

Polmoniti degli agnelli in territorio Abruzzese: indagini anatomo-istopatologiche ed immunolocalizzazione di *Mycoplasma ovipneumoniae*

Chiara Ettorre⁽¹⁾, Flavio Sacchini⁽¹⁾, Massimo Scacchia⁽¹⁾ & Leonardo Della Salda⁽²⁾

Riassunto

Le principali flogosi delle vie respiratorie inferiori degli ovini sono la polmonite enzootica acuta, causata soprattutto da *Mannheimia haemolytica*, la polmonite enzootica cronica definita "atipica" negli agnelli, il cui agente causale è *Mycoplasma ovipneumoniae* e le flogosi d'origine virale il cui patogeno principale è *Parainfluenzavirus* tipo 3. In questo lavoro è stato effettuato uno studio anatomo-istopatologico sulle flogosi polmonari spontanee di maggior riscontro negli agnelli macellati nel territorio abruzzese, con particolare riguardo alla "polmonite atipica". Al fine di evidenziare un'eventuale correlazione tra gli agenti causali e i pattern di lesione, sono stati eseguiti isolamenti microbiologici, indagini istopatologiche ed immunoistochimiche. Inoltre, i risultati positivi dell'immunolocalizzazione di *M. ovipneumoniae* sono stati messi in relazione a quelli positivi all'isolamento di *Mycoplasma*, per valutare la sensibilità delle due metodiche. L'indagine ha evidenziato che, su 156 campioni analizzati, 31 (19,8%) mostravano il coinvolgimento di *M. ovipneumoniae*, in quanto: in 15 casi (il 9,6% del totale) si è evidenziata positività all'isolamento microbiologico confermata mediante tipizzazione con metodiche biomolecolari; nei restanti 16 casi (10,2% del totale) si è osservata la presenza di lesioni istologiche riferibili a polmonite atipica. Sempre contestualmente ai 31 campioni presi

in esame, 23 (14,7% del totale) hanno manifestato, tramite la tecnica immunoistochimica, positività antigenica nei macrofagi alveolari e nelle cellule giganti. Dai dati ottenuti da questa ricerca emergono la non rara presenza della polmonite enzootica cronica nel territorio abruzzese e l'importanza della metodica immunoistochimica, associata all'isolamento e all'esame anatomoistopatologico, per la diagnosi delle polmoniti causate da *M. ovipneumoniae*; nonché la sua elevata sensibilità dimostrata dall'espressione del segnale antigenico anche in campioni in cui la carica infettante del patogeno era esigua.

Keywords

Agnelli, Immonoistochimica, Istologia, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Parainfluenzavirus* tipo 3, Polmonite.

Introduzione

Le infezioni respiratorie degli animali domestici possono provocare gravi perdite economiche sia per la morte sia per il deprezzamento dell'animale (10).

In particolare negli ovini sono frequenti le patologie respiratorie di cui è difficile chiarire la patogenesi a causa dell'interazione di diversi agenti causali (1, 14, 15), i quali possono dare quadri anatomo-patologici simili. Pertanto di fronte ad una flogosi del

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
m.scacchia@izs.it

(2) Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Piazza A. Moro, 64100 Teramo, Italia

parenchima polmonare occorre effettuare una valutazione clinica, di localizzazione ed accertamento dei caratteri del processo pneumonico, ed eziologica, con identificazione certa dell'agente causale.

Mannheimia haemolytica è il microrganismo maggiormente isolato in corso di polmoniti dell'ovino sia adulto sia degli agnelli ed è, talora in associazione ad agenti virali (PI-3 virus), ritenuto responsabile della pleuro-polmonite fibrinosa acuta. Nelle forme subacute o croniche di questa patologia entra in causa anche *Mycoplasma ovipneumoniae* (10).

Negli agnelli si osserva spesso una forma di polmonite cronica enzootica definita anche non progressiva, proliferativo/interstiziale, o "atipica" in cui concorrono i due microrganismi sopracitati (*M. ovipneumoniae* e *M. haemolytica*) (4, 8).

