

Właściwości biologiczne *Mycoplasma hyopneumoniae*, czynnika etiologicznego mykoplazmowego zapalenia płuc

PIOTR KOŁODZIEJCZYK, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kołodziejczyk P., Pejsak Z.

Biological properties of *Mycoplasma hyopneumoniae*, agent of mycoplasmal pneumonia in swine

Summary

Mycoplasma pneumonia in swine (MPS) is one of the most common respiratory diseases in this animal. Its characteristic gross lesions in lungs are found in 30%-80% of slaughtered pigs. *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp), the etiological agent of MPS, is one of the smallest self-replicating bacteria. In contrast to other bacteria from *Mycoplasma* family it has no cellular wall and this contributes to its considerable polymorphism.

The Mollicutes class contains over 120 *Mycoplasma* species. Some species are pathogenic for plants, vertebrates and insects. Due to the fact that this bacterium is able to pass through membrane filters of very small diameter in the pores, it has for many years been described as a virus. However, in contrast to viruses, *Mycoplasma* contains both DNA and RNA, is able to grow on a cell-free medium and is sensitive to wide spectrum of antibiotics. Molecular studies have revealed that proteins are located on the surface of cytoplasmic membrane lipoprotein components like p65, p50 and p44. Through using polyclonal and monoclonal mice, the antibodies of p65 lipoprotein have proven to be the major antigen recognised by the immune system of the macro-organism during infection.

The attachment of Mhp to the host cells is a preliminary and necessary prerequisite for infection. The early stage of infection involves the colonisation of the surface of the trachea, bronchi and bronchioles. Mhp does not enter inside the cells, but locates itself on the top of the cilia. There are structures which play the role of adhesives among the proteins on the Mhp cytoplasmic membrane and which provide specific binding with the epithelial tissue receptors. The most important adhesive is P97. Infected airways show evidence of ciliary and epithelial cell damage and their antibacterial mucus activity is reduced. The result of this state is catarrhal bronchopneumonia.

Significant immunosuppression is present during Mhp infection. The specific cellular immune-response is reduced, contributing to chronic multifactor respiratory tract infections. Thacker and Thacker have proven the significantly negative influence of mixed Mhp and PRRS virus infections in piglets. Bacterial organisms are very fastidious and require a specific, enriched media. Cultures grow slowly in primary broth, producing a faint turbidity and an acid colour shift.

PCR technique is recommended for the quick detection of Mhp. This method is expensive, so indirect techniques, such as serological examination are the most popular.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, infection, immunosuppression

Mykoplazmowe zapalenie płuc świń (*Mycoplasma pneumoniae* of swine – MPS), nazywane dawniej enzootyczną bronchopneumonią, grypą prosiąt lub enzootycznym odoskrzelowym zapaleniem płuc (19), jest najczęściej występującą chorobą układu oddechowego świń. Choroba ta jest jednocześnie jedną z najbardziej rozpowszechnionych na świecie. Z obserwacji prowadzonych w wielu krajach wynika, że u 30-80% ubijanych w rzeźniach świń stwierdza się w płucach zmiany typowe dla MPS (23). Badania epizootyczne przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych wykazały, że w 99% ferm zlokalizowanych na obszarze 13 rolniczych stanów USA odchowywane są tuczniaki, które przechorowały MPS (25).

W krajach europejskich sytuacja epizootyczna, dotycząca częstotliwości zakażeń świń *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp), wygląda podobnie, jakkolwiek odsetek występowania MPS w poszczególnych rejonach kontynentu jest bardzo zróżnicowany (20). Analiza wy-

ników badań poubojowych, przeprowadzonych w Hiszpanii wykazała, że w rzeźniach znajdujących się na terenie tego kraju zmiany sekcyjne, charakterystyczne dla MPS, stwierdzano w płucach 38-100% ubijanych świń. W Niemczech ponad 90% ferm zakażonych jest tym drobnoustrojem. W Holandii stopniowo dochodzi do spadku częstotliwości zachorowań na MPS. Badania prowadzone w tym kraju wykazały, że w 1981 r. zmiany typowe dla tej choroby stwierdzano w rzeźniach u 23% poddanych ubojowi zwierząt, podczas gdy w 1990 r. tylko u 5,8%. Podobnie niski odsetek świń zakażonych Mhp występuje na terenie Szwecji. Zmiany w płucach wykrywa się tam poubojowo zaledwie u 10-15% zwierząt. W Finlandii na MPS choruje 8-36% świń. W Polsce, spośród 935 przebadanych próbek krwi 23,1% reagowało dodatnio z antygenem Mhp, natomiast mykoplazmy izolowano z 61% zmienionych zapalnie płuc.

