

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013-2014

**BESTRIJDING VAN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* MET NADRUK OP VACCINATIE**

door

Laurent LOCQUET

Promotoren: Dr. Elin Verbrugghe  
Prof. dr. Dominiek Maes

Literatuurstudie in het kader  
van de Masterproef

©2014 Laurent Locquet

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.*

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.*

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013-2014

**BESTRIJDING VAN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* MET NADRUK OP VACCINATIE**

door

Laurent LOCQUET

Promotoren: Dr. Elin Verbrugghe  
Prof. dr. Dominiek Maes

Literatuurstudie in het kader  
van de Masterproef

©2014 Laurent Locquet

## **VOORWOORD**

Ten eerste zou ik graag mijn promotoren, Dr. Elin Verbrugghe en Prof. dr. Dominiek Maes, willen bedanken voor de begeleiding van deze literatuurstudie. Zij hebben mij gedurende de voorbije maanden altijd snel met goede raad bijgestaan bij vragen over zowel cruciale zaken als details, en dit altijd door middel van opbouwende kritiek. Ten tweede had ik graag mijn dank betuigd aan Prof. dr. Freddy Haesebrouck om mij dit onderwerp aan te raden en de definitieve versie van deze literatuurstudie na te lezen. Ten derde wil ik graag mijn studiegenoten, kennissen en vrienden bedanken voor hun tips en steun. Tot slot wil ik graag van harte mijn familie en in het bijzonder mijn ouders bedanken voor hun onvoorwaardelijke steun gedurende mijn volledige diergeneeskundige studies. Bedankt.

# **INHOUDSOPGAVE**

VOORBLAD

TITELBLAD

VOORWOORD

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING.....	1
1. INLEIDING.....	2
2. LITERATUURSTUDIE.....	3
2.1. Taxonomie en kenmerken van <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	3
2.2. Pathogenese.....	4
2.3. Lesies en symptomen.....	6
2.4. Immunrespons.....	8
2.5. Controle.....	10
2.5.1. Huisvesting, management en gebruik van antimicrobiële middelen.....	10
2.5.1.1. Populatiemanagement en huisvesting.....	10
2.5.1.2. Bedrijfsvoering.....	11
2.5.1.3. Antibiotica.....	14
2.5.2. Vaccinatie.....	15
2.5.2.1. Huidige vaccinatiestrategie.....	15
2.5.2.2. Effect van vaccinatie op transmissie van <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ....	16
2.5.2.3. Ontwikkeling van nieuwe vaccins.....	17
2.5.2.3.1. Inleiding.....	17
2.5.2.3.2. Soorten nieuwe vaccins.....	18
2.5.2.4. Alternatieve toedieningswegen.....	20
2.5.2.4.1. Oraal.....	20
2.5.2.4.2. Via aerosol.....	20
2.5.2.4.3. Nasaal.....	21
2.5.2.4.4. Intraperitoneaal.....	21
2.5.2.4.5. Subcutaan.....	21
2.5.2.4.6. Intradermaal.....	21
3. BESPREKING.....	22
4. REFERENTIELIJST.....	24

## **SAMENVATTING**

*Mycoplasma hyopneumoniae* is een infectieus agens dat respiratoire problemen veroorzaakt bij varkens. Zowel klinische als subklinische infecties met *M. hyopneumoniae* zijn jaarlijks verantwoordelijk voor grote economische verliezen in de vleesvarkenssector wereldwijd. *M. hyopneumoniae* is een facultatief anaerobe bacterie die behoort tot het genus *Mycoplasma*, de kleinste gekende zelf-replicerende bacteriën. Deze bacterie infecteert het varken en heeft zich evolutionair aangepast aan dit parasitair bestaan. De wijzigingen in de morfologie van de celstructuur en het genoom enerzijds en het metabolisme van de kiem anderzijds, zijn erop gericht om het varken zo efficiënt mogelijk te infecteren en te overleven in deze gastheer. De infectie gebeurt horizontaal via direct contact tussen varkens onderling of onder de vorm van een aerosol welke zich over een korte afstand verspreidt tussen verschillende varkens. Gezien de hoge prevalentie op varkensbedrijven en de economische verliezen die hiermee gepaard gaan, is een goede preventie- en controlestrategie van groot belang. Deze strategie bestaat uit een goed bedrijfsmanagement met een optimale huisvesting en ventilatie enerzijds en een correct toegepast vaccinatieschema ter preventie van een infectie anderzijds. De huidige vaccins bestaan uit geïnactiveerde *M. hyopneumoniae* cellen. De vaccins verminderen de klinische symptomen, de letsels en de verminderde prestaties van de dieren, maar ze bieden slechts een gedeeltelijke bescherming. De transmissie van *M. hyopneumoniae* wordt niet significant beïnvloed en ze verhinderen het aanslaan van de kiem t.h.v. het ademhalingsstelsel niet. Door deze nadelen werden reeds verschillende alternatieve soorten vaccins ontwikkeld en getest en dit via verscheidene toedieningswegen aan de hand van verschillende vaccinatieschema's. Tot op heden werd echter nog geen optimale vaccinatiestrategie gevonden, waardoor geïnfecteerde dieren behandeld moeten worden met antibiotica. Het is en blijft dus heel moeilijk om *M. hyopneumoniae* te eradiceren uit een geïnfecteerde varkenspopulatie op een bedrijf en om een *M. hyopneumoniae*-vrije status te behouden.

# **1. INLEIDING**

De varkenshouderij is de laatste decennia uitgegroeid tot een erg gespecialiseerde sector waarvan het beleid een optimaal management en een grondige economische kennis vereist van de veehouder. De varkensindustrie kan ingedeeld worden in twee verschillende takken: deze die zich toelegt op de fok en vermeerdering enerzijds, en deze van de vleesvarkens anderzijds. In landen zoals België, Denemarken en Duitsland vormt de varkensindustrie een belangrijk aandeel van de landbouwsector. Zo waren er in 2012 in Vlaanderen ongeveer 6 miljoen varkens. Deze sector had een eindproductiewaarde van ongeveer 1,1 miljard euro in Vlaanderen (ongeveer 30 procent van de volledige land- en tuinbouwsector) (Bernaerts et al., 2012).

Enzoötische pneumonie (EP) vormt een van de meest prevalentie respiratoire aandoeningen die voorkomen in de varkenshouderij. Over de precieze impact van EP in de varkenssector bestaan verschillende cijfers. Afhankelijk van de toegepaste onderzoeksmethode kunnen deze significant verschillen van elkaar (Maes et al., 1996). Wel kan er besloten worden dat er jaarlijks grote economische verliezen worden geleden ten gevolge van respiratoire problemen.

EP is een multifactoriële respiratoire aandoening waarvan *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) het primaire causale agens is. *M. hyopneumoniae* is een globaal verspreide bacterie die voorkomt in alle landen met een intensieve varkensindustrie (Zimmerman et al., 2012). Andere soorten mycoplasma's die vaak geïsoleerd worden uit het varken zijn *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*), *Mycoplasma hyosynoviae* (*M. hyosynoviae*) en *Mycoplasma flocculare* (*M. flocculare*). Sommige stammen *M. hyorhinis* kunnen het ademhalingsstelsel van het varken aantasten en klinische respiratoire symptomen induceren, terwijl andere stammen geïsoleerd kunnen worden uit gezonde dieren. *M. hyosynoviae* tast de gewrichten aan van het varken en induceert artritis. Naast *M. hyopneumoniae*, kunnen dus ook *M. hyorhinis* en *M. hyosynoviae* verantwoordelijk zijn voor economische verliezen in de varkenshouderij. *M. flocculare* wordt vaak geïsoleerd uit gezonde dieren maar heeft geen pathogeen vermogen (Kobisch en Friis, 1996).

Gezien de impact van *M. hyopneumoniae* in de varkenshouderij is een goede preventie en controle van infecties vereist. Het huidige controlebeleid bestaat uit een optimale huisvesting, gericht antibioticagebruik en het vaccineren van de varkens. Hedendaagse vaccins en bijhorend vaccinatieschema bieden echter geen volledige bescherming. Daarom wordt er verder onderzoek verricht naar meer efficiënte vaccins, toedieningswijzen en -wegen en vaccinatieschema's. In deze literatuurstudie wordt eerst een beknopt overzicht gegeven van de taxonomie, kenmerken, pathogenese, symptomen en lesies van *M. hyopneumoniae* en de immuunrespons tegen deze bacterie. Daarna worden de verschillende huidige en experimentele aspecten van de controle tegen *M. hyopneumoniae* besproken, met nadruk op de vaccinatie.

## **2. LITERATUURSTUDIE**

### **2.1. Taxonomie en kenmerken van *Mycoplasma hyopneumoniae***

*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) is een bacterie species dat behoort tot het genus *Mycoplasma*, de kleinst gekende zelf-replicerende bacteriën (0,2 µM). Er zijn reeds meer dan honderd mycoplasmasoorten geïdentificeerd en uitgebreid beschreven (Vasconcelos et al., 2005; Citti en Blanchard, 2013) (Zie tabel 1). *M. hyopneumoniae* behoort tot de klasse van de Mollicutes. Bacteriën die tot deze klasse behoren, worden onder andere gekenmerkt door de afwezigheid van een celwand. Normaal bepaalt de celwand de structuur van een bacterie, met als gevolg dat *Mycoplasma* bacteriën pleiomorf zijn. De ronde tot ovale vorm kan zich aanpassen aan de omgeving, bv. wanneer deze bacteriën tussen de cilia van het longepitheel voorkomen. Ook verschillen ze significant qua grootte ten opzichte van andere leden van de Mollicutes. *M. hyopneumoniae* heeft een diameter van ongeveer 300 tot 1000 nm (Tajima en Yagihashi, 1982). *M. hyopneumoniae* wordt beschouwd als een facultatief anaerobe bacterie, hoewel deze beter kan groeien in aerobe dan in anaerobe omstandigheden (Vranckx, 2011).

De afwezigheid van een beschermende celwand en de nood aan specifieke nutriënten zorgen ervoor dat *M. hyopneumoniae* niet lang kan overleven buiten de gastheer, tenzij deze zich bevindt onder de vorm van een aerosol (Goodwin, 1972). De kiem heeft zich evolutionair aangepast aan een parasitair bestaan. Hierdoor zijn zowel het aantal celorganellen als de genomgrootte beperkt tot een absoluut minimum en is de celwand verloren gegaan. *M. hyopneumoniae* bezit een circulaire, dubbelstrengige DNA-molecule (ook wel plasmide genoemd), ribosomen en een plasmamembraan. Het genoom is rijk aan adenine en thymine (± 70 %). Het is ongeveer 600 kb groot en bestaat uit 400 tot 500 genen. De omvang van dit genoom is gedurende de evolutie sterk gereduceerd aangezien er geen coderende sequenties meer vereist waren voor bijvoorbeeld een celwand, of voor een energieproducerend proces (Razin, 1992). De gensequentie van *M. hyopneumoniae* is vrij goed gekend (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005). Gezien de beperkte omvang van het genoom zijn er ook relatief meer coderende sequenties aanwezig in vergelijking met andere organismen (Minion et al., 2004). Door het beperkt aantal structurele elementen en het eenvoudig metabolisme is *M. hyopneumoniae* echter genoodzaakt een aantal voedingsstoffen, bv. bepaalde aminozuren, vetzuren en vitamines, uit hun omgeving op te nemen om zich te kunnen repliceren (Razin et al., 1998). Hierdoor is het moeilijk om *M. hyopneumoniae* *in vitro* te kweken. Speciale supplementen zoals aanwezig in het Friis medium en vaste omgevingsomstandigheden zijn vereist. Aangezien cultivatie van *M. hyopneumoniae* een tijdrovend en arbeidsintensief proces is, een lage sensitiviteit heeft en er dikwijls contaminatie optreedt met *Mycoplasma hyorhinis*, wordt isolatie van de kiem niet standaard gebruikt als diagnostisch hulpmiddel (Friis, 1974).

