présence ou non de poussières ont montré un comportement plus calme que ceux des autres groupes. Aucune modification hématologique n'a été enregistrée dans les différents groupes.

2.2. Effets de l'inhalation de poussières et d'ammoniac sur la composition du liquide de lavage nasal.

L'exposition aux poussières n'a pas influencé la composition cellulaire du liquide de lavage nasal (tableau 2, p 420). L'ammoniac, en revanche, a induit une augmentation significative du nombre de leucocytes dans le liquide de lavage. Le rapport moyen entre le nombre de leucocytes après et avant exposition, ou facteur multiplicatif, était de 19,1 ± 19,3. Lors de l'exposition concomitante à l'ammoniac et aux poussières, l'augmentation du nombre de cellules est significative,

Tableau 2 - Composition cellulaire et biochimique du liquide de lavage nasal avant (J 0) et après (J 6) exposition aux poussières et à l'ammoniac

Groupes	Cellules ($\times 10^3/\text{ml}$)		Albumine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	J 0	J 6	J 0	J 6
Témoins	380 \pm 330	329 \pm 319	2,51 \pm 2,28	1,37 \pm 1,44
I (Poussières)	112 \pm 111	318 \pm 545	2,91 \pm 2,92	2,02 \pm 1,80
II (Ammoniac)	167 \pm 181	1219 \pm 790 * $\Delta\Delta$ ++	1,92 \pm 1,36	5,27 \pm 5,60
III (Poussières-Ammoniac)	189 \pm 97	986 \pm 836 * Δ +	1,96 \pm 1,09	2,15 \pm 1,13

Les valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type.

* Valeur significativement différente de celle enregistrée au J 0.

Δ Valeur significativement différente de celle enregistrée dans le groupe témoin.

+ Valeur significativement différente de celle enregistrée dans le groupe I.

* : $p < 0,05$

D: Δ : $< 0,05$;

$\Delta\Delta$: $p < 0,01$

+ : $p < 0,05$;

++ : $p < 0,01$

mais avec une valeur de p plus faible. Le facteur multiplicatif correspondant était de $7,8 \pm 9,9$. Dans aucun des groupes, la concentration en albumine n'a été modifiée suite à l'exposition aux polluants.

2.3. Effets de l'inhalation de poussières et d'ammoniac sur la composition du liquide de lavage broncho-alvéolaire.

L'exposition aux poussières a provoqué une augmentation significative du nombre de cellules dans le groupe I. Le nombre de cellules totales, exprimé en millions par millilitre, dans les groupes témoin et I étaient respectivement : $7,50 \pm 3,87$ et $13,89 \pm 4,47$. La composition cellulaire du liquide de lavage broncho-alvéolaire est illustrée à la figure 1. L'augmentation du nombre de cellules totales est expliquée par des augmentations significatives dans le nombre de macrophages et de lymphocytes. Au niveau biochimique, la concentration en albumine est significativement augmentée (tableau 3).

Tableau 3 - Modifications biochimiques dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire suite à une exposition de 6 jours aux poussières et à l'ammoniac

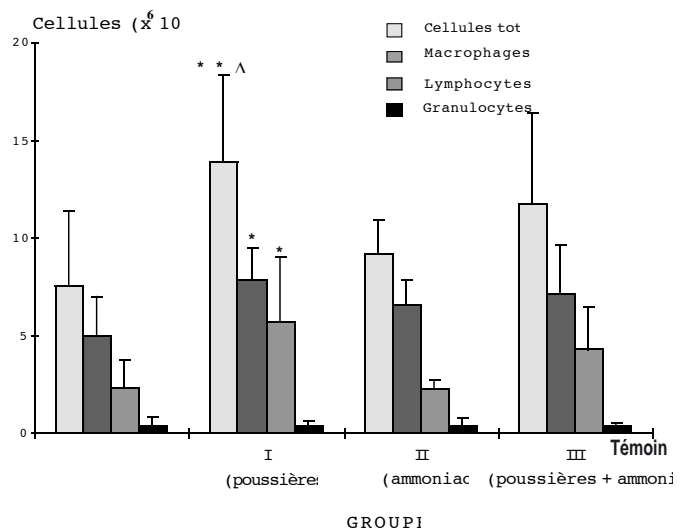
Groupes	Albumine (mg/ml)	LDH (U/ml)
Témoins	218 \pm 125	491 \pm 155
I (Poussières)	434 \pm 217 *	660 \pm 310
II (Ammoniac)	380 \pm 85 *	1014 \pm 233 ***
III (Poussières-Ammoniac)	330 \pm 122	1018 \pm 375 *