Jako pierwsi przyczynę zachorowań świń z objawami typowymi dla MPS starali się wyjaśnić Hutyra

w 1907 r. i Glässer w 1910 r. (cyt. 21). Zdaniem wymienionych autorów, rozwój choroby zależał od współdziałania wielu niekorzystnych czynników, w tym przede wszystkim nieodpowiednich warunków bytowania zwierząt oraz obecności w środowisku drobnoustrojów warunkowo chorobotwórczych.

Według Shope i Köbego (cyt. 21), czynnikiem etiologicznym choroby były wirusy o charakterze pneumotropowym, a ponieważ stwierdzano ją u większości zwierząt w stadzie, zaproponowano dla niej nazwę: „grypa prosiąt”. W dalszych badaniach udowodniono, że chorobę można przenosić na zdrowe prosięta za pomocą bezbakteryjnego przesączu z płuc, pobranego od chorych zwierząt, w konsekwencji czego schorzenie nazwano „wirusowym zapaleniem płuc” (virus pneumonia of pigs). Zarazek ten został wówczas umieszczony w grupie drobnoustrojów pleuropneumonia like organisms (PPLO) przez Lanneka i Weslena (cyt. 21). W 1962 r. Bakos i Dinter (cyt. 21) zaszeregowali ten drobnoustrój do rodzaju *Mycoplasma*. Dopiero w 1965 r. Maré i Switzer w USA (15) oraz Goodwin w Anglii (8) równocześnie wyizolowali mykoplazmy z zapalnie zmienionych płuc, pochodzących od chorych zwierząt. Ci sami autorzy dokonali także sztucznego zakażenia zdrowych świń wyizolowanym zarazkiem, dzięki czemu spełnili triadę Kocha. Izolatom nadano wówczas różne nazwy: *Mycoplasma suis pneumoniae* w Anglii oraz *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*) w USA. Jako obowiązująca przyjęła się na świecie ta ostatnia nazwa choroby.

Według obowiązującej obecnie systematyki, zgodnie z postanowieniami Podkomitetu Taksonomii *Mycoplasmatales* (1), drobnoustroje *Mhp* zaszeregowane zostały do odrębnej klasy *Mollicutes* (mollis – miękki; cutis – skóra), obejmującej drobnoustroje o miękkiej błonie cytoplazmatycznej i nie posiadające ściany komórkowej, występującej u pozostałych grup bakterii. W ramach klasy *Mollicutes* mieszczą się trzy rzędy: *Mycoplasmatales* (z rodzinami: *Mycoplasmataceae* i *Spiroplasmataceae*), *Acholeplasmatales* (zawierający tylko jedną rodzinę *Acholeplasmataceae*) oraz *Anaeroplasmatales* (obejmujący rodzinę *Anaeroplasmataceae*).

Mykoplazmy należące do rodzin *Mycoplasmataceae* i *Acholeplasmataceae* izoluje się najczęściej od ludzi i zwierząt kręgowych, podczas gdy przedstawiciele rodziny *Spiroplasmataceae* występują jedynie u owadów i roślin. Do rodziny *Anaeroplasmataceae* zaszeregowane zostały mykoplazmy ściśle beztlenowe, które występują w przedżołądkach bydła i owiec.

Klasa *Mollicutes* obejmuje obecnie ponad 120 gatunków mykoplazm (11). Najczęściej drobnoustroje te są saprofitami żyjącymi w organizmach lub środowisku, część z nich jest pasożytami, niektóre są patogenne dla ludzi, zwierząt i roślin. Pomimo wielu badań, zagadnienia dotyczące roli mykoplazm w wywoływaniu chorób u zwierząt i ludzi nie zostały ostatecznie wyjaśnione. Jakkolwiek uważa się, że drobnoustroje te cechują się warunkową chorobotwórczością, to jednak w odniesieniu do pewnej, obecnie znacznej już liczby

gatunków wiadomo, że są one chorobotwórcze i samistnie mogą prowadzić do wystąpienia choroby. Dotyczy to również gatunku *Mhp*.