*M. hyopneumoniae* is het primair agens dat verantwoordelijk is voor enzoötische pneumonie (EP) bij varkens. Andere gastheren of eventuele tussenvectoren zijn niet gekend (Bogema et al., 2011). De redenen voor deze gastheerspecificiteit zijn nog grotendeels onbekend, maar het is mogelijk dat de specifieke nutriënten die nodig zijn om te kunnen repliceren enkel aanwezig zijn in het varken (Minion



et al., 2004). Een *M. hyopneumoniae* infectie bij varkens is ook vaak een predisponerende factor voor andere respiratoire infecties wat kan leiden tot 'porcine respiratory disease complex' (PRDC). Respiratoire problemen veroorzaken wereldwijd grote economische verliezen in de varkenssector. *M. hyopneumoniae* komt zeer frequent voor (38 tot 100 procent van de vleesvarkens zijn geïnfecteerd) in alle landen met een intensieve varkensproductie (Zimmerman et al., 2012). Hoewel de meeste infecties voorkomen bij vleesvarkens, zijn alle leeftijden gevoelig voor de infectie. Er bestaat een grote diversiteit tussen verschillende *M. hyopneumoniae*-stammen, zowel op genomisch vlak als op het vlak van antigene eigenschappen en virulentie (Mayor et al., 2007).

**Tabel 1:** Taxonomie van de klasse Mollicutes (uit Razin et al., 1998).

Classification	Current no. of recognized species	Genome size (kb)	Mol% G+C of genome	Cholesterol requirement	Distinctive properties	Habitat
<b>Order I: Mycoplasmatales</b>						
Family I: <i>Mycoplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Mycoplasma</i>	102	580–1,350	23–40	Yes	Optimum growth at 37°C	Humans, animals
Genus II: <i>Ureaplasma</i>	6	760–1,170	27–30	Yes	Urea hydrolysis	Humans, animals
<b>Order II: Entomoplasmatales</b>						
Family I:						
<i>Entomoplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Entomoplasma</i>	5	790–1,140	27–29	Yes	Optimum growth at 30°C	Insects, plants
Genus II: <i>Mesoplasma</i>	12	870–1,100	27–30	No	Optimum growth at 30°C; 0.04% Tween 80 required in serum-free medium	Insects, plants
Family II:						
<i>Spiroplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Spiroplasma</i>	33	780–2,220	24–31	Yes	Helical motile filaments; optimum growth at 30–37°C	Insects, plants
<b>Order III Acholeplasmatales</b>						
Family I:						
<i>Acholeplasmataceae</i>						
Genus: <i>Acholeplasma</i>	13	1,500–1,650	26–36	No	Optimum growth at 30–37°C	Animals, some plants, insects
<b>Order IV: Anaeroplasmatales</b>						
Family: <i>Anaeroplasmataceae</i>						
Genus I: <i>Anaeroplasma</i>	4	1,500–1,600	29–34	Yes	Oxygen-sensitive anaerobes	Bovine/ovine rumen
Genus II: <i>Asteroleplasma</i>	1	1,500	40	No	Oxygen-sensitive anaerobes	Bovine/ovine rumen
Undefined taxonomic status						
Phytoplasma	ND <sup>b</sup>	640–1,185	23–29	Not known	Uncultured in vitro	Insects, plants

## 2.2. Pathogenese

*M. hyopneumoniae* verspreidt zich tussen verschillende varkens via direct contact of indirect via aerosolen en dit zowel horizontaal (tussen de biggen onderling) als verticaal (van zeug naar big). Dit gebeurt via hoesten en niezen. Het is nog onduidelijk in welke mate er een verband bestaat tussen de leeftijd van de geïnfecteerde zeugen en de kans dat deze *M. hyopneumoniae* doorgeven aan hun biggen (Sibila et al., 2007a). Over het algemeen vormen jongere zeugen een groter risico voor overdracht van de infectie naar de biggen.

Binnen een bedrijf kunnen er meerdere stammen aanwezig zijn. De virulentie tussen verschillende *M. hyopneumoniae* isolaten kan sterk verschillen. Men kan laag, gemiddeld of hoogvirulente *M. hyopneumoniae* isolaten onderscheiden. De oorzaken van deze virulentieverschillen zijn nog grotendeels onbekend (Calus et al., 2009).

Een belangrijke stap in de pathogenese van *M. hyopneumoniae* en de ontwikkeling van EP is de adhesie van *M. hyopneumoniae* aan trilhaarepithelcellen (zie Fig. 1). *M. hyopneumoniae* koloniseert het trilhaarepithel van de respiratoire tractus: de trachea, de bronchiën en de grotere bronchiolen (Blanchard et al., 1992; Kwon et al, 2002). De wijze waarop *M. hyopneumoniae* vasthecht aan de cilia is nog niet volledig gekend. Wel staat vast dat dit een multifactorieel proces is (Haesebrouck et al., 2004). Er zijn enkele eiwitten (adhesines) beschreven waarvan geweten is dat ze een rol spelen in de adhesie van *M. hyopneumoniae* (Tajima en Yagihashi, 1982; Zielinski en Ross, 1993). In het adhesieproces zijn P97 en P102 de best gekende adhesines. Ze spelen een belangrijke rol bij de adhesie van de kiem via interacties met de trilharen en componenten van de extracellulaire matrix zoals glycosaminoglycanen (bijvoorbeeld heparine), fibronectine, plasminogeen en mucine. Dergelijke stoffen komen voor in de extracellulaire matrix, namelijk in de mucus die de respiratoire epitheelcellen bedekt en beschermt (Hsu en Minion, 1998; Jenkins et al., 2005; Bogema et al., 2011). Naargelang de infectie vordert, gaat *M. hyopneumoniae* zich steeds dieper in het ademhalingsstelsel vestigen (Kwon et al., 2002).



**Fig. 1:** Elektronenmicroscopisch beeld van de adhesie (pijltjes) van *M. hyopneumoniae* aan het trilhaarepithel van het ademhalingsstelsel van het varken (uit Tajima en Yagihashi, 1982) (Vergroting: 1 x 25000 en 1 x 250000).

Reeds enkele uren na adhesie is *M. hyopneumoniae* in staat om ciliostase en schade aan gecilieerde epitheelcellen te induceren, zonder zelf te infiltreren in de cel. Op welke manier dit precies gebeurt, is nog niet bekend (DeBey en Ross, 1994). Na binding op de respiratoire epitheelcellen via een nog onbekend oppervlakteproteïne (niet P97), wordt een intracellulaire concentratiestijging van calcium, afkomstig van het endoplasmatisch reticulum, opgemerkt. Een dergelijke stijging is afhankelijk van de *M. hyopneumoniae* concentratie en zou betrokken zijn bij de signalering die ciliostase induceert (DeBey et al., 1993; Park et al., 2002). Daarnaast is *M. hyopneumoniae* ook in staat om het immuunsysteem van de gastheer te moduleren. Het exacte mechanisme hiervoor is nog grotendeels

onbekend. Verschillende gastheermoleculen, o.a. cytokines en inflammatoire mediators, interageren met heparine. De mogelijkheid van *M. hyopneumoniae* om heparine te binden zou een mogelijke verklaring kunnen bieden voor deze modulatie. Onderzoek heeft namelijk aangetoond dat heparine en andere gesulfateerde polysachariden de binding van *M. hyopneumoniae* op gepurifieerde, respiratoire cilia van het varken kunnen tegengaan (Jenkins et al., 2005). De respiratoire epitheelcellen kunnen verder beschadigd worden door toxische producten van het metabolisme van het *Mycoplasma*, bijvoorbeeld superoxide radicalen en waterstofperoxide (Razin et al., 1998; Haesebrouck et al., 2004; Bai et al., 2013). De ciliostase en immunomodulatie verhogen de kans op aanslaan van secundaire pathogenen die op hun beurt ernstige lesies kunnen veroorzaken (Ciprian et al., 1988; Sorensen et al., 1997). De meest voorkomende zijn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* en in mindere mate *Trueperella pyogenes* en stafylo- en streptokokken, maar ook virale pathogenen zoals het porcien reproductief en respiratoir syndroom virus (PRRSV), het porcine influenzavirus, en het porcine circovirus type 2 (Kwon et al., 2002; Muneta et al., 2008). Ondanks het feit dat *M. hyopneumoniae* een respiratoir pathogeen is, kon de kiem teruggevonden worden in verschillende andere organen, zoals de nier, milt en lever. Dit wijst op een verspreiding via de lymfevaten of het bloed. Het is echter onwaarschijnlijk dat deze systemische verspreiding een bijdrage heeft in de ontwikkeling van EP.

### **2.3. Lesies en symptomen**

EP wordt gekenmerkt door een hoge morbiditeit, maar een lage mortaliteit. Geïnficeerde varkens vertonen een vertraagde groei, een verhoogde voederconversie, lethargie, anorexie, koorts, dyspnee en een niet-productieve droge hoest en dit na een incubatieperiode van 10 à 16 dagen (Haesebrouck et al., 2004). Een lichte zwelling van de lymfeklieren is zichtbaar vanaf 7 dagen na infectie. In afwezigheid van complicerende secundaire bacteriële infecties treedt er geen pericarditis of pleuritis op en verdwijnen de klinische symptomen vanaf ongeveer 35 dagen na infectie. Een groot deel van de geïnficeerde dieren is echter subklinisch geïnficeerd. Deze dieren vormen een belangrijke bron van infectie (Kwon et al., 2002).

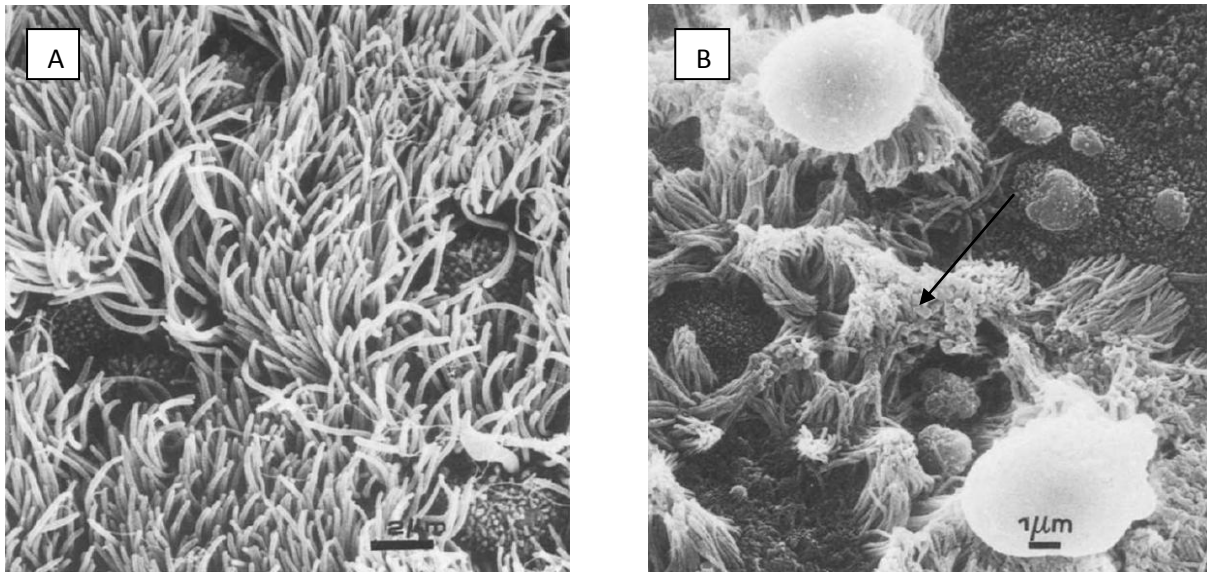
Bij autopsie zijn macroscopische letsels zichtbaar vanaf ongeveer 7 tot 14 dagen na (experimentele) infectie (Kobisch et al., 1993). In de craniale, middelste, accessoire en de voorste delen van de caudale longkwab zijn goed omschreven donkerrode tot paarse parenchymateuze letsels te zien (Kwon et al., 2002) (zie Fig. 2). De aangetaste zones voelen stevig aan en hebben een atelectatisch uitzicht (Morrison et al., 1985).



