

Rozpoznawanie mykoplazmowego zapalenia płuc u świń

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*

Summary

Mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) is one of the most common respiratory diseases in swine. The 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 the other bacteria from the *Mycoplasma* family it has no cellular wall, which contributes to the considerable polymorphism of the bacteria.

The Mollicutes class contains over 120 *Mycoplasma* species. Some species are pathogenic for plants, vertebrates and insects. Because the bacteria are able to pass through membrane filters of a very small pore diameter, for many years it has been described as a virus. In contrast to viruses, *Mycoplasma* contains both DNA and RNA, is able to grow in a cell-free medium and is sensitive to a wide spectrum of antibiotics.

Molecular studies have revealed that lipoprotein components like p65, p50 and p44 proteins are located on the surface of the cytoplasmic membrane. Using polyclonal and monoclonal mice antibodies, p65 lipoprotein was determined to be the major antigen recognised by the immune system of the macroorganism during infection.

The attachment of Mhp to the host cells is a prerequisite for infection. The early stage of infection is the colonisation of the surface of the trachea, bronchi and bronchioles. Mhp does not get inside the cells, but is localised on the top of cilia.

Among the proteins on the Mhp cytoplasmic membrane there are structures carrying out the role of adhesins that provide specific binding with the epithelial tissue receptors. The most important adhesin is thought to be P97.

Infected airways evidence ciliary and epithelial cell damage and the antibacterial mucus activity is reduced. The consequence of such a state is catarrhal bronchopneumonia.

During Mhp infection significant immunosuppression is present. The specific cellular immunoresponce is reduced, which contributes to chronic multifactorial respiratory tract infections. Thacker and Thacker proved the significantly negative influence of mixed Mhp and PRRS virus infections in piglets on the immune system.

The organism is very fastidious and requires specific enriched media. In primary broth cultures it grows slowly, producing a faint turbidity and an acid color shift.

PCR technique is recommended for the quick detection of Mhp. This method is expensive so indirect technique like serological examinations are the most popular.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, infection, immunosuppression

Mykoplazmowe zapalenie płuc (Mycoplasmal pneumonia of swine – MPS) jest od wielu lat najczęstszą chorobą układu oddechowego świń. W okresie ostatnich kilku lat obserwuje się nasilenie tego schorzenia, co związane jest, między innymi, z rozprzestrzenieniem się mającego właściwości immunosupresyjne wirusa zespołu rozrodczo-oddechowego świń (porcine respiratory reproductive syndrome virus – PRRSV). Do infekcji prosiąt dochodzi zazwyczaj na porodówce, gdzie oseski zakażają się od loch, z których część wykazuje niski poziom odporności i sieje dużą liczbę mykoplazm do środowiska. Rozprzestrzenianie się MPS w populacji świń jest powolne, przy czym liczba zwierząt zakażonych jest zmienna i waha się w granicach od 30% do 80%. *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) – czynnik etiologiczny MPS, łatwo przenosi się z obiektów zakażonych do wolnych, znajdujących się w pobliżu. Rozprzestrzenianie się zarazka drogą kro-

pelkową na większe odległości uzależnione jest w dużym stopniu od warunków atmosferycznych (8).

Diagnostyka MPS oparta jest na badaniu klinicznym i sekcyjnym oraz badaniach laboratoryjnych (badania serologiczne techniką ELISA, odczynem wiązania dopełniacza OWD, testem pośredniej hemaglutynacji HI oraz odczynem dyfuzji immunoradialnej RID), badaniu histopatologicznym, izolacji Mhp na podłożach sztucznych; wykrywaniu antygeny Mhp metodą immunofluorescencji bezpośredniej i pośredniej oraz wykrywaniu materiału genetycznego Mhp metodą jednoetapowej reakcji polimeryzacji łańcuchowej DNA (PCR) lub techniką nested PCR (z użyciem dwóch par starterów).

Celem niniejszej publikacji jest omówienie przydatności poszczególnych metod oraz warunków ich wykonania.

