

## KIAULIŲ PLAUČIŲ PAŽEIDIMŲ, BŪDINGŲ ENZOOTINEI PNEUMONIJAI, VERTINIMAS IR SUKĖLĖJO *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IDENTIFIKAVIMAS

Jūratė Šiugzdaitė<sup>1</sup>, Henrikas Žilinskas<sup>1</sup>, Kristina Garlaitė<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT–47181 Kaunas; tel. (8–37) 36 23 92; faks. (8–37) 36 24 17; el. paštas: jurate.saugzdaite@lva.lt

<sup>2</sup>„Linus ir Viza“, Veterinarijos centras, Smėlynės g. 2c, LT–5319 Panevėžys; tel. 8 (–455) 50 73 25;

**Santrauka.** Kiaulių enzoootinė pneumonija (sukėlėjas *Mycoplasma hyopneumoniae*) – lėtinė kiaulių liga. Jos diagnozė nustatoma kompleksiniais tyrimais. Vienas iš tokių – plaučių pažeidimų vertinimas pagal R. F. Goodwin ir P. Whittlestone rekomenduotą metodiką (1968). Sergančių enzoootine pneumonija kiaulių plaučių pažeidimai skiriasi nuo kitų mikroorganizmų (*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*) sukeltų pažeidimų.

Tyrimams buvo atrinktos 187–206 dienų 396 kiaulės iš devynių skirtingų fermų (po 44 kiaules). Plaučių pažeidimai, būdingi enzoootinei pneumonijai, vertinti paskerdus kiaules skerdyklose. Plaučiai su pažeidimais atrinkti mikrobiologiniams tyrimams (mikoplazmų atžvilgiu). *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) iš plaučių mėginių išskirta metodais, taikomais Danijos veterinarijos laboratorijoje (Friis, 1975).

*M. hyopneumoniae* iš plaučių išskirta ir identifiukuota diskų augimo slopinimo (DGI) reakcija 80,6% atveju. Enzoootinės pneumonijos sukėlėjo genetinei įvairovei nustatyti iš kiekvienos fermos išskirtų mikoplazmų padermes tyrėme atsitiktinės amplifikacijos polimorfines DNR (AAPD) analizės metodu. Tyrimai parodė, kad mažo specifškumo pradmuo generavo PGR amplifikavimo produktus, būdingus *M. hyopneumoniae* rūšiai. Atsitiktinės amplifikacijos polimorfines DNR analizės metodu nustatyta išskirtų *M. hyopneumoniae* padermių genetinė įvairovė.

**Raktažodžiai:** enzoootinė pneumonija, plaučių pažeidimai, atsitiktinė amplifikacijos polimorfine DNR.

## EVALUATION OF LUNG LESIONS ENZOOTIC PNEUMONIA AND IDENTIFICATION OF *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

**Summary.** *Mycoplasma hyopneumoniae* is the primary agent of enzoootic pneumonia, one of the most chronic diseases in pigs herds, with high morbidity. Diagnosis of enzoootic pneumonia has been characterized by complex investigations. One of such investigations scored lung lesions by R.F. Goodwin and P. Whittlestone (1968). Lesions of mycoplasmal pneumonia are characteristic and differ from those induced by other agents (*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*).

Total 396 pigs from nine farms (in each 44) 178 – 206 days were selected for the experiment. Lungs with gross lesions were selected for microbiological investigation. All mycoplasma cultivation procedures were performed according to the methods used in the mycoplasma section at the Danish Veterinary laboratory in Copenhagen (Friis, 1975). Isolated strains of mycoplasma were identified by the disc grow inhibition test (DGI), using antisera against the type „J“ strain of *M. hyopneumoniae* and strain Ms 42 of *M. flocculare*. *M. hyopneumoniae* was isolated and identified by the disc grow inhibition test (DGJ) in 80,6%. RAPD analysis confirmed that *M. hyopneumoniae* strains, isolated by classical methods, belonged to the same *M. hyopneumoniae* species. RAPD results showed that in different farms it was possible to obtain genetically heterogenous strains.

