

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

***Mycoplasma bovis* : synthèse des connaissances actuelles**

THOMAS A., MAINIL J. , LINDEN A.

Bactériologie, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43A, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Bactériologie, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43A, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Correspondance : THOMAS Anne
athomas@ulg.ac.be

RESUME : Les mycoplasmes infectent fréquemment les cheptels bovins. Parmi eux, *Mycoplasma bovis* est l'espèce la plus pathogène dans les pays indemnes de péripneumonie contagieuse du bovin puisqu'elle provoque des bronchopneumonies, des arthrites et des mammites, et engendre des pertes économiques considérables. Plusieurs études ont montré sa fréquence en Europe et l'acquisition d'antibiorésistances. Vu l'absence de vaccin à l'heure actuelle en Europe, il est crucial de connaître et de comprendre cette bactérie afin de contrôler l'infection chez les bovins. Dans ce but, cet article résume les connaissances actuelles sur *M. bovis*.

INTRODUCTION

Les pathologies respiratoires bovines restent un problème épineux en médecine vétérinaire. En effet, de nombreux facteurs peuvent être impliqués séparément, mais peuvent également interagir pour provoquer ces maladies responsables de pertes économiques importantes dans le secteur agricole (Coghe, 2000). Outre l'environnement et l'hôte, les agents infectieux ont un rôle déterminant dans la morbidité et la mortalité imputables aux pathologies respiratoires. Le large éventail d'agents étiologiques complique le diagnostic et le traitement dans les exploitations bovines. A côté des pasteurelles ou du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) par exemple, les mycoplasmes jouent un rôle non négligeable lors d'atteintes respiratoires. Ainsi, *Mycoplasma bovis* suscite l'intérêt des chercheurs et des praticiens vu son rôle pathogène, démontré aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, aux niveaux respiratoire, mammaire et articulaire (Gourlay *et al.*, 1979; Thomas *et al.*, 1986;

Rodriguez *et al.*, 1996), et vu sa présence dans de nombreux pays européens (ter Laak *et al.*, 1992a; Brice *et al.*, 2000; Byrne *et al.*, 2001). De plus, aucun vaccin n'est commercialisé à l'heure actuelle en Europe, faisant de la chimiothérapie et de l'hygiène les seules armes utilisables en pratique contre *M. bovis*. Néanmoins, plusieurs études menées dans divers pays européens ont démontré l'inefficacité de certains antibiotiques, utilisés souvent depuis de nombreuses années lors de troubles respiratoires bovins, sur des souches de *M. bovis* (Ball *et al.*, 1995; Ayling *et al.*, 2000). Il s'avère donc primordial d'optimiser la prophylaxie et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment par une meilleure compréhension des mécanismes pathogènes de cette bactérie. Cet article reprend de façon détaillée les connaissances actuelles sur cet agent pathogène particulier. Les résultats belges seront résumés dans un prochain article.

CLASSIFICATION ET TAXONOMIE

Mycoplasma bovis fait partie des Mollicutes et plus particulièrement du genre *Mycoplasma* appartenant à la famille *Mycoplasmataceae* de l'ordre I des Mycoplasmatales (Razin *et al.*, 1998). Il a été isolé aux USA en 1962, pour la première fois, dans le lait d'une vache souffrant de mammité (Hale *et al.*, 1962). D'abord appelé *Mycoplasma bovimastritis* et *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*, il a été ensuite individualisé sous le nom de *M. bovis* grâce à l'analyse de l'ARN ribosomal 16s qui a révélé 8 nucléotides différents par rapport à *Mycoplasma agalactiae* (Mattsson *et al.*, 1994) et grâce au séquençage du gène *uvrC* (Subramaniam *et al.*, 1998). Cette parenté entre les deux espèces est aussi illustrée par de nombreuses réactions immunologiques croisées (Boothby *et al.*, 1981) et par l'existence de régions génomiques communes (Flitman-Tene *et al.*, 1997). Par comparaison des profils de restriction en champ pulsé, Tola et

collaborateurs (1999) ont estimé la taille du génome à 945 ± 84 Kpb pour *M. agalactiae* et à $961 \pm 18,9$ Kpb pour *M. bovis*. De plus, *M. bovis*, dont l'hôte est l'espèce bovine, peut parfois être isolé chez la chèvre, hôte habituel de *M. agalactiae* (Egwu *et al.*, 2001).

EPIDÉMIOLOGIE

Importance de *M. Bovis*

Chez les bovins, *M. bovis* est l'espèce la plus pathogène du tractus respiratoire dans les pays indemnes de péri-pneumonie contagieuse bovine à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC et se retrouve partout dans le monde. En effet, *M. bovis* est principalement isolé à partir du tractus respiratoire bovin, rarement chez la chèvre (Egwu *et al.*, 2001), le lapin (Boucher *et al.*, 1999) et l'homme (Madoff *et al.*, 1979). A côté des pathologies respiratoires, il provoque également des polyarthrites chez les veaux (Stipkovits *et al.*, 1993), des mammites (Byrne *et al.*, 2000), des infections génitales et des avortements chez les adultes (Langford, 1975 ; Byrne *et al.*, 1999) et une réduction de la fertilité *in vitro* (Eaglesome et Garcia, 1990). Il est associé plus rarement à des otites (Walz *et al.*, 1997), des abcès méningés (Stipkovits *et al.*, 1993), des abcès de décubitus (Kinde *et al.*, 1993), et des kératoconjunctivites chez les veaux (Jack *et al.*, 1977 ; Kirby et Nicholas, 1996).

Toutefois, la fréquence de *M. bovis* dans les pathologies respiratoires et les pertes économiques y associées montrent le rôle prépondérant joué par cette espèce dans le complexe respiratoire bovin (Lekeux et Martineau, 1981 ; Reeve-Johnson, 1999). Cette fréquence dans le tractus respiratoire bovin est cependant fonction de plusieurs facteurs dont :

- (i) le lieu et le type de prélèvement : *M. bovis* est plus souvent isolé dans les poumons que dans les cavités nasales (ter Laak *et al.*, 1992a) ;
- (ii) l'âge des animaux : les animaux âgés de moins d'un an sont plus souvent infectés que les adultes, probablement en raison de l'immaturité du système immunitaire et des stress imposés au jeune bétail (vaccins, ...). Pilaszek et Truszczynski (1978) ont observé la colonisation de veaux par *M. bovis* à partir du quatrième mois.

Tableau I : Fréquences d'isolement des mycoplasmes dans les poumons d'animaux atteints de troubles respiratoires, en fonction du pays et de l'année (Muenster *et al.*, 1979 ; Kirchhoff et Binder, 1986 ; Knudtson *et al.*, 1986 ; Poumarat *et al.*, 1988 ; ter Laak *et al.*, 1992a et b ; Le Grand *et al.*, 1996a ; Linden *et al.*, 1998 ; Tegtmeier *et al.*, 1999 ; Brice *et al.*, 2000 ; Kusiluka *et al.*, 2000 ; Byrne *et al.*, 2001 ; Haines *et al.*, 2001 ; Vogel *et al.*, 2001).

Pays	Fréquence (%)	Année(s)
Belgique	27,5 %	1981-1982
Irlande du Nord	20,5 à 10,4 %	1993-1998
Irlande	18 %	1995-1998
Allemagne	28,5 %	< 1985*
Allemagne	12,8 à 36,4 %	1987
France	25 à 30 %	< 1988
Pays-Bas	17 à 20 %	1983-1985
Danemark	1,3 %	1981-1984
Danemark	24 %	1997-1999
Suisse	37 à 69 %	1998
Canada	71 %	1995
U.S.A.	37 %	1974-1975
U.S.A.	36 %	< 1985

* < signifie antérieur à.

D'autres auteurs (Stipkovits *et al.*, 2000) signalent la présence de *M. bovis* dans les cavités nasales de veaux dès le cinquième jour après la naissance ;

(iii) le lieu géographique : la fréquence de *M. bovis* chez les animaux malades varie d'un pays à l'autre (tableau I). Cette fréquence oscille également d'une région à l'autre au sein d'un même pays. Par exemple, les fréquences varient de 0 à 76 % aux U.S.A. (Knudtson *et al.*, 1986) ;

(iv) l'état de santé de l'animal : *M. bovis* est rarement (6 % ; 2,4 % et 3 %) isolé dans le nez d'animaux sains (Bennett et Jasper, 1977 ; Kirchhoff et Binder, 1986 ; ter Laak *et al.*, 1992b). Il est par contre très fréquemment identifié chez les animaux atteints de troubles respiratoires (tableau I).

Associations dans les pathologies respiratoires

Même si *M. bovis* peut être isolé seul lors de pneumopathies (Poumarat *et al.*, 1996), il est souvent associé à d'autres micro-organismes pathogènes dont le virus respiratoire syncytial bovin, le virus parainfluenza de type III, l'adénovirus, le virus de la

diarrhée virale bovine (BVDV pour *bovine viral diarrhea virus*), *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus somnus*, *Salmonella* sp., *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis* et *Ureaplasma diversum* (tableau II). Les interactions entre *M. bovis* et d'autres agents infectieux ont également été étudiées expérimentalement. Gourlay et Houghton (1985) ont analysé l'interaction de *M. bovis* avec *M. haemolytica*. Ils ont ainsi montré que, lors de l'inoculation expérimentale de *M. bovis* et *M. haemolytica* chez un même veau, les lésions pulmonaires étaient significativement plus étendues lorsque *M. bovis* était inoculé quelques jours avant *M. haemolytica*. Par contre, aucun effet n'a été observé lors d'une inoculation mixte BRSV-*M. bovis* (Thomas *et al.*, 1986). De même, aucun effet sur la clairance muco-ciliaire de *M. haemolytica* n'a été observé lors d'une infection expérimentale à *M. bovis* et au BVDV (Thomas *et al.*, 1986).

Prévalence sérologique

Peu d'études ont été consacrées à la séroprévalence de *M. bovis* dans les troupeaux bovins de telle sorte que

Tableau II : Fréquences de quelques associations de *M.bovis* avec d'autres bactéries ou virus.

Référence/ Micro-organisme	Haines <i>et al.</i> , 2001	Kusiluka <i>et al.</i> , 2000	Brice <i>et al.</i> , 2000	Ter Laak <i>et al.</i> , 1992a	Binder <i>et al.</i> , 1990	Knudtson <i>et al.</i> , 1986
<i>Pasteurella multocida</i>	20,0 %		8,4 %		62 %	
<i>Mannheimia haemolytica</i>			20,6 %			
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>			9,0 %			
<i>Salmonella sp.</i>			2,8 %			
<i>Haemophilus somnus</i>	10,0 %		4,2 %			
<i>Ureaplasma diversum</i>		18,6 %		80,5 %		38,1 %
<i>Mycoplasma dispar</i>				24,1 %		50,0 %
Virus de la diarrhée virale bovine	24,5 %					

seuls quelques pays disposent de données. Poumarat et collaborateurs (1988) ont analysé la prévalence sérologique de *M. bovis* dans les troupeaux français. Ils ont ainsi montré que, de 1985 à 1987, 5 à 9 % des bovins adultes (18 % des troupeaux), 7 à 10 % des jeunes bovins de boucherie et 4 % des veaux étaient séropositifs pour *M. bovis*. De 1988 à 1990, 6 à 10 % des adultes de type laitier et 6 à 9 % des adultes de type viandeux étaient séropositifs (Poumarat *et al.*, 1996). Récemment, Le Grand et collègues (2002) ont rapporté la variabilité (de 2 à 13 %) des séroprévalences chez les adultes de type laitier suivant les régions françaises. En Suisse, la séroprévalence chez les adultes était de 13,4 % (78 % pour les troupeaux) dans le canton du Jura et de 6,1 % (47 % pour les troupeaux) pour l'ensemble du territoire

suisse (Burnens *et al.* 1999). Dans le même pays, 54,7 % des troupeaux de veaux à l'engrais étaient séropositifs (Tschopp *et al.*, 2001).