Rozpoznawanie przyżyciowe

Badanie kliniczne. Objawy kliniczne w przebiegu MPS są mało swoiste i uwidaczniają się zazwyczaj między 12. a 20. tygodniem życia.

Pierwszym symptomem choroby, pojawiającym się po dość długim okresie inkubacji (10-16 dni) jest kaszel, początkowo suchy, a następnie wilgotny.

Zachorowalność w przebiegu MPS jest duża, a śmiertelność rośnie w miarę dołączania się kolejnych czynników patogennych. Zwierzęta, które przestają rosnąć, charłaczają, skóra jest blada, a sierść staje się matowa i nastroszona (ryc. 1). Kliniczna diagnostyka MPS opiera się przede wszystkim na ocenie stanu zdrowotnego całego stada świń, a nie na indywidualnym badaniu pojedynczych zwierząt.

Badania serologiczne. W przyżyciowej diagnostyce omawianej choroby można stosować następujące odczyny serologiczne: ELISA (3, 16), OWD (3), HI (16), RID (3). Jak wskazują wyniki badań Bereitera i wsp. (6) najwcześniej, tj. dwa tygodnie po zakażeniu, przeciwciała dla *Mhp* wykrywane są przy pomocy odczynu OWD, po trzech tygodniach testem ELISA, natomiast dopiero po 5 tygodniach odczynem RID. Ci sami autorzy wykazali ponadto, że u świń zakażonych eksperymentalnie *Mhp*, przeciwciała stwierdzone były w surowicy odczynami ELISA i RID przez 12 miesięcy, a przy pomocy OWD tylko przez około 5 miesięcy po zakażeniu. Według Armstronga i wsp. badanie surowicy świń OWD w późniejszej fazie zakażenia niejednokrotnie daje wyniki ujemne. Odczyn hemaglutynacji pośredniej również pozwala wykryć przeciwciała jedynie we wczesnej fazie zakażenia, co wynika z większego udziału immunoglobulin klasy IgM w odczynie. Jakkolwiek test ten daje względnie zadowalające wyniki w późniejszych fazach zakażenia, to jednak jest on niewygodny i mało praktyczny w użyciu, w związku z czym nie nadaje się do zastosowania na szerzą skalę.

W diagnostyce MPS najczęściej wykorzystywana jest technika ELISA, umożliwiająca określanie poziomu przeciwciał w surowicy krwi (3, 13) i w siarze pobranej od loch. Należy jednak zaznaczyć, że czas pojawiania się przeciwciał po zakażeniu i moment ich wykrywania zależy od odporności stada, dawki zakaźnej zarazki, czynników środowiskowych, a także od sposobu pobrania próbek. Jeśli dawka zakaźna jest niewielka, czas niezbędny do wytworzenia wykrywalnego badaniem poziomu immunoglobulin jest stosunkowo długi – sięgający kilku tygodni. Po zakażeniu doświadczalnym przeciwciała stwierdzano u świń po upływie dwóch tygodni, szczyt natomiast przypadał dopiero na 8. i 9. tydzień. Należy podkreślić, że serokonwersję rejestruje się zazwyczaj około dziewiątego dnia po wystąpieniu objawów kaszlu.

Do rozpoznawania zakażeń powodowanych przez mykoplazmy opracowano dotychczas wiele różnych zestawów ELISA. Ponieważ prawidłową interpretację wyników niejednokrotnie utrudnia występowanie reakcji krzyżowych z *M. flocculare* i *M. hyorhinis*, wydaje się, że wykorzystanie w teście ELISA przeciwciał monoklonalnych w istotny sposób ogranicza reakcje krzyżowe, podnosząc tym samym swoistość i czułość metody. W diag-



Ryc. 1. Warchlaki dotknięte chroniczną postacią mykoplazmowego zapalenia płuc

nostyce MPS najczęściej stosuje się przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko wysoce immunogennym proteinom powierzchniowym *Mhp*, głównie P74 kDa (6) oraz P40 kDa (11). Wykazano, że wykorzystanie wymienionych immunoglobulin w teście blocking ELISA znajduje szczególne zastosowanie w przypadku występowania reakcji wątpliwych w innych testach serologicznych (12).