**Keywords:** enzoootic pneumonia, lung lesions, randomly amplified polymorphic DNA.

**Įvadas.** Kiaulių enzoootinė pneumonija, sukelta *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), registruojama daugelyje šalių (Christensen et al., 1999; Maes et al., 1996; Ross, 1999; Stakenborg et al., 2004; Stipkovits et al., 2003; Thacker et al., 2000). Mikoplazmą iš uždegimo pažeistų kiaulių plaučių vienu metu išskyrė R. F. Goodwin su grupe mokslininkų (1965) Jungtinėje Karalystėje bei C. J. Mare ir W. P. Switzer (1965) Jungtinėse Amerikos Valstijose. Enzoootinei pneumonijai diagnozuoti vertinami klinikiniai sergančių kiaulių simptomai, tikslinga atsižvelgti ir į epidemiologinius tyrimus. Tačiau ligos klinikiniai simptomai nėra ryškūs dėl galimų asocijuotų infekcijų (*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*) (Kobish, Friis, 1996). Enzoootinės pneumonijos diagnozė turi būti patvirtinta laboratoriniais tyrimais (Friis, 1975;

Šiugzdaite, Garlaite, 2002; Stipkovits et al., 2003; Stakenborg et al., 2002). Informatyvus ir specifinis plaučių pažeidimų vertinimas skerdziant ar gyvuliui nugaišus. Nustatyta, kad būdingi šiai ligai plaučių pažeidimai randami nuo 30% iki 80% paskerstų kiaulių (Hill et al., 1992; Ross, Young, 1993).

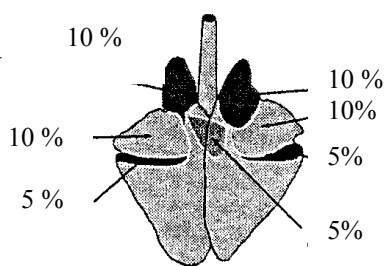
Mikoplazmos nuo kitų bakterijų skiriasi tuo, kad neturi ląstelės sienelės ir yra apsuptos trisluoksne citoplazmine membrana. Mikoplazmos, būdamos membraniniai fakultatyviniai parazitai, yra reiklios maitinimosioms terpėms. Augimo terpėse joms būtini sterolai ir riebiosios rūgštys.

*M. hyopneumoniae* išskyrimą iš klinikinės ir patloginės medžiagos apsunkina saprofitinė mikoplazmų rūšis *M. flocculare* ir patogeninė rūšis *M. hyorhinitis*, kurios lokalizuojasi kvėpavimo takuose (Zhuang, 2002).

Mikoplazmoms identifikuoti naudojamos įvairios fluorescuojančių antikūnų modifikacijos (Meyling, 1979; Šiugždaitė, Kevišas, 2001). Plačiai taikomos polimerazinės grandininės reakcijos (Calsamiglia et al., 1999; Harasawa et al., 1997; Verdin et al., 1996). Kadangi šie metodai yra greiti, specifiški, nepriklauso nuo mikroorganizmų gyvybingumo arba virulentiškumo, gali būti taikomi tiriant gyvas kiaules, taip pat patologinę medžiagą (Ruiz, Pijoan, 2000). Jautrus ir specifiškas metodas nustatant mikoplazmų DNR sekų įvairovę yra PGR, kurioje naudojamas vienas mažo specifškumo oligonukleotidinis pradmuo (Geary et al., 1994; Stärk et al., 1998). Atsitiktinės amplifikuotos polimorfinės DNR metodas skatina DNR segmentų amplifikavimą homologiniam genomui sukurti. Net ir labai artimų rūšies padermių tam tikros DNR fragmentų specifinės sekos gali skirtis (Stakenborg et al., 2002).

**Darbo tikslas** – įvertinti plaučių pažeidimus, būdingus enzootinei pneumonijai, išskirti ir identifikuoti *M. hyopneumoniae* padermes, vyraujančias kiaulininkystės ūkiuose.

**Medžiagos ir metodai.** Tyrimams atrinktos 396 kiaulės (187–206 dienų) iš devynių fermų (po 44 iš kiekvienos). Tyrime dalyvaujančiuose kompleksuose buvo auginamos mišrios veislės kiaulės (landrasai, diurokai, pjentrenai, jorkšyrai, kryžminti su Lietuvos vietine ir Lietuvos baltąja). Skerstos 187–206 dienų kiaulės. Plaučių pažeidimai vertinti pagal R. F. Goodwin ir P. Wittlstone (1968), kurie nurodo, kad maksimaliai kiaulių plaučiai gali būti pažeisti 55%. Kiekvienai plaučių sričiai tenka atitinkama pažeidimų dalis: viršutinėms kairiajai ir dešiniajai – po 10%, širdinėms kairiajai ir dešiniajai – po 10%, apatinei kairiajai ir dešiniajai diafragminėms – po 5%, vidurinei plaučių daliai taip pat 5% (1 pav.).