Contamination

Sources d'infection

La première source d'infection est bien évidemment l'animal infecté. Ainsi, l'excrétion de mycoplasmes précède l'apparition de signes cliniques. Toutes les sécrétions ou excréments sont potentiellement virulents (Poumarat *et al.* 1996). De plus, les animaux convalescents peuvent rester excréteurs pendant des mois. Le lait (Kirk *et al.*, 1997), le sperme (Bielanski *et al.*, 2000) et le jetage nasal sont des exemples de source d'infection. On peut compter jusqu'à 10^6 à 10^8 mycoplasmes par

gramme de poumon infecté. La pasteurisation du lait (65°C pendant 2 minutes ou 70°C pendant 1 minute) permet de tuer *M. bovis* et d'éviter la transmission de cet agent lors de l'utilisation du lait d'animaux malades pour nourrir les veaux (Butler *et al.*, 2000). La diffusion de *M. bovis* est rapide au sein d'un troupeau (Poumarat *et al.*, 1988). La proportion d'infectés latents est élevée dans les foyers et représente donc un risque de contamination insidieux non négligeable.

Malgré l'absence de paroi et contrairement aux idées reçues, les mycoplasmes peuvent persister dans l'environnement pendant plusieurs jours, voire plusieurs mois. Ils survivent ainsi sur tous les matériaux d'une salle de traite, dans les éponges pendant 18 jours et jusqu'à 230 jours dans le fumier (Pfützner, 1984; Le Grand *et al.*, 1996a). *M. bovis* résiste également pendant 28 jours à 30°C et pendant 126 jours sur un papier sec (Nagatomo *et al.*, 2001). L'environnement constitue donc la seconde source importante d'infection par *M. bovis*.

Modes de transmission

M. bovis se transmet de manière directe et horizontale via les aérosols produits lors de bronchopneumonies. Cette transmission est rapide même en l'absence de signes cliniques (Pfützner et Schimmel, 1985). Ainsi, l'introduction d'animaux infectés latents est un moyen de transmission entre élevages. Les mouvements de plus en plus fréquents d'animaux entre élevages et entre pays représentent donc un risque supplémentaire non négligeable. La détection d'animaux porteurs de *M. bovis* et l'élimination de ces animaux du troupeau diminueraient les infections respiratoires à *M. bovis*.

La transmission directe existe aussi entre la mère et le veau, principalement par le lait maternel contaminé (Wienhus *et al.*, 1984). Pfützner et Schimmel (1985) ont démontré que des veaux, nés de mères atteintes de mammite à *M. bovis*, excrètent le germe pendant plus de 12 mois et que *M. bovis* s'installe dans leurs voies respiratoires jusqu'à leur maturité sexuelle. Les génisses ré-excrètent le germe lors de leur première mise-bas et contaminent ainsi leur descendance.

La transmission indirecte via le matériel et l'environnement ne doit pas être négligée vu la persistance de *M. bovis* pendant plusieurs semaines (Pfützner, 1984).

Plusieurs voies d'entrée pour *M. bovis* sont rapportées. Chez les jeunes bovins, la plus fréquente est la muqueuse respiratoire et occasionnellement la voie orale lors de la tétée. Chez les vaches, la contamination des glandes mammaires se fait par voie hématogène à partir d'infections pulmonaires ou articulaires. L'infection des voies génitales est souvent due à l'insémination artificielle avec du sperme congelé dans lequel *M. bovis* peut persister des années et ce malgré la présence d'antibiotiques (Visser *et al.*, 1999).

Divers facteurs peuvent favoriser l'infection et la dissémination de *M. bovis* dans les élevages: la taille du troupeau, le stade de lactation des femelles, l'âge des animaux, l'introduction d'animaux non contrôlés et le manque général d'hygiène (Thomas *et al.*, 1982; Gonzalez *et al.*, 1992). Il a d'ailleurs été montré que le mélange d'animaux d'âges différents ainsi que la présence d'un individu séropositif dans un troupeau représentent des risques dont les conséquences sont une réduction du gain quotidien moyen et une augmentation des traitements antibiotiques au sein du troupeau infecté (Tschopp *et al.*, 2001). Par contre, Allen et collègues (1992) n'ont pas observé d'influence significative du climat sur l'incidence des infections à *M. bovis*.

L'absence de vaccin spécifique en Europe et la fréquence des échecs thérapeutiques inciteront donc à donner la priorité à la prévention par l'hygiène, à éviter la surpopulation et les mélanges d'animaux d'âges ou d'origines différents, ainsi qu'au contrôle des animaux entrant dans le troupeau (Stott *et al.*, 1987; Le Grand *et al.*, 1996a).

PATHOLOGIES ASSOCIÉES À *MYCOPLASMA BOVIS*

Les postulats de Koch ont été vérifiés pour diverses pathologies dues à *M. bovis*. En effet, les inoculations respiratoire(s), mammaire(s) et articulaire(s) de *M. bovis* sur des animaux sains ont été suivies par l'apparition de signes cliniques et de lésions

associées à la présence de *M. bovis* en l'absence d'autres agents infectieux. De plus, *M. bovis* a pu être ré-isolé des animaux infectés. Les principaux signes cliniques et lésions sont présentés dans ce chapitre.

Pathologie respiratoire

L'inoculation intra-trachéale de *M. bovis* a permis d'induire des signes cliniques respiratoires et des lésions étendues du parenchyme pulmonaire chez des veaux gnotobiotiques (Gourlay *et al.*, 1979). Lopez et collaborateurs (1986) ont décrit la lésion emblématique due à *M. bovis* c'est-à-dire une pneumonie à manchons péri-bronchiques lymphoplasmocytaires avec un léger exsudat contenant des neutrophiles et des macrophages dans les parties crânielles de poumons infectés. Récemment, Rodriguez et collaborateurs (1996; 2000) ont reproduit des lésions dont de la pleurésie fibrineuse, une bronchopneumonie exsudative et subaiguë avec hyperplasie lymphoïde et infiltration de cellules mononucléées dans les voies respiratoires. De plus, des signes cliniques respiratoires ont été observés après l'inoculation de *M. bovis* par voies nasale et trachéale à des veaux de 3 mois. Rosenbusch (1995) a également réalisé l'inoculation intra-trachéale de souches respiratoires et articulaires. Il a observé une mycoplasmémie et une hyperthermie après inoculation de la souche respiratoire contrairement à la souche articulaire qui n'a pas révélé de capacité de dissémination systémique. Ces multiples infections expérimentales du tractus respiratoire par *M. bovis* sont souvent compliquées par des pasteurelles (Martin *et al.*, 1983).

Lors d'infections naturelles, des symptômes non spécifiques tel que l'apathie, l'anorexie, l'amaigrissement, l'absence de rumination et l'hyperthermie (Stipkovits *et al.*, 2000) sont accompagnés de signes respiratoires dont du jetage, de la toux et de la dyspnée. Les liquides de lavage broncho-alvéolaire présentent un nombre accru de polymorphonucléaires neutrophiles (Allen *et al.*, 1992). La transmission et donc l'évolution des signes cliniques s'effectuent rapidement au sein du troupeau. Une autre caractéristique est la persistance de signes cliniques malgré les traitements antibiotiques classiques dont la pénicilline ou la gentamicine.

Les lésions observées lors d'infections naturelles consistent notamment en une pneumonie broncho-alvéolaire crânio-ventrale, aiguë et chronique, avec exsudations sérumuqueuses et abcédation (Adegboye *et al.*, 1995b). L'infiltration de cellules mononucléées autour des bronches et des alvéoles, l'hyperplasie lymphoréticulaire, ainsi qu'une bronchiolite avec de la nécrose de coagulation sont fréquemment décrites (Gourlay *et al.*, 1979; Rodriguez *et al.*, 1996).

Pathologie articulaire

Les inoculations intra-articulaire (Pfützner *et al.*, 1983), intraveineuse et intrabronchique de *M. bovis* provoquent des lésions articulaires dont des polyarthrites graves chez les veaux et plus rarement chez les adultes (Henderson et Ball, 1999). L'accumulation de lymphocytes, de macrophages et de polymorphonucléaires neutrophiles ainsi que des taux élevés en immunoglobulines ont été observés dans la synovie (Chima *et al.*, 1981; Poumarat *et al.*, 1996). De l'hyperthermie, de la neutrophilie accompagnent les signes cliniques articulaires dus aux diverses lésions dont l'érosion des cartilages, la nécrose et la présence de tissu de granulation (Ryan *et al.*, 1983).

Lors d'infections naturelles, le carpe et le tarse sont les articulations les plus souvent atteintes. L'inflammation sérofibrineuse au niveau de l'articulation ainsi que la périarthrite et la ténosynovite rendent souvent les animaux boiteux (Stipkovits *et al.*, 1993; Adegboye *et al.*, 1996; Poumarat *et al.*, 1996).

Pathologie mammaire

L'inoculation intramammaire de ce micro-organisme même à faible dose (70 mycoplasmes) a engendré des mammites graves chez les bovins (Illing, 1979; Bocklisch *et al.*, 1991), mais aussi chez des souris où des réactions systémiques ont été observées (Thorns et Boughton, 1980). L'utilisation de souches propagées en milieu de culture inerte réduisait l'extension des lésions sur souris suggérant l'atténuation et la perte de facteurs de virulence (Thorns et Boughton, 1980). Howard et son équipe (1973), Horvath et collègues (1983) ainsi que Pfützner et collaborateurs (1983) ont ainsi pu reproduire,

avec certaines souches respiratoires, urogénitales, articulaires et d'autres isolées de kératoconjonctivites, des infections de la glande mammaire bovine accompagnées d'œdème et d'infiltrats de polymorphonucléaires neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages. De l'hyperthermie ainsi que la transmission de l'infection à d'autres quartiers de la glande mammaire et à d'autres animaux ont suivi ces infections expérimentales (Bocklisch *et al.*, 1991).

Lors de mammites dans un troupeau, *M. bovis* est l'espèce de mycoplasme la plus fréquemment identifiée (Bennett et Jasper, 1978). Ces infections sont sporadiques dans les grandes unités de production laitière où la transmission est rapide (Kunkel, 1985) et semblent plus fréquentes en hiver (Brown *et al.*, 1990 ; Feenstra *et al.*, 1991 ; Gonzalez *et al.*, 1992 ; Brice *et al.*, 2000 ; Byrne *et al.*, 2001). Plusieurs quartiers sont atteints et présentent des sécrétions séropurulentes. On observe peu de signes cliniques systémiques mais la résistance aux traitements antibiotiques classiques (Gunning et Shepherd, 1996) et la diminution de la production laitière sont significatives (Kunkel, 1985 ; Poumarat *et al.*, 1996).

Pathologie génitale

L'inoculation de *M. bovis* dans la vésicule séminale provoque une inflammation aiguë et le portage de la bactérie durant plus de 8 mois (LaFaunce et McEntee, 1982). Toutefois, les autres voies d'inoculation n'ont pas pu reproduire de vésiculite. Lors d'infections naturelles, *M. bovis* peut occasionnellement provoquer des lésions génitales et des avortements (Poumarat *et al.*, 1996 ; Byrne *et al.*, 2000).

