



HAL
open science

Technique de lavage trachéobronchique par voie transnasale pour la détection de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant non anesthésié

P Abiven, P Pommier

► **To cite this version:**

P Abiven, P Pommier. Technique de lavage trachéobronchique par voie transnasale pour la détection de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant non anesthésié. *Veterinary Research*, 1993, 24 (6), pp.515-522. <hal-00902167>

HAL Id: hal-00902167

<https://hal.science/hal-00902167v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Technique de lavage trachéobronchique par voie transnasale pour la détection de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant non anesthésié

P Abiven¹, P Pommier^{2*}

¹ CNEVA, laboratoire central de recherches avicoles et porcines, station de pathologie porcine, BP 53;

² Centre technique des productions animales et agro-alimentaires, BP 7, Zoopôle développement,
22440 Ploufragan, France

(Reçu le 28 janvier 1993; accepté le 14 septembre 1993)

Résumé — Chez le porc la technique de lavage trachéobronchique est actuellement limitée à la recherche. Les méthodes décrites utilisent une sonde introduite par voie orale ou intratrachéale chez des animaux anesthésiés. Ces procédés sont difficiles à mettre en œuvre et les risques de mortalité en cours d'anesthésie ne sont pas négligeables. Un essai de prélèvement chez des porcs vivants non anesthésiés a été entrepris en introduisant une sonde par voie nasale. L'analyse des prélèvements a permis de mettre en évidence à l'aide d'une sonde nucléique non radioactive la présence de *Mycoplasma hyopneumoniae*, l'un des contaminants majeurs du poumon de porc. Cette technique de prélèvement n'entraîne pas de traumatisme chez l'animal et pourrait se révéler intéressante pour l'étude de certains contaminants de la flore microbienne des voies respiratoires profondes.

lavage trachéobronchique / porc / *Mycoplasma hyopneumoniae* / sonde nucléique

Summary — Tracheobronchial lavage for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in living non-anaesthetized swine. Tracheobronchial lavage has proven useful to research. The technique has been performed in anaesthetized swine using a catheter introduced by oral or intratracheal routes. The risk of mortality during anaesthesia is not negligible. In our trial, tracheobronchial lavages were realized after introducing a catheter into the lung via the nasal route. The analysis of the tracheobronchial fluid samples using a nonradioactive DNA-specific probe showed the presence of *Mycoplasma hyopneumoniae*, one of the major contaminants of swine lungs. This technique does not cause any traumatism to the animal and should be an interesting method for the study of some contaminants of the lower respiratory tract.

tracheobronchial lavage / swine / *Mycoplasma hyopneumoniae* / DNA probe

* Correspondance et tirés à part.

INTRODUCTION

Les lavages trachéobronchiques sont couramment employés en médecine humaine (Avril *et al*, 1991 ; Bergogne-Berezin, 1988 ; Chastre *et al*, 1990 ; Meduri et Baselski, 1991) et sont utilisés également chez les bovins (Allen *et al*, 1992 ; Khadom *et al*, 1985 ; Espinasse *et al*, 1991 ; Viso *et al*, 1983 ; Zundel *et al*, 1985) et chez le cheval (Sweeney *et al*, 1992). Les prélèvements obtenus servent de support, selon les cas, à des recherches cytologiques, biochimiques ou bactériologiques.

Chez les porcs l'utilisation de la technique de lavage trachéobronchique est à l'heure actuelle essentiellement limitée à la recherche, une sonde trachéale étant introduite par voie orale chez des animaux anesthésiés (Charley *et al*, 1980 ; Ganter *et al*, 1900 ; Neumann *et al*, 1984, 1985 ; Neumann, 1986 ; Van Leengoed et Kamp, 1989a, b). Une technique de sondage par voie intratrachéale a toutefois été employée dans certains élevages en Belgique (Cassimon, communication personnelle). Ces méthodes sont assez lourdes et le risque de mortalité des animaux en cours d'anesthésie n'est pas négligeable.