**Fig. 2:** *M. hyopneumoniae*-achtige letsels: de longen vertonen duidelijk omschreven donkerrode tot paarse parenchymateuze letsels (Bron: Prof. dr. Maes).

De macroscopische letsels zijn maximaal twee tot vier weken na infectie. Op dat moment wordt er een aanzienlijke hoeveelheid cellulair exsudaat in de respiratoire tractus en alveoli teruggevonden (Tajima en Yagihashi, 1982).

De eerste microscopische lesies zijn te zien vanaf 5 dagen na experimentele inoculatie (Jacques et al., 1992). Tijdens infectie is er een sterke toename te zien van het aantal leukocyten in het longweefsel onder de vorm van een peribronchiale, peribronchiolaire en perivasculaire lymfoïde hyperplasie in de lamina propria van het epitheel. Voornamelijk interstitiële en alveolaire macrofagen, lymfocyten en polymorfonucleaire leukocyten (neutrofielen) zijn aanwezig. Histologisch zijn er verder gecollabeerde alveoli zichtbaar tussen gezwollen septa, die deels opgevuld zijn met oedemateus vocht en inflammatoire cellen (Tajima en Yagihashi, 1982; Kwon et al., 2002; Muneta et al., 2008). De epitheelcellen zelf hebben hun cilia verloren (of de toppen van verschillende cilia zijn aan elkaar vastgehecht), zijn gedesquameerd en bevinden zich vrij in het lumen en in de mucus (Blanchard et al., 1992) (Zie Fig. 3). De precieze lokalisatie van *Mycoplasma*-organismen varieert naargelang het stadium van infectie, maar bevinden zich oppervlakkig en niet in het cytoplasma van de epitheelcellen (Kwon et al., 2002). De lesies zijn niet enkel het gevolg zijn van interacties met *M. hyopneumoniae* zelf, maar de immuunrespons draagt ook bij tot het ontstaan van de letsels (Tajima en Yagihashi, 1982).



**Fig. 3:** Scanning elektronenmicroscopisch (SEM) beeld van de trachea van (A) een controlebig en (B) een big geïnfecteerd met *M. hyopneumoniae*. (A) De trilharen en microvilli zijn duidelijk zichtbaar en intact. (B) Het merendeel van de cilia zijn verdwenen en op de resterende cilia hebben de kiemen zich vastgehecht. De microvilli zijn bedekt met mucus (pijl) (uit Blanchard et al., 1992).

## 2.4. Immunrespons

Het volledige mechanisme en verloop van de verschillende interacties tussen *M. hyopneumoniae* en het immuunsysteem van de geïnfecteerde gastheer zijn nog niet volledig gekend. De immunrespons zorgt enerzijds voor een gedeeltelijke bescherming van de gastheer, zowel lokaal als systemisch en dit zowel op cellulair als op humoraal niveau. Anderzijds speelt de immunrespons een belangrijke rol in de pathogenese van de infectie en de ernst van de geïnduceerde lesies (Suter et al., 1985; Razin et al., 1998; Simecka et al., 2005). De immunrespons bevat een aspecifieke component waarbij vooral granulocyten, macrofagen en natural killer cellen van belang zijn. Daarnaast bestaat deze ook nog uit een specifieke component, waarbij T- en B-cellen de voornaamste celtypes zijn (Vicca, 2005).

De mucociliare clearance vormt een belangrijk onderdeel van de aspecifieke afweer ter hoogte van het ademhalingsstelsel. Het immuunsysteem van de gastheer herkent bepaalde antigenen, meer bepaald lipoproteïnes, aanwezig op het celoppervlak van *M. hyopneumoniae*. Deze lipoproteïnes vormen de zogenaamde PAMP's (pathogen-associated molecular patterns) welke herkend worden door Toll-like receptoren. Na infectie produceren de geactiveerde macrofagen bepaalde chemoattractieve cytokines, o.a. IL1 en IL6, welke andere cellen gaan activeren en aantrekken (Messier et al., 1990; Sarradell et al., 2003). De chemoattractie is zichtbaar vanaf 7 dagen na infectie (Choi et al., 2006). Zo gaan macrofagen en neutrofielen zich verzamelen rondom de luchtwegen, meer bepaald rond de trachea, bronchiën en bronchiolen. Bij chronische infecties kunnen de interalveolaire septa verdikt zijn door lymfoïde hyperplasie van het BALT (bronchus-associated lymphoid tissue), het lokale mucosale lymfoïde weefsel ter hoogte van het ademhalingsstelsel (Sarradell et al., 2003). Een dergelijke verdikking kan resulteren in een vernauwing van de luchtwegen (Blanchard et al., 1992; Choi et al., 2006).

Antigen presenterende cellen, bijvoorbeeld macrofagen en dendritische cellen, brengen na opsonisatie en fagocytose van een antigeen bepaalde onderdelen van dit antigeen tot expressie op hun celoppervlak en presenteren deze aan T-cellen, die na herkenning op hun beurt de specifieke immunrespons induceren. Daarnaast sturen ze ook deels de aspecifieke immunrespons. Zo wordt de fagocytose en de cytotoxiciteit van macrofagen gestimuleerd (Messier et al., 1990; Asai et al., 1994; Chen et al., 2003). Pro-inflammatoire cytokines activeren de immature T-helpercel (Th) (Baarsch et al., 1995; Murtaugh en Foss, 2002). Dit is het meest voorkomende celtype in het BALT. Hieruit ontstaan Th1-cellen of Th2-cellen. Th1-cellen induceren voornamelijk een celgemedieerde immunrespons met stimulatie van de productie van opsoniserende antistoffen (bijvoorbeeld IgG2) door B-cellen. Indien voornamelijk Th2-cellen worden gevormd, zal dit eerder resulteren in een humorale immunrespons, met productie van immunoglobulines, bijvoorbeeld IgG1 en IgA (Chen et al., 2003; Okamba et al., 2007). De concentraties van IgG1 en IgA stijgen zowel systemisch in het serum als lokaal in de long en het longspoelvocht (Suter et al., 1985; Messier et al., 1990). Secretory IgA (sIgA) bedekt de respiratoire mucosa en inhibeert de adhesie en bepaalde metabolische processen van *M. hyopneumoniae*, met een verminderde cytotoxiciteit tot gevolg (Fagan et al., 1997). De concentraties IgA en IgG gemeten in zowel het serum als in de respiratoire tractus, hebben echter een beperkte prognostische waarde voor de bescherming van varkens tegen *M. hyopneumoniae* infectie (Djordjevic et al., 1997). *M. hyopneumoniae* hecht enkel vast op het trilhaarepitheel van de respiratoire tractus en heeft een niet-invasief karakter. Bijgevolg is de antistoffentiter in het serum, geïnduceerd door deze bacterie, erg variabel en moet men de resultaten van metingen van de antistoffentiters in het serum kritisch interpreteren (Haesebrouck et al., 2004; Martelli et al., 2006). De seroconversie gebeurt traag en is pas duidelijk 3 tot 6 weken na infectie (Thacker et al., 2000).

Het is duidelijk dat zowel een goede cellulaire als humorale immunreactie vereist zijn om een goede bescherming te bieden tegen *M. hyopneumoniae* (Haesebrouck et al., 2004).

*M. hyopneumoniae* is in staat het immuunsysteem van het varken te moduleren. De capaciteit om de immunrespons te manipuleren verschilt van stam tot stam. Het verschil in uitkomst van de immunrespons is waarschijnlijk afhankelijk van het gezamenlijke effect van alle betrokken cytokines (Razin et al., 1998). Cytokines hebben zowel een invloed op de cellulaire als humorale immunrespons. Cytokines kunnen onderverdeeld worden in pro-inflammatoire cytokines (bijvoorbeeld IL1, IL6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) en anti-inflammatoire cytokines (bijvoorbeeld IL10 en TGF- $\beta$ ) (Asai et al., 1993 en 1994; Thanawongnuwech et al., 2003 en 2004; Choi et al., 2006). *M. hyopneumoniae* is enerzijds in staat de immunrespons te onderdrukken, waardoor de kiem niet verwijderd kan worden uit het ademhalingsstelsel. Pieters et al. (2009) hebben aangetoond dat de kiem tot 214 dagen na infectie kan persisteren in de gastheer. Zo ziet men bijvoorbeeld soms een inhibitie van de fagocytose van macrofagen: er is een tekort aan opsonines, aan Fc- en complementreceptoren en bovendien is er een verminderde lysosomale activiteit. Tevens is er een suppressie van verscheidene cytokines, bijvoorbeeld van IFN $\gamma$  (Caruso en Ross, 1990; Muneta et al., 2008). De mate van inhibitie is sterk gecorreleerd met de concentratie van prostaglandine E2 in het longspoelvocht (Asai et al., 1996). Anderzijds kan *M. hyopneumoniae* het immuunsysteem overstimuleren, met bijvoorbeeld een

disproportionele synthese van pro-inflammatoire cytokines, welke bijdragen tot de ernst van de lesies in het ademhalingsstelsel (Choi et al., 2006). Infecties met hoogvirulente stammen induceren hogere concentraties TNF $\alpha$  en IL1 aanwezig in het longspoelvocht ten opzichte van infecties met laagvirulente stammen. Hetzelfde geldt voor de concentratie leukocyten in het longweefsel (Meyns et al., 2007).

Zeugen geven passief een deel van hun antistoffen en lymfocyten door aan hun biggen via het colostrum (Bandrick et al., 2008). Deze passief verworven immuniteit kan de kolonisatie van *M. hyopneumoniae* niet verhinderen. Biggen van immunocompetente zeugen vertonen wel minder ernstige longlesies na infectie (Sibila et al., 2008).

## **2.5. Controle**

Er zijn talrijke factoren, zoals de algemene conditie van de varkens, de huisvesting, de bedrijfsvoering en/of andere infecties die bijdragen tot de controle van EP (zie Fig. 4). Gezien de multifactoriële oorzaak, moet de bestrijdingsstrategie een combinatie zijn van een optimaal bedrijfsmanagement, waaronder een goede huisvesting, een verantwoord en doelgericht antibioticagebruik en vaccinatie. Het is zeer moeilijk een bedrijf vrij te maken van *M. hyopneumoniae* en deze status tevens te behouden (Haesebrouck et al., 2004). Wegens de enorme kosten die varkensbedrijven globaal jaarlijks ondervinden ten gevolge van *M. hyopneumoniae* infecties, is een zo efficiënt mogelijke controle van deze bacterie van groot economisch belang. Een van de grootste knelpunten is en blijft het ideale tijdstip waarop desbetreffende maatregelen, bijvoorbeeld vaccinatie en toedienen van antibiotica, moeten worden toegepast (Meyns et al., 2004).

### 2.5.1. Huisvesting, management en gebruik van antimicrobiële middelen

#### 2.5.1.1. Populatiemanagement en huisvesting

De dierbezettingsdichtheid en de ventilatie op het bedrijf zijn factoren die een grote invloed uitoefenen op de kans dat *M. hyopneumoniae*, na contact met het varken, aanslaat en persisteert in de gastheer. EP komt bijgevolg minder voor op extensieve varkensbedrijven, gezien hier relatief meer stalruimte en luchtvolume is per individueel dier in vergelijking met een intensief productiesysteem. Overbezetting leidt tot meer stress bij varkens en een verhoogd stofgehalte, welke een negatieve invloed hebben op de afweer ter hoogte van het ademhalingsstelsel. Bedrijven met een intensief productiesysteem bestaan vaak ook uit grotere groepen, dus meer varkens die een potentiële transmissieweg kunnen vormen voor *M. hyopneumoniae* en andere respiratoire pathogenen (Jolie et al., 1998). Deze risicofactor kan echter beperkt worden door de dieren onder te verdelen in verschillende afdelingen. Het is tegenaangewezen om dieren afkomstig van verschillende varkensbedrijven samen te huisvesten. Varkensbedrijven die per productieronde dieren houden van slechts één herkomstbedrijf, lopen minder risico op insleep van infectieuze ziektes, onder andere van *M. hyopneumoniae* (Hurnik et al., 1994; Heinonen et al., 2001; Hege et al., 2002).