Les valeurs sont des moyennes \pm l'écart-type.

*: Valeur significativement différente de celle enregistrée dans le groupe témoin.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

Figure 1. - Nombre de cellules totales, de macrophages, de lymphocytes et de polymorphonucléaires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire chez des porcelets exposés à l'ammoniac et aux poussières. (Les valeurs sont des moyennes accompagnées d'un écart-type)



* Valeurs significativement différentes de celle enregistrée dans le groupe t

* : $p < 0,05$; $\Delta\Delta$: $p < 0,01$

Δ Valeurs significativement différentes de celle enregistrée dans le groupe II

+ : $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$

Dans le groupe II, l'exposition à l'ammoniac n'a pas modifié la composition cellulaire du liquide de lavage broncho-alvéolaire (Figure 1). Par contre, des modifications biochimiques telles que des augmentations significatives dans les taux d'albumine et de LDH ont été enregistrées (tableau 3).

Dans le groupe III, incluant les animaux exposés simultanément à l'ammoniac et aux poussières, aucune modification de la composition cellulaire du liquide de lavage broncho-alvéolaire n'a été enregistrée (figure 1). Au niveau biochimique, seule l'activité de la LDH était significativement augmentée (tableau 3).

Les proportions de sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ n'ont été affectées par aucun des traitements. Le rapport entre les populations lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺ dans les groupes témoins, I, II et III étaient respectivement : $0,63 \pm 0,17$; $0,45 \pm 0,27$; $0,58 \pm 0,19$; $0,59 \pm 0,26$.

3. DISCUSSION

Les effets des polluants de l'air sur l'appareil respiratoire du porc ont fait l'objet de plusieurs études. Cependant, la problématique des interactions a rarement été abordée. Signalons un travail récent illustrant l'interaction entre l'ammoniac et les endotoxines sur la muqueuse nasale (URBAIN et al, 1996b). Dans la présente étude, les effets interactifs de deux polluants de l'air de porcherie, les poussières et l'ammoniac, sur l'appareil respiratoire du porc, ont été recherchés par l'analyse cytologique et biochimique des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire après une exposition de 6 jours à ces agents.

Les poussières et l'ammoniac sont constamment détectés en porcheries. Les concentrations en poussières inhalables sont de l'ordre de 2 à 25 mg/m³. Les valeurs moyennes sont situées entre 2,8 et 7,4 mg/m³, tandis que des concentrations peuvent atteindre 24, voire 27 mg/m³ lors de la pesée des animaux ou lors de la distribution de farines (ATTWOOD et al, 1987; LARSSON et al, 1992, 1994). Les concentrations moyennes en poussières respirables sont de l'ordre de 0,2 à 1 mg/m³ (DONHAM, 1991; PICKRELL et al, 1993). Les concentrations en ammoniac varient le plus souvent de 5 à 50 ppm avec des valeurs moyennes de 6 à 26 ppm (ATTWOOD et al, 1987; DONHAM, 1991).