Pomimo wysokiej czułości i swoistości techniki ELISA, wykorzystanie jej w rozpoznawaniu MPS jest z wielu względów ograniczone. Badaniem serologicznym można wykryć jedynie obecność lub brak serokonwersji, co nie zawsze jest równoznaczne z wystąpieniem choroby w stadzie. Komercyjne testy serologiczne w zasadzie nie nadają się do indywidualnej oceny statusu immunologicznego pojedynczych zwierząt, dlatego rutynowo wykorzystywane są zazwyczaj do wykonywania badań przeglądowych w stadach świń lub do sprawdzenia skuteczności zastosowanej szczepionki, poprzez określenie czasu utrzymywania się odporności poszczepiennej.

Prowadząc badania serologiczne należy pamiętać o wspomnianym uprzednio fakcie późnego pojawiania się przeciwciał, ale także i o tym, że u niektórych osobników mimo zakażenia czy szczepienia przeciwciała humoralne nie wiadomo dlaczego nie pojawiają się wcale, lub są wykrywane niezwykle późno.

Sheldrake i wsp. (13) badając dynamikę pojawiania się przeciwciał dla *Mhp* w wyniku doświadczalnego zakażenia świń omawianym drobnoustrojem wykazali, że swoiste immunoglobuliny, wykrywane testem ELISA, pojawiają się u części zwierząt między 7. a 9. dniem życia, natomiast u innych dopiero po 30 dniach od zakażenia. Badania serologiczne prowadzone w fermie, gdzie MPS występowało stacjonarnie od wielu lat, dowiodły z kolei, że u 36,4% świń przeciwciała pojawiły się dopiero po 12. tygodniu życia, a u 96,3% osobników nawet między 115. a 144. dniem życia (13).

Biorąc pod uwagę wyraźnie zróżnicowany czas utrzymywania się odporności biernej do badań serologicznych – techniką ELISA – nie powinno się pobierać próbek od prosiąt, których wiek nie przekroczył 10 tygodni. Wskazują na to między innymi wyniki badań Morrisa i wsp., którzy wykazali, że u prosiąt z początkową ilością przeciwciał sklasyfikowaną na wysokim, średnim i niskim

poziomie immunoglobuliny matczyne zanikają odpowiednio w 63., 45., i 30. dniu.

Niektórzy autorzy uważają ponadto, że do badań serologicznych w kierunku zakażeń *Mhp* zdecydowanie lepszym od surowicy materiałem biologicznym jest siara (10). Zimmerman i wsp. badając testem ELISA siarę loch ze stada, w którym stwierdzano chroniczną postać MPS, obecność swoistych przeciwciał wykazali w 16% próbek, natomiast w siarze pochodzącej od samic ze stada z ostrą postacią choroby w 71%. W surowicach pobranych od tych samych zwierząt odsetek wyników dodatnich kształtował się odpowiednio na poziomie 7% i 55%.

Rozpoznawanie pośmiertne

Diagnostyka sekcyjna. Zmiany anatomopatologiczne u świń padłych z powodu MPS ograniczają się zazwyczaj do narządów jamy klatki piersiowej i zależą od postaci choroby. We wczesnej i środkowej fazie infekcji widoczne są ogniska nieżyłowego zapalenia płuc, umiejscowione po wewnętrznej stronie doczaszkowych płatów płuc i płata środkowego, w płacie dodatkowym oraz po stronie zewnętrznej płatów doogonowych (ryc. 2 i 3). Obserwuje się także powiększenie węzłów chłonnych śródpiersiowych i tchawicz-oskrzelowych.

Zmiany w płucach rozwinięte są w maksymalnym stopniu w dwa do czterech tygodni po zakażeniu. Jeśli nie dochodzi do reinfekcji lub zakażeń wtórnych, zmiany makroskopowe utrzymują się do 10 tygodni po zakażeniu.