Bij het optimaliseren van de huisvesting en de voeding wordt een verbetering van de gezondheid, het welzijn en de productiviteit van de varkens nagestreefd. De temperatuur en de vochtigheid hebben zowel een invloed op de gezondheid en de groeiprestaties van de varkens als op de capaciteit van *M. hyopneumoniae* om te overleven en zich te verspreiden (Lebret et al., 2006). Indien de bacterie zich niet in een koud en vochtig milieu bevindt, zal deze in de praktijk niet langer overleven dan 48 uur. Gezien deze ideale omgevingsomstandigheden voor *M. hyopneumoniae*, komen er meer infecties voor tijdens de herfst en de winter (Goodwin, 1985). Aangezien *M. hyopneumoniae* zich over een beperkte afstand kan verspreiden onder de vorm van een aerosol, lopen bedrijven die dicht bij een geïnfecteerd bedrijf gelegen zijn een hoger risico op infectie (Hurnik et al., 1994). Hetzelfde geldt voor bedrijven in de buurt van slachthuizen, parkeerplaatsen voor voertuigen bestemd voor varkenstransport en andere plaatsen waar frequent varkens aanwezig zijn. De belangrijkste transmissieweg van *M. hyopneumoniae* tussen verschillende varkensbedrijven is via aankoop van (subklinisch) geïnfecteerde dieren. Zo verspreidt de kiem zich direct en indirect tussen verschillende groepen varkens, bedrijven en slachthuizen. Een grondige controle, reiniging en desinfectie van vrachtwagens bij het verlaten van het bedrijf kan tevens bijdragen tot de preventie van EP. Hiervoor voorziet men best een afgezonderde ruimte (Hege et al., 2002). Om een optimale bioveiligheid te bekomen, moet ook het personeel strikt hygiënische maatregelen navolgen. Schoenen en kledij worden best grondig gereinigd en ontsmet. Materiaal wordt best steeds bij dezelfde populatie varkens gebruikt en niet uitgewisseld tussen dieren van verschillende leeftijdscategorieën (Roman et al., 2006).

Indien de varkens slecht gehuisvest zijn, met bijvoorbeeld een te hoge bezettingsgraad, heeft dit een negatieve weerslag op de kwaliteit van het vlees (Lebret et al., 2006). Een optimale huisvesting resulteert in een kortere afmestperiode, een hogere dagelijkse gewichtstoename en een lager mortaliteitspercentage (Heinonen et al., 2001).

#### 2.5.1.2. Bedrijfsvoering

##### *A. Productiesysteem*

Er worden meer gevallen van EP vastgesteld op afmestbedrijven en bedrijven met een gemengd fok- en afmestmanagement ten opzichte van fokbedrijven. Dit komt onder andere doordat afmestbedrijven afhankelijk zijn van kweekbedrijven. Dergelijke kweekbedrijven kunnen namelijk varkens leveren die mogelijk reeds geïnfecteerd zijn en kunnen hierdoor verantwoordelijk zijn voor een insleep van *M. hyopneumoniae* in het afmestbedrijf. Heinonen et al. (2001) hebben aangetoond dat wanneer varkensbedrijven enkel dieren aankopen met een uitstekende gezondheid, dit resulteert in significante economische voordelen op het einde van de afmestperiode. Zo is er een hogere dagelijkse gewichtstoename, een verlaagde uitval en is de duur van de afmestperiode korter. Tevens wordt in de slachthuizen een betere vleeskwiteit opgemerkt. Bedrijven met een all-in/all-out- systeem lopen minder risico op infectie met *M. hyopneumoniae* ten opzichte van een continue doorstroom.



Bovendien resulteert dit in betere productieresultaten, met een hoger slachtgewicht en dagelijkse gewichtstoename (Ice et al., 1999; Hege et al., 2002).

Afhankelijk van het aandeel aangetaste dieren en de ernst van de infectie kan men voor eradicatie op een bedrijf overgaan tot een gedeeltelijke (op kweekbedrijven) of volledige (op afmestbedrijven) depopulatie van de varkens op het bedrijf. Een effectief eradicatieprogramma werd onder andere reeds toegepast in Zwitserland. Hierbij werden alle varkens op een geïnfecteerd bedrijf jonger dan 10 maanden geëlimineerd. Een partiële depopulatie op een kweekbedrijf kan een lange tijd in beslag nemen (tot enkele maanden), aangezien alle dieren ouder dan 10 maanden een immuunrespons moeten opbouwen tegen *M. hyopneumoniae* (Hege et al., 2002).

#### *B. Medicated early weaning*

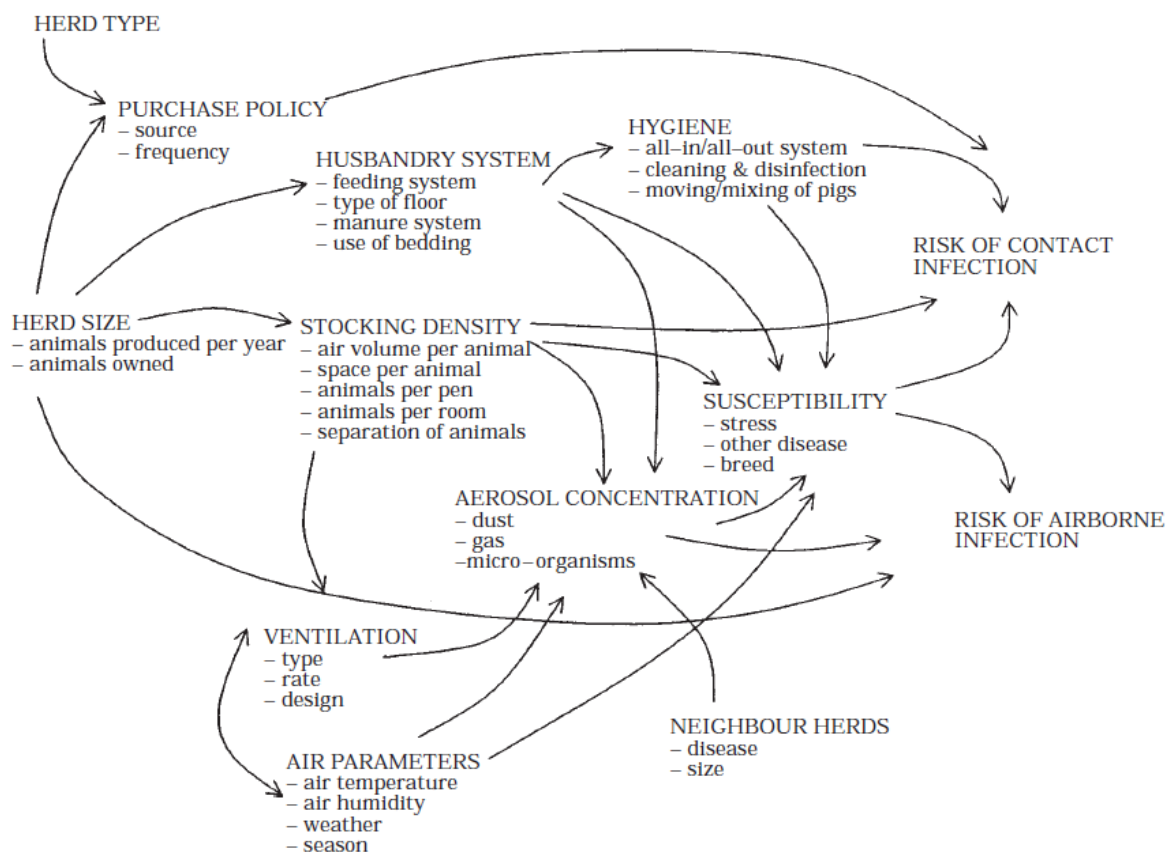
Onderzoek heeft aangetoond dat biggen die met oxytetracycline behandeld werden op dag 1, 7 en 14 na de geboorte en bovendien gespeend werden op de leeftijd van 14 dagen, betere productieresultaten behaalden. Deze groep varkens had een lager uitvalspercentage en een hoger slachtgewicht. Bovendien werd *M. hyopneumoniae* niet overgedragen op deze biggen. Bijgevolg was er later minder medicatie vereist bij de gespeende biggen, wat financiële voordelen met zich meebrengt. Op deze manier kan tevens de gezondheidsstatus van latere generaties verbeterd worden, zonder dat dieren hierbij geëlimineerd moeten worden (Dee, 1994).

#### *C. Opvolgen van dieren*

Een goede inspectie van de dieren gedurende de productie is een essentieel onderdeel van de controle van *M. hyopneumoniae*. Gezien de lange incubatietijd, het groot aantal subklinisch geïnfecteerde dieren en de vaak vage symptomen is het noodzakelijk de dieren nauwkeurig op te volgen. Indien in het slachthuis kenmerkende longlesies worden opgemerkt, moeten controlemaatregelen genomen worden. Bevindingen in het slachthuis kunnen dus een idee geven over het effect van de toegepaste controlemaatregelen op het bedrijf (Heinonen et al., 2001). Het infectiepatroon op het bedrijf heeft namelijk een invloed op het percentage aangetaste dieren en de leeftijd waarop ze geïnfecteerd worden. Dit wordt frequent nagegaan d.m.v. serologisch onderzoek. Hierbij worden er serumantistoffen opgespoord. Onder praktijkomstandigheden kan het echter 3 tot 8 weken duren alvorens een serologische respons optreedt, niet alle dieren seroconverteren na infectie en de interpretatie is ook moeilijker indien er gevaccineerd wordt. De uitslagen van serologische testen moeten kritisch geïnterpreteerd worden (Haesebrouck et al., 2004).

#### D. Preventie van andere ziektes

Bedrijven die weinig aandacht besteden aan ziekte-insleep en controle van andere respiratoire aandoeningen hebben relatief meer kans om geïnfecteerd te worden met *M. hyopneumoniae* t.o.v. bedrijven die dit wel doen. Een goede bestrijding kan het verloop en/of de ernst van de infectie beperken. Andere respiratoire aandoeningen bestaan zowel uit parasitaire, bacteriële en virale infecties. Zo zal een goede ontworming van de varkens resulteren in minder infecties met *Ascaris suum*. De migrerende larven van *A. suum* kunnen ernstige lesies veroorzaken in het ademhalingsstelsel waardoor varkens gevoeliger worden voor secundaire infecties. Hetzelfde geldt voor verschillende andere respiratoire pathogenen, bijvoorbeeld PRRSV, PCV-2, influenza en *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Jolie et al., 1998; Bochev et al., 2008). Een hoge prevalentiegraad van andere respiratoire aandoeningen kan het gevolg zijn van het gebrek aan diergeneeskundige controle en bedrijfsbegeleiding. Dit is echter een risicofactor die moeilijk te onderzoeken en kwantificeren is. De dierenarts kan namelijk zowel preventief als curatief een bijdrage leveren tot de bestrijding van EP.



**Fig. 4:** Schematische illustratie van verschillende risicofactoren met een invloed op de preventie en controle van respiratoire infecties bij varkens (uit Stärk, 2000).