PATHOGÉNICITÉ DE MYCOPLASMA BOVIS

Les mécanismes pathogènes de *M. bovis* sont relativement peu connus, mais les données actuelles suggèrent d'ores et déjà l'utilisation de stratégies complexes et multifactorielles.

Adhésion de *Mycoplasma bovis*

L'adhésion aux cellules de l'hôte constitue la première étape de l'infec-

tion, étape primordiale quel que soit l'agent pathogène.

Adhésion aux cellules phagocytaires

L'interaction de *M. bovis* avec les neutrophiles et les macrophages a été analysée par Thomas et collègues en 1991. Ils ont observé l'adhésion de *M. bovis* sur ces cellules de façon dose-dépendante et l'absence de phagocytose de *M. bovis* par ces cellules. Howard (1984) avait précédemment montré que *M. bovis* persistait et se multipliait à la surface de ces cellules.

Adhésion aux cellules non-phagocytaires

L'adhésion de *M. bovis* sur les lymphocytes, contrairement à d'autres mycoplasmes bovins pathogènes ou non pathogènes, provoque l'apoptose de ces cellules immunitaires via une ou plusieurs protéines non identifiées à l'heure actuelle (Vanden Busch et Rosenbusch, 2001). La nature de l'adhésion n'a pas été étudiée.

Les données obtenues sur les propriétés et mécanismes d'adhésion à des cellules en culture sont assez récentes et concernent essentiellement la souche de référence PG45 sur la lignée continue de cellules embryonnaires pulmonaires bovines (*embryonic bovine lung* ou EBL) (Sachse *et al.*, 1993 ; 1996 ; 2000). Ces expériences ont décrit la cinétique de l'adhésion, sa spécificité et l'implication de protéines, dont la protéine P26, et de résidus sialylés bactériens dans l'adhésion, ainsi que des résidus d'acide sialique et des groupements sulfatidés comme récepteurs cellulaires (Sachse *et al.*, 1993). Il a cependant été observé, soit *in vivo*, soit *in vitro* sur culture d'anneaux de trachée, que *M. bovis* n'adhère pas spécifiquement aux cils des cellules épithéliales de la trachée à la manière de *M. pneumoniae* et de *M. dispar* (Howard *et al.*, 1987 ; Rodriguez *et al.*, 1996). Le rôle de la protéine P26 (Sachse *et al.*, 1993), dont l'importance relative varierait selon la souche de *M. bovis*, n'a cependant pas été démontré *in vivo*. Récemment, Sachse et collaborateurs (2000) ont montré l'implication de peptides appartenant à certaines protéines variables de surface (Vsps pour *variable surface lipoproteins*) dans l'adhésion de la souche de référence PG45 sur la lignée continue de cellules EBL. Ainsi, plusieurs oligopeptides dérivés des séquences répétées des Vsps A, B, E et F inhi-

bent partiellement l'adhésion de la souche *M. bovis* PG45 aux cellules EBL. De plus, certaines de ces séquences représentent des épitopes immunogènes, illustrant l'importance des Vsps dans la pathogénie de *M. bovis* en tant qu'adhésines et épitopes immunogènes.

Activité antiphagocytaire

Les micro-organismes qui réussissent à échapper aux défenses physico-chimiques de la trachée et des grosses bronches (mouvements vibratiles des cils, mucus, réflexe de toux) rencontrent les macrophages alvéolaires lorsqu'ils atteignent les alvéoles pulmonaires. L'activité principale des macrophages est l'ingestion par phagocytose des cellules et des particules étrangères, conduisant à leur destruction. Les micro-organismes pneumopathogènes ont développé des stratégies afin d'échapper à cette phagocytose et à cette destruction.

M. bovis est ainsi capable de survivre en inhibant la phagocytose proprement dite (Thomas *et al.*, 1991). Cependant, l'activité tueuse des macrophages n'est en rien affectée. L'addition, au milieu de culture, d'immunsérums spécifiques à *M. bovis* produits sur veaux et lapins permet aux macrophages et aux polymorphonucléaires neutrophiles d'ingérer les mycoplasmes et de les détruire (Howard *et al.*, 1976 ; Howard, 1984). Les mécanismes par lesquels *M. bovis* inhibe la phagocytose ne sont pas connus.

Invasion

Des études, menées *ex vivo* sur des cultures d'anneaux de trachée et *in vivo* chez des veaux naturellement et expérimentalement infectés par *M. bovis*, ont montré que *M. bovis* est capable d'envahir la muqueuse de l'épithélium trachéobronchique et de s'y multiplier, au contraire de *M. dispar*, qui reste localisé à la surface de l'épithélium respiratoire (Howard *et al.*, 1987). *M. bovis* pénètre au travers de l'épithélium respiratoire, entre les cellules (Howard *et al.*, 1987). Cette pénétration en profondeur de *M. bovis* est également observée *in vivo* (Rodriguez *et al.*, 1996). Des localisations intracellulaires sont présentes dans les cas chroniques et permettraient aux mycoplasmes d'échapper et de persister en évitant les défenses

de l'hôte (Rodriguez *et al.*, 1996). Les actions pathogènes systémiques (arthrites par exemple) de cette espèce bactérienne surviennent probablement après le passage de la bactérie dans le système circulatoire. Ainsi, l'isolement de *M. bovis* en phase aiguë à partir du sang et de multiples organes (cerveau, foie, rate, rein, ...) prouve le caractère hautement septicémique de l'infection (Poumarat *et al.*, 1996).

Toxicité

Une toxine a été mise en évidence chez *M. bovis* par extraction dans l'éthanol à 75 %. Il s'agit d'un complexe polysaccharidique thermostable, d'un poids moléculaire de 73000 daltons, localisé dans la membrane cytoplasmique où il est associé à des protéines. Seule la partie polysaccharidique est toxique. Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'une exotoxine car aucun effet toxique n'a jamais été observé à partir des surnageants de culture. Son activité s'exerce via une exacerbation de la réponse inflammatoire, par augmentation de la perméabilité capillaire et par activation de la cascade du complément, activités qui sont proches de celle du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif (Geary *et al.*, 1988). Aucune autre publication n'évoque la présence de toxine chez *M. bovis*, laissant le mystère entier.

Récemment, l'infection expérimentale par *M. bovis* a provoqué l'exacerbation des lésions chez un lot d'animaux vaccinés par rapport au lot d'animaux témoins suggérant le rôle de l'immunité à médiation cellulaire et l'intervention d'une hypersensibilité de type IV dans la pathogénie de *M. bovis* (Bryson *et al.*, 1999).

Hypervariabilité antigénique

Processus

La souche de référence PG45 de *M. bovis* ainsi que les souches de terrain sont capables de modifier rapidement certains déterminants antigéniques exposés à leur surface. Ce processus est appelé hypervariabilité antigénique et remet en question la définition d'une souche de référence, d'un vaccin et des tests d'identification de *M. bovis*. Cette hypervariabilité antigénique représente un phénomène dynamique, contrairement à la

variation antigénique observée entre différentes souches d'*Escherichia coli*, par exemple, qui est statique.

L'hypervariabilité antigénique de *M. bovis* a été mise en évidence en 1994 par Behrens et collègues. Ils ont observé une extrême variabilité d'expression d'antigènes parmi des souches d'origines (animaux asymptomatiques, atteints d'arthrite ou de mammite ou de pneumonie) et de pays différents. Cette observation a été confortée par Poumarat et collaborateurs (1994). Des variations d'expression ont été remarquées par microscopie électronique entre différents clones d'une même souche, illustrant la dynamique du processus (Behrens *et al.*, 1996).

Antigènes

Ces antigènes hypervariables de surface sont principalement des lipoprotéines (Vsp ou *variable surface lipoprotein*, de A à O) et sont fortement immunogènes. Leur extrémité aminée est chargée positivement alors que la région centrale est hydrophobe. Ces protéines sont composées jusqu'à 80 % de structures (18 connues actuellement) polypeptidiques périodiques, c'est-à-dire répétées, et de longueur variable (Lysnyansky *et al.*, 1999 et 2001). Les 29 premiers acides aminés dans la portion N-terminale de ces Vsps sont conservés. Les résidus cystéine représentent le site d'acylation de ces lipoprotéines (Razin *et al.*, 1998).

Mécanismes génétiques

Des variations d'expression ou processus *switch ON-OFF* ainsi que des variations de taille ont été décrites par Lysnyansky et collaborateurs (1996). L'insertion d'une séquence au niveau du promoteur est responsable de la non-expression de la protéine (*Switch OFF*). L'inversion de séquences peut engendrer la juxtaposition d'un promoteur et l'expression de la protéine (*Switch ON*) (Lysnyansky *et al.*, 2001). L'insertion ou la délétion d'une séquence répétée parmi d'autres séquences répétées provoque une variation de taille (Yogev *et al.*, 2002). Ces réarrangements de l'ADN se produisent spontanément et fréquemment. Des recombinaisons intergéniques peuvent provoquer l'apparition de nouvelles configurations génétiques et de nouveaux variants. Jusqu'à présent, 13 gènes et 13 sites de recombinaison impliqués dans ces

mécanismes ont été identifiés sur le locus *vsp* de la souche de référence PG45 (Yogev *et al.*, 2002). Enfin, deux gènes adjacents aux gènes *vsp* présentent des séquences homologues à celles codant pour des recombinases et pourraient intervenir dans l'hypervariabilité antigénique de *M. bovis* (Ron *et al.*, 2002).

Fonctions

Plusieurs hypothèses ont été développées quant aux fonctions de cette hypervariabilité faisant de *M. bovis* un caméléon redoutable. Ainsi, Poumarat et collaborateurs (1996) suggèrent l'adhésion aux cellules de l'hôte, l'éviction du système immunitaire, et l'adaptation de ce mycoplasme à son environnement et à son hôte. L'implication des Vsps dans l'adhésion aux cellules de l'hôte a été démontrée par Sachse et collègues (1996; 2000). L'éviction du système immunitaire a été étudiée par Le Grand et collaborateurs (1996b). Ils ont montré, *in vitro*, que l'ajout d'anticorps dirigés contre certaines Vsps dans le milieu de culture modifie l'expression des antigènes, et que le retrait de ces anticorps rétablit l'expression initiale mais engendre également de nouveaux variants d'expression. Des mutations à très haute fréquence ou la variation d'expression des antigènes suite à la liaison des anticorps sur ces antigènes pourraient expliquer leurs observations.

Cette hypervariabilité est donc responsable du polymorphisme d'expression protéique observé *in vitro* et *in vivo* chez les souches de terrain. Toutes celles-ci possèdent les gènes *vsp* avec, cependant, des variations du nombre et des caractéristiques de ces gènes, ainsi que du nombre de copies des séquences répétées (Poumarat *et al.*, 1994; Beier *et al.*, 1998; Poumarat *et al.*, 1999). Ces observations suscitent de nombreuses questions quant à leur signification *in vivo*, et de nombreuses controverses quant à l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans les réactions d'immunomarquage et à la définition d'une souche de référence (Rosengarten et Yogev, 1996).

DIAGNOSTIC

Plusieurs méthodes de détection et d'identification des mycoplasmes peuvent être appliquées. La technique

classique est la culture sur gélose associée au marquage fluorescent avec des anticorps spécifiques de diverses espèces afin d'optimiser la spécificité et la sensibilité. Les techniques immunologiques avec recherche d'antigènes en bouillon sont fréquemment utilisées (Poumarat *et al.*, 1991 ; 1992). Enfin, les techniques se basant sur le patrimoine génétique des mycoplasmes se développent actuellement pour un diagnostic de routine à grande échelle (Hirose *et al.*, 2001).