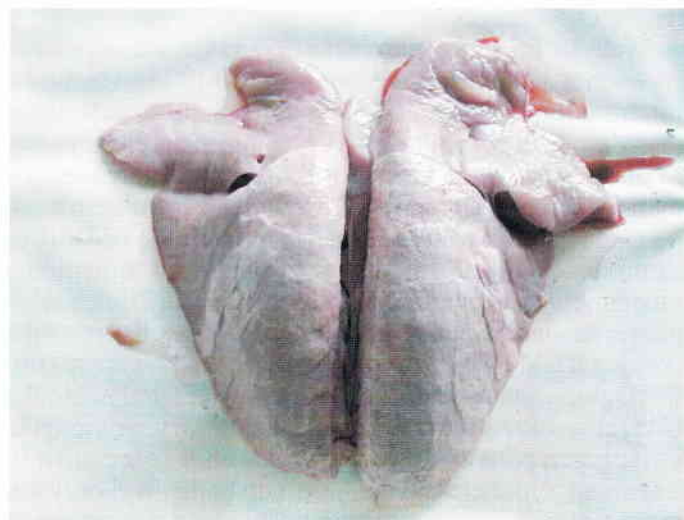
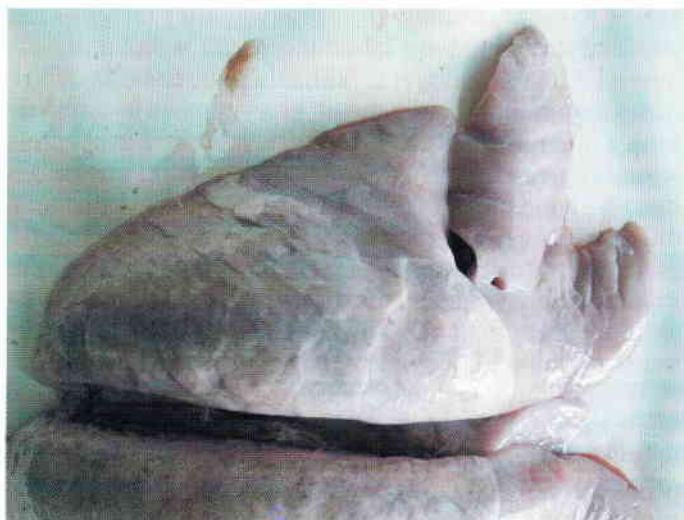
Badanie sekcyjne umożliwia oszacowanie strat ekonomicznych wynikających z zakażenia *Mhp* za pomocą tzw. metody punktowej (scoring technique), służącej do określonej poubojowo ilościowej oceny zmian patologicznych w płucach. Celem tego badania jest prezentacja rzeczywistych strat ekonomicznych, manifestujących się zmianami w płucach podlegających wybrakowaniu. Wydaje się jednak, że techniki uwzględniające trójwymiarowy charakter zmian w płucach, takie jak pomiary objętościowe czy też oznaczanie masy zapalnie zmienionej tkanki, są zdecydowanie bardziej precyzyjne niż metody umożliwiające określenie wielkości zmian jedynie na powierzchni płuc. Należy podkreślić, że posługiwanie się wyłącznie metodami punktowymi w szacowaniu strat

ekonomicznych spowodowanych MPS zdecydowanie zaniża rzeczywiste koszty ponoszone przez hodowców z powodu tej choroby. Przydatność tej metody można kwestionować między innymi dlatego, że nie uwzględnia ona strat związanych ze śmiertelnością zwierząt zainfekowanych *Mhp*, a także strat wynikających z wczesnego zakażenia zwierząt i zaniku zmian w płucach przed osiągnięciem wagi rzeźnej. W tych przypadkach zmiany obserwowane poubojowo są niewielkie lub nie odpowiadające stanom zapalnym, toczącym się w okresie wzrostu zwierząt (14). Stwierdzenia powyższe zostały potwierdzone przez Sitjara i wsp. (15), którzy badając zwierzęta charakteryzujące się serokonwersją w stosunku do *Mhp* w okresie przed odsadzeniem, w rzeźni obserwowali niewielkie zmiany lub wręcz brak zmian uznawanych za charakterystyczne dla MPS, podczas gdy zwierzęta reagujące pozytywnie w badaniach testem ELISA w późniejszym okresie (wczesny tucz) wykazywały zdecydowane i obszerne zmiany w tkance płucnej.