### 2.5.1.3. Antibiotica

Antibiotica onderdrukken of verminderen de klinische symptomen en verminderen het aantal secundaire infecties. Hierdoor kunnen de geïnfecteerde varkens vaak zonder vertraging de opfok- en afmestfase doorlopen (Bargen, 2002). De antibiotica worden dikwijls via het water of via de voeding toegediend. Dit kan zowel profylactisch, metafylactisch als curatief. Ook al resulteert toediening van antibiotica niet altijd in een volledige bescherming tegen of eradicatie van de infectie, toch is deze methode minder arbeidsintensief dan het individueel vaccineren met de huidige vaccins. Een nadeel van deze massatoediening is echter dat er een verhoogd risico bestaat op ontwikkeling van resistentie bij *M. hyopneumoniae* en andere pathogenen. Dit is zeker het geval bij oraal opgenomen antibiotica, aangezien deze vaak ondergedoseerd worden toegediend (Timmerman et al., 2006). Verworven antimicrobiële resistentie komt voor bij *M. hyopneumoniae*, maar vormt tot dusver nog geen duidelijke problemen voor de behandeling (Kobisch en Friis, 1996) (zie tabel 2). Bij herhaaldelijk en/of overmatig gebruik van antibiotica verhoogt het risico dat er na slachting residuen van antimicrobiële middelen worden teruggevonden in de karkassen (Maes et al., 2008).

De meest gebruikte antibiotica tegen *M. hyopneumoniae* zijn de antibiotica die behoren tot de klasse van de tetracyclines en de macroliden. Tot de klasse van de macroliden behoren onder andere tilmicosine en acetylisovaleryl-tylosine (Inamoto et al., 1993). Chloortetracycline, oxytetracycline en tylosine verminderen de klinische symptomen, maar sommige stammen van *M. hyopneumoniae* vertonen resistentie tegen deze antibiotica. Tegen chloortetracycline werd een zeer hoge frequentie van resistentie beschreven (Inamoto et al., 1993; Hannan et al., 1997). Dit is echter wellicht te wijten aan het feit dat chloortetracycline niet stabiel blijft tijdens de *in vitro* testen, waardoor de resultaten niet betrouwbaar zijn.

Fluoroquinolones zoals enrofloxacin en marbofloxacin worden voornamelijk frequent gebruikt bij jonge biggen. Er werd echter reeds resistentie (verkregen door genmutaties) aangetoond tegen deze antibiotica, waardoor *M. hyopneumoniae* in staat is na infectie te persisteren ter hoogte van het ademhalingsstelsel en dit ondanks een goede penetratie van deze antibiotica tot in de trachea en het tracheaal secreet (Le Carrou et al., 2006). Pleuromutilines, zoals tiamuline en valnemuline, zijn zeer effectief in de bestrijding van *M. hyopneumoniae*. Bovendien werd er slechts een minimale resistentieontwikkeling bemerkt *in vitro* tegen deze pleuromutilines (Hannan et al., 1997). Een ander effectief antibioticum is bijvoorbeeld lincomycine (Inamoto et al., 1993).

Antibiotica die de aanmaak of het metabolisme van de celwand van de bacterie aantasten, zoals de  $\beta$ -lactams (bijvoorbeeld penicillines en cephalosporines), zijn helemaal niet werkzaam tegen *M. hyopneumoniae* aangezien deze geen celwand heeft (Wu et al., 1997).

**Tabel 2:** Tabel met de minimale inhibitorische concentraties van verschillende antibiotica voor de behandeling tegen *M. hyopneumoniae*. Cephalosporines en penicilines zijn niet werkzaam tegen *M. hyopneumoniae* aangezien deze geen celwand heeft. Sommige stammen vertonen reeds een hoge graad van resistentie tegen o.a. tylosine (Uit Wu et al., 1997).

MICs of 12 antibiotics (µg/mL) versus <i>M. hyopneumoniae</i>																
Antibiotic	Isolate	P232	P5429	P2057	13359-4	P2218	P4713	P5456	P7331	P10617-2	P11796-1/a	P5215-1	P12536	P11796-1/b	P1170	
	CCU/mL	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	
Enrofloxacin		1	0.5	1	0.06	2	2	>4	1	1	1	2	1	1	1	
Ceftiofur		>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	
Ampicillin		>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	
Tilmicosin		≤0.25	4	>32	8	8	1	1	0.5	0.5	≤0.25	0.5	2	≤0.25	≤0.25	
Tylosin		≤0.5	>64	16	64	>64	>64	>64	>64	>64	16	64	>64	32	>64	
Erythromycin		0.25	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	≤0.25	>16	8	4	
Lincomycin		≤0.25	1	>32	0.5	1	0.5	0.5	0.5	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	≤0.25	≤0.25	
Spectinomycin		≤1	8	4	2	2	2	2	2	2	2	4	16	2	2	
Apramycin		0.5	8	4	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4	
Gentamicin		≤0.5	2	1	≤0.5	1	1	1	≤0.5	1	2	≤0.5	1	1	1	
Tetracycline		≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0.5	≤0.5	≤0.5	
Trimethoprim/ Sulfa		ND	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	16/ 304	>16/ >304	>16/ >304	>16/ >304	

## 2.5.2. Vaccinatie

### 2.5.2.1. Huidige vaccinatiestrategie

Door het meer en meer streven naar een verminderd en een meer verantwoord gebruik van antibiotica is men steeds meer belang gaan hechten aan de preventie van de ziekte, bijvoorbeeld door vaccinatie (Fagan et al., 1997). Vaccinatie is een kosten-effectieve methode ter controle van *M. hyopneumoniae* (Chen et al., 2001; Jones et al., 2005). Tegenwoordig wordt ongeveer 70 procent van de varkenspopulatie gevaccineerd tegen *M. hyopneumoniae* (Feng et al., 2013). Na vaccinatie met een commercieel vaccin ondergaat 30 tot 100 procent van de dieren een seroconversie (Martelli et al., 2006).

Het besluit om te vaccineren en wanneer is afhankelijk van verscheidene factoren, welke sterk kunnen verschillen van bedrijf tot bedrijf en hun productiemanagement. Enkele factoren waarmee men kan (moet) rekening houden zijn o.a.: aanwezigheid en infectiedruk van *M. hyopneumoniae* op het bedrijf en in de omgeving, impact van respiratoire aandoeningen, dagelijkse gewichtstoename en mortaliteitspercentage tussen spenen en slachten. De efficiëntie van vaccinatie is afhankelijk van onder andere het vaccinatieschema, het bedrijfsmanagement en het vaccin zelf (Sibila et al., 2007b). Maes et al. (2003) hebben aangetoond dat vaccinatie tegen *M. hyopneumoniae* in de meeste geïnfecteerde bedrijven rendabel is. Men ziet de beste resultaten in bedrijven met een hoge infectiedruk, wellicht omdat de ziekte dan meer schade teweegbrengt en er dus een grotere mogelijkheid bestaat tot verbetering (Maes et al., 2003). Vaccinatie van varkens kan leiden tot economische voordelen zoals een betere voederconversie, minder klinische symptomen en longlesies, een gedaalde mortaliteit en een betere vleeskwiteit (Haesebrouck et al., 2004). Dieren gevaccineerd met commerciële vaccins hebben een significant hogere dagelijkse gewichtstoename

ten opzichte van niet-gevaccineerde dieren van dezelfde leeftijd. Studies vermelden een gemiddeld verschil van 21 tot 37 g per dag. Hierdoor wordt het slachtgewicht sneller bereikt (Jensen et al., 2002). Men raadt aan een serologische studie uit te voeren binnenin het bedrijf om zo het meest geschikte tijdstip te bepalen waarop men de varkens kan vaccineren. Zo krijgt men ook een zicht op de immunologische status van de zeugen aanwezig op het bedrijf (Bochev, 2008).

Men kan verschillende vaccinatieschema's toepassen. Bij de keuze van vaccinatieschema houdt men rekening met de infectiedruk van *M. hyopneumoniae* op het bedrijf en het soort productiesysteem waarin de varkens gehouden worden. Vroeger werden biggen steeds tweemaal gevaccineerd met commerciële vaccins. Later werd ook een systeem met slechts een éénmalige vaccinatie gecommercialiseerd. Dit is minder arbeidsintensief voor de veehouder en minder stresserend voor de varkens (Baccaro et al., 2005; Sibila et al., 2007b). Wanneer de infecties op het bedrijf voornamelijk tijdens de vroege productiefasen (bijvoorbeeld in de biggen- of voormeststal) voorkomen, worden de biggen vaak voor de leeftijd van 3 weken tweemaal gevaccineerd. Een éénmalige vaccinatie van biggen ouder dan 3 weken blijkt een gelijkaardige bescherming te bieden. Gebeurt de infectie later (bijvoorbeeld in de afmestfase op een all-in/all-out varkensbedrijf), dan zou de vaccinatie ook op een latere leeftijd kunnen toegepast worden. Echter, het tijdstip van infectie kan variëren tussen opeenvolgende groepen binnen eenzelfde bedrijf. Daarom worden de biggen meestal gevaccineerd op jonge leeftijd nl. in de kraamstalperiode. Voordelen van vaccinatie worden pas zichtbaar enkele maanden na de start van het vaccinatieprogramma, waardoor deze gedurende een aanzienlijke tijd aangehouden moet worden. Een aanhoudende vaccinatie van alle dieren is bovendien gunstig om uiteindelijk een uniforme immuunstatus te krijgen binnen de groep varkens aanwezig op het bedrijf. Dit gebeurt echter minder effectief wanneer slechts een deel van de biggen gevaccineerd wordt op een bedrijf (Maes et al., 2003; Haesebrouck et al., 2004; Sibila et al., 2007b). Na vaccinatie wordt er tevens een snellere seroconversie en hoger aandeel seropositieve dieren waargenomen ten opzichte van een natuurlijke infectie, en dit zowel bij een enkele als dubbele vaccinatie. In de praktijk gebeurt de seroconversie na natuurlijke vaccinatie vrij traag, meer bepaald tijdens de voormest- en afmestfase (Sibila et al., 2007b).

#### 2.5.2.2. Effect van vaccinatie op transmissie van *M. hyopneumoniae*

##### A. Effect op de horizontale transmissie

De huidige, conventionele vaccins (bacterins) kunnen het varken niet beschermen tegen infectie en kolonisatie door *M. hyopneumoniae*, noch kunnen ze de kiem elimineren uit dragers. Meyns et al. (2006) hebben aangetoond dat er geen significant verschil bestaat in de transmissie tussen gevaccineerde varkens en niet-gevaccineerde varkens onderling. Er is geen significant verschil in de mate van transmissie tussen hoog- en laagvirulente stammen (Meyns et al., 2004). Men heeft vastgesteld dat in de biggenstal één geïnfecteerd, gespeend big gemiddeld één ander big zal infecteren met *M. hyopneumoniae*. Bij gevaccineerde dieren worden na infectie echter minder

klinische symptomen opgemerkt, zijn er minder longletsels en is er een verbetering van de groei en voederconversie (Bargen, 2004; Haesebrouck et al., 2004; Bochev, 2008).

### *B. Effect op de verticale transmissie*

Om de verticale overdracht van *M. hyopneumoniae* tussen zeugen en hun biggen te verhinderen, kan men de zeugen vaccineren. Via het colostrum van gevaccineerde zeugen worden naast antistoffen ook functionele, antigeen-specifieke T-cellen overgedragen aan biggen. Deze cellen maken bijgevolg actief deel uit van de neonatale immuunrespons en reduceren het risico op infectie van *M. hyopneumoniae* (grosse Beilage et al., 2005). Hoe hoger de antistoffentiter in het colostrum van de zeug, hoe hoger de initiële antistoffentiter zal zijn in het serum van de zogende biggen en bijgevolg hoe langer deze antistoffen zullen persisteren (T<sub>1/2</sub> verandert echter niet) (Morris et al., 1994). Deze biggen testen minder vaak positief voor *M. hyopneumoniae* op het tijdstip van spenen en vertonen minder (ernstige) lesies in de longen na het slachten (Bandrick et al., 2008). De passief verworven immuniteit, afkomstig van het colostrum van de zeug, heeft bij vaccinatie van biggen van 1 week oud, geen of een minimaal effect op de opbouw van een actieve immuunrespons die werd geïnduceerd door vaccinatie. De serologische status van de zeugen heeft dus weinig invloed op de opbouw van een beschermende immuunrespons in vroeg gevaccineerde biggen (Martelli et al., 2006). Er kan wel een lagere serologische respons optreden wanneer biggen met maternale antistoffen gevaccineerd worden. Dit is waarschijnlijk te wijten aan een beperkte interferentie met de maternale antistoffen. Dit wordt niet of minder opgemerkt bij vaccinaties op 4 en 8 weken (grosse Beilage et al., 2005). Het ideale tijdstip waarop men de biggen op het bedrijf moet vaccineren, is afhankelijk van de voordelen van de uitgestelde vaccinatie en de noodzaak om een immuniteit op te bouwen tegen *M. hyopneumoniae* vooraleer het dier er wordt aan blootgesteld. Het effect van een vaccinatie is namelijk het grootst wanneer de biggen immuniteit hebben opgebouwd alvorens ze worden blootgesteld aan het pathogeen (Martelli et al., 2006). De antistoffentiter is echter slechts deels indicatief voor de bescherming tegen *M. hyopneumoniae* (Haesebrouck et al., 2004). Deze antistoffen bieden namelijk geen volledige bescherming. Biggen van zowel seronegatieve als seropositieve zeugen kunnen nog steeds geïnficeerd worden met *M. hyopneumoniae* (Sibila et al., 2007a). Vaccinatie van de zeugen wordt in de praktijk weinig toegepast (Martelli et al., 2006).