Le diagnostic sérologique permettant la détection d'anticorps par ELISA ou *enzyme-linked immunosorbent assay*, par hémagglutination indirecte ou par inhibition de film, est intéressante en routine sur les troupeaux.

Isolement de *Mycoplasma bovis*

Prélèvements

L'isolement des mycoplasmes respiratoires peut être réalisé à partir de plusieurs types de prélèvement du tractus respiratoire : l'écouvillon nasal ou pharyngé, le lavage broncho-alvéolaire, l'aspiration transtrachéale et le poumon-même. Ce dernier cas est limité au diagnostic *post mortem*. L'écouvillon nasal est peu coûteux, rapide et facilement réalisable. Toutefois, la flore commensale nasale interfère avec la croissance lente des mycoplasmes. L'aspiration transtrachéale est difficile à appliquer en routine, car elle nécessite une anesthésie et une aseptie locales (Schreiber *et al.*, 2000). Le lavage broncho-alvéolaire est une alternative intéressante dans l'identification de *M. bovis* lors de pathologies respiratoires.

Le lait et le liquide synovial sont les deux prélèvements à réaliser lors de mammite et d'arthrite respectivement. Enfin, l'écouvillon est applicable lors d'otite ou de kératoconjonctivite, et le liquide pleural lors de pleurésie (Nicholas et Baker, 1998).

Ces prélèvements doivent être transportés sous le couvert du froid. Ainsi, les échantillons peuvent être conservés à 4°C pendant plusieurs jours, et à -20°C pendant des mois (Nicholas et Baker, 1998). En effet, vu la culture fastidieuse des mycoplasmes, il est nécessaire d'optimiser leur survie et de minimaliser le risque de contaminations par d'autres bactéries ou des moisissures.

Croissance *in vitro*

Plusieurs milieux de culture permettent l'isolement de *M. bovis*. Les cultures peuvent être réalisées sur gélose ou en bouillon. Tous ces milieux comprennent du sérum (soit de cheval, soit de porc), de l'extrait de levure, du glucose et/ou du pyruvate ainsi que des agents sélectifs tels que l'ampicilline et la bacitracine. Le milieu Hayflick est un des principaux milieux de culture bien que des variantes existent (Shimizu, 1983) dont certaines sont commercialisées. Malgré la présence d'agents sélectifs, les risques de contamination par des bactéries ou des champignons ne sont pas négligeables vu la richesse du milieu et la durée de la culture (24 à 72 h pour *M. bovis*). De plus, ces milieux complexes et coûteux ne sont pas spécifiques à *M. bovis*, et bien d'autres espèces comme *M. bovirhinis* peuvent y pousser. Shimizu (1983) a toutefois décrit une gélose sélective comprenant du *Tween 80* qui permet d'identifier les colonies de *M. bovis* par leur aspect en œufs sur le plat, entourées d'agrégats produits par la réaction entre la lipase de cette bactérie et le *Tween 80* (Devriese et Haesebrouck, 1991).

En résumé, la lenteur de la croissance des mycoplasmes, la complexité des milieux utilisés et leur coût, la taille réduite des colonies et enfin la présence de contaminants qui nécessite l'ajout d'antibiotiques dans le milieu, expliquent les difficultés de croissance *in vitro*. Toutefois, elle reste indispensable afin de réaliser des subcultures et d'observer des co-infections par plusieurs espèces de mycoplasmes.

Identification de *Mycoplasma bovis*

Identification biochimique

Elle est fastidieuse et longue puisqu'elle nécessite l'isolement de colonies sur gélose puis seulement l'identification en bouillon contenant les différents métabolites dont le pyruvate pour *M. bovis* (Megid *et al.*, 2001). L'utilisation de cette substance par *M. bovis* provoque une diminution du pH du milieu et un virage de l'indicateur (rouge de phénol) du rouge à l'orange-jaune.

Identification immunologique

L'identification immunologique est très fréquente pour le diagnostic de *M. bovis*. L'utilisation de ces techniques permet d'identifier plus rapidement le mycoplasme dans un large nombre d'échantillons. Toutefois, elles nécessitent le plus souvent un pré-enrichissement afin d'augmenter la sensibilité, talon d'Achille de ces méthodes.

Les anticorps monoclonaux permettent une plus grande spécificité par rapport aux sérums polyclonaux compte tenu du risque de réactions croisées de ces derniers (Poumarat *et al.*, 1991 ; Ball *et al.*, 1994a ; 1994b). Mais, certains auteurs (Poumarat *et al.*, 1996) préconisent d'utiliser des sérums polyclonaux vu la variabilité antigénique des mycoplasmes en général et de *M. bovis* en particulier.

La détection des antigènes sur coupe par immunofluorescence (Muenster *et al.*, 1979) ou par immunohistochimie (Knudtson *et al.*, 1986 ; Gourlay *et al.*, 1989 ; Reilly *et al.*, 1993 ; Adegboye *et al.*, 1995a) permet d'associer la présence de lésions à celle de mycoplasmes (Rodriguez *et al.*, 1996) mais aussi d'éviter les contaminations bactériennes (*Bacillus sp.* par exemple).

La détection des antigènes peut aussi être réalisée à partir des cultures soit par immunofluorescence (Brown *et al.*, 1990), par ELISA avec capture de l'antigène par un immunosérum de lapin (Nielsen *et al.*, 1987 ; Ball *et al.*, 1994a) ou par un anticorps monoclonal (Heller *et al.*, 1993), par *dot immunobinding* sur membrane de filtration (ter Laak et Noordergraaf, 1987 ; Poumarat *et al.*, 1991 ; Poumarat *et al.*, 1992), par inhibition de croissance ou par inhibition métabolique (Hill, 1977).

L'utilisation conjointe de la culture et d'une technique immunologique représente un bon choix stratégique en routine.

Identification génétique

L'hybridation d'ADN, souvent utilisée pour *Mycoplasma gallisepticum* (Geary *et al.*, 1988 ; Dohms *et al.*, 1993), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Stemke, 1989) et *Mycoplasma genitalium* (Hyman *et al.*, 1987 ; Risi *et al.*, 1988), et l'amplification génique (PCR pour *polymerase chain reaction*) sont appliquées en recherche et

Tableau III : Techniques PCR spécifiques à *M. bovis*.

Cible	Caractéristiques	Référence
ARN ribosomal 16 S : fragment de 360 pb	Sur écouvillon nasal (4 10 ² UFC/ml)	Chavez Gonzalez <i>et al.</i> , 1995
ADN génomique : fragment de 2Kpb	Sur lait et écouvillon nasal avec pré-traitements (50 à 500 UFC/ml en 24 h)	Hotzel <i>et al.</i> , 1996
ADN génomique : fragment de 215 pb	10 à 20 UFC/ml	Ghadersohi <i>et al.</i> , 1997
Gène <i>uvrC</i> : fragment de 1,6 Kpb	Différencie <i>M. bovis</i> de <i>M. agalactiae</i>	Subramaniam <i>et al.</i> , 1998
ARN ribosomal 16 S : fragment de 2 Kpb	Sur lait, sans culture	Hirose <i>et al.</i> , 2001
ADN génomique	Sur lait traité avec un conservateur	Pinnow <i>et al.</i> , 2001
ADN génomique	Sur échantillons, sans culture	Hayman et Hirst, 2003

peu à peu en diagnostic de routine. La PCR, visant les séquences spécifiques portées, par exemple, par les gènes hautement conservés codant pour l'ARN ribosomal 16S (Chavez Gonzalez *et al.*, 1995), devient progressivement un outil d'identification incontournable vu sa grande sensibilité, sa grande spécificité, son universalité intra-spécifique et sa rapidité. Certains types de prélèvement nécessitent cependant toujours une culture d'enrichissement en bouillon avant de réaliser le test PCR (Chavez Gonzalez *et al.*, 1995 ; Hotzel *et al.*, 1996 ; Poumarat *et al.*, 1996). Plusieurs espèces de mycoplasmes respiratoires bovins (*U. diversum*, *M. bovis*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma bovigenitalium*) peuvent être identifiées par des tests PCR ciblant l'ARN ribosomal 16S (Vasconcellos Cardoso *et al.*, 2000 ; Hirose *et al.*, 2001). De plus, différents tests PCR ont été développés pour l'identification de *M. bovis* (tableau III). Les expériences se multiplient pour effectuer ces analyses sur les échantillons cliniques afin d'obtenir des résultats le plus rapidement possible. Le désavantage majeur est le risque de faux-positifs dû aux nombreux contaminants présents dans les échantillons. L'avantage majeur d'une telle approche, outre sa rapidité, est sa sensibilité (sensibilité biochimique estimée à minimum 50

unités formant colonie ou UFC/ml suivant le test). L'hybridation d'ADN avec une sonde oligonucléotidique est utilisée plus rarement pour le diagnostic de mycoplasmes bovins. Mattsson et collègues (1991), McCully et Brock (1992) ainsi que Ghadersohi et collaborateurs (1997) ont mis au point des sondes complémentaires à l'ARN ribosomal 16S et des sondes d'ADN spécifiques de *M. bovis*.

Identification des protéines

La technique du *Western immunoblot* n'est pas utilisée en diagnostic, mais bien en recherche pour la comparaison de souches (Beier *et al.*, 1998 ; Poumarat *et al.*, 1999). Elle permet d'analyser l'expression, par la souche étudiée, de protéines spécifiques identifiées par un anticorps monoclonal ou un sérum polyclonal. Elle nécessite la séparation des protéines sur gel, en une ou deux dimensions, puis le transfert de ces protéines sur une membrane.

Diagnostic sérologique

La détection dans le sang (Poumarat *et al.*, 1987) ou dans le lait (Brank *et al.*, 1999 ; Byrne *et al.*, 2000) des anticorps dirigés contre *M. bovis* peut être effectuée par plusieurs tests commercialisés ou non (hémagglutination passive ou indirecte, hémolyse radiale

simple, inhibition de croissance et de formation de film, fixation du complément, ELISA) (Howard *et al.*, 1977 ; Pilaszek et Trusczyński, 1978 ; Thorns, 1978 ; Boothby *et al.*, 1981 ; Poumarat *et al.*, 1987 ; Martin *et al.*, 1989 ; Feenstra *et al.*, 1991). La détection d'anticorps est moins laborieuse que la culture mais sa sensibilité ne permet pas de détecter certains animaux porteurs latents. De plus, le pathogène ne peut pas être détecté pendant la période d'incubation car le taux d'anticorps dans le sérum n'apparaît que 10 à 14 jours après l'infection. Ces tests sont intéressants lors d'analyses sérologiques répétées et effectuées sur un grand nombre d'animaux, mais pas au niveau individuel (Thorns, 1978 ; Poumarat *et al.*, 1996).

Epidémiologie moléculaire

Kusiluka et son équipe (2000) ont pu souligner, par la technique AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), l'homogénéité génomique de souches danoises. Butler et collègues (2001) ont décrit un test PCR permettant de comparer des souches et de déterminer leur parenté afin d'établir le nombre de souches à l'origine de l'infection d'un troupeau.

TRAITEMENTS DES INFECTIONS RESPIRATOIRES À MYCOPLASMA BOVIS

Les techniques classiques d'antibiogramme sont peu applicables en mycoplasmodologie vu la lenteur des cultures sur gélose qui peut altérer l'activité des antibiotiques. Plusieurs techniques alternatives ont été développées tel que l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice en bouillon (Hannan, 2000). Il n'est toutefois pas conseillé de comparer les résultats de différentes études vu l'absence de standardisation des conditions du test.