1 pav. Plaučių pažeidimų vertinimas pagal R. F. Goodwin ir P. Whittlestone (1968)

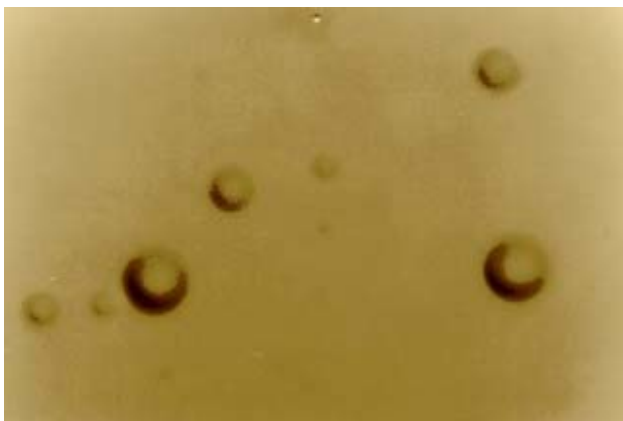
Plaučių mėginiai (4x5 cm gabalėliai) su mikoplazmoms būdingais pakitimais paimti iš pažeistų plaučių vietų. Iš plaučių mėginių, panaudojus selektyvinį PPLO sultinį (Difco, JAV), paruošta 20% suspensija. Mėginiai homogenizuoti, 0,2 ml paruoštos suspensijos pasėta į selektyves maitinamąsias terpes (NHS4, S), tiriamieji mėginiai kultivuoti aerobinėmis sąlygomis. Mikoplazmų augimas (terpės spalvos pasikeitimas) vertintas po 5–8 dienų. *M. hyopneumoniae* fermentuoja gliukozę, dėl to terpės pH rūgštėja, spalva iš avietinės keičiasi į geltoną. Toliau persėti buvo atrinkti

mėgintuvėliai su pakitusia terpės spalva. Skystoje selektyvinėje terpėje mikoplazmų kultūra persėta tris kartus. Tiriamoji mikroorganizmų kultūra (0,1 ml) sėta ant standžių selektyvių (NHS4, S) maitinamųjų terpių. Pasėtos kultūros Petri lėkštelėse kultivuotos mikroaerofilinėmis sąlygomis. Augančios mikoplazmų kolonijos praėjus 24–78 val. buvo stebimos per mikroskopą (didinta 10–40 kartų). *M. hyopneumoniae* identifikuoti atlikta diskų augimo inhibicijos (DGI) reakcija. Naudoti popieriniai diskai su antiserumais prieš *M. hyopneumoniae* „J“ ir prieš *M. flocculare* Ms 42 etalonines padermes. *M. hyopneumoniae* iš plaučių mėginių išskirta metodais, taikomais Danijos veterinarijos laboratorijoje.

Galimiems išskirtų mikoplazmų padermių genetiniams skirtumams nustatyti taikytas atsitiktinės amplifikuotos polimorfinės DNR metodas (AAPD), kitaip vadinamas pasirinktinio pradmens PGR. Tam tikslui buvo ruošiamas 30 μl PGR mišinys: 1 μl tiriamosios DNR, 3 μl Ampli Taq 10x buferio (Perkin Elmer), 3 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Perkin Elmer), 1,2 μl dNTPs mišinio (10 mM, Perkin Elmer), 3 μl Stoffel buferio, 1 μl OPA3 pradmens (AGTCAGCCAC), 0,3 μl (1,25 U) Ampli Taq DNA polimerazės (Perkin Elmer), 0,15 μl Ampli Taq Stoffel fragmento ir 17,35 μl DEPC vandens. AAPD PGR buvo atliekama amplifikatoriuje „Perkin Elmer“ 2400. Pradinė denatūracija buvo atliekama 92°C 2 min. Tada 45 ciklus amplifikuota laikantis tokių parametrų: denatūracija – 92°C 1 min., hibridinimas su pasirinktu pradmeniu OPA-3 – 36°C 1 min., ilginimas – 72°C temperatūroje 2 min. PGR amplifikacijos produktai buvo analizuojami 1% agarozės gelyje, dažytame etidžio bromidu (koncentracija 1 μg/ml). PGR rezultatai UV lempos spinduliuose buvo lyginami su molekulinės masės DNR standartu ir tarpusavyje. Nuotraukos padarytos taikant „Westburn“ firmos Genegenius“ dokumentavimo sistemą.