Questa polmonite colpisce prevalentemente gli animali da 2 a 12 mesi, mostra andamento cronico, i sintomi clinici sono scarsi o assenti e si riscontra prevalentemente negli allevamenti di tipo intensivo (7).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di effettuare uno studio anatomico-istopatologico sulle flogosi polmonari spontanee di maggior riscontro negli agnelli del territorio abruzzese, con particolare riguardo alla polmonite atipica. I risultati di tali indagini sono stati analizzati cercando di individuare una correlazione tra agente patogeno e pattern di lesione, per meglio definire e comprendere i quadri anatomico-istopatologici di polmonite riscontrati. È stata effettuata, inoltre, l'immunolocalizzazione di *Mycoplasma* spp. tramite la metodica immunoistochimica e sono state messe in relazione le varie tecniche diagnostiche al fine di valutarne la sensibilità.

Materiali e metodi

La ricerca è stata articolata in diverse fasi.

Una prima fase, dicembre 2002-aprile 2003, ha comportato il reperimento di campioni con aspetti morfologici riferibili a patologie infettive non parassitarie, per un totale di 156 casi, presso i Macelli di Teramo, Chieti e

L'Aquila, prelevati da agnelli d'età inferiore a 12 mesi.

Dopo l'esame anatomopatologico, i campioni di polmone sono stati suddivisi in due aliquote, una è stata rapidamente inviata all'IZSAM per l'isolamento di micoplasmi ed eventuali agenti batterici e l'altra è stata fissata in formalina tamponata al 10% per gli esami istologici ed immunoistochimici presso la sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Teramo. I prelievi sono stati effettuati da polmoni che presentavano varie lesioni, principalmente ai lobi apicali, medi e cardiaci, riconducibili a processi flogistici, in particolare: aree atelettasiche, di epatizzazione (rossa in caso di una fase acuta e grigia per uno stadio più cronico), aree enfisematose e edematose.

Isolamento

Per l'isolamento di *Manheimia haemolytica* è stato utilizzato l'esame batteriologico standard secondo la procedura operativa standard dell'IZS A&M (SOP) (6).

Per l'isolamento dei micoplasmi è stato impiegato terreno liquido e agarizzato *Mycoplasma Experience*[®], selettivo per micoplasmi. Per il prelievo del parenchima polmonare, i campioni sono stati ottenuti asportando sterilmente una porzione di tessuto di circa 1 cm³ al margine tra parenchima sano e parenchima alterato. Il materiale è stato successivamente sottoposto a disaggregazione meccanica mediante Stomacher[®] utilizzando 10 ml di brodo triptosio. La frazione liquida ottenuta dal materiale disaggregato è stata raccolta, centrifugata per 15 min a 399 × g e filtrata con filtri Millipore 0,45 µm. Un'aliquota, pari a 300 µl di brodo primario e/o di materiale omogenato filtrato, è stata seminata in tre successive diluizioni, di 3 ml di brodo *Mycoplasma Experience*[®]. Ulteriori 100 µl di brodo primario e/o di materiale omogenato filtrato sono stati seminati direttamente su agar in piastre Petri da 5 cm di diametro. L'incubazione e lo studio delle colture sono stati effettuati in accordo con la bibliografia consultata (12). Successivamente i ceppi isolati

sono stati sottoposti a tipizzazione mediante metodo di *polymerase chain reaction* (5).

Istopatologia

Una volta realizzato il prelievo necessario per l'isolamento, i campioni sono stati fissati in formalina tamponata neutra al 10% (soluzione acquosa della formaldeide al 40-50%).

Dai campioni fissati, processati sottovuoto ed inclusi in paraffina sono state ottenute sezioni dello spessore di 5 µm. Tutte le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina (E-E).

Solo per alcuni casi sono state allestite anche le colorazioni Alcian blu-Pas a pH 2,5 per caratterizzare l'abbondante materiale mucoproteinoso a livello alveolare (11), Rosso Congo (Bio-Optica 04-210822) e Arancio di Acridina, (tecnica di Bertalanffy del 1984 modificata da Kerry Beebe 1999) (2) per verificare la composizione di caratteristiche concrezioni lamellari.

Immunoistochimica

Per l'indagine immunoistochimica sono state utilizzate sezioni di campioni con lesioni istologiche potenzialmente causate da *M. ovipneumoniae*, sezioni di campioni positivi all'isolamento di *Mycoplasma* spp. e sezioni di polmone prelevate da altre specie (cane e suino) come controllo della specificità del siero iperimmune impiegato nella prova immunoistochimica.

Le sezioni sono state poste su vetrini polilisinati e collocate in termostato a 37°C, così da permettere un'adeguata adesione del campione. Successivamente è stata adottata la metodica immunoistochimica "Streptavidina-biotina-perossidasi" utilizzando un kit disponibile in commercio (BIOSPA MR*HRP-6100), che prevede l'uso di: *normal goat serum* (NGS, siero di capra non immune), di un anticorpo secondario biotinilato bivalente (*goat anti-mouse and rabbit IgG*) e di un sistema rivelatore con HRP (*horseradish peroxidase*).

Nella metodica impiegata, le sezioni portate all'acqua sono state successivamente incubate in una soluzione di perossido d'idrogeno al 3% in metanolo assoluto per 15' a temperatura ambiente per inibire le perossidasi endogene.

Per quanto riguarda lo smascheramento dei siti antigenici si è ricorso al trattamento enzimatico con una proteasi (Pronase) per 10' in termostato a 37°C. Per ridurre il background è stata effettuata un'incubazione, in camera umida, di 30' con latte scremato in polvere al 5% (13). In seguito i vetrini sono stati riposti nella camera umida per 10' con il *normal goat serum*, anch'esso con proprietà atte ad eliminare le positività aspecifiche. Infine è stato applicato il siero iperimmune di coniglio anti-*M. ovipneumoniae* (gentilmente fornito dal Central Veterinary Laboratory di Weybridge, UK. Il siero, in questa sede, era stato controllato con esito positivo per verificarne la sensibilità e la specificità esaminando i ceppi di *M. ovipneumoniae* e *M. agalactiae*, *putrefaciens*, *arginini* e *cluster mycoides*, mediante la metodica di inibizione della crescita) alla diluizione 1.500 (in una soluzione di latte scremato in polvere al 3%) e lasciato agire alla temperatura di 4°C overnight. Dopo l'eliminazione dell'anticorpo primario, le sezioni sono state incubate con *goat anti-mouse and rabbit IgG* e *horseradish peroxidase*, per 10' ciascuno, in camera umida a temperatura ambiente. Per evidenziare l'avvenuta reazione è stato impiegato un cromogeno, la diaminobenzidina (DAB, SIGMA) sciolta in 100 ml di tris buffer. La soluzione ottenuta è stata filtrata ed è stato aggiunto perossido d'idrogeno all'1% per permettere una reazione di ossido-riduzione. Come colorazione di contrasto è stata utilizzata l'Ematossilina di Papanicolau e quindi è seguito il montaggio con DPX (Fluka).

Risultati

Lesioni anatomopatologiche

Le lesioni maggiormente riscontrate sono state: polmonite interstiziale e aree rossastre di atelettasia, le aree atelettasiche erano accompagnate da pleurite talvolta fibrinosa con fini aderenze fibrose soprattutto nei lobi apicali del polmone. Il parenchima mostrava edema, cianosi con aree rosso porpora che, al taglio, presentavano occasionalmente zone emorragiche.

Si sono osservate aree di consolidamento rosso/bruno o rosso/rosato, particolarmente nelle parti craniali e ventrali dei polmoni; in tali zone si riscontravano aree di necrosi con margini emorragici.

In alcuni casi il tessuto polmonare era caratterizzato da foci necrotici e masse nodulari biancastre diffuse.

Isolamento

L'isolamento microbiologico ha evidenziato la presenza di *Mycoplasma* spp. nel 9,6% dei campioni (15 casi), di questi, 5 casi sono risultati positivi anche all'isolamento di *M. haemolytica*.

La maggior parte dei rimanenti campioni analizzati ha rivelato la presenza di flora microbica aspecifica o sono risultati sterili. I campioni sottoposti alla tipizzazione (15 casi) hanno manifestato positività al *M. ovipneumoniae*.

Istopatologia

Le sezioni osservate hanno rivelato che una lesione comunemente presente era l'atelettasia, nella maggior parte dei campioni sub-pleurica, rilevata in 149 casi (95,5%). In 50 casi (32%) sono state osservate lesioni simili, quali bronchite catarrale, epitelizzazione alveolare, congestione, notevole aumento di macrofagi, neutrofili, plasmacellule ed eosinofili nei setti alveolari e bronchiolari. Si è evidenziato un aumento importante del tessuto linfatico bronco-associato (BALT) in 26 campioni (16,6%) che, a volte, coincideva con la presenza di noduli linfoidi, peribronchiali e perivasali, riscontrati in 10 casi (6,4%). Alcuni campioni, 23 casi (14,7%) (Fig. 1), mostravano le suddette

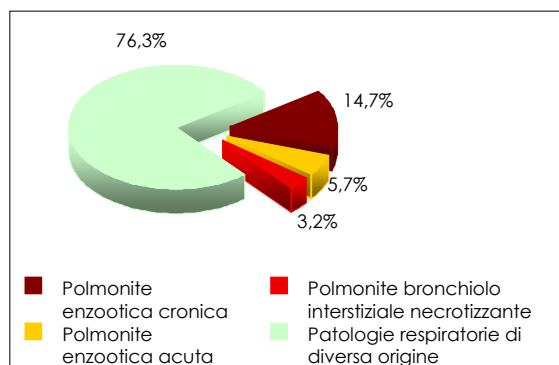


Figura 1
Percentuali patologie respiratorie negli ovini presi in esame

lesioni in associazione ad alveolite desquamativa (Fig. 2), epitelizzazione alveolare e presenza di cellule giganti (Fig. 3). Da queste lesioni si è potuta effettuare una diagnosi di sospetto riferibile alla polmonite atipica degli agnelli causata da *M. ovipneumoniae*.

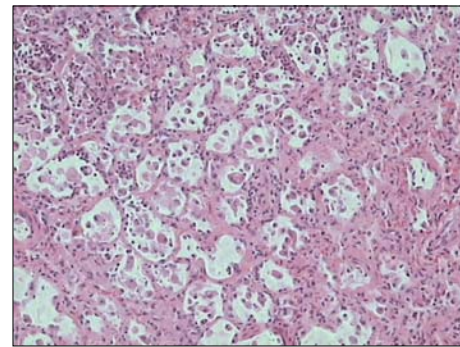


Figura 2
Agnello, polmone
Alveolite desquamativa ed epitelizzazione alveolare (ematossilina-eosina 40x)

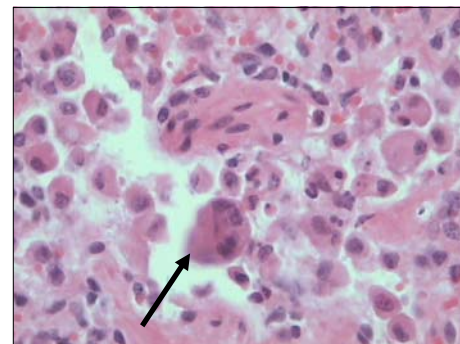


Figura 3
Agnello, polmone
Alveolite desquamativa, macrofagi e cellula gigante (ematossilina-eosina 40x)

Le lesioni osservate nel 5,7% dei campioni (9 casi), rappresentate da polmonite fibrinosa, edema, iperplasia bottonosa della muscolatura liscia a livello bronchiolare e a volte presenza di fibrina a livello alveolare, hanno orientato la diagnosi verso la polmonite enzootica acuta causata da *M. haemolytica*, avvallata anche dall'isolamento di tale patogeno dei campioni presi in esame (Fig. 1). In 5 casi (3,2%) si sono osservate lesioni attribuibili al virus parainfluenzale di tipo 3, caratterizzate da polmonite interstiziale e bronchiolite necrotizzante, associate a notevole aumento

del numero di macrofagi, presenza di cellule giganti sinciziali a livello dei setti alveolari, figure mitotiche nelle cellule dell'epitelio respiratorio e aree necrotiche diffuse. Sono stati osservati campioni che mostravano chiaramente la presenza di polmonite verminosa, con aumento del numero di granulociti eosinofili, emorragia, iperemia, concrezioni nodulari di materiale calcificato e, alle volte, granulomi parassitari e presenza di larve di strongili nei bronchi (19 casi, 12%). Si è sospettato, in 2 casi (1,3%), la presenza del *Corynebacterium pseudo-tuberculosis*, infatti si sono potute osservare le lesioni tipiche di tale patogeno, quali reazione infiammatoria, caratterizzata da cellule epitelioidi, linfociti e plasmacellule, attorno ad una zona centrale di detriti purulento-necrotici, congestione, atelettasia, bronchite catarrale, proliferazione connettivale e iperplasia del BAL. In un campione (0,65%) si è visto mucoproteinosi alveolare (meglio evidenziata dalla colorazione Alcian blue-Pas) (Fig. 4) bronchite catarrale-purulenta, infiltrato lifoplasmacellulare, granulociti neutrofili, macrofagi schiumosi, edema a livello alveolare, epitelizzazione alveolare e congestione. Una piccola percentuale di campioni (1,9%, 3 casi) hanno manifestato la presenza di concrezioni lamellari di materiale proteico, chiamate

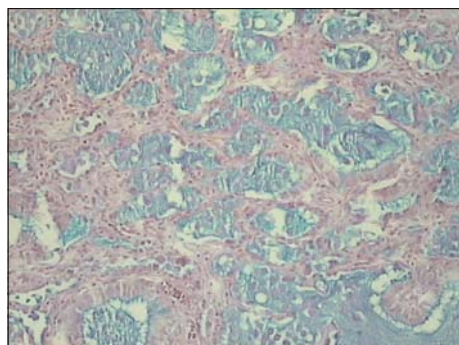


Figura 4
Agnello, polmone
Mucoproteinosi alveolare (Alcian blue-Pas 10×)

corpora amylacea (Fig. 5), caratterizzate con le colorazioni speciali di Rosso Congo e Arancio di Acridina (Fig. 6). Dalla positività di tali prove si è constatata la natura desossiribonucleica, glicoproteica e ribonucleoproteica di queste particolari strutture che sono associate,

indirettamente, alla polmonite atipica in quanto si formano in seguito alla stenosi bronchiolare e alla stasi di essudato, come osservato in altri studi (9).

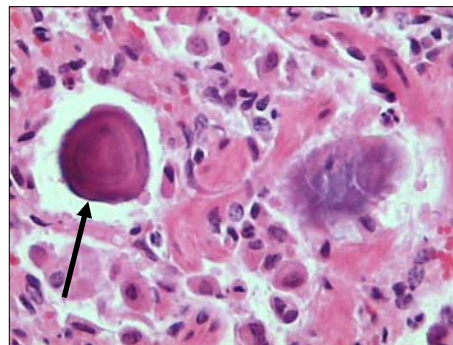


Figura 5
Agnello, polmone
Corpora amylacea, ispessimento dei setti alveolari
(ematossilina-eosina 40×)

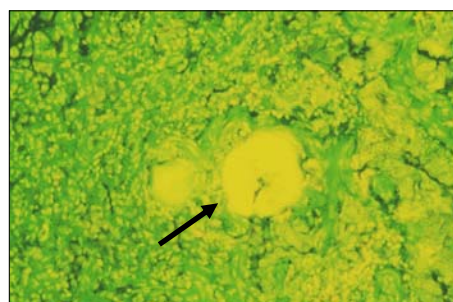


Figura 6
Agnello, polmone
Corpora amylacea arancio di acridina
(20× luce polarizzata)

Immunoistochimica

Per effettuare le prove immunoistochimiche si è deciso di utilizzare sezioni di polmoni in cui è stata evidenziata la presenza di micoplasma (15 campioni, dei quali 13 presentavano anche lesioni istologiche), tramite isolamento microbiologico, e 16 campioni in cui sono state identificate lesioni istologiche riconducibili a tale microrganismo ma che erano risultati negativi all'isolamento, per un totale di 31 polmoni.

Campioni positivi all'isolamento

Il segnale immunoistochimico è stato rilevato in 12 casi (7,6%), localizzato principalmente nei macrofagi alveolari (Figs 7 e 8), nelle cellule giganti e in un caso nell'epitelio alveolare (Fig. 9). Nei macrofagi, l'espressione di tale reazione, si è manifestata sottoforma di

materiale granulare, mentre nell'epitelio e nelle cellule giganti è risultata più uniforme.

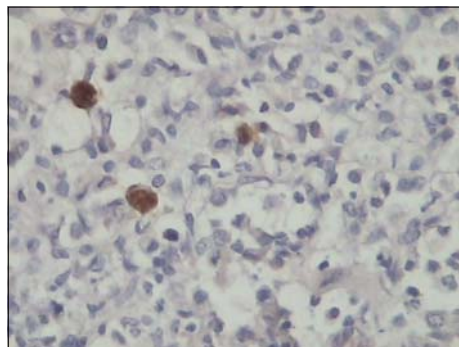


Figura 7
Agnello, polmone
Macrofagi polmonari
Positività immunoistochimica per la ricerca di *Mycoplasma ovipneumoniae* (40×)

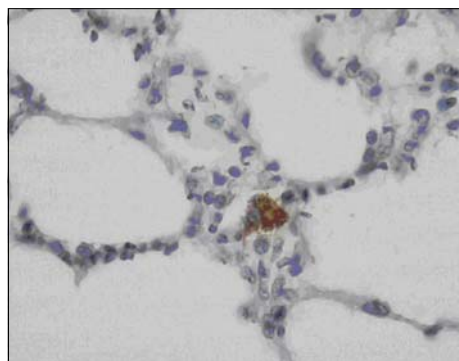


Figura 8
Agnello, polmone
Macrofago polmonare
Positività immunoistochimica per la ricerca di *Mycoplasma ovipneumoniae* (40×)

Campioni con lesioni istologiche ma negativi all'isolamento

11 campioni (7,1%), sono risultati positivi alla prova immunoistochimica. La positività è stata osservata principalmente nei macrofagi alveolari; in un caso l'espressione era evidente nelle cellule in disfacimento a livello bronchiolare, in un altro nei neutrofili in zone con accumulo di granulociti e in un altro caso si evidenziava, esclusivamente, nei macrofagi presenti nelle zone atelettasiche. In 5 casi (3,2%) il segnale è risultato molto intenso e le cellule positive erano numerose.

Dai campioni, utilizzati come controllo, si è rilevata una positività antigenica nel polmone di suino, affetto da polmonite enzoetica, che dimostra la cross-reattività di *M. ovipneumoniae*

con l'*hyopneumoniae* (16). Per quanto riguarda il tessuto polmonare di cane affetto da cimurro, come atteso, non ha mostrato alcun segnale immunoistochimico.

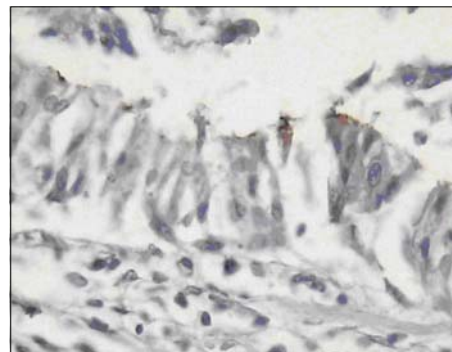


Figura 9
Agnello, polmone
Epitelio bronchiolare
Positività immunoistochimica per la ricerca di *Mycoplasma ovipneumoniae* (40×)

In conclusione si può affermare che, sui 31 testati, l'espressione del segnale immunoistochimico si è manifestato in 23 campioni (74,2%), 12 dei quali (38,7%) hanno manifestato, oltre alla positività immunoistochimica e al sospetto diagnostico su base istologica, la positività all'isolamento microbiologico di micoplasma. In 11 casi (35,5%) a fronte di un isolamento negativo i test istologici ed immunoistochimici sono risultati positivi (Fig. 10). In un caso, risultato positivo alla prova immun-istochimica, si è potuto osservare la contemporanea presenza del *M. ovipneumoniae* e della *M. haemolytica* sia su base istologica sia dall'isolamento microbiologico, come riportato in letteratura (3).

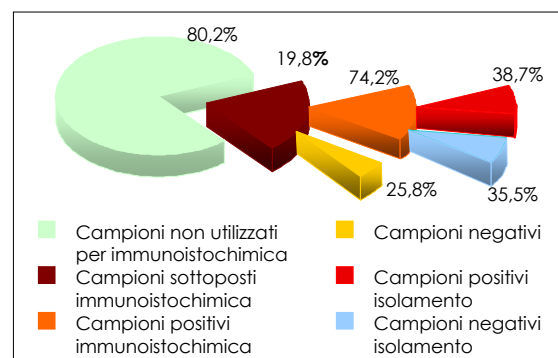


Figura 10
Risultati immunoistochimica per *Mycoplasma ovipneumoniae*

Conclusioni

La nostra analisi si è basata, fondamentalmente, sulla ricerca della polmonite atipica, la cui diagnosi è stata rilevata in base alle lesioni anatomo-patologiche, a quelle istopatologiche, all'isolamento microbiologico di *M. ovipneumoniae* e soprattutto in base all'espressione del segnale immuno-istochimico.

In base ai risultati delle indagini effettuate, si è osservato che i campioni con lesioni microscopiche riconducibili a *M. ovipneumoniae* erano in numero superiore rispetto a quelli in cui è stato isolato tale microrganismo, mentre 9 dei campioni esaminati risultati positivi all'isolamento non hanno manifestato lesioni istologiche caratteristiche del patogeno preso in esame. È tuttavia noto che il microrganismo può albergare nel polmone e non dare alcuna lesione (4). Infatti, tra i 15 casi dove è stato isolato il micoplasma, solo 7 erano caratterizzati da atelettasia, aumento del tessuto linfatico bronco-associato (BALT), alveolite desquamativa, aumento del numero di cellule polimorfonucleati a livello bronchiale e bronchiolare e presenza di noduli linfoidi peribronchiali e perivasali. Inoltre, tra tutti i campioni presi in esame, 16 casi mostravano le lesioni suddette senza rivelare positività all'isolamento.

Tra i campioni in cui si è palesata la reazione immunoistochimica, alcuni mostravano

un'intensa espressione del segnale, altri manifestavano uno scarso numero di cellule positive; ciò potrebbe giustificare, relativamente a questi ultimi, la negatività all'isolamento ipotizzando un'insufficiente carica batterica.

Un importante dato ottenuto dall'immuno-istochimica è riferibile ai bersagli cellulari coinvolti nella patogenesi dell'infezione da micoplasma. Infatti, le cellule risultate positive antigenicamente seguono l'iter patogenetico dell'infezione: cellule dell'epitelio della mucosa bronchiolare, cellule desquamate nel lume bronchiolare, cellule alveolari e cellule infiammatorie, principalmente macrofagi.

In definitiva si può affermare che per la diagnosi di polmonite atipica, causata da *M. ovipneumoniae*, sono di ausilio soprattutto lesioni anatomo-istopatologiche. Con tali dati si può pervenire ad una diagnosi di sospetto, in base alla quale, eseguendo l'isolamento microbiologico e l'indagine immuno-istochimica, si può giungere ad una diagnosi definitiva.

In conclusione questa ricerca ha dimostrato la non rara presenza della polmonite enzootica cronica nel territorio abruzzese e che la tecnica immunoistochimica è risultata molto sensibile e specifica per la ricerca di *M. ovipneumoniae* nei tessuti polmonari.

Bibliografia

1. Alley M.R. 1975. The bacterial flora of the respiratory tract of normal and pneumonic sheep. *N Z Vet J*, **23** (6), 113-118.
2. Beebe K. 1999. Acridineorange DNA/RNA staining (www.histosearch.com/histonet/oct99/AcridineOrangeDNA.RNAstai.html ultimo accesso 25 aprile 2006).
3. Brogden K.A., Lehmkuhl H.D. & Cutlip R.C. 1998. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Vet Res*, **29** (3-4), 233-254.
4. Dungworth D.L. 1993. The respiratory system. In *Pathology of domestic animals*, Vol. 2, 4th Ed. (K.V.F. Jubb, P.C.Kennedy & N. Palmer). Academic Press Inc, San Diego, 674 pp.
5. Hotzel H., Sachse K. & Pftzner H. 1999. A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Vet Microbiol*, **49** (1-2), 31-43.
6. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale' (IZS A&M) 2006. Esame batteriologico standard e ricerca Clostridi. IZS A&M, Teramo, IZSTE B2.1.2 SOP004.
7. Jones G.E., Buxton D. & Harker D.B. 1979. Respiratory infectious in housed sheep, with particular reference to mycoplasmas. *Vet Microbiol*, **4**, 47-59.

8. Jones G.E., Field A.C., Gilmour J.S., Rae A.G., Nettleton P.F. & McLauchlan M. 1982. Effects of experimental chronic pneumonia on body weight, feed intake and carcass composition of lambs. *Vet Rec*, **110** (8), 168-173.
9. Lin X., Alley M.R., Manktelow B.W. & Slack P. 1989. Pulmonary Corpora amylacea in sheep. *J Comp Pathol*, **10** (3), 267-274.
10. Martin W.B. 1996. Respiratory infections of sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **19** (3), 171-179.
11. Mowry R.W. 1956. Alcian blue/PAS for acid and neutral mucopolysaccharides. *J Histochem Cytochem*, **4**, 407.
12. Nicholas R.A.J. & Baker S. 1998. Recovery of mycoplasmas from animals. In *Mycoplasma protocols, methods in molecular medicine* (R.J. Miles & R.A.J. Nicholas). Humana Press Inc., Totowa, **104**, 37-43.
13. Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1994. Immunohistochemistry. *Am Reg Pathol*, **23**, 247-255.
14. St George T.D. 1972. Investigation of respiratory disease of sheep in Australia. *Aust Vet J*, **48**, 318-322.
15. Stamp J.T. & Nisbet D.I. 1963. Pneumonia of sheep. *J Comp Pathol*, **73**, 319-328.
16. Thirkell D., Spooner R.K., Jones G.E., Russell W.C. & Voice M.W. 1991. Cross-reacting antigens between *Mycoplasma ovipneumoniae* and other species of mycoplasma of animal origin, shown by ELISA and immunoblotting with reference antisera. *Vet Microbiol*, **26** (3), 249-261.