Résistances innées

Les mycoplasmes sont résistants aux bêta-lactamines car ils ne possèdent pas de peptidoglycan. Ils sont également résistants à l'acide nalidixique, aux polymyxines, aux rifamycines, au triméthoprime et aux sulfamidés (Poumarat *et al.*, 1996).

Sensibilité et résistances acquises

Les mycoplasmes, dont *M. bovis*, sont sensibles aux antibiotiques qui agissent sur la synthèse des protéines ou des acides nucléiques. Ils sont le plus souvent sensibles aux pleuromutilines, dont la tiamuline et la valnémuline, et aux fluoroquinolones (Taylor-Robinson et Bébéar, 1997). Les cyclines (doxycycline et tétracycline par exemple), les macrolides (tylosine et tilmicosine par exemple) et les aminoglycosides (gentamicine, spectinomycine, spiramycine) sont également actifs sur *M. bovis* bien que certaines publications énoncent l'apparition de souches résistantes à ces substances en Europe (Ball *et al.*, 1995 ; Ayling *et al.*, 2000).

Pleuromutilines

De façon plus précise, la tiamuline possède une très bonne activité antibiotique sur *M. bovis* (ter Laak *et al.*, 1993 ; Friis et Szancer, 1994 ; Hannan *et al.*, 1997). Toutefois, elle n'est pas commercialisée en médecine bovine et présente un spectre d'activité étroit. La valnémuline, utilisée en médecine porcine, a permis de contrôler l'infection par *M. bovis* du cheptel bovin (Stipkovits *et al.*, 2001).

Fluoroquinolones

La plupart des souches de *M. bovis* sont sensibles aux fluoroquinolones telles que la danofloxacin (Hannan *et al.*, 1997 ; Ayling *et al.*, 2000) et l'enrofloxacin (Ball *et al.* ; 1995 ; Hannan *et al.*, 1997). Ces substances sont mycoplasmacides à faibles concentrations car elles agissent sur l'ADN-gyrase et la topoisomérase de type IV bactériennes. Des résistances acquises *in vitro* et *in vivo* ont cependant été observées chez plusieurs mycoplasmes humains et animaux.

Tétracyclines

Les résultats concernant la sensibilité de *M. bovis* aux tétracyclines sont variables et dépendent de l'origine des souches (Poumarat et Martel, 1989 ; Cooper *et al.*, 1993 ; Hannan *et al.*, 1997 ; Ayling *et al.*, 2000).

Aminoglycosides

Contrairement à la gentamicine, la spectinomycine est très efficace contre de nombreuses souches (Poumarat et Martel, 1989). Toutefois, malgré une très bonne activité *in vitro* depuis 1976 en France

contre *M. bovis* mais aussi contre les pasteurelles notamment, son activité *in vivo* n'est pas si performante (Poumarat *et al.*, 2001). De plus, des études récentes relativisent l'efficacité *in vitro* de cette substance sur les souches anglaises de *M. bovis* (Ball *et al.*, 1995 ; Ayling *et al.*, 2000).

Enfin, Visser et collègues (1999) ont décrit l'échec de la spectinomycine combinée à la gentamicine, la tylosine et la lincomycine, à éliminer *M. bovis* de spermes artificiellement infectés.

Lincosamides

La lincomycine donne des résultats variables suivant les souches, notamment avec les plus récentes (Devriese et Haesebrouck, 1991 ; ter Laak *et al.*, 1993 ; Friis *et al.*, 1994 ; Ball *et al.*, 1995).

Macrolides

La tylosine et la tilmicosine sont connues pour leur bonne activité sur les mycoplasmes (Picavet *et al.*, 1991 ; Cooper *et al.*, 1993 ; ter Laak *et al.*, 1993 ; Henderson et Ball, 1999). L'efficacité thérapeutique (Picavet *et al.*, 1991) et prophylactique de la tilmicosine (Gourlay *et al.*, 1989 ; Morck *et al.*, 1993) *in vivo* est expliquée par sa très bonne diffusion associée à sa forte liposolubilité, et par sa concentration pulmonaire notamment dans les macrophages alvéolaires, ainsi que par sa persistance et son activité dans différents types cellulaires (Scorneaux et Shryock, 1999). Toutefois, des résistances à ces deux substances apparaissent dans diverses régions d'Europe (Ball *et al.*, 1995 ; Hannan *et al.*, 1997 ; Ayling *et al.*, 2000).

La spiramycine donne des résultats fort variables avec l'existence de résistances en France (Poumarat et Martel, 1989).

Efficacité du traitement

Le succès du traitement des infections respiratoires à *M. bovis* dépend donc de l'efficacité de l'antibiotique à arrêter la multiplication bactérienne, voire à tuer les mycoplasmes, mais aussi de sa distribution et de sa concentration aux niveaux tissulaire et cellulaire, caractéristiques qui ne sont pas prises en compte lors des antibiogrammes réalisés *in vitro*. Le système immunitaire joue aussi un

rôle prépondérant dans l'efficacité du traitement. En effet, l'oxytétracycline par exemple est efficace, si et seulement si, le système immunitaire est fonctionnel (Taylor-Robinson et Furr, 2000). De plus, vu les fréquentes associations de *M. bovis* avec d'autres agents bactériens, il est intéressant de choisir des substances antibiotiques actives contre les pasteurelles et *Haemophilus somnus* entre autres (Poumarat *et al.*, 1996).

PROPHYLAXIE

Plusieurs approches prophylactiques doivent être envisagées en mycoplasmatologie : thérapie prophylactique, gestion du troupeau, hygiène et vaccination. Toutefois, l'absence de vaccin contre *M. bovis* en Europe limite fortement l'efficacité des mesures de prévention de l'infection au sein des troupeaux.

Thérapie prophylactique

L'utilisation préventive de substances antibiotiques n'est à conseiller que dans des cas bien identifiés et pendant une période de temps limitée, en conjonction avec les autres approches sous peine de voir rapidement augmenter les résistances non seulement des mycoplasmes mais aussi des autres bactéries à ces antibiotiques.

Gestion du troupeau

L'analyse des animaux arrivant dans un troupeau ainsi que la détection et la séparation des porteurs sains et des excréteurs permettraient de limiter les infections bovines à *M. bovis* (Bicknell *et al.*, 1983 ; Poumarat *et al.*, 1996). Cependant, cette séparation ne peut se faire sans un diagnostic spécifique et suffisamment sensible.

Le contrôle des spermes servant à l'insémination artificielle, appliqué au Canada par exemple (Garcia *et al.*, 1986), réduirait la transmission de l'infection. Cependant, une telle gestion semble peu réalisable à l'heure actuelle vu le contexte de crise agricole, l'absence de dépistage individuel et la méconnaissance de la prévalence sur le plan national et international (Poumarat *et al.*, 1996). L'abattage des porteurs a été réalisé au Danemark durant quelques années

et a permis de réduire la prévalence de *M. bovis* (Feenstra *et al.*, 1991). Cependant, cette gestion très rigoureuse des élevages n'y est plus pratiquée actuellement (Kusiluka *et al.*, 2000).

Hygiène

Vu la persistance des mycoplasmes dans l'environnement, notamment le fumier, le matériel de traite et l'eau, deux des mesures primordiales et facilement réalisables sont le respect de l'hygiène et la désinfection du matériel lors de suspicion ou de cas prouvés d'infection par *M. bovis* (Pfützner, 1984). L'utilisation de formaldéhyde (Pfützner *et al.*, 1983) et d'acide acétique est recommandée (Poumarat *et al.*, 1996), car ces molécules agissent après peu de temps contrairement aux iodophores également efficaces contre les mycoplasmes mais qui nécessitent une plus grande durée d'exposition. Toutefois, l'efficacité de ces substances est réduite par la présence de lait et des matières organiques en général (Pfützner *et al.*, 1983).

Vaccination

Malgré une demande sans cesse croissante, il n'existe pas de vaccin contre *M. bovis* actuellement sur le marché européen. Les données concernant les variations antigéniques des mycoplasmes ralentissent la production d'un vaccin efficace (Le Grand *et al.*, 1996b). En effet, si une souche est incluse dans la préparation vaccinale, il se peut qu'elle n'exprime pas toutes les valences immunogènes protectrices nécessaires ou qu'elle en perde la faculté d'expression au cours du processus de fabrication. De plus, il est possible que, lors d'infection par les mycoplasmes, la bactérie échappe au système immunitaire par la modification de ses antigènes de surface. Toutefois, des résultats de protection ont été obtenus avec des souches atténuées de *M. mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony et *M. gallisepticum*, espèces connues pour leur variabilité antigénique (Poumarat *et al.*, 1996). Des résultats, récents et encourageants, montrent l'efficacité d'un vaccin pour *M. bovis* (Nicholas *et al.*, 2002). Cependant, les connaissances relatives à la réponse immunitaire engendrée par les mycoplasmes sont à approfondir pour la production d'un vaccin efficace (Mainil *et al.*, 1998).

Réponse immunitaire humorale

Lors d'infections naturelles et expérimentales par *M. bovis*, la production d'IgA est observée au niveau de la cavité nasale et de la trachée (Howard *et al.*, 1986) et celle d'IgG dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (Howard *et al.*, 1979). Les anticorps sont détectables dans le sang, 16 (Poumarat *et al.*, 1987; Bocklisch *et al.*, 1991) à 60 jours après l'infection (Howard *et al.*, 1979; Nagatomo *et al.*, 1996). Les IgM sont produites 2 à 7 semaines après l'infection, suivies par les IgG1 et 2 (Carroll *et al.*, 1977; Howard et Gourlay, 1983; Howard *et al.*, 1986). Cette production d'anticorps dans le sérum et dans le lait (Boothby *et al.*, 1983) peut être élevée notamment lors de l'excrétion de *M. bovis* dans le lait (Feenstra *et al.*, 1991). Cette production, stable et persistante, permet donc l'observation de séroconversions lors d'infection du cheptel bovin et diverses approches de diagnostic sérologique.

Réponse cellulaire

Certaines études ont avancé que *M. bovis* était responsable d'immunosuppression et, plus particulièrement, de l'inhibition de la blastogenèse et de la réduction de la réponse lymphocytaire (de type T) lors d'inoculation sous-cutanée de *M. bovis* à des veaux (Bennett et Jasper, 1977; Thomas *et al.*, 1990). La présence d'adjuvant a néanmoins permis d'augmenter la réponse lymphocytaire (Bennett et Jasper, 1977).

Par contre, *M. bovis* a été associé, plus récemment, à une réponse cellulaire (dont principalement des cellules mononucléées) accrue au niveau du parenchyme pulmonaire. Cette réponse caractérise la lésion observée lors d'infection expérimentale et nommée "cuffing pneumonia", c'est-à-dire "pneumonie avec hyperplasie lymphoïde péribronchique" (Howard *et al.*, 1986). L'accumulation de lymphocytes B et T a été observée dans le parenchyme pulmonaire avec la production d'anticorps (Howard, 1983; Howard *et al.*, 1987).

Essais de vaccination

Il n'existe pas de vaccin contre *M. bovis* commercialisé en Europe à l'heure actuelle. Ceci s'explique notamment par l'hypervariabilité antigénique de ce micro-organisme et par

le risque de cultiver les souches dans des milieux contenant des substances potentiellement infectées par le prion bovin. Toutefois, plusieurs essais avec des souches inactivées, à la formaldéhyde ou à la saponine (Nicholas *et al.*, 2002), ont été réalisés par diverses équipes scientifiques et les résultats obtenus sont encourageants.