Mycoplasma hyopneumoniae jest bakterią należącą do najmniejszych spośród znanych dotychczas wolno żyjących i zdolnych do samoreplikacji drobnoustrojów. Mykoplazmy, w odróżnieniu od innych bakterii nie posiadają ściany komórkowej, jednej z podstawowych struktur morfologicznych większości *Procarvotae*. Komórka tych drobnoustrojów zawiera minimalny zestaw organelli, niezbędnych do wzrostu i samodzielnego rozmnażania się: błonę cytoplazmatyczną, rybosomy oraz podwójną spiralę kwasu dezoksyrybonukleinowego. Cytoplazmę mykoplazm otacza pojedyncza, trójwarstwowa błona protoplazmatyczna, do której syntezy potrzebna jest obecność cholesterolu (24). Kolisty i mniejszy o około połowę niż u typowych bakterii genom tych drobnoustrojów posiada niską zawartość guaniny i cytozyny (G + C) w DNA (29).

Brak ściany komórkowej powoduje, że mykoplazmy charakteryzują się dużym polimorfizmem. Nie mają określonego kształtu, mogą natomiast tworzyć struktury ziarenkowate, nitkowate lub rozgałęzione, które często rozpadają się na mniejsze formy o zróżnicowanych kształtach. Wielkość komórek jest różna, od submikroskopowych ziarenek o wymiarach od 0,2 do 0,3 μm , do form wielkości 150 μm . Mykoplazmy nie mają rzęsek, jednak niektóre gatunki posiadają zdolność ruchu pełzającego lub rotacyjnego.

Przesączalność przez pory o bardzo małej średnicy powodowała, że drobnoustroje te przez wiele lat uznawano za wirusy, a duża ich różnorodność była przyczyną wielu trudności w ich klasyfikacji i systematyce. Obecnie wiadomo, że mykoplazmy odróżniają od wirusów zawartość obu kwasów nukleinowych (DNA i RNA), możliwość wzrostu na podłożach bezkomórkowych, naturalnych lub sztucznych, oraz wrażliwość na antybiotyki o szerokim spektrum działania, z równoczesną opornością na antybiotyki hamujące syntezę ściany komórkowej bakterii (13).

Morfologicznie *Mhp* jest komórką okrągłego bądź owalnego kształtu, o średnicy 0,20-0,50 μm , otoczoną pojedynczą, trójwarstwową błoną protoplazmatyczną o grubości około 10 nm. W cytoplazmie komórki występuje materiał genetyczny o charakterze włókienkowym oraz rybosomy (14). Analiza materiału genetycznego omawianych drobnoustrojów przy użyciu enzymów restrykcyjnych oraz elektroforeza w żelu, w odwróconym polu (FIGE – field inversion gel electrophoresis) dowiodła, że podobne fenotypowo szczepy *Mhp* w rzeczywistości są bardzo heterogeniczne (7). Ro i Ross (22), wykorzystując odczyn zahamowania metabolizmu (metabolic-inhibition), wykazali ponadto obecność różnic antygenowych pomiędzy poszczególnymi szczepami *Mhp*, wyizolowanymi z terenowych przypadków choroby, natomiast Freeman i wsp. (6) przy pomocy testu ELISA stwierdzili znaczne serologiczne krzyżowe pokrewieństwo, występujące między antygenami *Mhp* i *M. flocculare*. Wspomniane różnice anty-

genowe mogą być przyczyną zróżnicowanej efektywności immunoprofilaktyki.

Badania prowadzone na poziomie molekularnym wykazały, że na powierzchni błony cytoplazmatycznej *Mhp* znajdują się komponenty o charakterze lipoprotein, m.in. białka: p65, p50 i p44 (12, 30). Przy użyciu poliklonalnych (Pab) i monoklonalnych (Mab) przeciwciał mysich anti-p65 dowiedziono, że powierzchniowa lipoproteina p65 jest głównym antygenem rozpoznawanym przez układ immunologiczny makroorganizmu w trakcie zakażenia i w przebiegu choroby wywołanej tym drobnoustrojem. Wykazano równocześnie, że przy użyciu przeciwciał uzyskanych od świń eksperymentalnie zakażonych *Mhp* wykrywano głównie wymienioną lipoproteinę (12).