### 2.5.2.3. Ontwikkeling van nieuwe vaccins

#### 2.5.2.3.1. Inleiding

De geregistreerde en wettelijk toegelaten vaccins bestaan uit volledig geïnactiveerde *M. hyopneumoniae* cellen (bacterins). Sinds 2007 is in China een vaccin toegelaten dat een geattenueerde, levende stam (168) van *M. hyopneumoniae* bevat. De cultivatie van *M. hyopneumoniae*, die vereist is voor de ontwikkeling van de vaccins, en het conventionele intramusculair toedienen van deze vaccins, zijn tijdrovend en arbeidsintensief. Gezien het economisch belang van de preventie van EP, wordt echter steeds verder gezocht naar nieuwe, betere vaccins en

alternatieve toedieningswegen ter bescherming tegen *M. hyopneumoniae*. (Chen et al., 2003; Feng et al., 2013). Hierbij streeft men naar een vaccin dat de kolonisatie van het gecilieerde longepitheel verhindert d.m.v. inductie en stimulatie van zowel de humorale als de cellulaire immuniteit, en dit via toediening langs een efficiënte en meer praktische toegangsweg (Fagan et al., 2001). Zo werden bijvoorbeeld subunit-, vector- en DNA-vaccins ontwikkeld en onderzocht. Men testte hiervoor reeds verscheidene antigenen die mogelijk in aanmerking zouden kunnen komen als vaccincomponent. De testen leverden erg uiteenlopende resultaten op. Het is namelijk nog niet volledig duidelijk hoe en welke antigenen een prominente rol spelen in de specifieke afweer tegen *M. hyopneumoniae*. Verder onderzoek naar de interacties tussen *M. hyopneumoniae* en het varken kan een bijdrage leveren tot de selectie van kandidaat antigenen, geschikt voor de ontwikkeling van een nieuwe vaccin. Dit geldt ook voor de (anti)genen die verantwoordelijk zijn voor het verschil in virulentie tussen verschillende stammen (Fagan et al., 1997; Haesebrouck et al., 2004). Daarnaast werden alternatieve toedieningswijzen onderzocht, bijvoorbeeld door varkens te vaccineren via het voeder, met behulp van aerosolen of via subcutane, intradermale, intrapulmonaire of intraperitoneale injectie. Naast de samenstelling van het vaccin en de soort *M. hyopneumoniae* stam die deze bevat, kan de toedieningsweg namelijk ook een invloed hebben op de soort immuunrespons die geïnduceerd wordt na vaccinatie (Chen et al., 2008).

#### 2.5.2.3.2. Soorten nieuwe vaccins

##### SUBUNIT VACCINS

Bij subunit vaccins wordt slechts een beperkt aantal immunogene antigenen tot expressie gebracht. Dit in tegenstelling tot de conventionele bacterins, waarbij de volledige *M. hyopneumoniae* kiem geïnactiveerd wordt. Deze vaccins kunnen op twee manieren ontwikkeld worden. Ten eerste kan men de bacterie eerst cultiveren en daarna in verschillende fragmenten onderverdelen. Daarnaast kan men de gewenste antigenen bekomen door middel van DNA recombinatie, deze vaccins worden 'recombinant subunit vaccins' genoemd. Reeds verschillende testen werden uitgevoerd met dergelijke vaccins. King et al. (1996) onderzochten de immuunrespons bij varkens na vaccinatie met een recombinant subunit vaccin dat het adhesine P97 tot expressie bracht. Dit resulteerde echter niet in een significante bescherming.

##### VECTOR VACCINS

Een andere klasse van alternatieve vaccins die men heeft ontwikkeld en getest, is die van de vector vaccins. Hierbij wordt genetisch materiaal van *M. hyopneumoniae* zo getranslokaliseerd dat deze als immunogeen tot expressie wordt gebracht door een bepaalde vector. Dergelijke (levende) vectoren zijn in staat een sterke immuunrespons te induceren. Zo zullen (facultatief) intracellulaire, bacteriële vectoren (bijvoorbeeld *Listeria monocytogenes*) zorgen voor de inductie van zowel een humorale als een celgemedieerde immuunrespons. Bovendien is de productie van dit soort vaccins goedkoper ten opzichte van de conventionele vaccins (Shimaji et al., 2003). Verscheidene antigenen werden reeds

gecombineerd met diverse vectoren, bijvoorbeeld *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* (bijvoorbeeld het hittelabele enterotoxine), *Erysipelothrix rhusiopathia* en *Pseudomonas* (exotoxine) (Fagan et al., 1996 en 1997; Chen et al., 2001; Conceicao et al., 2006). Zo werd NrdF reeds gerecombineerd met *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium en  $\beta$ -galactosidase. NrdF speelt een belangrijke rol in de DNA-synthese van *M. hyopneumoniae*. Vector vaccins kunnen via verschillende wegen worden toegediend. Het vector vaccin met *E. coli* en *Salmonella* Typhimurium werd oraal toegediend aan muizen en induceerde een sterke stijging van mucosale IgA's in het ademhalingsstelsel (Fagan et al., 1997). NrdF werd in combinatie met  $\beta$ -galactosidase intramusculair toegediend aan varkens, wat resulteerde in een sterke reductie van de longpathologie (Fagan et al., 2001). Het C-terminale uiteinde van P97 werd gerecombineerd door Shimoji et al. (2003) met een geattenuerde *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 en intranasaal toegediend. De vaccinatie resulteerde bij varkens in een significante daling van de ernst van de longlesies na infectie met *M. hyopneumoniae*. Okamba et al. (2007) incorporeerden ditzelfde antigeen in een adenovirus (niet meer in staat om te repliceren), dat intranasaal en intramusculair werd toegediend aan muizen. Er was een sterke stijging van antigeenspecifieke antistoffen zichtbaar. Men mag hier echter niet zomaar uit besluiten dat deze aanleiding geven tot een significante bescherming tegen een infectie met *M. hyopneumoniae*. Het induceren van een immunerespons in muizen of zelfs varkens wil namelijk nog niet zeggen dat er een beschermende immuniteit wordt opgebouwd. Verder onderzoek is dus vereist.

## DNA VACCINS

DNA vaccins bevatten een deel van het DNA van *M. hyopneumoniae*, meer bepaald een gen dat codeert voor een antigeen waartegen men wilt vaccineren. Er werd aangetoond dat DNA-vaccins in staat zijn om zowel een cellulaire als een humorale immunerespons te induceren en te stimuleren (Gurunathan et al., 2000). Het genoom van *M. hyopneumoniae* werd gescreend om genen, coderend voor bepaalde antigenen, te identificeren, te klonen en te testen als potentieel onderdeel van een DNA-vaccin (Fagan et al., 1996). Enkele van deze antigenen die in aanmerking komen als potentiële componenten van DNA-vaccins zijn: P36, P46, P97, P97R1 en NrdF (Futo et al., 1995; Hsu et al., 1997; Chen et al., 2008). Deze genen, met uitzondering van P97R1, zijn namelijk sterk geconserveerd binnen verschillende *M. hyopneumoniae* stammen. Zo kunnen dieren d.m.v. kruisbescherming immuniteit opbouwen tegen verschillende stammen, ook al werden de dieren met slechts één stam gevaccineerd. Verschillende van deze geïdentificeerde genen kunnen gecombineerd worden in een recombinant plasmide, waardoor het gevaccineerde dier meteen geïmmuniseerd wordt tegen verschillende antigenen van *M. hyopneumoniae*. Vaccins die meerdere antigenen (of genen die coderen voor deze Ag) bevatten, bieden een completere bescherming dan wanneer gevaccineerd wordt met één afzonderlijk antigeen, welke vaak slechts een gedeeltelijke bescherming biedt. DNA-vaccins kunnen oraal, intramusculair of subcutaan worden toegediend (Chen et al., 2008). Verschillende DNA-vaccins kunnen via eenzelfde toedieningsweg andere soorten immuneresponsen induceren, afhankelijk van het antigeen. Zo toonde Chen et al. (2008) aan dat na intramusculaire vaccinatie met een DNA-vaccin vaak een sterke Th1-gepolariseerde immunerespons geïnduceerd wordt. Chen et al. (2003) testten ook een DNA-vaccin waarbij het heat shock protein P42 tot expressie



werd gebracht. Dit proteïne induceerde daarentegen een immuunrespons van zowel Th1- als Th2-cellen, een proliferatie van antigeen-specifieke mononucleaire cellen in de milt en inhibeerde de groei van *M. hyopneumoniae* (Chen et al., 2003; Dhama et al., 2008).

#### 2.5.2.4. Alternatieve toedieningswijzen

Naast het soort vaccin dat gebruikt wordt, is ook de wijze van toedienen van belang voor het effect van de vaccinatiestrategie. Hieronder zullen enkele alternatieve (experimentele) toedieningswegen toegelicht worden.

##### 2.5.2.4.1. Oraal

Vector vaccins kunnen onder andere oraal toegediend worden. Orale vaccinatie van muizen met een vector vaccin waarin NrdF tot expressie werd gebracht door *Salmonella* Typhimurium, leidde tot een significante stijging van IgA in de pulmonaire mucosa. Dit vaccin induceerde namelijk een immuunrespons ter hoogte van de intestinale mucosa, meer bepaald t.h.v. de Peyerse platen (Fagan et al., 1997). Later werd deze orale vaccinatie herhaald bij varkens (Fagan et al., 2001). Lin et al. (2003) testten een vaccin uit, geïncorporeerd in microcapsules, dat oraal aan varkens toegediend werd. Hierdoor werd een significant verschil gezien tussen de ernst van de longlesies van gevaccineerde dieren en deze van niet-gevaccineerde dieren.

##### 2.5.2.4.2. Via aerosol

Het gebruik van aerosolen als toedieningsweg voor vaccins werd nog niet veel toegepast bij varkens, in tegenstelling tot pluimvee. Binnen deze laatste soort vaccins kan men twee groepen vaccins onderscheiden: diegene die een geïnactiverde stam van *M. hyopneumoniae* bevatten, en deze die een geattenueerde vorm bevatten. Murphy et al. (1993) testten de immuunrespons bij varkens na aerogene vaccinatie met een geïnactiverde stam. Dit vaccin bleek echter geen significant betere bescherming te bieden tegen *M. hyopneumoniae* ten opzichte van de niet-gevaccineerde dieren. Feng et al. (2013) ontwikkelden een vaccin dat een geattenueerde vorm van *M. hyopneumoniae* bevatte. Na aerogene toediening was dit vaccin in staat zeer snel immuniteit te induceren bij de gastheer. Deze intrapulmonair toegediende vaccins stimuleerden zowel de lokale afweer ter hoogte van het ademhalingsstelsel als de systemische afweer. De stimulatie was zowel zichtbaar in de cellulaire als humorale immuunrespons. Zo werd 14 dagen na inoculatie van het vaccin een verhoogde concentratie sIgA opgemerkt in de nasale swabs van de gevaccineerde varkens. Verder onderzoek moet verricht worden omtrent de optimale vaccinatiedosis, aerosoldiameter en omgevingsfactoren die deze aerosolen kunnen beïnvloeden.