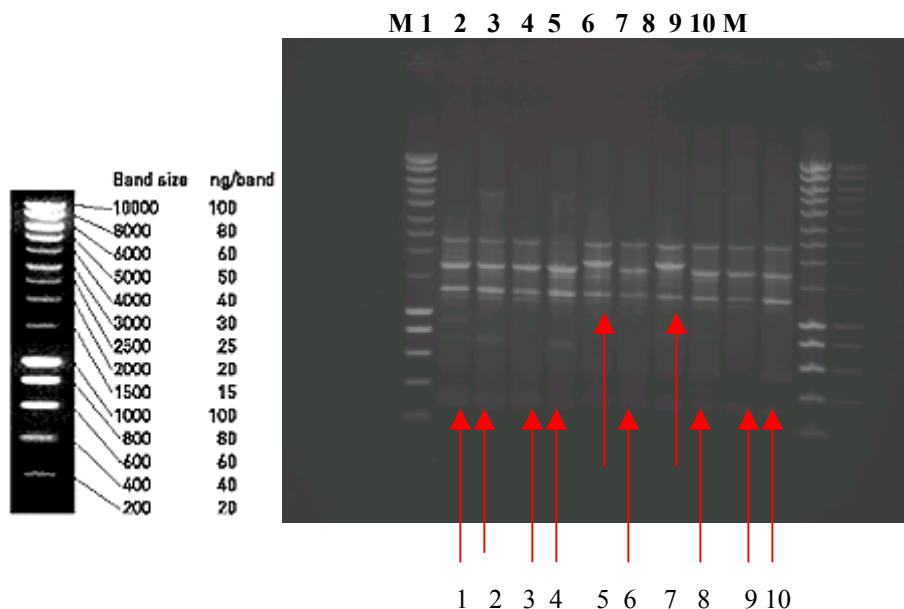
**Tyrimo rezultatai.** Vizualiai įvertinus 398 paskerstų kiaulių plaučius pagal R. F. Goodwin ir P. Whittlestone (1968) rekomenduotą metodiką, (1 pav.) mėginiai buvo tirti mikoplazmų atžvilgiu. Pasėtų mikoplazmų augimas vertintas praėjus 5–8 dienoms. *M. hyopneumoniae* fermentavo gliukozę ir neskaldė arginino, tad terpės pH rūgštėjo. Pasėjus tiriamųjų mikoplazmų kultūrą ant standžių selektyvių terpių, po 24–48 valandų buvo matomos *M. hyopneumoniae* kolonijos. Daugumai mikoplazmų rūšių būdinga kepto kiaušinio („fried egg“) morfologija. Tačiau *M. hyopneumoniae* kolonijų centras, skirtingai nuo *M. hyorhinis* ar *M. bovis*, nėra iškilęs (2 pav.), kolonijos lėtai ant agarų auga iki 10 dienų. *M. flocculare* buvo vertinama atsižvelgiant į tai, kad skystoje selektyvinėje maitinamojoje terpėje dauginasi lėtai, augimas pastebėtas praėjus 12 parų nuo sėjimo. Enzootinės pneumonijos sukėlėjas *M. hyopneumoniae* buvo išskirtas 80,6% atvejų (iš 319 plaučių mėginių). *M. hyopneumoniae* identifikuota panaudojus specifinius antiserumus prieš *M. hyopneumoniae* „J“ ir prieš *M. flocculare* Ms 42 etalonines padermes.

*M. hyopneumoniae* genetinei įvairovei patvirtinti iš kiekvieno ūkio kiaulių išskirtų mikoplazmų padermių taikėme AAPD metodą.



2 pav. *Mycoplasma hyopneumoniae* augimas ant selektyvios maitinamosios terpės (padidinta x 25)

Tos pačios rūšies mikoplazmų padermės, išskirtos skirtingose vietovėse, gali genetiškai skirtis, todėl mažo specifiškumo pradmenis AAPD metodas taikytas devynioms kiaulių fermose išskirtoms ir identifikuotoms padermėms. Visos amplifikavimo produktų linijos (3 pav.) agarozės gelyje buvo būdingos 10 mėginyje esančioms *M. hyopneumoniae* teigiamai kontrolei („J“ padermė). Lyginant visų mėginių amplifikavimo produktus su teigiama kontrole arba tarpusavyje buvo matyti, kad tarp išskirtų padermių yra ryšys. Visų mėginių amplifikavimo produktai su OPA-3 pradmeniu buvo tokio ilgio, kaip ir tipinė „J“ padermė. Penkto ir septinto mėginių vidurinės linijos PGR produktų ilgis skyrėsi nuo kitų padermių ir viduriniojo PGR produkto linijos agarozės gelyje. Jos buvo išsidėsčiusios aukščiau nei kitų mėginių. Vadinasi, PGR produktų ilgis šioje vietoje buvo trumpesnis nei kitų padermių ir teigiamos kontrolės.