Chima et collègues (1981) ont vacciné des veaux par voie parentérale, puis les ont infectés avec *M. bovis*. Ils ont observé une diminution de la fréquence des arthrites par rapport au groupe contrôle non-vacciné. Boothby et son équipe (1986) ont observé l'absence d'infection par *M. bovis* de glandes mammaires d'animaux vaccinés mais, malheureusement, une exacerbation de la réponse inflammatoire cellulaire au niveau de l'organe. Stott et collaborateurs (1987) ont testé l'efficacité d'un vaccin quadrivalent composé des virus BRSV et parainfluenza de type 3 (PI-3) ainsi que de *M. bovis* et *M. dispar* inactivés par la formaldéhyde. Ils ont observé une diminution, malheureusement non significative, de la mortalité dans le groupe des animaux vaccinés (1,9% contre 3,4% dans le groupe contrôle). La même année, Howard et collaborateurs ont comparé l'efficacité d'un vaccin quadrivalent (BRSV, PI-3, *M. bovis*, *M. dispar*) à un vaccin monovalent BRSV. Ils ont décrit une diminution de la mortalité dans les deux groupes par rapport au groupe contrôle. Le vaccin quadrivalent était cependant le plus efficace avec 80 à 100% des animaux ayant répondu sérologiquement pour les valences *M. bovis* et *M. dispar*. Bryson et ses collaborateurs (1999) ont étudié l'efficacité de deux vaccins constitués d'une protéine membranaire purifiée de *M. bovis*. Ils ont observé une augmentation des lésions pulmonaires et suggèrent, comme explication, l'implication d'une réaction d'hypersensibilité de type IV. Des essais récents (Nicholas *et al.*, 2002) ont donné des résultats reproductibles de protection par une souche inactivée à la saponine, mais nécessitent une étude clinique de plus grande envergure.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Ministère Fédéral Belge de l'Agriculture (Conventions 5792-5940 et 6039) pour le financement de leur recherche.

SUMMARY

***Mycoplasma bovis* : summary of current knowledge**

Mycoplasmas frequently infect cattle. Amongst them, *M. Bovis* is the most pathogenic species in countries free from contagious bovine pleuropneumonia because it is responsible for bronchopneumonia, arthritis and mastitis, and is thus associated with

strong economic losses. Several studies have shown the frequency of *M. bovis* in Europe and the spread of antibiotic-resistant strains. Considering the absence of vaccine in Europe, it is essential to understand this bacteria in order to control the infection in cattle. In this context, this paper aims at summarizing the current knowledge about *M. bovis*.

BIBLIOGRAPHIE

- ADEGBOYE D.S., RASBERRY U., HALBUR P.G., ANDREWS J.J., ROSENBUSCH R.F. Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded calf lung tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1995a, **7**, 261-265.
- ADEGBOYE D.S., HALBUR P.G., CAVANAUGH D.L., WERDIN R.E., CHASE C.C.L., MISKIMINS D.W., ROSENBUSCH R.F. Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis*-associated lung abscesses in calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1995b, **7**, 333-337.
- ADEGBOYE D.S., HALBUR P.G., NUTSCH R., KADLEC R.G., ROSENBUSCH R.F. *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and arthritis complicated with pyogranulomatous tenosynovitis in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **3**, 647-649.
- ALLEN J.W., VIEL L., BATEMAN K.G., ROSENDAL S., SHEWEN P.E. Cytological finding in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves : Associations with pulmonary microbial flora. *Can. J. Vet. Res.*, 1992, **56**, 122-126.
- AYLING R.D., BAKER S.E., PEEK M.L., SIMON A.J., NICHOLAS R.A.J. Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.*, 2000, **146**, 745-747.
- BALL H.J., FINLAY D., REILLY G.A.C. Sandwich ELISA detection of *Mycoplasma bovis* in pneumonic calf lungs and nasal swabs. *Vet. Rec.*, 1994a, **135**, 531-532.
- BALL H.J., MACKIE D.P., FINLAY D., GUNN J., MacFARLAND E.A., REILLY G.A.C., POLLOCK D. An antigen-capture ELISA for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Ir. Vet. J.*, 1994b, **47**, 45-52.
- BALL H.J., REILLY C., BRYSON D.G. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains isolated in Northern Ireland. *Ir. Vet. J.*, 1995, **48**, 316-318.
- BEHRENS A., HELLER M., KIRCHHOFF H., YOGEV D., ROSENGARTEN R. A family of phase and size variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsp) of *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 5075-5084.
- BEHRENS A., HELLER M., ROSENBUSCH R., KIRCHHOFF H. Immunoelectron microscopic localization of variable proteins on the surface of *Mycoplasma bovis*. *Microbiology*, 1996, **142**, 1863-1871.
- BEIER T., HOTZEL H., LYNSNYANSKY I., GRAJETZKI C., HELLER M., RABELING B., YOGEV D., SACHSE K. Intraspecies polymorphism of vsp genes and expression profiles of variable surface protein antigens (Vsp) in field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, 1998, **63**, 189-203.
- BENNETT R.H., JASPER D.E. Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. *Cornell Vet.*, 1977, **67**, 361-373.
- BENNETT R., JASPER D.E. Bovine mycoplasmal mastitis from intramammary inoculations of small numbers of *Mycoplasma bovis* : local and systemic antibody response. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **41**, 889-892.
- BICKNELL S.R., GUNNING R.F., JACKSON G., BOUGHTON E., WILSON C.D. Eradication of *Mycoplasma bovis* infection from a dairy herd in Great Britain. *Vet. Rec.*, 1983, **112**, 294-297.
- BIELANSKI A., DEVENISH J., PHILIPPS-TODD B. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* in semen on fertilization and association with *in vitro* produced morula and blastocyst stage embryos. *Theriogenology*, 2000, **53**, 1213-1223.
- BINDER A., AMTSBERG G., DOSE S., FISCHER W., SCHOLZ H., KIRCHHOFF H. Untersuchung von rindern mit respiratorischen erkrankungen auf Mykoplasmen und bakterielle bronchopneumonieerreg. *J. Vet. Med. B*, 1990, **37**, 430-435.
- BOCKLISCH H., KREUSEL S., BRYSON A., PFUTZNER H. Experimental infection of the udder of ewes due to *Mycoplasma bovis*. *J. Vet. Med. B.*, 1991, **38**, 385-390.
- BOOTHBY J.T., JASPER D.E., ROLLINS M.H., THOMAS C.B. Detection of *Mycoplasma bovis* specific IgG in bovine serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 1981, **42**, 1242-1247.
- BOOTHBY J.T., JASPER D.E., ZINKL J.G., THOMAS C.B., DELLINGER J.D. Prevalence of mycoplasmas

- and immune responses to *Mycoplasma bovis* in feedlot calves. *Am. J. Vet. Sci.*, 1983, **44**, 831-838.
- BOOTHBY J.T., JASPER D.E., THOMAS C.B. Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows: effect on the mycoplasmal infection and cellular inflammatory response. *Cornell Vet.*, 1986, **76**, 188-197.
- BOUCHER S., BLANCHARD A., KEMPF I. Premières données sur l'isolement, l'identification et le pouvoir pathogène de deux souches de mycoplasmes (*Mycoplasma bovis* et *Mycoplasma arginini*) isolés de poumons de lapins. 8e Journées de Recherche Cunicole Française, 1999, 21-24.
- BRANK M., LE GRAND D., POU-MARAT F., BEZILLE P., ROSEN-GARTEN R., CITTI C. Development of a recombinant antigen for antibody-based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999, **6**, 861-867.
- BRICE N., FINLAY D., BRYSON D.G., HENDERSON J., McCONNELL W., BALL H.J. Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland, 1993 to 1998. *Vet. Rec.*, 2000, **147**, 335-336.
- BROWN M.B., SHEARER J.K., ELVINGER F. Mycoplasmal mastitis in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1990, **196**, 1097-101.
- BRYSON D.G., BALL H.J., BRICE N., FORSER F., POLLOCK D.S. Pathology of induced *Mycoplasma bovis* calf pneumonia in experimentally vaccinated animals. In : Stipkovits L., Rosengarten R., Frey J.(Eds.) *Mycoplasmas of ruminants : pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. European Communities, Belgium, Vol. 3. 1999, 128-132.
- BURNENS A.P., BONNEMAIN P., BRUDERE U., SCHALCH L., AUDIGE L., LE GRAND D., POU-MARAT F., NICOLET J. The seroprevalence of *Mycoplasma bovis* in lactating cows in Switzerland, particularly in the republic and canton of Jura. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 1999, **141**, 455-460.
- BUTLER J.A., SICKLES S.A., JOHANNIS C.J., ROSENBUSCH R.F. Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: thermal effects on various mycoplasma. *J. Dairy Sci.*, 2000, **83**, 2285-2288.
- BUTLER J.A., PINNOW C.C., THOMSON J.U., LEVISOHN S., ROSENBUSCH R.F. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to investigate *Mycoplasma bovis* outbreaks. *Vet. Microbiol.*, 2001, **78**, 175-181.
- BYRNE W.J., BRENNAN P., McCORMACK R., BALL H.J. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the abomasa contents of an aborted bovine fetus. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 211-212.
- BYRNE W.J., BALL H.J., BRICE N., McCORMACK R., BAKER S.E., AYLING R.D., NICHOLAS R.A.J. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Rec.*, 2000, **146**, 368-369.
- BYRNE W.J., MCCORMACK R., BRICE N., EGAN J., MARKEY B., BALL H.J. Isolation of *Mycoplasma bovis* from clinical samples in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 331-333.
- CARROLL E.J., BENNETT R.H., ROLLINS M., JASPER D.E. The immune response of calves given *Mycoplasma bovis* antigens. *Can. J. Comp. Med.*, 1977, **41**, 279-286.
- CHAVEZ GONZALEZ Y.R., BAS-CUNANA C.R., BOLSKIE G., MATTSSON J.G., FERNANDEZ MOLINA C. JOHANSSON K-E. *in vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet. Microbiol.*, 1995, **47**, 183-190.
- CHIMA J.C., WILKIE B.N., NIELSEN K.H., RUHNKE H.L., TRUSCOTT R.B., MAXIE G., CHICK B. Synovial immunoglobulin and antibody in vaccinated and nonvaccinated calves challenged with *Mycoplasma bovis*. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, **45**, 92-96.
- COGHE J. Evaluation de l'impact fonctionnel du complexe respiratoire bovin: validation de nouvelles technologies et critères objectifs du pronostic. (Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Vétérinaires). Université de Liège : Liège, 2000, 180 p.
- COOPER A.C., FULLER J.R., WHITTLESTONE P., WISE D. R. *in vitro* activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. *Res. Vet. Sci.*, 1993, **54**, 329-334.
- DEVRIESE L.A., HAESBROUCK F. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* using Tween 80 hydrolysis as an indicator of growth. *J. Vet. Med. B*, 1991, **38**, 781-783.
- DOHMS J.E., HNATOW L.L., WHETZEL P., MORGAN R., KEELER C.L. Identification of the putative cytoadhesion gene of *Mycoplasma gallisepticum* and its use as a DNA probe. *Avian Dis.*, 1993, **37**, 380-388.
- EAGLESOME M.D., GARCIA M.M. The effect of *Mycoplasma bovis* on fertilization processes *in vitro* with bull spermatozoa and zona-free hamster oocytes. *Vet. Microbiol.*, 1990, **21**, 329-337.
- EGWU G.O., AMEH J.A., ALIYU M.M., MOHAMMED F.D. Caprine mycoplasmal mastitis in Nigeria. *Small Ruminant Res.*, 2001, **39**, 87-91.
- FEENSTRA A., BISGAARD MASEN E., FRIIS N.F., MEY-LING A., AHRENS P. A field study of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *J. Vet. Med. B*, 1991, **38**, 195-202.
- FLITMAN-TENE R., LEVISOHN S., ROSENBUSCH R., RAPOPORT E., YOGEV D. Genetic variation among the *Mycoplasma agalactiae* isolates detected by the variant surface lipoprotein gene (vspA) of *Mycoplasma bovis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, **156**, 123-128.
- FRIIS N.F., SZANCER J. Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antimicrobial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. *Acta Vet. Scand.*, 1994, **35**, 389-394.
- GARCIA M.M., TRUSCOTT R.B., McLAREN J., STEWART R.B., KINGSCOTE B., BURCHAK J. Absence of *Mycoplasma bovis* in unprocessed frozen bull semen