#### 2.5.2.4.3. Nasaal

Intranasale vaccinatie van varkens met een vector vaccin op basis van *Erysipelothrix rhusiopathiae* resulteerde in significant minder ernstige longlesies ten opzichte van de niet-gevaccineerde controlegroep (Shimoji et al., 2003).

#### 2.5.2.4.4. Intraperitoneaal

Een geïnactiveerd vaccin werd intraperitoneaal geïnjecteerd bij varkens door Sheldrake et al. (1991). Gedurende de eerste 30 dagen na vaccinatie was er een duidelijke groeiachterstand te zien bij de gevaccineerde groep. Deze achterstand werd later echter gecompenseerd door een versnelde groei ten opzichte van de niet-gevaccineerde dieren. Bij autopsie waren duidelijk minder ernstige letsels te zien ter hoogte van het ademhalingsstelsel bij de gevaccineerde dieren. Soortgelijke resultaten werden gezien na vaccinatie met een ander adjuvans (Ciprian et al., 1994).

#### 2.5.2.4.5. Subcutaan

Chen et al. (2008) injecteerden muizen subcutaan met DNA- en proteïnevaccins (en combinaties van beide) die verscheidene antigenen bevatten. Hierbij werd een zeer sterk wisselende immuniteit verkregen. De immuunrespons was onder andere afhankelijk van het soort vaccin en het specifieke antigeen.

#### 2.5.2.4.6. Intradermaal

Jones et al. (2005) hebben aangetoond dat intradermale vaccinatie van varkens met een bacterin een efficiënt alternatief kan betekenen ten opzichte van de huidige intramusculaire toediening. Intradermale vaccinatie is in staat een snelle en effectieve bescherming bij jonge biggen te induceren tegen EP. Dit is deels te danken aan het hoge vetgehalte in het plasmamembraan van *M. hyopneumoniae*, wat zorgt voor een goede verdeling in de huid. Ontsmetting of andere voorbereidingen van de huid waren niet nodig. Deze bescherming start via stimulatie van zowel de celgemedeerde als mucosale immuniteit via antigeen-presenterende, dendritische cellen aanwezig in de epidermis, welke beide een rol spelen in de afweer tegenover *M. hyopneumoniae*. Dergelijke intradermaal toegediende vaccins induceerden ten opzichte van de conventionele toedieningswijze een hogere antistoffentiter (voornamelijk IgG en IgA in het BAL). Tevens werden significant minder ernstige lesies ter hoogte van de longen en pleuritis vastgesteld na experimentele infectie van *M. hyopneumoniae* (Jones et al., 2005; Tassis et al., 2012). Intradermale vaccinatie resulteerde tevens in een significante daling van de ernst van klinische symptomen en een stijging van de dagelijkse gewichtstoename. Intradermaal toegediende vaccins zijn reeds gecommercialiseerd in o.a. Griekenland, maar nog niet in België (Tassis et al., 2012).

### **3. BESPREKING**

De controlestrategie in de bestrijding tegen *M. hyopneumoniae* bestaat uit een combinatie van een optimale huisvesting, gericht antibioticagebruik en het preventief vaccineren van de varkens. Gezien de stijgende graad van resistentie in sommige stammen van *M. hyopneumoniae* tegen steeds meer verschillende soorten antibiotica, moet men het gebruik van antimicrobiële middelen proberen te beperken. Het optimaliseren van de huisvesting in de varkenshouderij vergt een grote investering. De varkenshouder is echter niet steeds even kapitaalkrchtig, zeker aangezien de winstmarge per varken de laatste jaren steeds kleiner wordt en soms zelfs negatief is. Daarom ben ik ervan overtuigd dat een goede vaccinatiestrategie cruciaal is in de controle van *M. hyopneumoniae* infecties. De huidige geregistreerde vaccins hebben echter enkele nadelen. Het individueel intramusculair vaccineren van de dieren vereist heel wat tijd en arbeid voor de varkenshouder. Daarom wordt er tegenwoordig intensief onderzoek verricht naar betere vaccins.

Er is reeds heel wat onderzoek uitgevoerd naar het effect van alternatieve soorten vaccins en toedieningswegen. Veel van deze onderzoeken hadden positieve resultaten en dit zowel bij onderzoek naar andere soorten vaccins als bij onderzoek naar alternatieve toedieningswegen. Zo werd er een significante verbetering van de bescherming tegen *M. hyopneumoniae* aangetoond na vaccinatie met bepaalde subunit vaccins, vector vaccins en DNA vaccins (Fagan et al., 2001; Okamba et al., 2007; Chen et al., 2008). Daarnaast werden ook gunstige resultaten bekomen via oraal, intranasaal, intraperitoneaal, intradermaal toegediende vaccins en vaccins toegediend via aerosol (Sheldrake et al., 1991; Lin et al., 2003; Shimoji et al., 2003; Jones et al., 2005; Feng et al., 2013). Andere onderzoeken daarentegen resulteerden in geen, een erg wisselvallig en onvoorspelbaar of zelfs een negatief effect op de bescherming tegen een infectie met *M. hyopneumoniae*. Zo kon bij Jones et al. (2005) geen significant verschil aangetoond worden in de dagelijkse gewichtstoename tussen intradermaal gevaccineerde en niet-gevaccineerde varkens. Enkele jaren later werd echter wel een dergelijk verschil aangetoond door Tassis et al. (2012). Er werd tevens geen bescherming opgemerkt na vaccinatie via aerosolen met een geïnactiveerde stam (Murphy et al., 1993). Dit was wel het geval bij het gebruik van een geattenuerde stam (Feng et al., 2013).

Ondanks het wetenschappelijk onderzoek naar het ideale vaccin tegen *M. hyopneumoniae*, is er nog geen beter alternatief vaccin beschikbaar dat de huidige conventionele vaccins in de praktijk kan vervangen. Hetzelfde geldt voor een alternatieve toedieningsweg die het arbeidsintensief intramusculair vaccineren van varkens zou kunnen vervangen en bovendien heel wat tijd uitsparen.

Er wordt nog steeds verder intensief onderzoek verricht, gezien de kosten (onder de vorm van gereduceerd geneesmiddelengebruik en betere productieresultaten) die men zou kunnen uitsparen met behulp van een beter soort vaccin en/of toedieningswijze. Dit is zeker het geval in de varkenshouderij, gezien het groot aantal dieren waarop men potentieel winst kan maken d.m.v. een betere bescherming. Het intramusculair toedienen van de conventionele vaccins is erg arbeidsintensief en tijdrovend, aangezien elk dier individueel gevaccineerd moet worden. Daarom moet men zich in toekomstig onderzoek voornamelijk concentreren op de ontwikkeling van vaccins die

in de praktijk makkelijker toe te dienen zijn aan de varkens. Vaccinatie via aerosolen of via het voeder bieden dit voordeel. Ondanks sommige gunstige, experimentele resultaten met intranasaal, intraperitoneaal, subcutaan en intradermaal toegediende vaccins, beschikt men langs dergelijke wegen niet over de mogelijkheid deze vaccins in één keer aan een grote groep dieren toe te dienen en hierbij heel wat tijd en arbeid te besparen. Hieruit kan men besluiten dat ondanks intensief onderzoek er nog steeds geen volwaardige alternatieven met een praktische meerwaarde gevonden zijn voor de huidige vaccins.

## **4. REFERENTIELIJST**

- Asai T., Okada M., Ono M., Irisawa T., Mori Y., Yokomizo Y., Sato S. (1993). Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 38, 253-260.
- Asai T., Okada M., Ono M., Mori Y., Yokomizo Y., Sato S. (1994). Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44, 97-102.
- Asai T., Okada M., Yokomizo Y., Sato S., Mori Y. (1996). Suppressive effect of bronchoalveolar lavage fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51, 325-331.
- Baarsch M.J., Scamurra R.W., Burger K., Foss D.L., Maheswaran S.K., Murtaugh M.P. (1995). Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 63, 3587-3594.
- Baccaro M.R., Hirose F., Umehara O., Goncalves L.C., Doto D.S., Paixao R., Shinya L.T., Moreno A.M. (2006). Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *Veterinary Journal* 172, 526-531.
- Bai F., Ni B., Liu M., Feng Z., Xiong Q., Xiao S., Shao G. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase 3-activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 155, 155-161.
- Bandrick M., Pieters M., Pljoan C., Molitor T.W. (2008). Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 540-543.
- Bargen L. (2004). A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs. *Canadian Veterinary Journal* 45, 856-859.
- Bernaerts E., Demuyne E., Lenders S., Maertens E., Raes W., Van Buggenhout E., Vuylsteke A. (2012). Varkenshouderij, Landbouwrapport 2012, Landbouw en Visserij. Internetreferentie: [http://lv.vlaanderen.be/nlapps/data/docattachments/varkens\\_lara2012.pdf](http://lv.vlaanderen.be/nlapps/data/docattachments/varkens_lara2012.pdf) (geconsulteerd op 29 maart 2014).
- Blanchard B., Vena M.M., Cavalier A., Le L.J., Gouranton J., Kobisch M. (1992). Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 30, 329-341.
- Bochev I. (2008). Porcine Respiratory Disease Complex- a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 11, 219-234.
- Bogema D.R., Scott N.E., Padula M.P., Tacchi J.L., Raymond B.B.A., Jenkins C., Cordwell S.J., Minion F.C., Walker M.J, Djordjevic S.P. (2011). Sequence TTKF QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 41217-41229.
- Calus D., Maes D., Meyns T., Pasmans F., Haesebrouck F. (2009). *In vivo* virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates does not correlate with *in vitro* adhesion assessed by a microtitre plate adherence assay. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1951-1956.

- Caruso J.P., Ross R.F. (1990). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *American Journal of Veterinary Research* 51, 227-231.
- Chen J.R., Liao C.W., Mao S.J., Weng C.N. (2001). A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: *in vivo* evaluation of specific IgG response in mice and pigs. *Veterinary Microbiology* 80, 347-357.
- Chen Y.L., Wang S.N., Yang W.J., Chen Y.J., Lin H.H., Shiuan D. (2003). Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infection and Immunity* 71, 1155-1160.
- Chen A.Y., Fry S.R., Daggard G.E., Mukkur T.K. (2008). Evaluation of immune responses to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine* 26, 4372-4378.
- Choi C., Kwon D., Jung K., Ha Y., Lee Y.H., Kim O., Park H.K., Kim S.H., Hwang K.K., Chae C. (2006). Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 134, 40-46.
- Ciprian A., Pijoan C., Cruz T., Camacho J., Tortora J., Colmenares G., Lopez-revilla R., de la Garza M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Canadian Journal of Veterinary Research* 52, 434-438.
- Ciprian A., Cruz T.A., de la Garza M. (1994). *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. *Archives of Medical Research* 25, 235-239.
- Citti C., Blanchard A. (2013). *Mycoplasmas* and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology* 21, 196-203.
- Conceicao F.R., Moreira A.N., Dellagostin O.A. (2006). A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 24, 5734-5743.
- DeBey M.C., Roth J.A., Ross R.F. (1993). Enhancement of the increase in intracellular calcium concentration in stimulated neutrophils by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Research Communications* 17, 249-257.
- DeBey M.C. Ross R.F. (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity* 62, 5312-5318.
- Dee S. (1994). Apparent prevention of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in growing pigs with a low-cost modified medicated-early-weaning program. *Swine Health and Production* 2, 7-12.
- Dhama K., Mahendran M., Gupta P.K., Rai A. (2008). DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. *Veterinary Research Communications* 32, 341-356.
- Djordjevic S.P., Eamens G.J., Romalis L.F., Nicholls P.J., Taylor V., Chin J. (1997). Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denaturated membrane antigen pool and adjuvant. *Australian Veterinary Journal* 75, 504-511.
- Fagan P.K., Djordjevic S.P., Eamens G.J., Chin J., Walker M.J. (1996). Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infection and Immunity* 64, 1060-1064.