Afin d'effectuer des prélèvements trachéo-bronchiques tout en évitant d'anesthésier les animaux, nous avons essayé d'utiliser chez le porc une voie d'accès parfois employée chez l'homme pour les investigations broncho-fibroscopiques : la voie transnasale.

La présence de *Mycoplasma hyopneumoniae*, l'un des contaminants majeurs des voies respiratoires profondes du porc, a été recherchée dans les prélèvements ainsi recueillis. Cette recherche a été effectuée à l'aide de la technique d'hybridation moléculaire qui est actuellement l'une

des techniques les plus rapides et sensibles pour détecter les mycoplasmes.

Mycoplasma hyopneumoniae est l'agent responsable de la pneumonie enzootique du porc. Il peut être isolé du mucus trachéal et bronchique de porcs infectés. En diagnostic sa détection est réalisée à partir d'animaux morts par le test d'épi-immunofluorescence directe (ce procédé peut également être employé sous sa forme indirecte). Cette technique permet de révéler *M hyopneumoniae* au niveau de l'épithélium bronchique sur coupe congelée de poumon (Kobisch *et al*, 1978). Ce test possède cependant l'inconvénient de nécessiter le sacrifice d'un ou plusieurs animaux pour pouvoir être réalisé.

Le diagnostic sérologique, consistant à mettre en évidence dans le sérum les anticorps produits en réponse à l'infection, est réalisée par le test Elisa (Bruggmann *et al*, 1977 ; Nicolet et Paroz, 1980 ; Armstrong *et al*, 1983 ; Feld *et al*, 1992). Cette dernière technique présente un certain nombre d'avantages dont la rapidité et la sensibilité. Son inconvénient, inhérent à tout dépistage sérologique, est que la mise en évidence des anticorps spécifiques n'est possible qu'à partir de 2 à 4 sem après l'infection, laps de temps nécessaire à leur apparition.

Dans la présente étude, une alternative aux moyens actuels de diagnostic est proposée, alternative qui ne présenterait pas les inconvénients précédemment évoqués (nécessité d'euthanasier des animaux, délai entre l'infection et le diagnostic, difficulté et durée de réalisation du test, coût...).

Le but de ce travail est de mettre en évidence, dans des liquides de lavages trachéobronchiques prélevés par voie transnasale chez des porcs vivants, la présence de *M hyopneumoniae* à l'aide d'une sonde nucléaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

Un porc EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiés) produit à la station de pathologie porcine de Ploufragan (CNEVA-LCRAP, France) a permis d'obtenir un échantillon témoin négatif pour les expériences d'hybridations moléculaires. Deux porcs infectés expérimentalement par *M hypopneumoniae* ont permis d'obtenir des témoins positifs. Les animaux ont été infectés puis sacrifiés à la station de pathologie porcine de Ploufragan. Des lavages pulmonaires (Abiven *et al*, 1992) ont été réalisés après le sacrifice.

Protocole expérimental

Étude sur animaux vivants

Chez les animaux du terrain, des ponctions sanguines ont été réalisées sur 8 porcs charcutiers de 40 à 60 kg provenant d'une porcherie d'engraissement où des troubles respiratoires avaient été notés au cours de visites d'élevage hebdomadaires précédant l'étude.

Chacun des 8 animaux a subi un lavage trachéobronchique comme décrit ci-après. Les liquides recueillis ont été congelés à -20°C avant d'être traités en vue de réaliser le test d'hybridation moléculaire.

Étude sur animaux euthanasiés

Les animaux ont été immédiatement euthanasiés au laboratoire de développement et d'analyses des Côtes-d'Armor (France) et, une étude des contaminants de l'élevage étant parallèlement en cours, le bilan respiratoire suivant a été effectué sur chacun d'eux :

- recherche de lésions des cavités nasales, des poumons ;
- recherches bactériologiques et mycoplasmiques de *M hypopneumoniae* au niveau des poumons, des contaminants bactériens des cavités nasales et des poumons.