Z uwagi na bardzo charakterystyczne zmiany makroskopowe, rozwijające się w wyniku zakażenia *Mhp*, badania te mają dużą wartość diagnostyczną, nie mogą jednak stanowić o ostatecznym rozpoznaniu choroby.

Badanie histopatologiczne. W obrazie mikroskopowym zmienionej tkanki płucnej widoczne jest zniszczenie rzęsek, złuszczenie komórek nabłonka rzęskowego i niewielkiego stopnia nagromadzenie neutrofilii, w świetle oraz wokół dróg doprowadzających powietrze do płuc. W dalszym przebiegu choroby pojawia się okołoskrzelowy, okołoskrzelikowy i okołonaczyniowy naciek limfocytarny. Jakkolwiek charakterystyczny obraz kliniczny oraz sekcyjny czy też stwierdzenie nieżyłowego zapalenia przednich odcinków płatów doczaszkowych i sercowych płuc mogą wskazywać na MPS, podstawą ostatecznego rozpoznania jest wykazanie obecności *Mhp* w tkance płucnej.

Izolacja *Mhp* na podłożach sztucznych. Najpewniejszym, ale jednocześnie najtrudniejszym i najbardziej czasochłonnym sposobem potwierdzenia występowania *Mhp* w populacji świń jest wykazanie obecności tych drobnoustrojów w tkance płucnej zwierząt ubitych diagnostycznie lub padłych z objawami klinicznymi MPS.



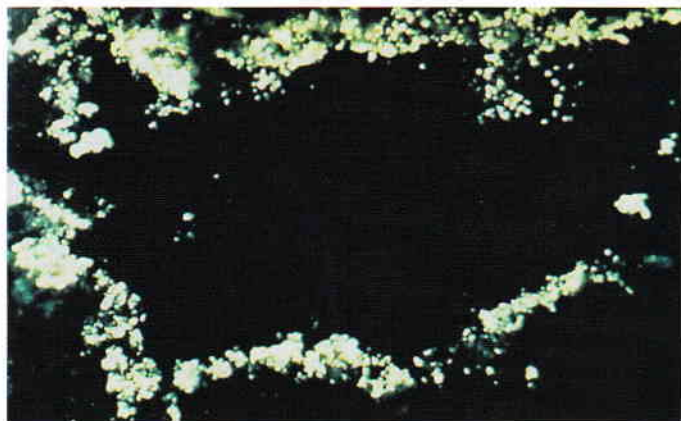
Ryc. 2 i 3. Charakterystyczne zmiany zapalne w przednich płatach płuc



Ryc. 4. Kolonie *Mycoplasma hyopneumoniae* po 10 dniach inkubacji na podłożu stałym Veterinary Mycoplasma Medium Solid (Anglia), widziane pod mikroskopem przy powiększeniu 50-krotnym

Mycoplasma hyopneumoniae potrzebuje do wzrostu dodatku cholesterolu oraz glukozy, natomiast nie hydrolyzuje 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 nieznacznego zmętnienia i zmiany barwy pożywki po 4-15 dniach. Izolacja zarazka na selektywnych podłożach stałych wymaga inkubacji w atmosferze z 8% dodatkiem CO_2 . Po około 2-3 dniach powstają ledwo dostrzegalne kolonie o średnicy około 0,5 mm (ryc. 4). Ze względu na długi czas niezbędny do izolacji i identyfikacji zarazka (kilka tygodni), zazwyczaj nie wykorzystuje się tej metody do rutynowych badań diagnostycznych. Dodatkowo, w trakcie analiz mikrobiologicznych często obserwuje się wzrost innych, rozpowszechnionych w środowisku i bytujących w płucach świń mykoplazm, jak *M. hyorhinae* czy *M. flocculare*, o zbliżonych do *Mhp* cechach wzrostu. Istnieje również wiele podobieństw, zarówno antygenowych, jak i morfologicznych między *Mhp* i *M. flocculare*, co stanowi dużego stopnia utrudnienie w zakresie właściwej identyfikacji zarazka. Obecnie w Polsce tylko Państwowy Instytut Weterynaryjny dysponuje odpowiednimi podłożami do hodowli mykoplazm i podejmuje się izolacji tych drobnoustrojów z materiału chorobowego.