- from Canadian artificial insemination centers. *Vet. Rec.*, 1986, **119**, 11-12.
- GEARY S.J., TOURTELLOTTE M.E., CAMERON J.A. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: isolation and characterization. *Science*, 1981, **212**, 1032-1033.
- GHADERSOHI A., COELEN R.J., HIRST R.G. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, 1997, **56**, 87-98.
- GONZALEZ R.N., SEARS P.M., MERRILL R.A., HAYES G.L. Mastitis due to *Mycoplasma* in the state of New York during the period 1972-1990. *Cornell Vet.*, 1992, **82**, 29-40.
- GOURLAY R., HOWARD C., THOMAS L., WYLD S. Pathogenicity of some *Mycoplasma* and *Acholeplasma* species in the lungs of gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.*, 1979, **27**, 233-237.
- GOURLAY R.N., HOUGHTON S.B. Experimental pneumonia in conventionally reared and gnotobiotic calves by dual infection with *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica*. *Res. Vet. Sci.*, 1985, **38**, 377-382.
- GOURLAY R., THOMAS L., WYLD S. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet. Rec.*, 1989, **124**, 420-422.
- GUNNING R.F., SHEPHERD P.A. Outbreak of bovine *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Rec.*, 1996, **139**, 23-24.
- HAINES D.M., MARTIN K.M., CLARK E.G., JIM G.K., JANZEN E.D. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can. Vet. J.*, 2001, **42**, 857-860.
- HALE H.H., HELMBOLDT C.F., PLASTRIDGE W.N., STULA E.F. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.*, 1962, **52**, 582-591.
- HANNAN P.C.T., WINDSOR G.D., DE JONG A., SCHMEER N., STEGEMANN M. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, **41**, 2037-2040.
- HANNAN P.C.T. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.*, 2000, **31**, 373-395.
- HAYMAN B., HIRST R. Development of semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from milk and mucosal samples. *Vet. Microbiol.*, 2003, **91**, 91-100.
- HELLER M., BERTHOLD E., PFUTZNER H., LEIRER R., SACHSE K. Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Vet. Microbiol.*, 1993, **37**, 127-133.
- HENDERSON J.P., BALL H.J. Polyarthritis due to *Mycoplasma bovis* infection in adult dairy cattle in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 374-376.
- HILL A.C. The metabolic inhibition test for mycoplasmas based on phosphatase production. *J. Hygiene*, 1977, **79**, 391-393.
- HIROSE K., KAWASAKI Y., KOTANI K., TANAKA A., ABIKO K., OGAWA H. Detection of *Mycoplasma* in mastitic milk by PCR analysis and culture method. *J. Vet. Med. Sci.*, 2001, **63**, 691-693.
- HORVATH G., STIPKOVITS L., VARGA Z., ZOLDAG L., MESZAROS J. Infection of cows by *Mycoplasma bovis*. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 1983, **37**, 401-403.
- HOTZEL H., SACHSE K., PFÜTZNER H. Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.*, 1996, **80**, 505-510.
- HOWARD C.J., GOURLAY R.N., BROWNLIE J. The virulence of T-mycoplasmas, isolated from various animal species, assayed by intramammary inoculation in cattle. *J. Hygiene*, 1973, **71**, 163-170.
- HOWARD C.J., TAYLOR G., COLLINS J., GOURLAY R.N. Interaction of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* with bovine alveolar macrophages and bovine lacteal polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 1976, **14**, 11-17.
- HOWARD C.J., COLLINS J., GOURLAY R.N. A single radial haemolysis technique for the measurement of antibody to *Mycoplasma bovis* in bovine sera. *Res. Vet. Sci.*, 1977, **23**, 128-130.
- HOWARD C.J., GOURLAY R.N., TAYLOR G. Immunity of *Mycoplasma bovis* infections of the respiratory tract of calves. *Res. Vet. Sci.*, 1979, **28**, 242-249.
- HOWARD C.J., GOURLAY R.N. Immune response of calves following the inoculation of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, 1983, **8**, 45-56.
- HOWARD C.J. Comparison of bovine IgG1, IgG2 and IgM for ability to promote killing of *Mycoplasma bovis* by bovine alveolar macrophages and neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1984, **6**, 321-326.
- HOWARD C.J., PARSONS K.R., THOMAS L.H. Systemic and local immune responses of gnotobiotic calves to respiratory infection with *Mycoplasma bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1986, **11**, 291-300.
- HOWARD C.J., THOMAS L.H., PARSONS K.R. Comparative pathogenicity of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma dispar* for the respiratory tract of calves. *Isr. J. Med. Sci.*, 1987, **23**, 621-624.
- HYMAN H.C., YOGEV D., RAZIN S. DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, **25**, 726-728.
- ILLING K. Das klinische bild experimenteller *Mycoplasma bovis*-Mastitiden beim rind. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 1979, **33**, 945-948.
- JACK E.J., MORING J., BOUGHTON E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. Rec.*, 1977, **101**, 287.
- KINDE H., DAFT B.M., WALKER R.L., CHARLTON B.R., PETTY R. *Mycoplasma bovis* associated with decubital abscesses in

- Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 194-197.
- KIRBY F.D., NICHOLAS R.A. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks' eyes. *Vet. Rec.*, 1996, **138**, 552.
- KIRCHHOFF H., BINDER A. Untersuchungen zur Verarbeitung von *Mycoplasma bovis* und anderen *Mycoplasma*-Spezies bei Rindern des Norddeutschen Raumes. *J. Vet. Med. B*, 1986, **33**, 68-72.
- KIRK J.H., GLENN K., RUIZ L., SMITH E. Epidemiologic analysis of *Mycoplasma* spp isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of a milk cooperative. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **211**, 1036-1038.
- KNUDTSON W.U., REED D.E., DANIELS G. Identification of mycoplasmas in pneumonic calf lungs. *Vet. Microbiol.*, 1986, **11**, 79-91.
- KUNKEL J.R. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bulk milk. *Cornell Vet.*, 1985, **75**, 398-400.
- KUSILUKA L.J.M., OJENIYI B., FRIIS N.F. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. *Acta Vet. Scand.*, 2000, **41**, 139-146.
- LAFAYANCE N.A., McENTEE K. Experimental *Mycoplasma bovis* seminal vesiculitis in the bull. *Cornell Vet.*, 1982, **72**, 150-167.
- LANGFORD E.V. *Mycoplasma* species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows. *Can. J. Comp. Med.*, 1975, **39**, 133-138.
- LE GRAND D., POUMARAT F., BEZILLE P. Mycoplasmas of bovines à *Mycoplasma bovis*. *Point Vét.*, 1996a, **28**, 771-778.
- LE GRAND D., SOLSONA M., ROSENGARTEN R., POUMARAT F. Adaptive surface antigen variation in *Mycoplasma bovis* to host immune response. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, **144**, 267-275.
- LE GRAND D., CALAVAS D., BRANK M., CITTI C., ROSENGARTEN R., BEZILLE P., POUMARAT F. Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 268-273.
- LEKEUX P., MARTINEAU G. Rôle des mycoplasmes dans les troubles respiratoires des jeunes bovins. *Ann. Med. Vet.*, 1981, **125**, 173-176.
- LINDEN A., THOMAS A., MAINIL J. Les mycoplasmes respiratoires des bovins : I. Clinique, diagnostic et traitement. *Ann. Med. Vet.*, 1998, **142**, 397-404.
- LOPEZ A., MAXIE M.G., RUHNKE H.L., SAVAN M., THOMSON R.G. Cellular inflammatory response in the lungs of calves exposed to bovine viral diarrhoea virus, *Mycoplasma bovis*, and *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 1283-1287.
- LYSNYANSKY I., ROSENGARTEN R., YOGEV D. Phenotypic switching of variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* involves high-frequency chromosomal rearrangements. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 5395-5401.
- LYSNYANSKY I., SACHSE K., ROSENBUSCH R., LEVISOHN S., YOGEV D. The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis* : gene organization and structural features. *J. Bacteriol.*, 1999, **181**, 5734-41.
- LYSNYANSKY I., RON Y., YOGEV D. Intrachromosomal recombination within the *vsp* locus of *Mycoplasma bovis* generates a chimeric variable surface lipoprotein antigen. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 3703-3712.
- MADOFF S., PIXLEY B.Q., DELGUIDICE R.A., MOELLERING R.C. Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. *J. Clin. Microbiol.*, 1979, **9**, 709-711.
- MAINIL J., THOMAS A., LINDEN A. Les mycoplasmes respiratoires des bovines : II. Propriétés de virulence et vaccination. *Ann. Med. Vet.*, 1998, **142**, 405-410.
- MARTIN J., BOCKLISCH H., PFÜTZNER H., ZEPEZAUER V. *Mycoplasma* infection of calves. 3. The histological picture of *Mycoplasma bovis*-induced pneumonia. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 1983, **37**, 499-507.
- MARTIN S.W., BATEMAN K.G., SHEWEN P.E., ROSENDAL S., BOHAC J.E. The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario. *Can. J. Vet. Res.*, 1989, **53**, 355-362.
- MATTSSON J.G., GERSDORF H., GOBEL U.B., JOHANSSON K-E. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA. *Mol. Cell. Probes*, 1991, **5**, 27-35.
- MATTSSON J.G., GUSS B., JOHANSSON K-E. The phylogeny of *Mycoplasma bovis* as determined by sequence analysis of the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, **115**, 325-328.
- MCCULLY M.A., BROCK K.V. Development of a DNA hybridization probe for detection of *Mycoplasma bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1992, **4**, 464-467.
- MEGID R., NICHOLAS R.A.J., MILES R.J. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. *Vet. Res. Commun.*, 2001, **25**, 1-12.
- MORCK D.W., MERRILL J.K., THORLAKSON B.E., OLSON M.E., TONKINSON L.V., COSTERTON J.W. Prophylactic efficacy of tilmicosin for bovine respiratory tract disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **2**, 273-277.
- MUENSTER O.A., OSE E.E., MATSUOKA T. The incidence of *Mycoplasma dispar*, *Ureaplasma* and conventional *Mycoplasma* in the pneumonic calf lung. *Can. J. Comp. Med.*, 1979, **43**, 392-398.
- NAGATOMO H., SHIMIZU T., HIGASHIYAMA Y., YANO Y., KUROKI H., HAMANA K. Antibody response to *Mycoplasma bovis* of calves introduced in a farm contaminated with the organism. *J. Vet. Med. Sci.*, 1996, **58**, 919-920.
- NAGATOMO H., TAKEGAHARA Y., SONODA T., YAMAGUCHI A., UEMURA R., HAGIWARA S., SUEYOSHI M. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. *Vet. Microbiol.*, 2001, **82**, 223-232.