Techniques utilisées

Prélèvement des sécrétions trachéobronchiques

La contention de chaque animal a été assurée par un lasso placé le plus en arrière possible autour de la mâchoire supérieure. L'autre extrémité du lasso a été fixée en hauteur de façon à ce que l'encolure se trouve en extension modérée, la tête devant rester dans l'axe du corps.

Un cathéter à dénudation en polyuréthane, de 1 mm de diamètre intérieur, 1,5 m de diamètre extérieur et 150 cm de longueur (Steriflex ORX, code 165-15, Laboratoire Vygon, BP7 95440 Écouen, France) a été utilisé pour le prélèvement.

Après nettoyage de la partie rostrale du nez à l'aide d'un coton imbibé de solution physiologique, le cathéter a été introduit le long de la cloison nasale et poussé au cours d'une inspiration de l'animal. Il a ensuite été enfoncé dans la trachée. Le passage du carrefour trachéobronchique a été marqué par une toux assez forte. Après cette toux, le cathéter a été introduit de quelques centimètres supplémentaires puis, à l'aide d'une seringue stérile, 10 à 20 ml de solution physiologique ont été injectés et immédiatement réaspirés. Le cathéter a alors été retiré et le liquide de lavage transvasé dans un tube stérile. L'ensemble de la manipulation a duré une quinzaine de minutes par animal.

Technique d'hybridation moléculaire

Les liquides de lavages pulmonaires (environ 1 à 4 ml) ont été centrifugés à $10\,000 \times g$. Le culot a été repris dans 500 μl de tampon TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). La suspension a été additionnée de SDS (0,1%) et de protéinase K (0,5 mg/ml final) puis elle a été placée au bain-marie à 37°C pendant 2 h. Trois extractions (v/v) ont ensuite été réalisées, la première au phénol, la deuxième au phénol-chloroforme, la troisième au chloroforme. Les acides nucléiques ont été précipités à l'éthanol. Le culot final a été séché sous vide puis repris dans 20 μl de tampon TE.

Les échantillons (10 μl) ont été dénaturés en présence de 100 mM de méthyl mercurate à température ambiante pendant 10 min. Ils ont ensuite été déposés sur membrane de nitrocellulose (Hybond C extra, Amersham, France) à l'aide d'une hybridot (hybridot manifold apparatus, BRL).

La sonde nucléique utilisée était un fragment d'ADN de *M hypopneumoniae* d'une taille de 1,65 kpb qui ne présentait pas d'homologies de séquences avec les principaux micro-organismes procaryotes isolés des voies respiratoires du porc (Abiven *et al*, 1992). Ce fragment d'ADN a été cloné dans la forme répliquative du phage M13mp18 et marqué non radioactivement à l'aide du kit «Dig DNA labeling and detection» (Boehringer Mannheim, Allemagne).

La préhybridation et l'hybridation ont été réalisées à 42°C comme décrit par Bonnet *et al* (1990). La sonde nucléique a été utilisée à la concentration de 50 ng par ml de tampon d'hybridation. Après hybridation, les filtres ont été lavés 3 fois en tampon 2XSSC-1% SDS pendant 15 min à température ambiante (1XSSC = 0,15 mM NaCl, 0,015 mM citrate de sodium) puis 2 fois en 0,1XSSC-1%SDS pendant 30 min à 65°C.

Les hybrides ont été détectés par une méthode immuno-enzymatique selon le protocole joint au kit «Dig DNA labeling and detection» (Boehringer Mannheim, Allemagne).

Recherche des agents microbiens

Les recherches bactériologiques ont été réalisées à partir du mucus des cavités nasales profondes et du tissu pulmonaire préférentiellement lésé (Kobisch *et al*, 1984).