Takeliai: M – molekulinės masės žymeklis; 1 – 9 specifiniai amplifikavimo produktai; 10 – teigiama kontrolė

### 3 pav. *M. hyopneumoniae* padermių tyrimai atsitiktinės amplifikuotos polimorfinės DNR analizės metodu

**Aptarimas ir išvados.** Enzootinei pneumonijai būdingi plaučių pažeidimai skiriasi nuo kitų mikroorganizmų sukeltamų pažeidimų (Kobish, Friis, 1996). Norėdami patvirtinti plaučių pažeidimus, mėginius ištyrėme mikrobiologiškai.

*M. hyopneumoniae* nustatyti panaudojė specifinius antiserumus prieš *M. hyopneumoniae* „J“ ir prieš *M. flocculare* Ms 42 padermes, 80,6% atvejų identifikavome *M. hyopneumoniae*. Nustatyta, kad būdingi enzootinei pneumonijai plaučių pažeidimai randami nuo 30% iki 80% paskerstų kiaulių (Ross, Young, 1993). Mūsų taikytas plaučių pažeidimo vertinimo būdas nesudėtingas ir pakankamai objektyvus. Šį metodą rekomenduotume taikyti šalies skerdyklose tiriant kiaulių enzootinės pneumonijos išplitimą. R. F. Goodwin ir P. Whittlestone (1968) plaučių tyrimo metodas plačiai taikomas Danijos ir Naujosios Zelandijos skerdyklose (Christensen et

Cullinane, 1990).

Išskirtų mikoplazmų padermių genetinei įvairovei nustatyti tinka AAPD metodas (Stakenborg et al., 2002). Šiuo metodu ištyrėme *M. hyopneumoniae* padermes, išskirtas iš skirtingų kiaulių fermų.

Tyrimai parodė, kad mažo specifiškumo pradmuo generavo PGR amplifikavimo produktus, būdingus *M. hyopneumoniae* rūšiai. Paaikškėjo, kad tarp išskirtų *M. hyopneumoniae* padermių genetiniai skirtumai atsitiktinio pradmens pasirinktose DNR srityse nėra ženklūs. Skirtumus būtų galima paaikškinti heterogeniškumu, kuris, mūsų nuomone, gali atsirasti dėl taškinių genetinių mutacijų. AAPD metodas tik pastaruoju metu plačiau pradėtas taikyti genetinės mikoplazmų įvairovės tyrimams (Stakenborg et al., 2002). Šiuo metodu galima būtų prognozuoti ir mikoplazmų padermių virulentiškumą (Vicca et al., 2003). Norint iširti genetinio

heterogeniškumo priežastis, mūsų manymu, būtų tikslinga nustatyti genomo sekas konservatyviajame mikoplazmų DNR regione 16S rRNA, atlikti filogenetinę analizę lyginant tarpusavyje gautas sekas.

#### Išvados.

1. Įvertinus plaučių pažeidimus, būdingus enzootinei pneumonijai, iš plaučių mėginių 80,6% atvejų išskirtas ir identifiktuotas sukėlėjas *Mycoplasma hyopneumoniae*.

2. Atsitiktinės amplifikacijos polimorfinės DNR analizės metodu nustatyta skirtingų ūkių *Mycoplasma hyopneumoniae* padarmių genetinė įvairovė.

