

## ***Mycoplasma bovis* dans le complexe respiratoire bovin et propriétés de cyto-adhésion *in vitro***

THOMAS A. <sup>1</sup>, DIZIER I. <sup>1</sup>, SACHSE K. <sup>2</sup>, BALL H. <sup>3</sup>, MAINIL J. <sup>1</sup>, LINDEN A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43A, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique;

<sup>2</sup> Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Division 4, Naumberger Str. 96a, 07743 Jena, Allemagne;

<sup>3</sup> DARDNI, Bacteriology, Stoney Road, Belfast, Irlande du Nord, Royaume-Uni.

Correspondance : A. Thomas, Morphologie et Pathologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, B43A, Sart Tilman, 4000 Liège.  
Tél. +32 4 366 40 59, Fax +32 4 366 45 65, athomas@ulg.ac.be;

Travail subventionné par le Ministère Fédéral Belge de l'Agriculture.

**RESUME :** *Mycoplasma bovis* est fréquemment isolé en Belgique chez les bovins présentant des troubles respiratoires. Il est souvent associé aux pasteurelles et au virus respiratoire syncytial bovin, démontrant le caractère multifactoriel des pathologies respiratoires, la complexité de leur diagnostic, de leur prophylaxie et de leur thérapie. En raison de la fréquence élevée des souches multirésistantes, il est donc primordial d'optimiser la prophylaxie soit par un vaccin soit par le respect des règles d'hygiène et de gestion des troupeaux.

La compréhension des mécanismes d'adhésion de *M. bovis* aux cellules de l'hôte est essentielle. Nous avons ainsi montré *in vitro* que l'adhésion est fonction (i) de la souche bactérienne, (ii) de son nombre de passages en culture et (iii) de la lignée cellulaire utilisée lors des tests d'adhésion. La souche de référence PG45 s'est avérée non représentative de la plupart des souches de terrain, probablement en raison du nombre élevé de passages subis en milieu de culture inerte. Enfin, *M. bovis* est capable d'adhérer spécifiquement sur des cellules épithéliales bronchiques bovines en culture primaire au moyen de plusieurs protéines dont les protéines variables de surface C et F.

### **INTRODUCTION**

Les mycoplasmes constituent un univers bactérien particulier dont les mystères s'élucident peu à peu. Ils ont été souvent négligés vu leur isolation et identification fastidieuses. Toutefois, l'implication de mycoplasmes dans les pneumonies humaines a incité les chercheurs à isoler, étudier et comprendre la pathogénicité de ces bactéries. En clinique bovine, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* variant «*Small Colony*», agent de la péripneumonie contagieuse bovine, est largement étudié vu son impact économique dans les pays en voie de développement. Dans les pays indemnes de péripneumonie

contagieuse, *Mycoplasma bovis* représente l'espèce la plus pathogène et est responsable de pertes économiques élevées dans les élevages bovins (Pfützner et Sachse, 1996). Cette espèce pathogène est associée à des bronchopneumonies, mammites, infections génitales et arthrites chez les bovins de tous âges. Les dernières données concernant la fréquence de *M. bovis* en Belgique ont été publiées en 1983 et nécessitent une mise à jour (Linden *et al.*, 1998). Les études consacrées à sa pathogénicité sont rares et éparses, mais leurs résultats soulignent les multiples stratégies mises en œuvre de ce micro-organisme au patrimoine génétique limité.

La première de ses propriétés pathogènes est l'adhésion aux cellules eucaryotes. La compréhension et l'identification des structures impliquées dans ce processus ouvriraient de nouvelles perspectives de diagnostic et de prophylaxie (Mainil *et al.*, 1998). Cependant, les connaissances actuelles sur l'adhésion de *M. bovis* sont faibles et peuvent être résumées de la façon suivante : il ne possède pas de structure d'attachement particulière ; il est capable d'interagir avec les neutrophiles et les lymphocytes ; il envahit l'épithélium respiratoire et est capable d'adhérer aux cellules embryonnaires pulmonaires bovines. Cette adhésion a été étudiée quant à sa

**Tableau I:** Comparaison entre les cultures obtenues à partir des écouvillons nasaux et des lavages broncho-alvéolaires (LBA) récoltés chez des bovins atteints de troubles respiratoires récurrents (données paires). Les sensibilités et spécificités de l'écouvillon nasal par rapport au lavage broncho-alvéolaire sont également représentées ; d'après Thomas et collègues (2002a).