Jakkolwiek czynniki decydujące o zjadliwości *Mhp* nie zostały dotychczas ostatecznie zdefiniowane, wiadomo, że wstępnym i jednocześnie niezbędnym warunkiem zakażenia jest zdolność adhezji omawianych drobnoustrojów do komórek gospodarza. *Mycoplasma hyopneumoniae*, po dostaniu się do wrażliwego na infekcję organizmu kolonizuje powierzchnię nabłonka rzęskowego w tchawicy, oskrzelach i oskrzelikach świń, przy czym nie wnika do wnętrza komórek, ale lokalizuje się głównie na wierzchołku rzęsek oraz w przestrzeniach międzrzęskowych (10). Wydaje się, że istotną rolę w tym procesie odgrywają włóknikowe struktury otoczkowe, znajdujące się na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej mykoplazm, które umożliwiają mocne i precyzyjne przyleganie zarazka do komórek nabłonka oddechowego (26, 27). Doświadczenia przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo*, z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazały, że *Mhp* może przylegać tylko do komórek urzęsionych, nie stwierdzono natomiast obecności zarazka w nieurzęsionych miejscach układu oddechowego (16, 33). Wyniki te sugerują, że rzęski nabłonka układu oddechowego posiadają swoiste dla *Mhp* receptory, które umożliwiają adhezję zarazka jedynie na ich powierzchni. Zhang i wsp. (31) analizując opisany mechanizm stwierdzili, że receptory te mają charakter glikolipidowy, a poprzez zastosowanie odczynu chromatografii cienkowarstwowej do badania ekstraktu z rzęsek nabłonka oddechowego świń naturalnie zakażonych *Mhp* wykazali, że istnieją trzy, różniące się między sobą rodzaje receptorów, które oznaczono jako La, Lb i Lc.

Dalsze badania, prowadzone w warunkach *in vitro*, pozwoliły na dokładniejszą charakterystykę procesu adhezji zarazka do urzęsionych komórek nabłonka oraz umożliwiły identyfikację kolejnych czynników decydujących o patogenności mykoplazm. Wykazano, że wśród protein występujących na powierzchni błony cytoplazmatycznej *Mhp* znajdują się struktury spełniające rolę adhezyn, pozwalających na swoiste wiązanie się zarazka z glikolipidowymi receptorami tkanki nabłonkowej (4, 9, 32). Szczególną rolę w tym zakresie przypisuje się adhezynie oznaczonej jako P97, która zdaniem Zhanga i wsp. (31) znajduje się w obrębie zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej patogennych

szczepów *Mhp*. Jak wskazują wyniki badań wymienionego autora, w obrębie adhezyn powierzchniowych dochodzi do znacznych zmian antygenowych, co prawdopodobnie osłabia aktywność systemu immunologicznego, zwiększając tym samym możliwość utrzymywania się mykoplazm w organizmie gospodarza.

Wykazano, że w miejscach przylegania omawiane drobnoustroje utrzymują się przez szereg tygodni, prowadząc do zmian patologicznych zaburzających normalne funkcjonowanie nabłonka błony śluzowej układu oddechowego. Oblepione przez *Mhp* rzęski początkowo ulegają sklejeniu, a następnie dochodzi do ich obumierania i zaniku. Mechanizm powstawania destrukcyjnych zmian w rzęskach nie został dotychczas wyjaśniony. Przypuszcza się, że do wywołania efektu toksycznego w komórce gospodarza niezbędny jest bezpośredni kontakt *Mhp* z powierzchnią urzęsionych komórek nabłonka, co prowadzi do uwolnienia białek o charakterze cytotoksycznym oraz innych szkodliwych związków, takich jak nadtlenek wodoru, które działają destrukcyjnie na rzęski oraz komórki nabłonka. W efekcie dochodzi do całkowitego zaniku rzęsek, zmniejsza się przeciwbakteryjne oddziaływanie śluzu, a uszkodzony nabłonek stopniowo ulega złuszczeniu (10). Dzięki temu mykoplazmy mogą przenikać do dolnych części układu oddechowego, przez co proces chorobowy przenosi się na oskrzeliki i pęcherzyki płucne. Konsekwencją tego jest rozwój odoskrzelowego nieżyłowego zapalenia płuc. Powstawanie kleistej wydzieliny w drogach oddechowych tłumaczone jest redukcją aktywności rzęsek, hipersekrecją oraz zaburzeniami w produkcji glikoprotein przez komórki kubkowe nabłonka (5). W wyniku zniszczenia komórek nabłonka błony śluzowej układu oddechowego mykoplazmy i ich antygeny dostają się do krwi, gdzie blokują funkcje makrofagów i specyficzne różnicowanie się limfocytów, a następnie wpływają na intensywną infiltrację tkanek układu oddechowego przez te komórki. Wykazano, że mitogeny znajdujące się w błonie cytoplazmatycznej zarazka powodują masyną hiperplazję tkanki limfatycznej zlokalizowanej wzdłuż dróg oddechowych oraz wokół naczyń krwionośnych (18). Obrzęk tkanki chłonnej prowadzi w konsekwencji do obliteracji światła oskrzelików, co jest przyczyną zapadania się pęcherzyków płucnych (17).