Metoda immunofluorescencyjna. Często wykorzystywana w laboratoryjnej diagnostyce MPS jest technika immunofluorescencji (IF) pośredniej lub bezpośredniej (7). Metoda ta pozwala na wykrywanie antygenów *in situ* i polega na stwierdzeniu w mikroskopie fluorescencyjnym reakcji przeciwciał znakowanych barwnikiem z odpowiadającym im antygenem. Materiałem do badania są zamrożone wycinki, pobrane z pogranicza zmienionej i niezmienionej zapalnie tkanki płucnej, na które nakrapla się zawiesinę przeciwciał sprzężonych z fluoresceiną (konjugat). Mykoplazmy związane ze znakowanymi immunoglobulinami widoczne są na powierzchni nabłonka oskrzeli i oskrzelików w postaci zielono wybarwionych, świecących punktów (ryc. 5). Wykazano, że technika IF jest szczególnie efektywna, jeżeli do badań wykorzystuje się materiał świeży, pobrany od zwierząt w pierwszym okresie choroby, wtedy gdy w oskrzelach znajduje się



Ryc. 5. Obraz immunofluorescencyjny wycinka tkanki płucnej. Na błonie śluzowej oskrzelika widoczne charakterystyczne świecenie antygenów *Mycoplasma hyopneumoniae*

duża liczba poszukiwanych drobnoustrojów. Wraz z upływem czasu oraz w przypadkach chronicznych choroby, kiedy liczba mykoplazm w drogach oddechowych ulega ograniczeniu lub występuje efekt blokowania zarazka przez przeciwciała makroorganizmu, wynik IF może być fałszywie ujemny. Przy stosowaniu tej metody w diagnostyce MPS, należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych z innymi czynnikami zakaźnymi. Wykazano, że do uzyskania dodatniego wyniku w technice IF niezbędna jest obecność 10^4 komórek mykoplazm w jednym gramie badanej tkanki płucnej. Według Maesa i wsp. stwierdzenie w badaniu IF obecności *Mhp* na nabłonku oskrzeli i oskrzelików jest skorelowane z wynikami uzyskiwanymi przy wykorzystaniu pozostałych metod diagnostycznych. Warto zauważyć, że technika immunofluorescencyjna, udoskonalona poprzez różne modyfikacje jest w wielu ośrodkach, rutynową metodą wykrywania u świń zakażeń na tle *Mhp*.

Metoda polimeryzacji łańcuchowej DNA. Technika ta jest obecnie jedną z podstawowych metod badawczych, umożliwiających szybką diagnostykę drobnoustrojów chorobotwórczych i schorzeń trudnych do rozpoznania przy użyciu metod konwencjonalnych.

Czułość i szybkość wykonania PCR sprawia, że jest to metoda coraz chętniej wykorzystywana również w zakresie rozpoznawania MPS. Przewaga tej techniki nad pozostałymi metodami laboratoryjnymi wynika między innymi z faktu, że do jej wykonania potrzeba niewielkiej ilości materiału biologicznego, którym może być zeszkrobina z nabłonka oddechowego, wydzielina z oskrzeli, wymaz z nosa lub wycinek płuca. Na wyniki prowadzonego badania nie ma istotnego wpływu ewentualna terapia antybiotykowa ani czas, jaki upłynął od zakażenia zwierzęcia do momentu przesłania próbki do badania. Praktycznie wykluczona jest możliwość wystąpienia reakcji niespecyficznych lub krzyżowych z innymi drobnoustrojami wnikającymi proces chorobowy.