	LBA positif	Ecouvillon nasal positif	LBA négatif	Ecouvillon nasal	
				Sensibilité (%)	Spécificité (%)
<i>M. bovis</i> (n = 49) <sup>a</sup>	14(3)*	5(3)	35(33)	21,4	94,3
<i>M. bovirhinis</i> (n = 49)	18(10)	20(10)	31(21)	55,6	67,7
<i>M. arginini</i> (n = 49)	3(0)	0(0)	46(46)	ND	100,0
<i>M. alkalescens</i> (n = 49)	3(0)	0(0)	46(46)	ND	100,0

\*Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre d'animaux chez lesquels l'écouvillon nasal et le lavage broncho-alvéolaire donnent les mêmes résultats ; a = nombre de données paires ; – ND, non déterminé vu le faible nombre de LBAs positifs (n = 3).

cinétique et à l'implication de protéines dont les protéines variables de surface (vsp) (Sachse *et al.*, 1996; 2000). Cependant, ces expériences et les résultats qui en découlent concernent essentiellement la souche de référence PG45 qui a été isolée en 1962 et qui a été repiquée un grand nombre de fois en milieu de culture inerte.

Les objectifs de nos travaux se répartissaient en deux grands thèmes. Le premier était consacré à déterminer la place de *M. bovis* dans le complexe respiratoire bovin en Belgique et le second à étudier les mécanismes de l'adhésion de *M. bovis* aux cellules eucaryotes *in vitro*.

La première partie était subdivisée en trois études dont les objectifs étaient les suivants :

- déterminer la méthode de prélèvement qui, sur le terrain, permet d'isoler *M. bovis* le plus efficacement du tractus respiratoire bovin chez des animaux atteints de troubles respiratoires ;
- déterminer l'importance de *M. bovis* dans le complexe respiratoire bovin en Belgique par la technique de prélèvement déterminée au point 1 ;
- évaluer la susceptibilité des souches de *M. bovis* isolées récemment du tractus respiratoire bovin à dix substances antibiotiques.

**Tableau II.** Fréquences individuelles des mycoplasmes respiratoires et d'*Arcanobacterium pyogenes* chez 50 jeunes bovins cliniquement sains, 110 jeunes bovins atteints de troubles respiratoires récurrents et 20 jeunes bovins atteints de troubles respiratoires aigus ; d'après Thomas et collaborateurs (2002b).

n = 180	Cliniquement sains n = 50	Troubles respiratoires récurrents n = 110	Troubles respiratoires aigus n = 20
<i>M. bovis</i>	0	39 (35,5 %)	10 (50,0 %)
<i>M. dispar</i>	ND	30 (45,5 %) <sup>a</sup>	ND
<i>M. canis</i>	ND	6 (10,7 %) <sup>b</sup>	ND
<i>M. bovirhinis</i>	8 (16,0 %)	45 (40,9 %)	0
<i>M. arginini</i>	0	8 (7,3 %)	3 (15,0 %)
<i>M. alkalescens</i>	0	3 (2,7 %)	0
<i>M. bovisgenitalium</i>	0	0	0
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	0	0	0
<i>Ureaplasma diversum</i>	ND	8 (14,8 %) <sup>c</sup>	ND
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0 <sup>d</sup>	9 (8,2 %)	ND

Echantillons examinés pour *M. dispar* (n = 66)<sup>a</sup>, pour *M. canis* (n = 56)<sup>b</sup>, pour *Ureaplasma diversum* (n = 54)<sup>c</sup> et pour *Arcanobacterium pyogenes* (n = 4)<sup>d</sup> – ND : non déterminé.

**Tableau III:** Associations des mycoplasmes avec le BRSV et *Pasteurella/Mannheimia* spp. ; d'après Thomas et collègues (2002a).

	Poumons BRSV-positifs n = 38	Poumons <i>Pasteurella/Mannheimia</i> spp.-positifs n = 51*
<i>M. bovis</i>	4 (10,5 %)	29 (56,9 %)
<i>M. dispar</i>	3 (7,8 %)	15 (34,9 %) <sup>a</sup>
<i>Ureaplasma diversum</i>	4 (10,5 %)	7 (28,0 %) <sup>b</sup>
<i>M. bovirhinis</i>	2 (5,3 %)	22 (43,1 %)
<i>M. arginini</i>	5 (13,2 %)	4 (7,8 %)

Echantillons examinés pour *M. dispar* (n = 43)<sup>a</sup> et pour *U. diversum* (n = 25)<sup>b</sup>; – \*49 *Pasteurella/Mannheimia* spp. isolées de jeunes bovins atteints de troubles respiratoires récurrents et 2 de poumons pathologiques.

**Tableau IV :** Susceptibilité de 40 souches belges de *M. bovis* vis-à-vis de 10 antibiotiques : écarts et concentrations minimales (initiales) inhibitrices 50 et 90 (CII<sub>50</sub> et CII<sub>90</sub>) calculées à partir de 40 souches de *M. bovis*.

Antibiotique	Ecart	CII (µg/ml)	
		CII <sub>50</sub>	CII <sub>90</sub>
Danofloxacin	0,125-8	0,5 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>
Enrofloxacin	0,25-8	0,5	2
Marbofloxacin	0,25-8	1	2
Tétracycline	<0,03->64	1	64
Oxytétracycline	0,5-64	2	32
Tylosine	0,06->64	2	>64
Tiamuline	<0,03-4	0,06	1
Gentamicine	2->64	8	32
Spectinomycine	0,03->64	1	>64
Lincomycine	0,25->64	2	>64

<sup>a</sup>CII<sub>50</sub> et <sup>b</sup>CII<sub>90</sub> : CII pour laquelle 50 % ou 90 % des souches sont susceptibles, respectivement.

**Tableau V :** Comparaison des taux d'adhésion (%) sur les cellules EBL, EBTr, MDBK et RK avant et après passages en milieu de culture inerte de trois souches de *M. bovis*; d'après Thomas et collaborateurs (2003a).

Souche/ Passage <sup>a</sup>	Lignée cellulaire			
	EBL	EBTr	MDBK	RK
<b>9585/P7<sup>b</sup></b>	13,5 ± 0,4 <sup>c</sup>	8,4 ± 0,4	12,1 ± 0,5	15,1 ± 0,8
<b>9585/P98</b>	8,0 ± 0,5 *	5,5 ± 0,6 *	8,9 ± 1,3 *	8,5 ± 0,8 *
<b>2083/P7</b>	15,4 ± 0,6	7,9 ± 0,9	16,2 ± 1,0	19,1 ± 0,9
<b>2083/P98</b>	8,6 ± 0,3 *	3,5 ± 0,3 *	9,0 ± 1,2 *	11,2 ± 1,2 *
<b>2610/P7</b>	14,7 ± 0,7	11,3 ± 1,1	12,6 ± 1,2	16,1 ± 1,0
<b>2610/P116</b>	2,9 ± 0,5 *	1,8 ± 0,5 *	2,7 ± 0,3 *	3,0 ± 0,5 *

<sup>a</sup> Le nombre avant P indique la souche; <sup>b</sup> P7 signifie 7ème passage, etc; <sup>c</sup> Moyenne ± déviation standard à partir de trois tests indépendants. Le taux d'adhésion au P7 est considéré comme valeur-contrôle;

\*Différence significative par rapport à la valeur-contrôle (P < 0,001).

**Tableau VI :** Effet de cinq anticorps monoclonaux (MAb) spécifiques de *M. bovis* et de deux sérums polyclonaux sur les taux d'adhésion de la souche de *M. bovis* 0435 aux cellules épithéliales bronchiques bovines (CEB) en culture primaire; d'après Thomas et collègues (2003b).

Anticorps	Effet sur les taux d'adhésion sur les CEB
<b>MAb 1E5</b>	-24,7 % à + 3,6 %
<b>MAb 4D7</b>	-23,0 % à +7,1 %
<b>MAb 9F1</b>	-32,6 % à - 34,0 %*
<b>MAb 2A8</b>	-21,9 % à - 27,3 %*
<b>MAb 4F6</b>	-7,6 % à - 20,2 %
<b>Polyclonal anti-<i>M. bovis</i></b>	-35,7 % à - 45,3 %*
<b>Polyclonal anti-<i>M. dispar</i></b>	-1,7 % à - 13,5 %

Tests d'adhésion réalisés à 37°C pendant 30 min; Moyennes et déviations standards calculées à partir de trois tests indépendants; - et + pour réduction et augmentation des taux d'adhésion respectivement;

\*réduction significative (P < 0,05).

La seconde partie du travail visait à étudier, *in vitro*, l'adhésion de *M. bovis* aux cellules de l'hôte et était subdivisée en deux études dont les objectifs étaient les suivants :

1. évaluer la représentativité de la souche de référence PG45 de *M. bovis* quant à sa capacité d'adhésion aux cellules de l'hôte en culture;
2. caractériser l'adhésion de *M. bovis* sur une culture primaire de cellules épithéliales bronchiques bovines et identifier l'(les) adhésine(s) incriminée(s).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Première partie

Afin d'atteindre les trois premiers objectifs, nous avons, dans un premier temps, comparé les isollements de mycoplasmes par diverses techniques de prélèvement dont l'écouvillonnage nasal, le lavage broncho-alvéolaire et la section pulmonaire en *post mortem*, ainsi que l'écouvillonnage nasal et le lavage broncho-alvéolaire en *ante mortem* (Thomas *et al.*, 2002a). Dans un deuxième temps, nous avons déterminé les fréquences d'isolement de mycoplasmes à partir de lavages broncho-alvéolaires (LBA, n=388) chez des bovins vivants, cliniquement sains ou atteints de troubles respiratoires aigus et récurrents, ainsi qu'à partir de poumons macroscopiquement sains ou pathologiques. Neuf espèces de mycoplasmes ont été recherchées par culture, ELISA Sandwich (Ball *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2002b) et *immunobinding* sur membrane de filtration (Poumarat *et al.*, 1991). De plus, nous avons étudié l'association de *M. bovis* au virus respiratoire syncytial bovin (BRSV), à *Arcanobacterium pyogenes* et aux pasteurelles, *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* (Thomas *et al.*, 2002b). Dans un troisième temps, quarante souches de *M. bovis*, isolées récemment en Belgique, ont été étudiées quant à leur susceptibilité à dix antibiotiques (danofloxacin, enrofloxacin, gentamicine, lincomycine, marbofloxacin, oxytétracycline, spectinomycine, tétracycline,

tiamuline, tylosine) par la technique des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide (Hannan, 2000).

## Deuxième partie

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons comparé 16 souches marquées radioactivement (Sachse *et al.*, 1993) et isolées de pneumonies, mammites ou arthrites à la souche de référence PG45, à une souche lapine et à une souche bovine isolée d'un animal asymptomatique; ces trois dernières souches formant un groupe «contrôle». Ces comparaisons ont été effectuées sur 4 lignées cellulaires: embryonnaire pulmonaire bovine (EBL), embryonnaire trachéale bovine (EBTr), rénale bovine (MDBK, *Madin Darby bovine kidney*) et rénale lapine (RK, *rabbit kidney*). L'effet du nombre de passages en milieu de culture inerte a également été analysé sur les différentes lignées (Thomas *et al.*, 2003a). Ces résultats ont été confrontés à ceux obtenus sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques bovines. La nature de l'adhésion de *M. bovis* a été analysée par trypsinisation des mycoplasmes et par inhibition de l'adhésion par divers anticorps (Thomas *et al.*, 2003b).

## RÉSULTATS

### Première partie

La comparaison entre les trois techniques de prélèvement a mis en évidence la faiblesse de l'écouvillon nasal pour l'isolement de mycoplasmes, et principalement de *M. bovis* chez des animaux atteints de troubles respiratoires profonds (tableau I). Par contre, le LBA a permis l'isolement de *M. bovis* dans tous les poumons positifs pour *M. bovis*. Cette étude a confirmé l'intérêt de cette technique en routine pour l'isolement de *M. bovis* lors de pathologies respiratoires bovines.

Ainsi, 76,4% des LBAs prélevés chez des bovins atteints de troubles respiratoires étaient infectés par des mycoplasmes contrairement aux 16,0% observés chez les bovins sains. *M. bovis* n'a pas été identifié chez ces

derniers alors qu'il était présent chez 35,5% des cas récurrents et 50,0% des cas aigus (tableau II). L'association de *M. bovis* avec d'autres mycoplasmes était fréquente de même que celle avec des pasteurelles (tableau III). *M. bovis* a été isolé fréquemment (28,6%) dans des poumons pathologiques et rarement dans des poumons macroscopiquement sains (2,0%). L'association de *M. bovis* avec le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) était par contre moins fréquemment observée (10,5%) (tableau III).

Enfin, de nombreuses souches belges de *M. bovis* isolées récemment du tractus respiratoire bovin étaient mul-

tirésistantes (tableau IV). La tiamuline et les fluoroquinolones étaient les antibiotiques les plus efficaces contre la plupart des souches.

### Deuxième partie

Les résultats repris dans la figure 1 illustrent la variabilité des capacités d'adhésion entre les diverses souches. Nous n'observons pas de différence significative entre les 3 groupes (pneumonie, mammite, arthrite) alors que nous en observons une entre ces trois groupes et le groupe «contrôle», comprenant la souche PG45, la souche lapine et la souche asymptomatique, quelle que soit la lignée cel-

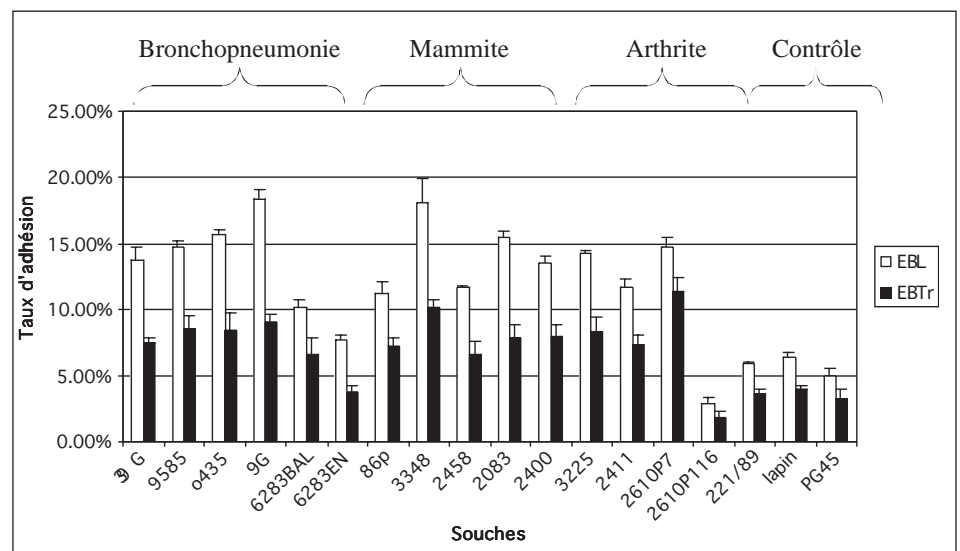


Figure 1: Taux d'adhésion (%) de différentes souches de *M. bovis* sur les lignées cellulaires EBL et EBTr; d'après Thomas et collègues (2003a).

Valeurs moyennes et déviations standards calculées à partir de trois tests d'adhésion indépendants; adhésion réalisée durant 30 minutes à 37°C; mycoplasmes marqués radioactivement selon Sachse et collaborateurs, 1993.

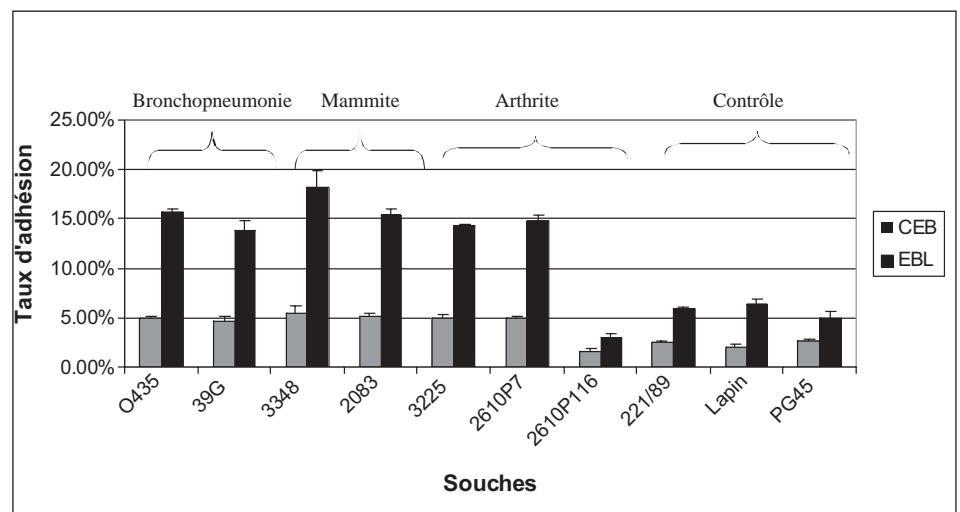


Figure 2: Taux d'adhésion (%) de différentes souches de *M. bovis* sur des cellules épithéliales bronchiques bovines en culture primaire et sur les cellules EBL; d'après Thomas et collaborateurs (2003b).

Valeurs moyennes et déviations standards calculées à partir de trois tests d'adhésion indépendants; adhésion réalisée durant 30 minutes à 37°C; mycoplasmes marqués radioactivement selon Sachse et collaborateurs, 1993.

lulaire (figure 1). Néanmoins, les taux d'adhésion étaient systématiquement plus faibles sur les cellules trachéales que sur les cellules pulmonaires bovines. La faible adhésion de PG45 peut être due au grand nombre de passages de cette souche puisque nous observons une diminution significative de l'adhésion lors d'une augmentation du nombre de passages (plus de 100) (tableau V). Ces différentes observations ont été confirmées sur culture primaire de cellules épithéliales bronchiques bovines (figure 2). La trypsinisation des mycoplasmes diminue significativement leur taux d'adhésion sur les cellules épithéliales bronchiques bovines en culture primaire, suggérant l'implication de protéines dans cette interaction. L'inhibition de l'adhésion par des anticorps dirigés notamment contre les vsp C et F (2A8 et 9F1 respectivement) confirme l'implication de plusieurs protéines dans cette première étape de l'infection (tableau VI).

## CONCLUSIONS

*M. bovis* est fréquemment isolé en Belgique chez les bovins présentant des troubles respiratoires. Il est souvent associé aux pasteurelles et au virus respiratoire syncytial bovin, démontrant le caractère multifactoriel des pathologies respiratoires, la complexité de leur diagnostic, de leur prophylaxie et de leur thérapie. En raison de la fréquence élevée des souches multirésistantes, il est donc primordial d'optimiser la prophylaxie soit par un vaccin soit par le respect des règles d'hygiène et de gestion des troupeaux.

La compréhension des mécanismes d'adhésion de *M. bovis* aux cellules de l'hôte est essentielle. Nous avons

ainsi montré que l'adhésion est fonction de la souche bactérienne, de son nombre de passages en milieu de culture inerte et de la lignée cellulaire utilisée. De plus, *M. bovis* est capable d'adhérer sur des cellules épithéliales bronchiques bovines en culture primaire au moyen de plusieurs protéines dont les vsp C et F. Cette adhésion est spécifique vu la saturation des récepteurs et l'inhibition de l'adhésion par des mycoplasmes non radioactifs (Thomas *et al.*, 2003b).

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le Ministère Fédéral Belge de l'Agriculture et SPSA pour leur soutien financier, les firmes Pfizer, Vétoquinol et Bayer pour nous avoir procuré respectivement la danofloxacine, la marbofloxacine et l'enrofloxacine. Nous remercions le Dr Poumarat (AFSSA, Lyon, France) pour son aide scientifique ainsi que les Dr Desmecht (Pathologie Spéciale, FMV, ULg, Liège, Belgique), Coghe (Physiologie, FMV, ULg, Liège, Belgique) et Schreiber (CER, Marloie, Belgique) pour les prélèvements.

## ***Mycoplasma bovis* in the bovine respiratory disease complex and its *in vitro* cytoadherence**

## SUMMARY

Mycoplasmas frequently infect cattle, causing especially respiratory diseases. *Mycoplasma bovis* is the most important pathogenic species in countries free of bovine contagious pleuro-

pneumonia. This species was frequently isolated in Belgium from cattle with respiratory disease. Furthermore, associations were often observed with pasteurellas and bovine respiratory syncytial virus. Of these *M. bovis* isolates, many were resistant to several antimicrobial agents which are used in cattle practice, except to fluoroquinolones. Inasmuch the high frequency of *M. bovis* isolation and antibiotic resistances, it is very important to understand the pathogenicity of this bacteria in order to optimize prophylactic tools. Therefore, the study of the cytoadherence of *M. bovis* is essential since it represents the first step of the bacterial infection. According to our experimental results, PG45 is not representative of field isolates because of its low adherence rates to various cell lines. This could be explained by the high number of subcultures of this pathogenic strain underwent since its first isolation, which sharply contrasts with other isolates. *M. bovis* adheres specifically to bovine bronchial epithelial cells in primary culture. Proteins such as variable surface proteins C and F are involved in this step as observed by decreased adherence rates after trypsinization of mycoplasma cells or addition of monoclonal antibodies.

---

## BIBLIOGRAPHIE

- BALL H.J., FINLAY D., REILLY G.A.C. Sandwich ELISA detection of *Mycoplasma bovis* in pneumonic calf lungs and nasal swabs. *Vet. Rec.*, 1994, **135**, 531-532.
- HANNAN P.C.T. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.*, 2000, **31**, 373-395.
- LINDEN A., THOMAS A., MAINIL J. Les mycoplasmes respiratoires des bovins: I. Clinique, diagnostic et traitement. *Ann. Med. Vet.*, 1998, **142**, 397-404.
- MAINIL J., THOMAS A., LINDEN A. Les mycoplasmes respiratoires des bovins: II. Propriétés de virulence et vaccination. *Ann. Med. Vet.*, 1998, **142**, 405-410.
- PFÜTZNER H., SACHSE K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev.-Off. Int. Epizoot.*, 1996, **15**, 1477-1494.
- POUMARAT F., PERRIN B., LONGCHAMBON D. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.*, 1991, **29**, 329-338.
- SACHSE K., PFÜTZNER 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., LYSNYANSKY 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.
- THOMAS A., DIZIER I., TROLIN A., MAINIL J., LINDEN A. Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Vet. Res. Commun.*, 2002a, **26**, 333-339.
- THOMAS A., BALL H., DIZIER I., TROLIN A., BELL C., MAINIL J., LINDEN A. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and from cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet. Rec.*, 2002b, **151**, 472-476.
- THOMAS A., SACHSE K., DIZIER I., GRAJETZKI C., FARNIR F., MAINIL J.G., LINDEN A. Adherence to various host cell lines of *Mycoplasma bovis* strains differing in pathogenic and cultural features. *Vet. Microbiol.*, 2003a, **91**, 101-113.
- THOMAS A., SACHSE K., FARNIR F., DIZIER I., MAINIL J., LINDEN A. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microb. Pathog.*, 2003b, **34**, 141-148.