- Fagan P.K., Djordjevic S.P., Chin J., Eamens G.J., Walker M.J. (1997). Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella* Typhimurium aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). *Infection and Immunity* 65, 2502-2507.
- Fagan P.K., Walker M.J., Chin J., Eamens G.J., Djordjevic S.P. (2001). Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella* Typhimurium aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA responses in the lungs. *Microbial Pathogenesis* 30, 101-110.
- Feng Z., Wei Y., Li G., Lu X., Wan X., Pharr G.T., Wang Z., Kong M., Gan Y., Bai F., Liu M., Xiong Q., Wu X., Shao G. (2013). Development and validation of an attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol vaccine. *Veterinary Microbiology* 143, 410-416.
- Friis N.F. (1974). *Mycoplasmas* in pigs with special regard to the respiratory tract. PhD Thesis. DSR Forlag. Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen.
- Futo S., Seto Y., Mitsuse S., Mori Y., Suzuki T., Kawai K. (1995). Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gen from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *Journal of Bacteriology* 177, 1915-1917.
- Goodwin R.F.W. (1972). The survival of *Mycoplasma suis* pneumoniae in liquid medium, on solid medium and in pneumonic tissue. *Research in Veterinary Science* 13, 203-204.
- Goodwin R.F. (1985). Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Veterinary Record* 116, 690-694.
- grosse Beilage E., Schreiber A. (2005). Impfung von sauen gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* mit Hyoresp®/ Vaccination of sows against *Mycoplasma hyopneumoniae* with Hyoresp®. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 112, 256-261.
- Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application and optimization 18, 927-974.
- Haesebrouck F., Pasmans F., Chiers K., Maes D., Ducatelle R., Decostere A. (2004) Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary Microbiology* 100, 255-268.
- Hannan P.C., Windsor H.M., Ripley P.H. (1997). *In vitro* susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor®), tiamuline and enrofloxacin and the *in vitro* development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Research in Veterinary Science* 63, 157-160.
- Hege R., Zimmerman W., Scheidegger R., Stärk K.D. (2002). Incidence of reinfections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig farms located in respiratory-disease-free regions of Switzerland-identification and quantification of risk factors. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43, 145-156.
- Heinonen M., Gröhn Y., Saloniemi H., Eskola E., Tuovinen V. (2001). The effects of health classification and housing and management of feeder pigs on performance and meat inspection findings of all-in-all-out swine-finishing herds. *Preventive Veterinary Medicine* 49, 41-54.
- Hsu T., Artiushin S., Minion F.C. (1997). Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 197, 1317-1323.
- Hsu T., Minion F.C. (1998). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infection and Immunity* 66, 4762-4766.

- Hurnik D., Dohoo I.R., Bate L.A. (1994). Types of farm management as risk factors for swine respiratory disease. *Preventive Veterinary Medicine* 20, 147-157.
- Ice A.D., Grant A.L., Clark L.K., Cline T.R., Einstein M.E., Diekman M.A. (1997). Health and lean growth performance of barrows reared in all-in/all-out or continuous flow facilities with or without antibiotic. *American Journal of Veterinary Research* 60, 603-608.
- Inamoto T., Takahashi H., Yamamoto K., Nakai Y., Ogimoto K. (1994). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *Journal of Veterinary Medical Science* 23, 239-247.
- Jacques M., Blanchard B., Fiory B., Girard C., Kobisch M. (1992). *In vitro* colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Annales des Recherches Vétérinaires* 23, 239-247.
- Jenkins C., Wilton J.L., Minion F.C., Falconer L. Walker M.J., Djordjevic S.P. (2005). Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesion bind heparin. *Infection and Immunity* 74, 481-487.
- Jensen D., Ersboll A., Nielsen J. (2002). A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 54, 265-278.
- Jolie R., Bäckström L., Pinckney R. (1998). Ascarid infection and respiratory health in feeder pigs raised on pasture or in confinement. *Journal of Swine Health and Production* 6, 115-120.
- Jones G., Rapp-Gabrielson V., Wilke R., Thacker E., Thacker B., Gergen L., Sweeney D., Wasmoen T. (2005). Intradermal vaccination of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 13, 19-27.
- King K.W., Faulds D.H., Rosey E.L., Yancey R.J.Jr. (1997). Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* 15, 25-35.
- Kobisch M., Blanchard B., Portier M., Le Potier M. (1993). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Veterinary Research* 24, 67-77.
- Kobisch M., Friis N.F. (1996). Swine mycoplasmoses. *Revue Scientifique et Technique* 15, 1569-1605.
- Kwon D., Choi C., Chae C. (2002). Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Veterinary Pathology* 39, 584-587.
- Lebret B., Meunier-Salaun C., Foury A., Mormede P., Dransfield E., Dourmad J.Y. (2006). Influence of rearing conditions on performance, behavioral, and physiological responses of pigs to preslaughter handling, carcass traits, and meat quality. *Journal of Animal Science* 84, 2436-2447.
- Maes D., Verdonck M., Deluyker H., de Kruif A. (1996). Enzootic pneumonia in pigs. *Veterinary Quarterly* 18, 104-109.
- Maes D., Verbeke W., Vicca J., Verdonck M., de Kruif A. (2003). Benefit to cost of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgian market conditions from 1996 to 2000. *Livestock Production Science* 83, 85-93.
- Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology* 126, 297-309.



- Martelli P., Terreni M., Guazzetti S., Cavarani S. (2006). Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 53, 229-233.
- Mayor D., Zeeh F., Frey J., Kuhnert P. (2007). Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Veterinary Research* 38, 391-398.
- Messier S., Ross R.F., Paul P.S. (1990). Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research* 51, 52-58.
- Meyns T., Maes D., Dewulf J., Vicca J., Haesebrouck F., de Kruif A. (2004). Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Preventive Veterinary Medicine* 66, 265-275.
- Meyns T., Dewulf J., de Kruif A., Calus D., Haesebrouck F., Maes D. (2006). Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 24, 7081-7086.
- Meyns T., Maes D., Calus D., Ribbens S., Dewulf J., Chiers K., de Kruif A., Cox E., Decostere A., Haesebrouck F. (2007). Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Veterinary Microbiology* 120, 87-95.
- Minion F.C., Lefkowitz E.J., Madson M.L., Clearly B.J., Swartzell S.M., Mahairas G.G. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of Bacteriology* 186, 7123-7133.
- Morris C., Gardner I., Hietala S., Carpenter T., Anderson R., Parker K. (1994). Persistence of passively acquired antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Preventive Veterinary Medicine* 21, 29-41.
- Morrison R.B., Pijoan C., Hilley H.D., Rapp V. (1985). Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 49, 129-137.
- Muneta Y., Minagawa Y., Shimoji Y., Ogawa Y., Hikono H., Mori Y. (2008). Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Veterinary Medical Science* 70, 1065-1070.
- Murphy D., Van Alstine W.G., Clark L.K., Albregts S., Knox K. (1993). Aerosol vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *American Journal of Veterinary Research* 54, 1874-1880.
- Murtaugh I., Foss M. (2002). Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87, 109-121.
- Okamba F.R., Moreau E., Cheikh Saad B.K., Gagnon C.A., Massie B., Arella M. (2007). Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 767-774.
- Park S.C., Yibchok-Anun S., Cheng H., Young T.F., Thacker E.L., Minion F.C., Ross R.F., Hsu W.H. (2002). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infection and Immunity* 70, 2502-2506.
- Pieters M., Pijoan C., Fano E., Dee S. (2009). An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Veterinary Microbiology* 134, 261-266.

- Razin S. (1992). Peculiar properties of *mycoplasmas*: the smallest self-replicating prokaryotes. FEMS Microbiology Letters 100, 423-432.
- Razin S., Yogev D., Naot Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of *mycoplasmas*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 1094-1156.
- Roman A.V., Lukesova D., Novak P., Zizlavsky M. (2006). Biosecurity in pig herds. Agricultura tropica et subtropica 39, 119-124.
- Sarradell J., Andrada M., Ramirez A.S., Fernandez A., Gomez-Villamandos J.C., Jover A., Lorenzo H., Herraes P., Rodriguez F. (2003). A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary Pathology 40, 395-404.
- Sheldrake R.F., Gardner I.A., Saunders M.M., Romalis L.F. (1991) Intraperitoneal vaccination of pigs to control *Mycoplasma hyopneumoniae*. Research in Veterinary Science 51, 285-291.
- Shimoji Y., Oishi E., Muneta Y., Nosaka H., Mori Y. (2003). Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. Vaccine 21, 532-537.
- Sibila M., Nofrarias M., Lopez-Soria S., Segales J., Riera P., Llopart D., Calsamiglia M. (2007a). Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. Veterinary Microbiology 121, 352-356.
- Sibila M., Nofrarias M., Lopez-Soria S., Segales J., Valero O., Espinal A., Calsamiglia M. (2007b). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. Veterinary Microbiology 122, 97-107.
- Sibila M., Bernal R., Torrents D., Riera P., Llopart D., Calsamiglia M., Segales J. (2008). Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. Veterinary Microbiology 127, 165-170.
- Simecka J.W. (2005). Immune responses following *Mycoplasma* infection. In: Blanchard A., Browning G. (Editors), *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. Horizon Biosciences, Norfolk, p. 485-534.
- Simionatto S., Marchioro S.B., Maes D., Dellagostin O.A. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. Veterinary Microbiology 165, 234-242.
- Sorensen V., Ahrens P., Barfod K., Feenstra A.A., Feld N.C., Friis N.F., Bille-Hansen V., Jensen N.E., Pedersen M.W. (1997). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. Veterinary Microbiology 54, 23-34.
- Stärk K. (2000). Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine- A literature review. Veterinary Journal 159, 37-56.
- Suter M., Kobisch M., Nicolet J. (1985). Stimulation of immunoglobulin-containing cells and isotype-specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* in specific-pathogen-free – pigs. Infection and Immunity 49, 615-620.
- Tajima M., Yagihashi T. (1982). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. Infection and Immunity 37, 1162-1169.

- Tassis P.D., Papatsiros V.G., Nell T., Maes D., Alexopoulos C., Kyriakis S.C., Tzika E.D. (2012). Clinical evaluation of intradermal vaccination against porcine enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*). *The Veterinary Record* 170, 261.
- Thacker E.L., Thacker B.J., Young T.F., Halbur P.G. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 18, 1244-1252.
- Thanawongnuwech R., Thacker E.L. (2003). Interleukin-10, interleukin-12, and interferon-gamma levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunology* 16, 357-367.
- Thanawongnuwech R., Thacker B., Halbur P., Thacker E.L. (2004). Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 901-908.
- Timmerman T., Dewulf J., Catry B., Feyen B., Opsomer G., de Kruif A., Maes D. (2006). Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Preventive Veterinary Medicine* 74, 251-263.
- Vasconcelos A.T., Ferreira H.B., Bizarro C.V. (2005). Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology* 187, 5568-5577.
- Vicca J. (2005). Virulence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs. Doctoraatthesis Faculteit Diergeneeskunde, Gent, p.23-26.
- Vranckx K. (2011). *Mycoplasma hyopneumoniae* diversity in pigs. Doctoraatthesis Faculteit Diergeneeskunde, Gent, p.7.
- Wu C., Shryock T., Lin T., Venhuizen M. (1997). Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae* *in vitro*. *Swine Health and Production* 5, 227-230
- Zielinski G.C., Ross R.F. (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *American Journal of Veterinary Research* 54, 1262-1269.
- Zimmerman J.J. (2012). Mycoplasmosis. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. (Editors) *Diseases of Swine*, 10<sup>th</sup> edition. Wiley-Blackwell, Hoboken, p.779-798.