La détection de *Mycoplasma hypopneumoniae* a été effectuée par le test d'immunofluorescence direct sur coupe de tissu pulmonaire (Kobisch *et al*, 1978).

Recherches sérologiques

La recherche d'anticorps dirigés contre *M hypopneumoniae* dans le sérum a été réalisée par une technique Elisa utilisant comme antigène les protéines de *M hypopneumoniae* solubles dans le tween 20 (Nicolet et Paroz, 1980).

RÉSULTATS

Prélèvements trachéobronchiques

Le temps nécessaire à chaque prélèvement était compris entre 5 et 20 min envi-

ron, selon le degré de nervosité des animaux. Lorsque le cathéter était introduit sur une longueur d'environ 40 cm, l'animal émettait une toux marquée, coïncidant avec le passage du carrefour trachéobronchique.

Pour un volume injecté de 10 à 20 ml de solution isotonique, la quantité de liquide recueillie s'est établie entre 1 et 4 ml, selon les prélèvements. Sur aucun des animaux prélevés au cours de cette expérimentation, il n'a été observé de réaction indésirable majeure (mortalité, choc) ou mineure (saignements) après la manipulation. Lors de l'autopsie des animaux de l'étude, aucune lésion d'origine traumatique des voies aériennes n'a été notée.

Recherche des mycoplasmes par hybridations moléculaires

Les résultats d'hybridation entre la sonde froide et les ADN extraits de lavages trachéobronchiques sont présentés sur la figure 1.

Le témoin négatif est situé au puits n° 1 de la ligne A. Les témoins positifs ont été

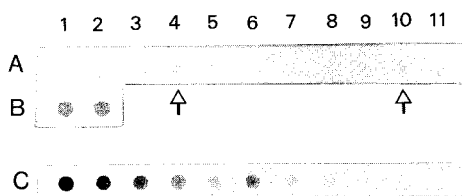


Fig 1. Les puits n° 2 à 6 et 9 à 11 de la ligne A correspondent aux 8 échantillons testés (respectivement porcs nos 338, 351, 360, 339, 430 et porcs nos 424, 350, 435). Le témoin négatif est situé au puits n° 1 de la ligne A, les témoins positifs aux puits n° 1 et 2 de la ligne B. Ligne C : gamme de concentration d'ADN purifié de *M hypopneumoniae* déposé à des quantités comprises entre 100 ng et 97 pg (dilution au 1/2 de puits en puits).

déposés en B1 et B2. Une gamme de concentration d'ADN purifié de *M hyopneumoniae* permet d'apprécier la sensibilité du test. Un signal d'hybridation a été obtenu jusqu'à 0,78 ng (puits n° 8).

Les puits A2 à A6 et A9 à A11 ont reçu les échantillons correspondant aux 8 porcs.

Des signaux d'hybridation sont notés au niveau des puits A4 et A10. De très faibles signaux sont également observés au niveau des autres puits. Toutefois, compte tenu d'un léger bruit de fond, au niveau du témoin négatif (A1), ces derniers résultats ne sont pas pris en considération.

Les deux échantillons positifs correspondent aux animaux n° 360 et n° 350.

Recherche des mycoplasmes par immunofluorescence

La recherche de *M hyopneumoniae* par le test d'IF s'est avérée positive chez 2 porcs sur 8 (n° 360 et n° 424).

Examens des organes

Tous les animaux ont présenté une atrophie plus ou moins marquée des cornets nasaux.

Au niveau des poumons, 4 porcs ont présenté des lésions d'hépatisation rouge (n° 351) ou grise (n°s 360, 424, 435), très peu étendues.

Recherche de bactéries

Au total, 4 espèces bactériennes ont été isolées :

- *Pasteurella multocida* (sur 4 porcs),
- *Bordetella bronchiseptica* (sur 7 porcs),

- *Hemophilus parasuis* (sur 3 porcs),
- *Streptococcus suis* type 4 (sur 4 porcs).