#### Literatūra

1. Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J. Vet. Diagn. Investig., 1999. Vol. 11. P. 246–251.
2. Christensen G., Soerensen V., Mousing J. Diseases of the respiratory system. In: Diseases of swine. Ed. by B. E. Staw et al, 8<sup>th</sup> edition, Iowa State University press. 1999. P. 913–940.
3. Christensen N. H., Cullinane L. C. Monitoring the health of pigs in New Zealand abattoirs. New Zealand Veterinary Journal., 1990. P. 136–141.
4. Friis N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. Nord. Vet. Med., 1975. Vol. 27. P. 337–339.
5. Geary S.J., Firsiyth M.H., Saoud S., Wang G., Berg D. E., Berg C.M. *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. Mol. Cell. Probes., 1994. Vol. 8. P. 311–316.
6. Goodwin R. F., Pomeroy AP., Whittlestone P. Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. Vet. Rec., 1965. Vol. 77. P. 1247–1249.
7. Goodwin RF., Pomeroy AP., Whittlestone P. Attempts to recover *Mycoplasma suis pneumoniae* from experimental and natural cases of enzootic pneumonia of pigs. J. Hyg., 1968. Vol. 66. P. 595–602.
8. Harasawa R., Koshimizu K., Takeda O., Uemori T., Asada K., Kato I. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes., 1997. Vol. 5. P. 103–109.
9. Hill M. A., Scheidt A. B., Teclaw R. F., Clark L. K., Knox K. E., Jordan M. Association between growth indicators and volume of lungs from pigs at slaughter. American Journal of Veterinary Research., 1992. Vol. 53. P. 2221–2223.
10. Kobish M., Friis N. F. Swine mycoplasmoses. Rev. Sci. tech. off. int. Epiz., 1996. Vol. 15. P. 1569–605.
11. Maes D., Verdonck M., Deluyker H., de Kruif A. Enzootic pneumonia in pigs. The Veterinary Quarterly., 1996. Vol. 18. P. 104–109.
12. Mare C. J., Switzer W. P. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. Vet. Med. 1965. Vol. 60. P. 841–846.
13. Meyling A. *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* demonstrated in pneumonic pig lungs by fluorescent antibody technique. Acta Vet. Scand., 1979. Vol. 4. P. 337–339.
14. Ross R. F. Mycoplasmal diseases. In: Diseases of swine. Ed. by B. E. Staw et al., 8th edition, Iowa State University press. 1999. P. 495–509.
15. Ross R. F., Young T. The nature and detection of mycoplasmal immunogens. Vet. Microbiol., 1993. Vol. 37. P. 369–380.
16. Ruiz A., Pijoan C. Using diagnostic tools to monitor *Mycoplasma hyopneumoniae* in the field. Allen D. Leman Swine Conference, 2000. P. 81–91
17. Siugzdaitė J., Garlaite K. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in a pig herd from birth to slaughter. Acta Vet. Brno., 2002. Vol. 71. P. 549–553.
18. Siugzdaitė J., Garlaite K., Urbsienė D. Evaluation of antibody formation, daily weight gain and meat quality after vaccination of piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. Acta Veterinaria Hungarica., 2003. Vol. 51. P. 273–281.
19. Stakenborg T., Vicca J., Butae P., Maes D., Kruif A., Hasebrouck F. RAPD analysis of Belgium *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. 14<sup>th</sup> International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Vienna, Austria., 2002. P. 96–97.
20. Stakenborg T., Vicca J., Butae P., Maes D., Kruif A., Hasebrouck F. Amplified fragment length polymorphism of three porcine *Mycoplasma* spp. 15<sup>th</sup> International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Athens, JAV, 2004. P. 90.
21. Stärk K. D. C., Nicolet J., Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. Appl. Environ. Microbiology. 1998. Vol. P. 543–548.
22. Stipkovits L., Laky Zs., Abony T., Siugzdaitė J., Szabo I. Reduction of economic losses caused by mycoplasmal pneumonia of pigs by vaccination with respisure and by tiamutin treatment. Acta Veterinaria Hungarica., 2003. Vol. 51. P. 259–271.
23. Šiugzdaitė J., Kevišas E. Indirect immunofluorescence method for detection *Mycoplasma hyopneumoniae* in smears from bronchi. Veterinarija ir zootechnika., 2001. T. 13 (35). P. 50–51.
24. Thacker E., Thacker B., Kuhn M. Evaluation of local and systematic immune responses induced by intramuscular injection of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. Am. J. Vet. Res., 2000. Vol. 61. P. 1384–1389.
25. Verdin E., Blanchard B., Kobisch M., Bove M., Saillard C. Use of nested PCR diagnosis test to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* under field conditions. 11<sup>th</sup> International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Florida, JAV. 1996. Vol. 4. P. 101–102.
26. Vicca J., Stakenborg T., Maes D., Butaye P., Peeters J., de Kruif A., Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Veterinary Microbiology., 2003. Vol. 97. N. 3–4. P. 177–190.
27. Zhuang Q. Epidemiology investigation of risk factors for infection with respiratory diseases in Danish genetic and production (SPF) pig herds. Ph D thesis., Denmark. 2002. P. 7–28.