Les effets biologiques individuels des poussières et de l'ammoniac chez le porc ont fait l'objet de travaux récents (URBAIN et al, 1994, 1996b, 1996c, 1997). L'exposition aux poussières d'origine alimentaire ne provoque pas d'irritation de la muqueuse nasale. En revanche, au niveau pulmonaire, les poussières peuvent engendrer une inflammation. Les effets biologiques sont caractérisés par une augmentation du nombre de macrophages, de lymphocytes et de la concentration en albumine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Les résultats enregistrés dans la présente étude chez les animaux exposés aux poussières (groupe I) corroborent ces observations.

Contrairement aux poussières, l'ammoniac est capable d'induire une irritation de la muqueuse nasale, dont l'importance est liée à la dose d'exposition. Les effets caractéristiques sont une infiltration de la muqueuse par des polymorphonucléaires neutrophiles, une hyperplasie épithéliale, une augmentation de la perméabilité épithéliale et une tendance à la destruction du tapis ciliaire. Au niveau pulmonaire, l'ammoniac ne modifie pas la perméabilité microvasculaire mais interfère avec la réaction hypertensive induite par les endotoxines (GUSTIN et al, 1994). Dans la présente étude, une exposition de 6 jours à 50 ppm d'ammoniac ne modifie pas la composition cellulaire du liquide de lavage broncho-

alvéolaire. Les modifications biochimiques enregistrées attestent l'agression de l'épithélium broncho-pulmonaire aboutissant à une élévation de la perméabilité aux protéines. L'absence de ces effets directs au cours d'une étude antérieure (URBAIN et al, 1996b) peut s'expliquer par des différences dans les protocoles expérimentaux.

Nos résultats montrent que l'exposition concomitante aux poussières et à l'ammoniac n'influence pas les effets de ce dernier sur les cavités nasales. L'effet de ce gaz semble moins important, mais reste significatif. CURTIS et al (1975) n'ont observé aucune lésion histologique de la muqueuse nasale lors de l'exposition de porcs à 50 ppm d'ammoniac avec 10 ou 300 mg/m³ de poussières. Ces observations sont à l'opposé de celles de DOIG ET WILLOUGHBY (1971) qui rapportent qu'une exposition à 100 ppm d'ammoniac pendant 5 et 6 semaines est sans effet sur la muqueuse nasale, mais induit des effets dans la muqueuse trachéale caractérisés par une augmentation de 50 à 100% de l'épaisseur de l'épithélium, et une diminution d'un facteur de 5 à 10 du nombre de cellules calciformes. L'exposition aux poussières seules, à raison de 220 mg/m³, n'engendre aucune lésion dans l'appareil respiratoire. L'exposition simultanée aux poussières et à l'ammoniac induit dans la muqueuse nasale des effets similaires à ceux observés dans la trachée lorsque l'ammoniac est administré seul. Par contre, plus aucune lésion n'est observée dans la trachée. Ces auteurs suspectent dès lors une plus grande toxicité de l'ammoniac lorsqu'il est adsorbé aux poussières.

DOIG ET WILLOUGHBY (1971), pas plus que CURTIS et al (1975), n'ont observé de modifications de la structure du parenchyme pulmonaire sous l'exposition concomitante d'ammoniac et de poussières pendant plusieurs semaines. Par contre, les résultats du tableau 3 et de la figure 1 montrent que l'ammoniac atténue l'appel cellulaire normalement induit par les poussières. Cet effet inhibiteur de l'ammoniac vis-à-vis de la réaction cellulaire pulmonaire, est à rapprocher de l'inhibition par l'ammoniac de l'hypertension pulmonaire normalement induite par les endotoxines (GUSTIN et al, 1994). En outre, l'agression de l'épithélium broncho-pulmonaire, bien que toujours présente étant donné les taux élevés en LDH enregistrés, n'aboutit plus à une altération de la perméabilité. Ces résultats montrent que l'ammoniac est capable d'interagir avec des agents biologiques et physiques et de modifier les réponses normalement induites par ceux-ci.