La plupart des isollements ont été réalisés à partir des cavités nasales. Des bactéries ont toutefois été isolées des poumons de 3 animaux (porcs n°s 360, 339, 350 : *B bronchiseptica* ; porc n°s 350 : *P multocida*).

Recherches sérologiques

La recherche d'anticorps anti-*M hyopneumoniae* dans le sérum s'est avérée négative chez les 8 animaux.

DISCUSSION

La technique de prélèvement originale décrite ici présente plusieurs avantages : relativement simple à mettre en œuvre, peu coûteuse, elle peut être réalisée en élevage par une personne seule, sur des animaux vivants non anesthésiés. L'absence de lésions traumatiques constatée à l'autopsie sur ces animaux de même que l'absence d'effets secondaires observés chez des porcs prélevés en élevages (données non publiées) semble démontrer l'innocuité de cette technique même si le risque d'une contamination des voies aériennes profondes, à l'occasion des prélèvements, n'a pas été évalué.

La recherche de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez des porcs provenant d'un élevage naisseur-engraisseur classique, effectuée parallèlement par hybridation moléculaire dans les liquides de lavages trachéobronchiques et par immunofluorescence sur coupe congelée de tissu pulmonaire, a conduit à des résultats concordants pour 6 porcs sur 8. Pour 5 porcs, les 2 tests de détection (hybridation et IF) étaient négatifs. Pour un porc (n° 360), les 2 tests étaient positifs. Un porc (n° 350)

était positif en hybridation et négatif en IF. Le dernier porc (424) était négatif en hybridation et positif en IF. Cette divergence pourrait être due au fait que les quantités d'ADN extraites des liquides de lavage pulmonaire étaient insuffisantes pour être détectées par la sonde froide (Abiven *et al*, 1992).

La spécificité de la sonde nucléique utilisée dans le test d'hybridation a été vérifiée à plusieurs reprises (Abiven *et al*, 1992) et peut être considérée comme très satisfaisante. On peut donc penser que l'échantillon faiblement positif (350) correspond à une infection réelle par *M hyopneumoniae* non détectée par l'IF.

Le fait que les signaux d'hybridation étaient faibles signifie que le mycoplasme n'était vraisemblablement pas présent en grandes quantités dans le liquide de lavage trachéobronchique. La détection du mycoplasme en l'absence d'anticorps spécifiques dans le sérum semble d'ailleurs traduire une infection récente des porcs étudiés. L'euthanasie des animaux a rendu impossible la réalisation d'un test sérologique ultérieur, test qui aurait permis de vérifier cette hypothèse.

Au niveau des cavités nasales, tous les animaux ont présenté une atrophie plus ou moins marquée des volutes et ont été trouvés porteurs de *Bordetella bronchiseptica* (pour 7 d'entre eux) et/ou de *Pasteurella multocida* (pour 4 d'entre eux). Ces deux bactéries (en particulier la seconde) sont considérées comme les principaux agents responsables de la rhinite atrophique du porc (de Jong, 1980 ; Pijoan, 1986).

Au niveau des poumons, en revanche, seuls 3 animaux ont été trouvés porteurs d'organismes pathogènes, le n° 360 (*B bronchiseptica*), le n° 350 (*B bronchiseptica* + *P multocida*) et le n° 339 (*B bronchiseptica*).

Il est à noter que, mis à part pour l'animal n° 351, sur lequel a été détecté un

petit foyer d'hépatisation rouge, les résultats de l'autopsie concordent avec ceux de la recherche des bactéries ou des mycoplasmes, la mise en évidence de l'un ou l'autre de ceux-ci au niveau des poumons correspondant à une observation de lésions pulmonaires.

L'expérimentation rapportée ici est un premier essai d'application pratique d'une technique originale de prélèvement (lavage trachéo-bronchique par voie transnasale chez des porcs vivants, non anesthésiés) couplée à une technique d'analyse sensible et rapide (détection de *Mycoplasma hyopneumoniae* à l'aide d'une sonde nucléique).