Warto podkreślić, że w wyniku infekcji *Mhp* dochodzi do istotnej z patogenetycznego punktu widzenia immunosupresji, związanej ze spadkiem wydajności limfocytów w zakresie produkcji przeciwciał (20). Na skutek zahamowania zdolności fagocytarnej makrofagów ma również miejsce osłabienie reaktywności systemu swoistej odpowiedzi komórkowej (2, 3). Efekt supresyjny widoczny jest bardzo wyraźnie w początkowym etapie infekcji. Należy zaznaczyć, że niski poziom odporności humoralnej i komórkowej obserwuje się przez wiele tygodni po zakażeniu. Następstwem zablokowania mechanizmów odpornościowych są nawracające zachorowania świń z objawami ze strony układu oddechowego, których przyczyną są z reguły

infekcje mieszane. Thacker i Thacker (28) wykazali, że szczególnie niekorzystne oddziaływanie na układ odpornościowy mają mieszane infekcje prosiąt *Mhp* i wirusem zespołu rozrodczo-oddechowego. W związku z intensywnym rozprzestrzenieniem się zakażeń obu wymienionymi drobnoustrojami, choroby układu oddechowego świń stały się głównym problemem ekonomicznym w chowie świń.

Hodowla *Mhp* na pożywkach sztucznych jest bardzo trudna i czasochłonna. *Mycoplasma hyopneumoniae* potrzebuje do wzrostu dodatku cholesterolu oraz glukozy, natomiast nie hydrolizuje ureazy i argininy. Z uwagi na swoiste wymagania wzrostowe, do izolacji *Mhp* niezbędne są specyficzne, wzbogacone odpowiednimi dodatkami, podłoża mikrobiologiczne. W hodowli bulionowej *Mhp* rośnie powoli, prowadząc do nieznacznej zmętnienia i zmiany barwy pożywki po 4-15 dniach. Izolacja zarazka na selektywnych podłożach stałych wymaga inkubacji w atmosferze z 8% dodatkiem CO₂ (14). Po około 2-3 dniach powstają ledwo dostrzegalne kolonie o średnicy około 0,5 mm. Z uwagi na fakt, że hodowla mykoplazm jest stosunkowo trudna, a czas niezbędny do izolacji i identyfikacji zarazka wynosi kilka tygodni, zazwyczaj nie wykorzystuje się tej metody do rutynowych badań diagnostycznych. Ponadto, w trakcie analiz mikrobiologicznych, często obserwuje się wzrost innych, rozpowszechnionych w środowisku i bytujących w płucach świń mykoplazm, takich jak *M. hyorhinitis* czy *M. flocculare*, które charakteryzują się zbliżonymi do *Mhp* cechami wzrostu. Istnieje również wiele podobieństw, zarówno antygenowych, jak i morfologicznych między *Mhp* a *M. flocculare*, co stanowi duży stopień utrudnienia w zakresie właściwej identyfikacji zarazka.

Mycoplasma hyopneumoniae jest drobnoustrojem trudnym do izolacji i identyfikacji, dlatego też bardzo często, mimo istotnego udziału tych bakterii w procesie chorobowym, w toku konwencjonalnych badań laboratoryjnych drobnoustroje te nie są identyfikowane. Z tego, między innymi, powodu lekarzom weterynarii niejednokrotnie brakuje laboratoryjnego potwierdzenia klinicznego i sekcijnego podejrzenia choroby w stadzie. Metodą umożliwiającą szybkie, oraz jednoznaczne wykrycie obecności *Mhp* w populacji świń jest aktualnie technika PCR, którą stosuje się w Polsce wyłącznie w Zakładzie Chorób Świń PIWet w Puławach.

Biorąc pod uwagę koszty tej metody, uzasadnione jest wykorzystywanie w rozpoznawaniu MPS innych, w tym pośrednich metod wykrywania *Mhp* w stadzie. Najpopularniejszą z nich jest badanie serologiczne w kierunku obecności przeciwciał dla *Mhp*.