W oparciu o technikę PCR opracowano dotychczas wiele metod (1, 2), które znalazły zastosowanie zarówno w wykrywaniu *Mhp* w materiale klinicznym (4), jak i w próbkach powietrza. Specyficzność techniki PCR uwarunkowana jest przede wszystkim właściwym doбором starterów niezbędnych do reakcji syntezy DNA. Sekwen-

cja starterów kierujących reakcją syntezy DNA musi charakteryzować się wysoką konserwatywnością i unikalnością; w przypadku braku homologii między sekwencją matrycy a startera istnieje ryzyko otrzymania wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych. Warto również pamiętać, że wysoka czułość techniki PCR w niektórych sytuacjach może okazać się poważną wadą. Nawet minimalne zanieczyszczenia badanego materiału *Mhp* mogą być powielone, przez co wydaje się, że są obecne w próbkach w znacznych ilościach. Wykorzystanie bardziej czulej metody nested PCR niesie ze sobą ponadto wzrost prawdopodobieństwa zanieczyszczenia laboratorium i odczynników produktami pierwszego etapu amplifikacji i w następstwie otrzymania reakcji fałszywie dodatnich.

W przypadku drobnoustrojów z rodzaju *Mycoplasma* amplifikacji poddaje się najczęściej fragment genu 16S rRNA, który jest wysoce konserwatywnym rejonem genomowego DNA *Mhp* (17). Z danych piśmiennictwa wynika, że w ostatnich latach projektowane są również startery komplementarne do genów kodujących immunogenne białka, zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej mykoplazm. Według Caron i wsp. (6) determinanty antygenowe, jakimi są białka p36 oraz p46, przedstawiają wysoce konserwatywne i, co bardzo istotne, gatunkowo specyficzne dla *Mhp*, fragmenty DNA. Badania przeprowadzone przez wymienionych autorów wykazały, że wykorzystanie w reakcji PCR starterów zaprojektowanych dla wymienionych genów, umożliwiło wykrycie produktów amplifikacji jedynie w próbkach DNA pochodzących ze szczepów *Mhp*, co wskazuje na wysoką swoistość gatunkową omawianych par starterów.

Verdin i wsp. (5) przedstawili wyniki badań potwierdzających przydatność techniki PCR do wykrywania DNA *Mhp* w warunkach terenowych. Badaniu poddano 43 prosięta pochodzące z trzech różnych stad, od których w wieku 4 i 6 miesięcy pobierano próbki krwi do badań serologicznych oraz popłuczną tchawiczo-oskrzelową do badania techniką PCR. Uzyskane wyniki wykazały, że obecność materiału genetycznego *Mhp* można stwierdzić metodą PCR we wczesnej fazie zakażenia, kiedy we krwi nie wykrywa się jeszcze swoistych przeciwciał testem ELISA.

Podobne badania przeprowadzili Calsamiglia i wsp., którzy zastosowali dwie odmiany PCR (metodę jednoetapową oraz nested-PCR – z zastosowaniem dwóch par starterów) do wykrywania DNA *Mhp* przyżyciowo, w wymazach pobranych z nosa zakażonych świń oraz poubojowo, w próbkach płuc pochodzących od tych samych zwierząt. Uzyskane wyniki uwiarygodniły, że techniką jednoetapową wykryto DNA *Mhp* we wszystkich badanych wycinkach płuc, podczas gdy w wymazach z nosa wyniki dodatni uzyskano tylko w dwóch z 55 próbek. Reakcja nested-PCR okazała się metodą bardziej czułą, ponieważ umożliwiła wykazanie DNA w 61% próbek pobranych z nosa. Autorzy tych badań twierdzą, że technika nested-PCR może być z powodzeniem stosowana zarówno w diagnostyce MPS, jak i w wykrywaniu nosicieli zarazki. Przedstawione wyniki badań sugerują możliwość wykorzystania tej metody do określania statusu zdrowotnego świń, szczególnie w okresie łączenia miotów, tworzenia grup technologicznych lub podczas wprowadzania nowych zwierząt do stada podstawowego.

Należy stwierdzić, że istotną korzyścią płynącą z zastosowania PCR w diagnostyce klinicznej jest możliwość identyfikacji nawet pojedynczych komórek drobnoustrojów w badanym materiale, co niewątpliwie nabiera szczególnego znaczenia w przypadku wykrywania zakażeń bezobjawowych.