La méthode de prélèvement décrite pourrait à l'avenir faire partie des techniques de choix pour la détection de la microflore pulmonaire chez le porc (mycoplasmes, virus, bactéries) au même titre que l'aspiration transtrachéale dans l'espèce bovine. Elle est actuellement la seule à notre connaissance susceptible de permettre la mise en évidence de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez les animaux vivants non anesthésiés.

L'étude ayant été menée sur 8 animaux, les résultats obtenus restent à confirmer mais ils apparaissent très encourageants.

Mycoplasma hyopneumoniae peut être détecté par hybridation ADN-ADN dans des prélèvements trachéobronchiques effectués sur des porcs vivants et non anesthésiés.

Cette technique pourrait s'avérer plus sensible et plus facile à utiliser que l'immuno-fluorescence, considérée comme la technique de référence dans les laboratoires de diagnostic. Ce gain de sensibilité éventuel (qui est à confirmer sur un échantillon plus important) reste cependant dépendant de la fiabilité de la méthode de prélèvement des échantillons, fiabilité qui doit pouvoir être améliorée.

Compte tenu de ces premiers résultats, il sera intéressant de mener une étude si-

miltaire sur un plus grand nombre d'animaux, provenant d'élevages à forte probabilité d'infection par *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La sensibilité de cette méthode, si elle s'avérait insuffisante, pourrait encore être améliorée par l'utilisation de la technique PCR (*polymerase chain reaction*) (Harasawa *et al*, 1991 ; Blanchard, communication personnelle).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement les équipes scientifiques du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de l'INRA/université de Bordeaux II (Villeneuve-d'Ornon) et du laboratoire de bactériologie, station de pathologie porcine, centre national d'études vétérinaire et alimentaire (Ploufragan), ainsi que les services d'autopsie et de bactériologie du laboratoire de développement et d'analyses des Côtes-d'Armor. Les cathéters ont été gracieusement fournis par les laboratoires Vygon SA, France.

RÉFÉRENCES

- Abiven P, Blanchard B, Saillard C, Kobisch M, Bové JM (1992) A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. *Mol Cell Probes* 6, 423-429
- Allen JW, Viel L, Bateman KG, Rosendal S (1992) Changes in the bacterial flora of the upper and lower respiratory tracts and bronchoalveolar lavage differential cell counts in feedlot calves treated for respiratory diseases. *Can J Vet Res* 56, 177-183
- Armstrong CH, Freeman MJ, Sands-Freeman L, Lopez-Ozuna M, Young T, Runnels LJ (1983) Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can J Comp Med* 47, 464-470
- Avril JL, Bébéar C, Berche R, Bergogne-Berezin E, Chabanon G, Darbenat H, Fleurette J, Le Faoui A, Monteil H, Orfila L, Sedaillan A (1991) L'examen bactériologique au cours des infections broncho-pulmonaires (à l'exception de la tuberculose). *Bull Soc Fr Microbiol* 6, 12-19
- Bergogne-Berezin E (1988) Les prélèvements dans les infections respiratoires bactériennes. *Rev Fr Laboratoires* 173, 59-65
- Bonnet F, Saillard C, Kollar A, Seemüller E, Bové JM (1990) Detection and differentiation of the mycoplasma-like organism associated with apple proliferation disease using cloned DNA probes. *Mol Plant-Microbe Interact* 3, 438-443
- Bruggmann S, Keller H, Bertschinger HU, Endberg B (1977) Quantitative detection of antibodies to *Mycoplasma suis pneumoniae* in pigs' sera by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Vet Rec* 101, 109-111
- Charley B, Frenove B, Villiers P (1980) Description et efficacité d'une méthode modifiée de lavage pulmonaire chez le porc anesthésié. *Ann Rech Vét* 11, 209-213
- Chastre J, Fagon JY, Domart Y, Gibert C (1990) Apport du lavage bronchoalvéolaire dans le diagnostic des pneumopathies aiguës infectieuses. *Rev Fr Laboratoires* 205, 29-35
- Espinasse J, Alzieu JP, Papageorgiou C, Beuguin JC, van Gool F (1991) Use of transtracheal aspiration to identify pathogens in pneumonic calves. *Vet Rec* 129, 339
- Feld NC, Qvist P, Ahrens P, Friis NF, Meyling A (1992) A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 30, 35-46
- Ganter M, Kipper S, Hensel A (1990) Bronchoscopy and alveolar lavage of live anaesthetized pigs. *11th IPVS Congress*, Lausanne, 109
- Harasawa R, Koshimizu K, Takeda O, Uemori T, Asada K, Kato I (1991) Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 5, 103-109
- De Jong MF (1980) AR-pathogenicity tests for *Pasteurella multocida* isolates. *Proc of the 6th Congr Pig Vet Soc*, Copenhagen, Denmark, 211
- Khadom NJ, Dedieu JF, Viso M (1985) Bovine alveolar macrophage: a review. *Ann Rech Vét* 16, 175-183
- Kobisch M, Tillon JP, Vannier P (1978) Pneumonie enzootique à *Mycoplasma hyopneumo-*

- niae* chez le porc : diagnostic rapide et recherche d'anticorps. *Recl Méd Vét Ec Alfort* 154, 847-852
- Kobisch M, Lagadic M, Le Ménéec M, Irgens K (1984) Infection à *Bordetella bronchiseptica* et rhinite atrophique chez le porc. Évaluation de différentes méthodes de diagnostic. *Recl Méd Vét Ec Alfort* 160, 573-579
- Meduri GU, Baselski V (1991) The role of bronchoalveolar lavage in diagnosing nonopportunistic bacterial pneumonia. *Chest* 100, 179-190
- Neumann R (1986) Untersuchungsmöglichkeiten und probenentnahmetechniken zur erfassung von abwehrmechanismen des atemtraktes beim schwein *in vivo*. VI. Internationales Leipziger Tierhygiene-Symposium, Leipzig 126-133
- Neumann R, Ballin A, Mehlhorn G, Leohnhardt P, Boschet C (1984) Die bronchoskopie beim schwein – eine methode der intravitales untersuchung des unteren und oberen respirationstraktes. *Arch Exp Veterinaarmed* 38, 223-233
- Neumann R, Leohnhardt P, Ballin A, Mehlhorn G, Diecke S (1985) Die methode der intravitales lungenspülung beim schwein. *Arch Exp Veterinaarmed* 39, 525-534
- Nicolet J, Paroz P (1980) Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 29, 305-309
- Pijoan C (1986) Respiratory System. *In: Diseases of Swine* (AD Leman, B Straw, RD Glock, WL Mengeling, RHC Penny, E Scholl, eds) 6e éd, 152-162
- Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg S (1992) Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res* 53, 1376-1379
- Van Leengoed LAMG, Kamp EM (1989a) A method for bronchoalveolar lavage in live pigs. *Vet Q* 11, 65-72
- Van Leengoed LAMG, Kamp EM (1989b) Endobronchial inoculation of various doses of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* in pigs. *Am J Vet Res* 50, 2054-2059
- Viso M, Espinasse J, Laval A (1983) L'aspiration transtrachéale chez les bovins. Technique et traitement des échantillons prélevés au laboratoire. *Recl Méd Vét Ec Alfort* 159, 1059-1064
- Zundel E, Lamblin J, Gouffe D, Dalou F (1985) Prélèvements trachéobronchiques chez les bovins par lavage et aspiration transtrachéale à la seringue. Application au diagnostic bactériologique des maladies respiratoires. *Bull Mens Soc Vét Prat Fr* 69, 321-330