Ces observations sont à mettre en relation avec une étude de terrain récente au cours de laquelle deux lots de porcs à l'engrais ont été élevés dans des locaux identiques, mais où les concentrations en ammoniac étaient significativement différentes (17 ± 7 vs 8 ± 4 ppm) (résultats non publiés). Des lavages broncho-alvéolaires effectués à l'abattage ont montré que le nombre de cellules inflammatoires totales dans ce liquide était significativement plus faible dans le groupe d'animaux où le taux d'ammoniac était plus élevé. Ces résultats, sans pouvoir être reliés à une cause précise, corroborent les observations décrites dans cet article.

CONCLUSIONS

L'exposition de porcs pendant 6 jours à l'ammoniac en présence de poussières ne modifie pas la l'irritation des cavités nasales induite par ce gaz. En revanche, l'ammoniac est capable d'inhiber la réaction cellulaire pulmonaire normalement induite par les poussières. En présence d'ammoniac et de poussières, l'altération de la perméabilité de l'épithélium

broncho-pulmonaire induite par chacun de ces polluants agissant séparément, n'est plus détectable bien que l'aggrégation de la muqueuse soit toujours présente.

REMERCIEMENTS

Ce travail est subsidié par le Ministère de l'Agriculture (DG VI).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ATTWOOD P., BROUWER R., RUIGIWAARD P., VERSLOOT P., DE WIT R., HEEDERIK D., BOLEIJ J.S.M., 1987, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 48, 745-751.
- CURTIS S.E., ANDERSON C.R., SIMON J., JENSEN A.H., DAY D.L., KELLEY K.W., 1975, *J. Anim. Sci.*, 41, 735-739.
- DOIG D.A., WILLOUGHBY R.A., J., 1971, *Am. Vet. Med. Assoc.*, 159, 1353-1361.
- DONHAM K.J., HAGLIND P., PETERSON Y., RYLANDER R., BELIN L. *Br. J.*, 1989, *Ind. Med.*, 46, 31-37.
- DONHAM J.D., 1991, *Am. J. Vet. Res.*, 52, 1723-1730.
- GUSTIN P., URBAIN B., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1994, *Tox. Applied Pharmacol.*, 125, 17-26.
- HAMILTON T. D. C., ROE J. M., WEBSTER A. J. F., 1996, *J. Clin. Micro.*, 34, 2185-2190.
- LARSSON K., EKLUND A., MALMBERG P., BEIN L., 1992, *Chest*, 101, 767-774.
- LARSSON K., EKLUND A., HANSSON L.O., ISAKSSON B.M., MALMBERG P., 1994, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 973-977
- PICKRELL J.A., HEBER A.J., MURPHY J.P., HENRY S.C., MAY M.M., NOLAN D., OEHME F.W., GILLEPSIE J.R., SCHONEWEIS D., 1993, *Vet. Hum. Toxicol.*, 35, 421-428.
- ROBERTSON J.F., WILSON D., SMITH W., 1990, *J. Anim. Prod.*, 50, 173-182.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J.F., MICHEL O., NICKS B., ANSAY M., 1993, *Vet. Res.*, 24, 503-514
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1994, *Am. J. Vet. Res.*, 55, 1335-1340.
- URBAIN B., GUSTIN P., PROUVOST J. F., BEERENS D., MICHEL O., NICKS B., ANSAY M., 1996a, *Vet. Res.*, 27, 569-578.
- URBAIN B., PROUVOST J. F., BEERENS D., ANSAY M., GUSTIN P., 1996b, *Inh. Toxicol.*, 8, 947-968.
- URBAIN B., GUSTIN P., CHARLIER G., COIGNOUL F., LAMBOTTE J.L., GRIGNON G., FOLIGUET B., VIDIC B., PROUVOST J.F., ANSAY M., 1996c, *Vet. Res. Communication*; 20, 381.
- URBAIN B., MAST J., GODDEERIS B., ANSAY M., GUSTIN P., 1997, *Journées Rech. Porcine en France*, 29, 17-22.