Piśmiennictwo

1. Anon.: International Committee On Systematic Bacteriology, Subcommittee On The Taxonomy Of Mollicutes. Proposal for minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes. Int. J. Syst. Bacteriol. 1979, 29, 172-180.
2. Asai T., Okada M., Yokomizo Y., Sato S., Mori Y.: Suppressive effect of bronchoalveolar lavage fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. Vet. Immunol. Immunopathol. 1996, 51, 325-331.
3. Caruso J. P., Ross R. F.: Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus* (*Haemophilus*) pleuropneumoniae infections on alveolar macrophage functions in swine. Am. J. Vet. Res. 1990, 51, 227-231.

4. Chen J. R., Lin J. H., Weng C. N., Lai S. S.: Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 1998, 62, 97-110.
5. Debey M. C., Jacobson C. D., Ross R. F.: Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 1992, 53, 1705-1710.
6. Freeman M. J., Armstrong C. H., Sands-Freeman L. L., Lopez-Osuna M.: Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinitis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. Can. J. Comp. Med. 1984, 48, 202-207.
7. Frey J., Heldmann A., Nicolet J.: Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992, 42, 275-280.
8. Goodwin R. F. W., Pomeroy A. P., Whittlestone P.: Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. Vet. Rec. 1965, 77, 1247-1249.
9. Hsu T., Minton F. C.: Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Infect. Immun. 1998, 66, 4762-4766.
10. Jacques M., Blanchard B., Foiry B., Girard C., Kobisch M.: In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Ann. Rech. Vét. 1992, 23, 239-247.
11. Kahane I., Adoni A.: Rapid diagnosis of Mycoplasmas. Plenum Press, New York and London 1993.
12. Kim M. F., Heidari M. B., Stull S. J., McIntosh M. A., Wise K. S.: Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. Infect. Immun. 1990, 58, 2637-2643.
13. Kobisch M., Friis N. F.: Swine mycoplasmoses. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1996, 15, 1569-1605.
14. Kobisch M.: Les Mycoplasmoses respiratoires du porc. Rec. Méd. Vét. 1987, 163, 419-430.
15. Mare C. J., Switzer W. P.: New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. Vet. Med. 1965, 60, 841-846.
16. Mebus C. A., Underdahl N. R.: Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 1977, 38, 1249-1254.
17. Messier S., Ross R. F.: Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 1990, 51, 52-58.
18. Messier S., Ross R. F.: Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. Am. J. Vet. Sci. 1991, 52, 1497-1502.
19. Pejsak Z., Tarasiuk K., Markovska I., Bednarek D., Włodarczyk B.: Cellular immunity in pigs, vaccinated against mycoplasmal pneumonia. Proc. 9th Intern. Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Ames, Iowa 1992, s. 121.
20. Pejsak Z.: Nowe dane nt. mykoplazmowego zapalenia płuc u świń. Medycyna Wet. 1991, 47, 536-539.
21. Piłaszek J.: Właściwości antygenowe i toksyczne kilku gatunków *Mycoplasma* wyobsonionych od świń. Praca dokt., Puławy 1972.
22. Ro L. H., Ross R. F.: Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods. Am. J. Vet. Res. 1983, 44, 2087-2094.
23. Ross R. F., Young T. F.: The nature detection of mycoplasmal immunogens. Vet. Microbiol. 1993, 37, 369-380.
24. Smith P. F.: The biology of mycoplasmas. Department of Microbiology University of South Dakota, Vermillion Academic Press, Inc. 1971.
25. Straw B. E., Tuovinen V. K., Bigras-Poulin M.: Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1989, 195, 1702-1706.
26. Tajima M., Yagihashi T., Nunoya T.: Ultrastructure of mycoplasmal capsules as revealed by stabilization with antiserum and staining with ruthenium red. Jpn. J. Vet. Sci. 1985, 47, 217-223.
27. Tajima M., Yagihashi T.: Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. Infect. Immun. 1982, 37, 1162-1169.
28. Thacker E. L., Thacker B. J., Young T. F., Halbur P. G.: Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vaccine 2000, 18, 1244-1252.
29. Tully J. G., Bové J. M., Laigret F., Whitcomb R. F.: Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993, 43, 378-385.
30. Wise K. S., Kim M. F.: Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. J. Bacteriol. 1987, 169, 5546-5555.
31. Zhang Q., Young T. F., Ross R. F.: Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. Infect. Immun. 1994, 62, 4367-4373.
32. Zhang Q., Young T. F., Ross R. F.: Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect. Immun. 1995, 63, 1013-1019.
33. Zielinski G. C., Ross R. F.: Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am. J. Vet. Res. 1993, 54, 1262-1269.