- NICHOLAS R., BAKER S. Recovery of mycoplasmas from animals. In : Miles R. and Nicholas R. (Eds.) *Mycoplasma protocols*. Vol. 104. Humana Press : Totowa, 1998, 37-44.
- NICHOLAS R.J., AYLING R.D., STIPKOVITS L. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis* : clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine*, 2002, **20**, 3569.
- NIELSEN K.H., STEWART R.B., GARCIA M.M., EAGLESOME M.D. Enzyme immunoassay for detection of *Mycoplasma bovis* antigens in bull semen and preputial washings. *Vet. Rec.*, 1987, **120**, 596-598.
- PFÜTZNER H., KIELSTEIN P., MARTIN J., SCHIMMEL D. Mycoplasma infection of calves. 2. Experimental infection of calves with *Mycoplasma bovis*. *Arch. Experim. Veterinarmed.*, 1983, **37**, 445-451.
- PFÜTZNER H. The tenacity of *Mycoplasma bovis*. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A*, 1984, **258**, 38-41.
- PFÜTZNER H., SCHIMMEL D. *Mycoplasma bovis* isolation in the offspring of cows with *M. bovis* mastitis and its epizootiological significance. *Veterinarmed.*, 1985, **32**, 265-279.
- PICAVET T., MUYLLE E., DEVRIESE L.A., GERYL J. Efficacy of tilmicosin in treatment of pulmonary infections in calves. *Vet. Rec.*, 1991, **129**, 400-403.
- PILASZEK J., TRUSZCZYNSKI M. The role of Mycoplasmales in the development of enzootic pneumonia in calves in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 1978, **22**, 6-13.
- PINNOW C.C., BUTLER J.A., SACHSE K., HOTZEL H., TIMMS L.L., ROSENBUSCH R.F. Detection of *Mycoplasma bovis* in preservative-treated field milk samples. *J. Dairy Sci.*, 2001, **84**, 1640-1645.
- POUMARAT F., PERRIN M., BELLI P., MARTEL J.L. Recherche des anticorps anti-*Mycoplasma bovis* dans le sérum des bovins à l'aide de la réaction d'hémagglutination passive : valeur et limites de la réaction. *Rev. Med. Vet.*, 1987, **138**, 12, 981-989.
- POUMARAT F., PERRIN M., GAUTHIER N., LEPAGE D., MARTEL J. Pathologie respiratoire des veaux de nurserie et des taurillons. *Recl. Med. Vet.*, 1988, **164**, 625-632.
- POUMARAT F., MARTEL J.L. Antibiosensibilité *in vitro* des souches françaises de *Mycoplasma bovis*. *Ann. Rech. Vet.*, 1989, **20**, 145-152.
- POUMARAT F., PERRIN B., LONGCHAMBON D. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.*, 1991, **29**, 329-338.
- POUMARAT F., LONGCHAMBON D., MARTEL J.L. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within "M. mycoides cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.*, 1992, **32**, 375-390.
- POUMARAT F., SOLSONA M., BOLDINI M. Genomic, protein and antigenic variability of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, 1994, **40**, 305-321.
- POUMARAT F., LE GRAND D., BERGONIER D. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Point Vet.*, 1996, **28**, 761-767.
- POUMARAT F., LE GRAND D., SOLSONA M., ROSENGARTEN R., CITTI C. Vsp antigens and vsp-related DNA sequences in field isolates of *Mycoplasma bovis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, **173**, 103-110.
- POUMARAT F., LE GRAND D., PHILIPPE S., CALAVAS D., SCHELCHER F., CABANIE P., TESSIER P., NAVETAT H. Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. *Vet. Microbiol.*, 2001, **80**, 23-35.
- RAZIN S., YOGEV D., NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**, 4, 1094-1156.
- REEVE-JOHNSON L. The impact of mycoplasma infections in respiratory diseases of cattle in Europe. In : Stipkovits L., Rosengarten R. and Frey J. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants : pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. European Communities, Bruxelles, Vol. 3. , 1999, 18-31.
- REILLY G.A.C., BALL H.J., CASSIDY J.P., BRYSON T.D.G. First reported isolation of *Mycoplasma bovis* from pneumonic calves in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, 1993, **133**, 550-551.
- RISI G.F., MARTIN D.H., SILBERMAN J.A., COHEN J.C. A DNA probe for detecting *Mycoplasma genitalium* in clinical specimens. *Mol. Cell. Probes*, 1988, **2**, 327-335.
- RODRIGUEZ F., BRYSON D.G., BAL H.J., FORSTER F. Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. *J. Comp. Pathol.*, 1996, **115**, 151-162.
- RODRIGUEZ F., SARRADELL J., POVEDA J.B., BALL H.J., FERNANDEZ A. Immunohistochemical characterization of lung lesions induced experimentally by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in goats. *J. Comp. Pathol.*, 2000, **123**, 285-293.
- RON Y., FLITMAN-TENE R., DYB-VIG K., YOGEV D. Identification and characterization of a site-specific tyrosine recombinase within the variable loci of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma agalactiae*. *Gene*, 2002, **292**, 205-211.
- ROSENGARTEN R., YOGEV D. Variant colony surface antigenic phenotypes within *Mycoplasma* strain populations : implications for species identification and strain standardization. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 149-158.
- RYAN M.J., WYAND D.S., HILL D.L., TOURTELLOTTE M.E., YANG T.J. Morphologic changes following intrarticular inoculation of *Mycoplasma bovis* in calves. *Vet. Pathol.*, 1983, **20**, 472-487.
- SACHSE K., PFUTZNER H., HELLER M., HANEL I. Inhibition of *Mycoplasma bovis* cytoadherence by a monoclonal antibody and various carbohydrate substances.

- Vet. Microbiol.*, 1993, **36**, 307-316.
- SACHSE K., GRAJETZKI C., ROSENGARTEN R., HÄNEL I., HELLER M., PFÜTZNER H. Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1996, **284**, 80-92.
- SACHSE K., HELBIG J.H., LYS-NYANSKY I., GRAJETZKI C., MULLER W., JACOBS E., YOGEV D. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 680-687.
- SCHREIBER P., THOMAS A., LINDEN A., MAINIL J., COLLARD A. Bactériologie comparée des liquides de lavage pulmonaire obtenus par voie transtrachéale ou par voie nasotrachéale chez le veau. *Ann. Med. Vet.*, 2000, **144**, 169-174.
- SCORNEAUX B., SHRYOCK T.R. Intracellular accumulation, subcellular distribution, and efflux of tilmicosin in bovine mammary, blood, and lung cells. *J. Dairy Sci.*, 1999, **82**, 1202-1212.
- SHIMIZU T. Selective medium for the isolation of *Mycoplasma bovis* from nasal discharges of pneumonic calves. *Res. Vet. Sci.*, 1983, **34**, 371-373.
- STEMKE G.W. A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiologic agent of enzootic porcine pneumonia. *Mol. Cell. Probes*, 1989, **3**, 225-232.
- STIPKOVITS L., RADY M., GLAVITS R. Mycoplasmal arthritis and meningitis in calves. *Acta Vet. Hung.*, 1993, **41**, 73-88.
- STIPKOVITS L., RIPLEY P., VARGA J., PALFI V. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. *Acta Vet. Hung.*, 2000, **48**, 387-395.
- STIPKOVITS L., RIPLEY P., VARGA J., PALFI V. Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 399-402.
- STOTT E.J., THOMAS L.H., HOWARD C.J., GOURLAY R.N. Field trial of a quadrivalent vaccine against calf respiratory disease. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 342-347.
- SUBRAMANIAM S., BERGONIER D., POUMARAT F., CAPAUL S., SCHLATTER Y., NICOLET J., FREY J. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Mol. Cell. Probes*, 1998, **12**, 161-169.
- TAYLOR-ROBINSON D., BEBEAR C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997, **40**, 622-630.
- TAYLOR-ROBINSON D., FURR P.M. Observations on the antibiotic treatment of experimentally induced mycoplasmal infections in mice. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000, **45**, 903-907.
- TEGTMEIER C., UTTENTHAL Aa., FRIIS N.F., JENSEN N.E., JENSEN H.E. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *J. Vet. Med. B*, 1999, **46**, 693-700.
- TER LAAK E.A., NOORDER-GRAAF J.H. An improved method for the identification of *Mycoplasma dispar*. *Vet. Microbiol.*, 1987, **14**, 25-31.
- TER LAAK E.A., NOORDER-GRAAF J.H., DIELTJES R.P.J.W. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves. *J. Vet. Med. B*, 1992a, **39**, 553-562.
- TER LAAK E.A., NOORDER-GRAAF J.H., BOOMSLUITER E. The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. *J. Vet. Med. B*, 1992b, **39**, 610-616.
- TER LAAK E.A., NOORDER-GRAAF J.H., VERSCHURE M.H. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, **37**, 317-321.
- THOMAS C.B., JASPER D.E., WILLEBERG P. Clinical bovine mycoplasmal mastitis. An epidemiological study of factors associated with problem herds. *Acta Vet. Scand.*, 1982, **23**, 53-64.
- THOMAS C.B., METTLER J., SHARP P., JENSEN-KOSTENBADER J.J., SCHULTZ R.D. *Mycoplasma bovis* suppression of bovine lymphocyte response to phytohemagglutinin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1990, **26**, 143-155.
- THOMAS C.B., VAN ESS P., WOLFGRAM L.J., RIEBE J., SHARP P., SCHULTZ R.D. Adherence to bovine neutrophils and suppression of neutrophil chemiluminescence by *Mycoplasma bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1991, **27**, 365-381.
- THOMAS L.H., HOWARD C.J., STOTT E.J., PARSONS K.R. *Mycoplasma bovis* infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. *Vet. Pathol.* 1986, **23**, 571-578.
- THORNS C.J. Characterisation of the antibodies detected by the film inhibition test for *Mycoplasma bovis*. *Res. Vet. Sci.*, 1978, **25**, 386-388.
- THORNS C.J., BOUGHTON E. Effect of serial passages through liquid medium on the virulence of *Mycoplasma bovis* for the mouse mammary gland. *Res. Vet. Sci.*, 1980, **29**, 328-332.
- TOLA S., IDINI G., ROCCHIGIANI A.M., MANUNTA D., ANGIOI P.P., ROCCA S., COCCO M., LEORI G. Comparison of restriction pattern polymorphism of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by pulse field gel electrophoresis. *J. Vet. Med. B*, 1999, **46**, 199-206.
- TSCHOPP R. Epidemiological study of risk factors for *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 2001, **143**, 461-467.
- VANDEN BUSH T.J., ROSENBUSCH R. *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2001, 1361, 1-7.
- VASCONCELLOS CARDOSO M., BLANCHARD A., FERRIS S., VERLENGIA R., TIMENETSKY J., AYR FLORIO DA CUNHA R. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet. Microbiol.*, 2000, **72**, 241-250.
- VISSER I.J.R., TER LAAK E.A., JANSEN H.B. Failure of antibio-

- tics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology*, 1999, **51**, 689-697.
- VOGEL G., NICOLET J., MARTIG J., TSCHUDI P., MEYLAN M. Pneumonia in calves : characterization of the bacterial spectrum and the resistance patterns to antimicrobial drugs. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 2001, **143**, 341-350.
- WALZ P.H., MULLANEY T.P., RENDLER J.A., WALKER R.D., MOSSEY T., BAKER J.C. Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. *J. Vet. Diagnost.*, 1997, **9**, 250-254.
- WIENHUS M., TAOUDI A., KIRCHHOFF H., WEIGT U. Occurrence of *Mycoplasma bovis* in milk samples from cows from the northern part of Germany. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1984, **97**, 311-313.
- YOGEV D., BROWNING G.F., WISE K.S. Genetic mechanisms of surface variation. In : Razin S., Herrmann R. (Eds.) *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Kluwer Academic : New York, 2002, 417-444.