Na zakończenie warto zwrócić uwagę na wyniki badań wykonanych ostatnio w Polsce przez Kołodziejczyka (8, 9). Autor ten, porównując przydatność bezpośrednich metod laboratoryjnego wykrywania *Mhp* w tkance płucnej świń, wykazał jednoznacznie, że technika PCR wyraźnie przewyższa w zakresie czułości i swoistości zarówno metodę izolacji mykoplazm, jak i wykrywania ich antygeny metodą IF. Mając na uwadze szybkość wykonania tego testu można stwierdzić, że polimeryzacja łańcuchowa DNA jest aktualnie metodą z wyboru w wykrywaniu zakażeń świń drobnoustrojami *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Piśmiennictwo

1. Artushin S., Stipkovits L., Minion F. C.: Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol. Cell. Probes 1993, 7, 381-385.
2. Baumeister A. K., Runge M., Ganter M., Feenstra A. A., Delbeck F., Kirchhoff H.: Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 1984-1988.
3. Bereiter M., Young T. F., Joo H. S., Ross R. F.: Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Vet. Microbiol. 1990, 25, 177-192.
4. Calsamiglia M., Collins J. E., Pijoan C.: Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. Vet. Microbiol. 2000, 76, 299-303.
5. Erdin E., Blanchard B., Kobisch M., Bové J. M., Saillard C.: Use of nested PCR diagnosis test to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* under field conditions. Proc. 11th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Orlando, Florida. IOM Letters 1996, 4, s. 101-102.
6. Feld N. C., Quist P., Ahrens P., Friis N. F., Meyling A.: A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 1992, 30, 35-46.
7. Kobisch M., Tillon J. P., Vannier P., Magueur S., Morvan P.: Pneumonie enzootique a *Mycoplasma suis pneumoniae* chez le porc: diagnostic rapide et recherches d'anticorps. Rec. Méd. Vét. 1978, 154, 847-852.
8. Kołodziejczyk P., Pejsak Z.: Właściwości biologiczne *Mycoplasma hyopneumoniae*, czynnika etiologicznego mykoplazmowego zapalenia płuc. Medycyna Weterynaryjna. W druku.
9. Kołodziejczyk P., Szczotka A., Pejsak Z.: Zastosowanie techniki PCR w rozpoznawaniu zakażeń *Mycoplasma hyopneumoniae* u świń. Medycyna Weterynaryjna. W druku.
10. Leon E. A., Madec F., Taylor N. M., Kobisch M.: Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. Vet. Microbiol. 2001, 78, 331-341.
11. Le Potier M. F., Abiven P., Kobisch M., Crevat D., Desmetre P.: A blocking ELISA using monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Res. Vet. Sci. 1994, 56, 338-345.
12. Levenon K., Sihvo E., Veijalainen P.: Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* and correlation with herd status. J. Vet. Diagn. Invest. 1999, 11, 547-549.
13. Sheldrake R. F., Gardner I. A., Saunders M. M., Romalis L. F.: Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. Austral. Vet. J. 1990, 67, 39-42.
14. Simon X., Sitjar M., Noyes E., Alcaide M. C., Fernandez De Aragon J., Pijoan C.: Relationship between lifetime pneumonia lesions, slaughter volumetric and superficial lung lesions and productive parameters in pig. Proc. 13th Internat. Pig Vet. Society Congress, Bangkok, Thailand 1994, s. 132.
15. Sitjar M., Noyes E., Moreso J. M., Fernández D. E., Aragón J., Pijoan C.: Relationship between respiratory pathogen seroconversion and lung lesions in pigs. Proc. 13th Internat. Pig Vet. Society Congress, Bangkok, Thailand 1994, s. 133.
16. Sörensen V., Barford K., Feld N. C.: Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig herds. Vet. Rec. 1992, 130, 488-490.
17. Stenke G. W., Phan R., Young T. F., Ross R. F.: Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare* and *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. Am. J. Vet. Res. 1994, 55, 81-84.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy