

FORSCHUNGSPROJEKT NR. 1338: Entstehung und Ausmaß Mykoplasmen-assoziiierter Genitalerkrankungen und Fruchtbarkeitsstörungen bei Rindern in Österreich

ENDBERICHT

Genitale Mykoplasmen

Mykoplasmen sind Kommensalen und Parasiten, welche vorwiegend auf den Schleimhäuten des Respirations- und Urogenitaltraktes von Mensch und Tier leben. Auch andere Organe, wie Auge, Milchdrüse, Gelenke und Verdauungstrakt können von Mykoplasmen besiedelt werden. Pathogene Mykoplasmen verursachen eine Reihe von meist zur Chronizität tendierenden Krankheiten und stehen oftmals als Kofaktoren verschiedenster Krankheitsbilder in Diskussion (RAZIN et al., 1998). Obwohl genitale Mykoplasmen mit Fruchtbarkeitsstörungen und Genitalinfektionen in Verbindung gebracht werden, wird ihre ätiologische Bedeutung häufig kontrovers beurteilt. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass Mykoplasmen in den unteren Abschnitten des Urogenitaltraktes auch bei gesunden Individuen nachzuweisen sind (TAYLOR-ROBINSON u. FURR, 1997). Klinisch gesunde Tiere, welche Mykoplasmen im Genitaltrakt beherbergen bilden eine konstante Infektionsquelle für Neuinfektionen.

Die Pathogenitätsfaktoren genitaler Mykoplasmen sind auch heute noch weitgehend ungeklärt. Die Fähigkeit, sich eng an die Wirtszelle anzuheften, ist jedoch eine essentielle Vorbedingung für die Kolonisation der Gewebe des Wirtes und damit initiale Phase einer möglichen Infektion. Eine zentrale Rolle bei der Manifestation solcher lokaler Infektionen spielen Adhärenzmoleküle, wobei besonders differenzierte Terminalstrukturen mancher Arten einen engen Kontakt des Erregers mit den Mucosa-Epithelzellen vermitteln (RAZIN et al., 1998). Spezielle Adhärenzorganellen in Form sogenannter "tip"- Strukturen konnten unter anderem bei *M. pneumoniae*, *M. penetrans*, *M. genitalium* und *M. gallisepticum* nachgewiesen werden (FELDNER et al., 1982; GIRÓN et al., 1996; LO et al., 1992; SIMECKA et al., 1992). Über diesen engen Kontakt können vor allem enzymatische Aktivitäten (Proteasen, Nukleasen, Phospholipasen) sowie die Produktion toxischer Stoffwechselendprodukte (NH_3 , H_2O_2) eine direkte Schädigung der Wirtszelle vermitteln (BENDJENNAT et al., 1999; RAZIN et al., 1998).

Im Genitaltrakt vorkommende Mykoplasmen adhäreren jedoch nicht nur an Epithelzellen. So konnten *in vitro*-Experimente aufzeigen, dass verschiedene Mykoplasmenarten an einen spezifischen Sulfoglycolipid-Rezeptor der Spermatozoa anheften und dabei deren Aktivität empfindlich stören (LINGWOOD et al., 1990). Inwieweit die beschriebene Adhärenz an die Zona pellucida boviner Embryonen und Eizellen ebenfalls spezifisch oder schlicht auf elektrostatische oder hydrophobe Bindung beruht, konnte bisher nicht geklärt werden (EAGLESOME u. GARCIA, 1990).

Phänotypische Variabilität als maßgebende Adaptations- und Überlebensstrategie konnte auch bei genitalen Mykoplasmen beobachtet werden (WATSON et al., 1990; ZHANG u. WISE, 1996, TORTSCHANOFF et al., 2005). Dabei wird die ständige Änderung der Membranoberflächenstruktur durch ein spontanes An- und Abschalten der Synthese bestimmter Membranoberflächenproteine erreicht. Dieses Phänomen beruht auf hochfrequente Mutationen beruhenden spontanen und

reversiblen phänotypischen Variation wird auch als "Switching" oder "Phasenvariation" bezeichnet (CITTI u. ROSENGARTEN, 1997; ROSENGARTEN, 1998; ROSENGARTEN u. WISE, 1990; WISE, 1993). Auch Mykoplasmen des Genitaltraktes nutzen den selektiven Vorteil von Individuen einer Gesamtpopulation mit geeigneten Eigenschaften, welcher schließlich zum Überleben von Subpopulationen unter bestimmten Milieubedingungen (Genitalschleimhaut) führt.

Genitale Mykoplasmen werden auch für indirekte Zellschäden verantwortlich gemacht, die auf Interaktionen mit dem Immunsystem zurückgehen. Die bei einer Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten oftmals überregulativ gebildeten Zytokine beteiligen sich nicht nur direkt an Epithel- und Gewebeschädigungen, sondern führen auch zu Störungen des sensiblen Mediator-Gleichgewichts in Uterus, Ovidukt, Embryo und Plazenta (MILLER et al., 1994). Mykoplasmen der Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma* besitzen die Fähigkeit in einer Reihe von Wirtszellen vermehrte Zytokin-Sekretion zu induzieren. Infektionen der Amnionflüssigkeit führen zur vermehrten Bildung von Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukin 6 und 1α , aber auch von Interleukin 1β , einem potenten Stimulator der Prostaglandin $F2\alpha$ Synthese. Die Induktion von Interleukin 1β gefolgt von vermehrter Prostaglandin $F2\alpha$ Produktion wird als eine der möglichen multifaktoriellen Mechanismen eingestuft, die schließlich zu Trächtigkeitsverlust in Form von embryonalen Tod und Abortus führen (HILLIER et al., 1993; MILLER et al., 1994).

Mykoplasmen des bovinen Genitaltraktes

Mykoplasmen verursachen beim bovinen Wirt eine Vielzahl verschiedenster Krankheitsbilder wie Pneumonie, Arthritis, Mastitis, Keratokonjunktivitis, Genitalinfekte und Abortus (NICOLET, 1996; PFÜTZNER u. SACHSE, 1996; ROSENGARTEN, 1998). In Europa sind vor allem *M. bovis*-assoziierte Atemwegsinfekte und Arthritiden bei Kälbern und Jungrindern sowie therapieresistente Mastitiden und Genitalinfekte bei adulten Tieren weit verbreitet (JASPER, 1981; ter LAAK et al., 1992; PFÜTZNER u. SACHSE, 1996). Sporadisch auftretende Infektionen des Respirationstraktes, des Euters sowie der Gelenke werden jedoch auch mit weiteren Mykoplasmenarten wie z.B. *M. californicum*, *M. canadense* und *M. bovigenitalium* assoziiert (MACKIE et al., 1987; JACKSON u. BROUGHTON, 1991; KIRK et al., 1997; INFANTE-MARTINEZ et al., 1999).

Mykoplasmen-induzierte Genitalinfekte des Rindes gehören zu jenen multikausalen Infektionskrankheiten, die in Folge wechselseitiger Beziehungen zwischen Erreger, Wirt und Umwelt entstehen und bei denen die Komponente der Kausalität bezüglich Ursache-Wirkung individuell vielfältigst variiert. Unter den zahlreichen Mykoplasmenarten, welche beim Rind aus dem Genitaltrakt isoliert werden können, werden vor allem *M. bovis*, *M. bovigenitalium* und *U. diversum* mit Genitalerkrankungen und Fruchtbarkeitsstörungen in Verbindung gebracht (PFÜTZNER und SACHSE, 1996; MILLER et al., 1994). Klinisch werden bei Mykoplasmen-Infektionen des weiblichen Genitaltraktes vor allem Vestibulovaginitis, Endometritis, Umrindern und Aborte diagnostiziert, beim Bullen treten gelegentlich katarrhalische Balanoposthitis, Entzündungen der Hoden, der Nebenhoden und der Samenblase sowie Verminderung der Samenqualität in Erscheinung. Neben klinisch signifikanten Genitalinfekten wird jedoch häufig eine latente Besiedelung des Genitaltraktes ohne ascendierender Erregerausbreitung klinisch unauffälliger Tiere beobachtet. Erst begleitende Hilfsfaktoren wie Erhöhung der Erregerkonzentration, ein Auftreten hochvirulenter Stämme, die Präsenz resistenzmindernder Faktoren und

Schwächung der Abwehr können schließlich zur Aktivierung einer Infektion und zu Krankheitserscheinungen führen (KREUSEL et al., 1989; MILLER et al., 1994; RUHNKE, 1994)..

Da Mykoplasmen auf Genitalschleimhäuten über erhebliche Zeiträume persistieren können, werden vor allem symptomlose Trägartiere für Neueinschleppungen in Mykoplasmen-freie Herden verantwortlich gemacht (PFÜTZNER u. SACHSE, 1996). Eine wesentliche Rolle spielt dabei die symptomlose Besiedelung des Genitaltraktes von Besamungstieren und folglich die Übertragung und Verbreitung durch Deckakt und künstliche Besamung (KREUSEL et al., 1989; PHILPOTT, 1994; SPRECHER et al., 1998). Das Risiko einer Übertragung boviner Mykoplasmen *via* künstliche Besamung gilt als besonders hoch und ist mit jenem einer Übertragung von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* oder *Brucella abortus* vergleichbar (EAGLESOME u. GARCIA, 1997). Studien belegen, dass manche Mykoplasmenarten nach jahrelanger Lagerung im Tiefgefriersamen keine Verluste in ihrer Infektiosität aufweisen (PFÜTZNER u. SACHSE, 1996). Übliche Maßnahmen wie die Behandlung von kontaminierten Samenproben mit Standard-Antibiotika (Gentamicin, Tylosin, Lincomycin, Spectinomycin) blieben in *in vitro*-Experimenten mit *M. bovis* weitgehend erfolglos (VISSER et al., 1999). Des weiteren bedingte der Einsatz *M. bovis*- und *M. bovigentialium*-haltiger Samenproben in *in vitro*-Fertilisationssystemen trotz empfohlener Behandlungs- und Waschvorgänge eine Infektion der dabei produzierten Embryos (PHILPOTT, 1994; BIELANSKI et al., 2000).

Über Entstehung und Ausmaß von Mykoplasmen-induzierten Genitalinfekten in der österreichischen Rinderpopulation ist bislang wenig bekannt. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass Mykoplasmen aufgrund ihrer hohen kulturellen Ansprüche sowie material- und arbeitsintensiven Methodik der Differenzierung routinediagnostisch nicht erfasst werden. Durch die Entwicklung molekularer Nachweis- und Differenzierungsverfahren (PCR, RFLP, RAPD) gewinnen jedoch auch in der Infektionsmedizin des Reproduktionstraktes im zunehmenden Maße jene Infektionskrankheiten wie Genitalmykoplasmosen an Bedeutung, denen man früher kaum Beachtung schenkte (HOTZEL et al., 1996; KOBAYASHI et al., 1998; VASCONCELLOS CARDOSO et al., 2000; BUTLER et al., 2001).

1. Kulturelle/r und molekulare/r Erregernachweis und -identifizierung

Material und Methode

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde folgendes klinisches Probenmaterial mittels Kulturversuch und molekularer Nachweisverfahren auf Mykoplasmen und Ureaplasmen untersucht:

- Zervixtupferproben von 102 Tieren mit klinischen Symptomen einer Endometritis sowie je eine Zervixtupferprobe von einem klinisch unauffälligen Tier im gleichen Reproduktionsstadium
- Vaginaltupferproben von 208 tragenden Kalbinnen und 201 nicht-tragenden Tieren
- 18 abortierte Rinderfeten sowie sonstiges Abortmaterial (Plazenta, Fruchthüllen)
- 1772 Samen- und Präputialspülproben von Stieren (in den Jahren 2000-2004 in österreichische Besamungsstationen neu eingestellte Besamungsstiere)

Einzel-tier- (Nationale, Alter, Anamnese, Reproduktionsstadium, Krankheitssymptomatik) und Betriebsdaten (Bestandsgröße, -struktur, Leistungsdaten, Fütterung, Haltungssystem) wurden durch tierärztliche Befundung und anhand eines Fragebogens ermittelt.

Alle Proben konnten nach Entnahme innerhalb von 24 Stunden dem Kulturversuch zugeführt werden. Zum kulturellen Nachweis von Mykoplasmen und Ureaplasmen wurden die gewonnenen Tupferproben sowie 100 µl Samen oder 50 µl Samen mit 50 µl Präputialspülflüssigkeit in 4 ml modifiziertes Hayflick's Medium bzw. U4-Medium überführt und diese für mindestens 7 Tage bei 37°C unter atmosphärischen Bedingungen inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationsperiode erfolgte eine tägliche Kontrolle der Flüssigkulturen auf Farbumschlag (pH-Wert-Veränderung). Bei Farbumschlag mindestens jedoch nach 7 Tagen Inkubation wurden schließlich 100 µl der Flüssigkulturen auf feste Nährböden überimpft und diese bei 37°C und 5%igen CO₂-Partialdruck (Mykoplasmen) bzw. unter mikroaerophilen Bedingungen (Ureaplasmen) bebrütet. Während einer weiteren Inkubationsperiode von 7 Tagen wurden die Nährböden täglich mittels Stereomikroskopie auf Kolonieformation überprüft. Die Identifizierung der gewonnenen Mykoplasmenisolaten erfolgte mittels Kolonie-Immunoblot-Technik unter Verwendung artspezifischer Antiseren. Ureaplasmen-Wachstum konnte anhand der charakteristischen Koloniemorphologie, des ausschließlichen Wachstums unter mikroaerophilen Bedingungen sowie ihrer Urease-Aktivität bestätigt werden. Ein wesentlicher Nachteil konventionell serologischer Differenzierungsmethoden ist das häufige Auftreten kreuzreagierender Antikörper gegen engverwandte Mykoplasmenarten. Dabei können nur durch den parallelen Testeinsatz von Antisera gegen die gesamten beim Rind vorkommenden Mykoplasmenarten und durch die Beurteilung der Reaktionsintensität (stärkste Reaktion mit homologen Serum) Fehlinterpretationen in der serologischen Differenzierung vermindert werden. Des Weiteren werden Probleme in der konventionellen serologischen Identifizierung auch aufgrund der hochvariable Oberflächenstruktur von Mykoplasmen beobachtet. Ein wesentliches Ziel dieses Forschungsvorhabens war es daher, durch die Etablierung geeigneter molekulare Identifizierungsverfahren das für die konventionelle Diagnostik nachteilige Phänomen der phänotypischen Variabilität zu umgehen. Zur molekularen Differenzierung der Mykoplasmenisolate kamen PCR und RFLP (Restriktionsfragment Längenpolymorphismus)-Analyse des 16S rRNA Gens und der 16S-23S rRNA *intergenic spacer* Region (IGS-PCR) zum Einsatz. Basierend auf Längen- und Sequenzpolymorphismen und in Folge der Generierung charakteristischer Bandenprofile und längenpolymorpher

Amplifikate konnten alle gewonnenen bovinen Mykoplasmenisolate identifiziert werden. Die zeit-, kosten- und arbeitsaufwendige Methodik der Mykoplasmen-Artidentifikation, deren Interpretation oftmals durch serologische Kreuzreaktionen erschwert wird, konnte daher im Laufe des Projektzeitraumes durch ein geeignetes molekulares Verfahren ersetzt werden.

Neben konventionellen Methoden des Erregernachweis (Kulturversuch) wurden alle gewonnenen Tupfer-, Samen- und Präputialsputerproben mittels molekularer Nachweisverfahren (PCR-Assays) auf Mykoplasmen getestet. Hierbei erfolgte vorerst die Isolierung der DNS aus Probenmaterial mit Hilfe des GenElute-DNA-Extraktionskits (Sigma, Vienna). Anschließend kamen bereits beschriebenen PCR-Assays zum Nachweis von *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovisgenitalium* sowie *Ureaplasma diversum* zum Einsatz (GHADERSHOHI et al., 1997; KOBAYASHI et al., 1998; van KUPPEVELD et al., 1992; VASCONCELLOS-CARDOSO et al., 2000).

Ergebnisse und Diskussion

In den aus insgesamt 200 Betrieben stammenden Zervixtupferproben waren nur in 2 Proben genitalerkrankter Tiere *M. bovis* und in insgesamt 8 Proben *M. bovisgenitalium* kulturell nachweisbar. Dabei konnte *M. bovisgenitalium* sowohl von Tieren mit klinischen Symptomen einer puerperalen Endometritis (n=5) als auch von der Zervix gesunder Tiere (n=3) isoliert werden. Weitere Mykoplasmenarten waren in Zervixtupferproben mittels Kulturversuches nicht nachweisbar. Der kulturelle Nachweis von *M. bovis* konnte mit Hilfe einer spezies-spezifischen PCR bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war *M. bovisgenitalium* mittels molekularer Nachweisverfahren in 18 Zervixtupferproben von Tieren mit puerperalen Endometritis sowie in 8 Zervixtupferproben von genitalgesunden Tieren nachweisbar (Tab. 1). Diese Diskrepanz zwischen molekularem und konventionellem Nachweis ist nur durch die höhere Sensitivität des molekularen Nachweissystems oder durch die Entnahme toter oder bereits phagozytierter Mykoplasmen erklärbar, die eine kulturelle Isolierung des Erregers verhindert, jedoch den Nachweis mit Hilfe der PCR nicht beeinträchtigt. Während bei 13 Endometritis-Fällen ausschließlich *M. bovisgenitalium* molekular/kulturell nachweisbar war, konnte bei 5 Proben *M. bovisgenitalium* in Kombination mit *Arcanobacterium pyogenes* diagnostiziert werden. Obwohl dies auf die ätiologische Bedeutung von *M. bovisgenitalium* als Endometritis-Erreger oder als Kofaktor im Krankheitsprozess hinweist, muss aufgrund des Nachweises von *M. bovisgenitalium* auch bei genitalgesunden Tieren die genitale Mykoplasmosen durch *M. bovisgenitalium* als eine polyfaktoriell und multikausal bedingten Infektionskrankheit kategorisiert werden. Neben der Erhöhung der Erregerkonzentration dürften stammesspezifische Virulenzunterschiede, Einwirken weiterer (bedingt)-genitalpathogener Erreger sowie die Wirtsempfänglichkeit (Resistenzlage, uterines Clearance) für die ascendierende Erregerausbreitung und in Folge für entzündliche Prozesse im Uterus ausschlaggebend sein. Im Gegensatz dazu war *U. diversum* in 10 der untersuchten Zervixtupferproben als alleiniger genitalpathogener Erreger nachweisbar, wobei ausschließlich Proben von Tieren mit Endometritis betroffen waren (Tab. 1). Während sich der Nachweis von *U. diversum* in Zervixtupferproben auf 8 Betriebe verteilte (1-2 *U. diversum*-positive Zervixtupfer/Betrieb), war *M. bovisgenitalium* in Zervixtupferproben aus insgesamt 5 Betrieben (4-6 *M. bovisgenitalium*-positive Zervixtupfer/Betrieb) nachweisbar. Auch in 13 Vaginaltupferproben von Tieren aus Betrieben mit *M. bovisgenitalium*-positiven Zervixtupfern war *M. bovisgenitalium* mittels molekularer Methodik nachweisbar (Tab. 1), was wiederum auf eine rasche Verbreitung von

M. bovis im Bestand und der Tendenz zur aszendierenden Ausbreitung des Erregers hinweist. Korrelationen zwischen Betriebsstruktur und *M. bovis*-Nachweis waren nicht feststellbar.

Eine massive Verbreitung von *U. diversum* in österreichischen Rinderbetrieben konnte durch den Nachweis (molekular und kulturell) in einem Drittel der untersuchten Vaginaltupfer (33,7%) festgestellt werden, wobei sich die Isolierungsrate aus Vaginaltupfern von nichtträchtigen Tieren auf 48% erhöhte. Die ätiologische Bedeutung von *U. diversum* als Vaginitis-Erreger (MILLER et al., 1994) konnte durch den Nachweis in 28 (44%) der untersuchten Vaginaltupfer mit Vaginitis (n=64) bestätigt werden, wobei sich Vaginalausfluss und Hyperämie als maßgebliche klinische Symptome darstellten. Eine vormals formulierte *U. diversum*-assoziierte Vulvovaginitis-Form mit granulärer Struktur (MILLER et al., 1994) der entzündlichen Schleimhautveränderungen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Korrelationen zwischen Betriebsstruktur und *U. diversum*-Nachweis waren nicht feststellbar. Bemerkenswert waren tendenzielle (jedoch nicht signifikante) geographische Unterschiede im Nachweis, wobei ein Ost-West-Gefälle ermittelt werden konnte. Hinweise auf klimatische Einflussfaktoren konnten bereits bei Studien zum Vorkommen von Mykoplasmen im equinen Genitaltrakt in Österreich nachgewiesen werden (Spergser et al., 2002).

Neben *M. bovis*, *M. bovis genitalium* und *U. diversum* waren keine weiteren Mykoplasmen-Arten im weiblichen Tier weder kulturell noch molekular nachweisbar.

Tab. 1: Molekularer Nachweis von *M. bovis*, *M. bovis genitalium* und *U. diversum* in Zervix- und Vaginaltupferproben

	Zervixtupfer Endometritis (n=102)	Zervixtupfer Gesund (n=102)	Zervixtupfer insgesamt (n=204)	Vaginaltupfer trächtig (n=208)	Vaginaltupfer nicht trächtig (n=202)	Vaginaltupfer insgesamt (n=410)
<i>M. bovis</i>	2 (2%)	0	2 (1%)	0	0	0
<i>M. bovis genital.</i>	18 (17,7%)	8 (7,8%)	26 (12,8%)	5 (2,4%)	8 (4%)	13 (3,2%)
<i>U. diversum</i>	10 (9,8%)	0	10 (4,9%)	41 (19,7%)	97 (48%)	138 (33,7%)

In dem im Projektzeitraum an die diagnostischen Einrichtung des Institutes eingesandten Abortmaterial (n=18) vom Rind konnten weder molekular noch kulturell Mykoplasmen noch Ureaplasmen nachgewiesen werden. Trotz der geringen Anzahl untersuchter Fälle kann von einer geringen Beteiligung dieser Erreger an Abortgeschehen ausgegangen werden. Schon PFÜTZNER und SACHSE (1996) sowie MILLER et al. (1994) beschrieben Mykoplasmen und Ureaplasmen als nur gelegentliche Abortauslöser.

Im Laufe des Forschungsprojektes als auch im Rahmen der diagnostischen Dienstleistung des Institutes für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene wurden in Zusammenarbeit mit den österreichischen Besamungsstationen regelmäßig Samen- und Präputialspülproben neu eingestellter Stiere auf Mykoplasmen und Ureaplasmen untersucht. Dabei konnten erstmals umfangreiche epidemiologische Daten zum Vorkommen von Mykoplasmen und Ureaplasmen im männlichen bovinen Genitaltrakt erfasst werden.

Insgesamt wurden 1772 Samen und Präputialspülproben in den letzten 5 Jahren aus 6 verschiedenen Besamungsanstalten auf Mykoplasmen/Ureaplasmen untersucht. Davon entfielen 708 auf Samenproben alleine und 1063 auf Samen in Kombination mit Präputialspülproben. Das gewonnene Probenmaterial wurden mittels kultureller Anreicherung und molekularer Nachweisverfahren

(*Mycoplasma* spp., *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *U. diversum*) auf Mykoplasmen und Ureaplasmen getestet und die dabei gewonnenen Isolate mit Hilfe einer neu etablierten molekularer Identifikationsverfahren (PCR-RFLP, IGS-PCR) der Artdiagnose zugeführt. In insgesamt 372 (21%) der untersuchten Proben des bovinen, männlichen Genitaltrakts waren Mykoplasmen/Ureaplasmen nachweisbar (Tab. 2), wobei keine signifikanten Unterschiede in der Nachweisrate von Mykoplasmen in Samenproben alleine oder in Kombination mit Präputialspülproben ermittelt werden konnten. Der anfänglich hohe Wert an Mykoplasmen/Ureaplasmen-positiven Proben im Jahr 2000 von 48,6% konnte im darauf folgenden Jahr auf 23,2% reduziert werden. Ab dem Jahre 2001 bis einschließlich 2004 konsolidierte sich die Nachweisrate auf durchschnittlich 22%. Dies lässt sich auf die regelmäßige Vakzinierung von Besamungstieren mit einer bestandsspezifischer Poolvakzine zur Eindämmung und Kontrolle der genitalen Besiedelung mit Mykoplasmen ab dem Jahre 2000 zurückführen.

Als prädominante Spezies konnten *M. canadense* mit 43% und *U. diversum* mit 18% ausgewiesen werden. Des Weiteren waren die Isolate als *M. alkalescens* (14%), *M. bovis genitalium* (11%) und *M. bovis* (5,3%) identifizierbar. In nur 4% der Isolate waren *A. laidlawii*, *M. arginini* und *M. californicum* nachweisbar. Bei den verbleibenden 4% der Isolate war eine eindeutige Artdiagnose mittels molekularer und konventioneller Verfahren nicht möglich. Anhand der partiellen Sequenzierung des 16S rRNA-Gens und des Vergleichs mit Sequenzdatenbanken waren diese Isolate mit höchster Wahrscheinlichkeit (>97% Sequenzhomologie) nicht-bovinen Mykoplasmenarten (*M. feliminutum*, *M. caviae*, *M. iners* und *M. gallisepticum*) zuzuordnen.

Im Untersuchungszeitraum konnte eine bemerkenswert massive Zunahme an Ureaplasmen-positiven Proben verzeichnet werden, während gleichzeitig die Anzahl Mykoplasmen-positiver Proben eindeutig zurückging (Abb. 1). Gründe für die Zunahme an genitaler Besiedelung trotz Integration von Ureaplasmenisolaten in den Vakzinepool sind nicht bekannt. Möglicherweise werden die durch die Vakzinierung hervorgerufenen lokal humoralen Abwehrmechanismen durch die nachgewiesene IgA-Protease-Aktivität von Ureaplasmen eingeschränkt.

Auch beim männlichen Tier waren Unterschiede in der Anzahl positiver Proben im Bezug auf die geographische Herkunft des Probenmaterials nachweisbar, wobei diese wiederum Rückschlüsse auf Einflussgrößen wie klimatische Gegebenheiten oder Management- sowie Umweltfaktoren zulassen (Tab. 3).

Korrelationen zwischen Mykoplasmen/Ureaplasmen-Nachweis oder isolierter Spezies und Samenqualitätsparametern sowie klinischer Symptomatik ließen sich nicht aufzeigen. Dies deutet daher darauf hin, dass Besamungstiere vor allem als asymptomatische Träger von Mykoplasmen/Ureaplasmen fungieren, wobei eine hohe Gefahr der venerealen Übertragung durch Deckakt oder via künstliche Besamung besteht.

Tab. 2: Anzahl Mykoplasmen/Ureaplasmen-positiver Samen/ Präputialspülproben im Untersuchungszeitraum 2000-2004

	2000	2001	2002	2003	2004
Samen/Präputialspülproben	65 48,6%	113 23,2%	43 22,9%	76 19,7%	75 22,3%

Tab. 3: Mykoplasmen/Ureaplasmen-positive Proben vom Besamungstier in Bezug auf geographische Lokalisation

	Probenanzahl	Positive Proben
Oberösterreich	831	128 (15,4%)
Niederösterreich	396	101 (25,5%)
Tirol	285	39 (13,6%)
Steiermark	165	62 (37,5%)
Kärnten	28	16 (57,1%)
Salzburg	21	8 (38%)

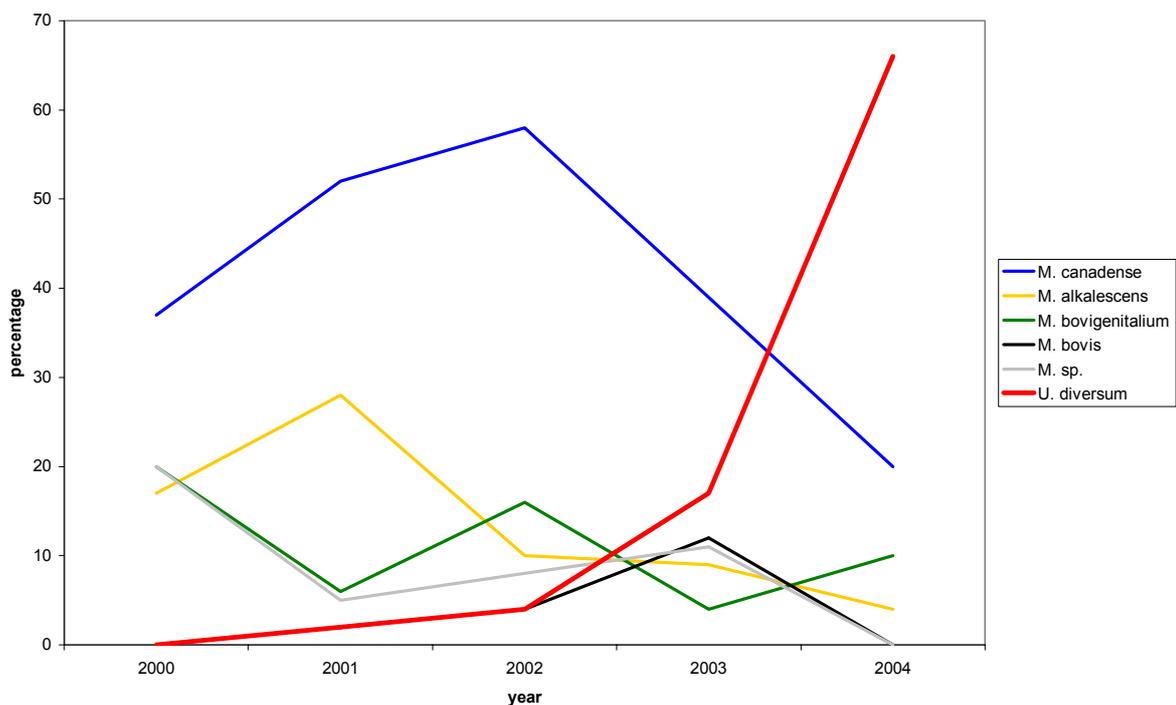


Abb. 1. Nachweis von Mykoplasmen/Ureaplasmen (in%) in Samen/Präputialspülproben im Untersuchungszeitraum 2000-2004.

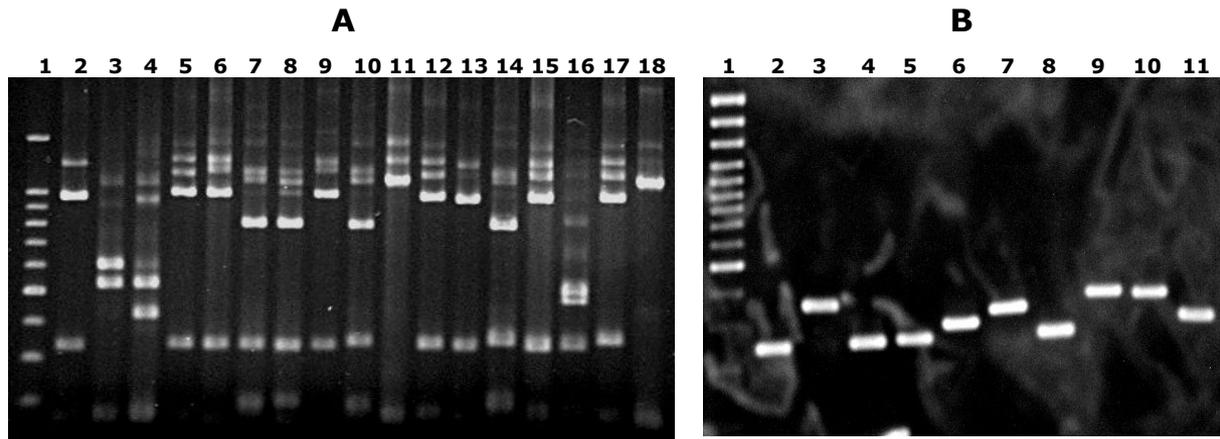


Abb. 2: **A** - Artdiagnose mittels PCR-RFLP-Analyse (16S rDNA-PCR mit anschließendem *Hinf*I-Verdau) von gewonnenen Mykoplasmenisolaten. Molekulargewichtsmarker (Spur 1), *M. bovis genitalium* (Spur 2, 5, 6, 9, 12, 13, 15, 17), *M. canadense* (Spur 3), *M. alkalescens* (Spur 4), *M. bovis* (Spur 7, 8, 10, 14), *A. laidlawii* (Spur 11, 18) und *M. arginini* (Spur 16). **B** - Artdiagnose mittels ISR-PCR-Analyse (Längenpolymorphie der 16S-23S *intergenic spacer* Region). Molekulargewichtsmarker (Spur 1), *M. alkalescens* (Spur 2, 4, 5, 8), *M. bovis genitalium* (Spur 3, 7, 11), *M. bovis* (Spur 6), *U. diversum* (Spur 9, 10)

2. Nachweis einer systemischen und lokal humoralen Immunantwort

Material und Methode

Folgendes Probenmaterial wurde im Laufe des Forschungsprojektes auf Antikörper gegen *M. bovis*, *M. bovis genitalium* und *U. diversum* untersucht:

- 614 Serumproben von allen Tieren von denen Zervix- und Vaginaltupfer entnommen wurden (Punkt 1)
- 317 Samen- und Präputialspülproben (Einsendungen des Jahres 2004)
- 1130 Serumproben (10-30% der Kalbinnen und Kühe in 200 österreichischen Betrieben)

Systemisch zirkulierende und lokal begrenzte Antikörper (IgG, IgM, IgA) gegen *M. bovis* wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (CHEKIT-*M. bovis* Sero EIA, Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz) erfasst. Hierbei erfolgte der Nachweis von Serum-IgG nach Herstellerangaben. Zur Bestimmung von zirkulierenden IgA und IgM sowie lokaler Antikörper (Samen und Präputialspülproben) wurde das Testsystem nach Maßgabe modifiziert (siehe *M. bovis genitalium*- und *U. diversum*-ELISA).

Zum Nachweis von zirkulierenden und lokalen Immunglobulinen gegen *M. bovis genitalium* und *U. diversum* wurden 2 *in house* ELISA-Systeme entwickelt. Hierfür wurden *M. bovis genitalium* PG11 (Typstamm) und *U. diversum* A417 (Typstamm) angezüchtet und das gewonnene Ganzzellantigen ohne weitere Aufbereitungsschritte eingesetzt. Die optimale Antigen- und Antiserumkonzentration wurde mittels Schachbrett-Titration unter Verwendung von Antigenen und positiven sowie negativen Standardseren bestimmt. Nach Festlegung der geeigneten Antigen- und Serumkonzentration wurden schließlich Mikrotiterplatten (96-well) mit 100 µl Antigen in Coatingpuffer pro Kavität beschichtet und 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschritt mit Waschpuffer. Freie Bindungsstellen wurden anschließend mit einer 3%igen BSA-Lösung (in PBS) für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch blockiert.

Kontrollseren und Feldseren wurden mit PBS auf die ermittelte Gebrauchsverdünnung von 1:100 eingestellt. Eine Gebrauchsverdünnung von 1:10 für Samen und Präputialspülproben wurde nach Literaturrecherche festgelegt. Nach Auftragen der Kontrollseren und der zu testenden Proben erfolgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C und ein dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatten mit Waschpuffer. Die verwendeten mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper (anti-bovine IgG, anti-bovine IgM, anti-bovine IgA, Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wurden mit PBS auf Gebrauchslösung verdünnt, aufgetragen und die Mikrotiterplatte bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach dem letzten des dreimaligen Waschschruttes wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit 100 µl Substratlösung (ABTS + H₂O₂) beschickt. Nach Inkubation für 15-30 Minuten bei Zimmertemperatur konnte die Extinktion mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 405 nm gemessen werden.

Die Überprüfung der Antigen-Spezifität erfolgte mittels Serumadsorptionstest und Spezifitätstest mit Kaninchen-Antiseren. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Testsysteme wurden Intra- und Interassayvariation bestimmt und aus den erhaltenen Extinktionswerten Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet. Der Schwellenwert (cut-off Wert), der der Bewertung untersuchter Proben dient und die Einteilung in positiv und negativ ermöglicht, wurde durch die Addition einer zweifachen Standardabweichung zum erhaltenen arithmetischen Mittelwert einer negativen Population errechnet. Zugrunde gelegt wurden hierfür die ELISA OD-Werte von 55 Seren aus 2 Beständen, deren Freisein von *M. bovigentialium* und *U. diversum* ermittelt wurde.

Nach Bestimmung der Serokonversion mittels ELISA wurde das Antigen-Erkennungsprofil ausgewählter Serumproben mit Hilfe der Westernblot-Analyse definiert und charakterisiert. Dabei kamen die für den ELISA hergestellten Zellpräparationen von *M. bovigentialium* PG11 und *U. diversum* A417 sowie eine Ganzzellpräparation von *M. bovis* PG45 (*vsp*-exprimierende, klonale Variante) zum Einsatz. Mittels SDS-Polyacrylamide-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), die in Anlehnung an die Methode von LAEMMLI (1970) durchgeführt wurde, erfolgt die Trennung der durch das SDS denaturierten und in Polyanionen überführten Proteine ausschließlich nach dem Molekulargewicht. Die Elektrophorese wurde in einem diskontinuierlich aufgebauten Trärgel- und Puffersystem durchgeführt. In der anschließenden Westernblot-Analyse wurden die im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Durch die zur Übertragung auf die Membran angelegte Spannung gelangten negativ geladene Proteine auf die Nitrozellulose, wobei die transferierten Proteine für Reaktionen mit Serumantikörpern zugänglich wurden. Für die hier angewandte indirekte Nachweismethode wurden zusätzlich enzymgekoppelte sekundäre Antikörper (anti-bovine IgG, Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland) eingesetzt. Das an den Antikörper gekoppelte Enzym katalysierte eine Farbreaktion, wodurch die Immunkomplexe sichtbar wurden. Vor der Verwendung von Antiseren wurden freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Methode von TOWBIN et al. (1979).

Ergebnisse und Diskussion

M. bovis: Von den insgesamt 1744 untersuchten Serumproben konnten 256 (14,7%) Proben im kommerziell erhältlichen ELISA-System (Nachweis von IgG) als positiv eingestuft werden. IgM waren in 73 (4,2%), IgA in 21 (1,2%) der untersuchten Serumproben nachweisbar, wobei IgM/IgA-Serokonversion nur in Proben mit infektionsserologischem Nachweis von IgG gegen *M. bovis* ermittelt

werden konnte. Insgesamt zeigten 72% der untersuchten Betriebe ein oder mehrere IgG-Seroreagenten, in 14% der Bestände waren mehr als 30% der untersuchten Tiere seropositiv (IgG), in keinem der untersuchten Betriebe konnte IgG-Serokonversion in mehr als 50% der untersuchten Tiere ermittelt werden. Auch die Tiere, in denen *M. bovis* im Genitaltrakt (Zervix) nachgewiesen werden konnte, zeigten IgG- und IgM-Serokonversion, jedoch keine *M. bovis*-spezifischen IgA.

Zur Westernblot-Analyse kamen Seren von Tieren mit Nachweis von *M. bovis* in Zervix (n=2) sowie 10 zufällig gewählte, im ELISA als positiv eingestufte Seren, zum Einsatz. In allen getesteten Seren waren prädominante Reaktionen mit den variablen, Oberflächenproteinen *vsp* (*variable surface protein*) A, B und C darstellbar. Schon BRANK et al. (1999) berichten von der Immunodominanz *M. bovis*-spezifischer *vsp*'s, wobei bereits 4 Tagen nach experimenteller Infektion IgG gegen die variablen Oberflächenproteine mittels Westernblot-Analyse nachweisbar waren.

Die Resultate der Infektionsserologie und Erregerdiagnostik unterstreichen insgesamt die Bedeutung von *M. bovis* als Infektionserreger in der österreichischen Rinderpopulation, relativiert jedoch eine maßgebliche Beteiligung an Genitalinfekten. Die hohe Nachweisrate an seropositiven Tieren lässt den Schluss zu, dass *M. bovis* vornehmlich das Habitat Respirationstrakt kolonisiert und in Folge vornehmlich Atemwegserkrankungen, Arthritiden nach systemischer Ausbreitung und Mastitiden mit Serokonversion verursacht.

M. bovigenitalium: Von den insgesamt 1744 untersuchten Serumproben konnten 402 (23%) Proben im ELISA (Nachweis von IgG) als positiv eingestuft werden. IgM waren in 112 (6,4%), IgA in 55 (3,2%) der untersuchten Serumproben nachweisbar, wobei wiederum IgM/IgA-Serokonversion nur in Proben mit infektionsserologischem Nachweis von IgG gegen *M. bovigenitalium* ermittelt werden konnte. Insgesamt zeigten 75% der untersuchten Betriebe ein oder mehrere IgG-Seroreagenten, in 33% der Bestände waren mehr als 30% der untersuchten Tiere seropositiv (IgG), in 18% der untersuchten Betriebe konnte IgG-Serokonversion in mehr als 50% der untersuchten Tiere ermittelt werden. Auch die 18 Tiere, in denen *M. bovigenitalium* in der Zervix (mit Endometritis) molekular nachgewiesen werden konnte, zeigten IgG-, IgM- und IgA-Serokonversion, jedoch nur 3 der 8 genitalgesunden Tiere mit zervikaler *M. bovigenitalium*-Besiedelung waren mittels ELISA seropositiv. Alle Tiere mit vaginaler Besiedelung mit *M. bovigenitalium* (n=13) waren seronegativ.

In der Westernblot-Analyse waren unter Verwendung ausgewählter, ELISA-positiver Serumproben 6 immunodominante Proteinstrukturen (95 kD, 58 kD, 40 kD, 35 kD, 30 kD, 22 kD) identifizierbar (Abb. 3A). Jedoch konnten weder qualitative Unterschiede im Antigen-Erkennungsprofil innerhalb der verwendeten Serumproben noch Antikörper-Isotyp-spezifische Unterschiede aufgezeigt werden.

Die Resultate der Infektionsserologie und Erregerdiagnostik unterstreichen die Bedeutung von *M. bovigenitalium* als Infektionserreger in der österreichischen Rinderpopulation, wobei auch von einer maßgeblichen Beteiligung an Genitalinfekten (akute, chronische und subklinische Endometritis) ausgegangen werden kann. *M. bovigenitalium* ist hauptsächlich im bovinen Genitaltrakt lokalisiert, nur selten wird von *M. bovigenitalium*-assoziierten Mastitiden mit Tendenz zur Selbstheilung berichtet.

U. diversum: Von den insgesamt 1744 untersuchten Serumproben konnten 293 (16,8%) Proben im ELISA (Nachweis von IgG) als positiv eingestuft werden. IgM

waren in 34 (2%), IgA in 21 (1,2%) der untersuchten Serumproben nachweisbar, wobei IgM/IgA-Serokonversion nur in Proben mit infektionsserologischem Nachweis von IgG gegen *U. diversum* ermittelt werden konnte. Insgesamt zeigten 72% der untersuchten Betriebe ein oder mehrere IgG-Seroreagenten, in 8% der Bestände waren mehr als 30% der untersuchten Tiere seropositiv (IgG), in keinem der untersuchten Betriebe konnte IgG-Serokonversion in mehr als 50% der untersuchten Tiere ermittelt werden. Alle 10 Tiere, in denen *U. diversum* in der Zervixtupferprobe nachgewiesen werden konnte, zeigten IgG-, IgM- und IgA-Serokonversion. Serumproben von Tieren mit Vaginitis und *U. diversum*-Nachweis (n=28) reagierten im ELISA zu 100% (IgG), zu 45% (IgM) und zu 42% (IgA) positiv. Auch bei 5 (14%) Tieren mit Vaginitis ohne *U. diversum*-Nachweis (n=36) konnten *U. diversum*-spezifische IgG und IgA mittels ELISA nachgewiesen werden. In 82 (59,4%) Serumproben von Tieren mit *U. diversum*-Nachweis in der Vagina (n=138) waren keine spezifischen Immunglobuline nachweisbar.

In der Westernblot-Analyse waren unter Verwendung ausgewählter, ELISA-positiver Serumproben 4 immunodominante Proteinstrukturen (50 kD, 45 kD, 40 kD, 30 kD) identifizierbar (Abb. 3B). Auch bei der *U. diversum*-Westernblot-Analyse konnten weder qualitative Unterschiede im Antigen-Erkennungsprofil innerhalb der verwendeten Serumproben noch Antikörper-Isotyp-spezifische Unterschiede aufgezeigt werden.

Die Resultate der infektionsserologischen und erregediagnostischen Untersuchung unterstreichen insgesamt die Bedeutung von *U. diversum* als Erreger multikausaler Genitalinfekte in der österreichischen Rinderpopulation. Die von *U. diversum* mitverursachte infektiöse Faktorenkrankheit ist Folge einer wechselseitigen Beziehung zwischen Erreger, Wirt und Umwelt, bei der die Komponenten der Kausalität bezüglich Ursache-Wirkung aufs vielfältigste variiert.

Lokal humolare Immunreaktion in Samen- und Präputialspülproben:

In allen untersuchten Samen- und Präputialspülproben konnten weder IgG, IgM noch IgA gegen *M. bovis*, *M. bovigentialium* und *U. diversum* mittels ELISA nachgewiesen werden. Dies bestätigt die ausschließlich saprophytäre Lebensweise von Mykoplasmen und Ureaplasmen im Genitaltrakt der untersuchten Besamungsstiere, wobei lokal humorale Abwehrmechanismen vermutlich nur nach aufsteigender Erregerausbreitung ausgebildet werden.

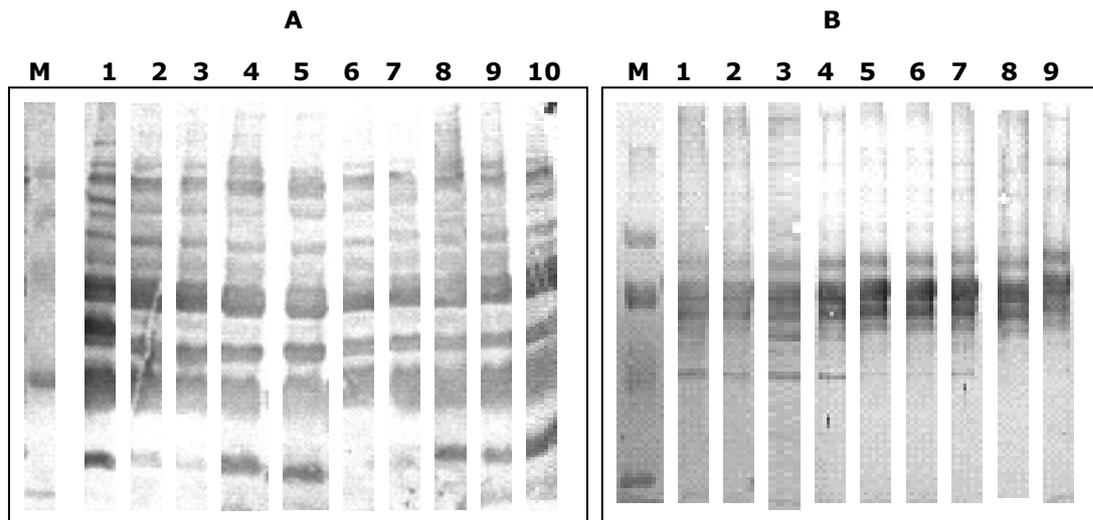


Abb. 3: **A** – Nachweis von IgG gegen *M. bovis genitalium* mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung von Feldseren. Molekulargewichtsmarker (Spur M), ELISA-positive Feldseren (Spur 1-10). **B** – Nachweis von IgG gegen *U. diversum* mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung von Feldseren. Molekulargewichtsmarker (Spur M), ELISA-positive Feldseren (Spur 1-9)

3. Phäno- und genotypischen Charakterisierung von Feldisolaten

Material und Methode

Zur phänotypischen Charakterisierung von Mykoplasmen- und Ureaplasmenisolaten standen 15 *M. bovis*-Isolate sowie jeweils 30 *M. bovis genitalium*- und *U. diversum*-Feldisolate, welche aus dem in Punkt 1 angeführten Probenmaterial isoliert werden konnten, zur Verfügung (Tab. 4). Ziel war es, Unterschiede im antigenen Repertoire klinischer Isolate und somit stammspezifische Unterschiede und Charakteristika sowie mögliche phänotypische Variabilität zu ermitteln. Die Proteinanalyse wurde an Ganzzellpräparationen durchgeführt, wobei die Proteinkomponenten mittels SDS-PAGE (siehe Punkt 2) aufgetrennt und mit Hilfe der Coomassie-Blau- oder Silberfärbung sichtbar gemacht werden konnten.

Genotypische Typisierungsverfahren stellen ein wichtiges infektionsepidemiologisches Instrument zur Untersuchung von Krankheitserregern dar. Sie dienen im Wesentlichen der Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Isolaten, der Aufdeckung von Infektionsketten und Streuquellen und in Folge der Einleitung entsprechender seuchenhygienischer Maßnahmen. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden mit Hilfe einer geeigneten Genotypisierungsmethode neben der genomischen Strukturanalyse die Charakterisierung und Differenzierung von Erregerisolaten über DNS-Polymorphismen ermöglicht. Auch zur genotypischen Charakterisierung von Mykoplasmen- und Ureaplasmenisolaten standen 15 *M. bovis*-Isolate sowie jeweils 30 *M. bovis genitalium*- und *U. diversum*-Feldisolate, welche aus dem in Punkt 1 angeführten Probenmaterial isoliert werden konnten, zur Verfügung (Tab. 4). Die genotypische Charakterisierung und Differenzierung der angeführten Feldisolate wurde mit Hilfe der *random amplified polymorphic DNA*-Analyse (RAPD-Analyse) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Einsatz eines kurzen Primers, dessen Sequenz nicht spezifisch gegen ein bekanntes Target-Gen gerichtet ist und dieser somit zufällig an verschiedene Bereiche des Genoms hybridisiert. Liegen diese Bereiche nah genug benachbart,

kann die dazwischen liegende Sequenz mittels PCR amplifiziert werden. Da die DNA-Abschnitte zwischen den beiden Primerbindungsstellen oftmals unterschiedlich lang sind, werden in einer PCR-Reaktion unterschiedlich lange DNA-Fragmente amplifiziert. Die dabei erhaltenen charakteristischen Bandenprofile, welche durch gelelektrophoretische Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht werden, unterscheiden sich entsprechend dem Grad der Verwandtschaft der untersuchten Stämme. Vergleich und Auswertung der ermittelten RAPD-Muster erfolgte computergestützt mit Hilfe der GelCompar[®] II Software (Applied Maths).

Tab. 4: Zur phäno- und genotypischen Charakterisierung eingesetzte Mykoplasmen- und Ureaplasmen-Isolate

Herkunft der Isolate	<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	<i>Ureaplasma diversum</i>
Zervixtupfer Endometritis	2	5	10
Zervixtupfer gesund	0	3	0
Vaginaltupfer Vaginitis	0	2	6
Vaginaltupfer gesund	0	11	6
Samen/Präputium gesund	5	9	8
Sonstige (Routinediagnostik)	8	0	0
Isolate insgesamt	15	30	30

Ergebnisse und Diskussion

Mittels SDS-PAGE waren phänotypische Stammunterschiede nur begrenzt ermittelbar. *M. bovis*, *M. bovigenitalium* und *U. diversum* zeigten nur geringe Unterschiede in ihrem antigenen Repertoire, was auf eine nahe Verwandtschaft der Erregergesamtpopulationen oder auf einen mangelhaften Nachweis spezifischer Strukturen mit Hilfe der verwendeten Methoden schließen lassen (Abb. 4A).

Die durchgeführte RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) – Analyse diente der molekular-epidemiologischen Charakterisierung und Differenzierung gewonnener Feldisolate. Die Eignung von verschiedenen Primern (n=6) aus einem kommerziell erhältlichen RAPD-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) wurde vorerst durch Analyse von Referenzstämmen (Typstämme) und ausgewählten Isolaten unter Berücksichtigung der Reproduzierbarkeit, des Diskriminierungspotentials und der Interpretierbarkeit der Ergebnisse festgestellt. Für die Wahl der geeigneten Primer waren die Generierung von 4-10 prädominanten Amplikons und eine ausreichende Differenzierung von Referenzstämmen und Feldisolaten ausschlaggebend. Insgesamt konnten durch diese Voranalyse jeweils 2 Primer aus dem RAPD-Kit pro untersuchte Spezies ausgewählt werden. Die im Rahmen des Forschungsprojektes durchgeführte RAPD-Analyse ermöglichte die Generierung reproduzierbarer und spezifischer Bandenprofile, welche mit der geographischen Herkunft der gewonnenen Isolate korrelierten. Die Darstellung bestandsspezifischer Bandenmuster wiesen auf eine Verbreitung nahverwandter Stammvarianten in den betroffenen Herden hin. Der Nachweis von Stämmen mit gleichem RAPD-Bandenprofil in Samenproben von Besamungstieren lieferten erste Hinweise zur entscheidenden Rolle der

künstlichen Besamung bei Übertragung und Verbreitung von genitalen Mykoplasmen in der österreichischen Rinderpopulation (Abb. 4B). Trotz hohem Diskriminierungspotential der verwendeten Primer waren keine Korrelationen zwischen Bandenmuster und vermeintlicher Virulenz des untersuchten Stammes (Krankheitsassoziation) erkennbar.

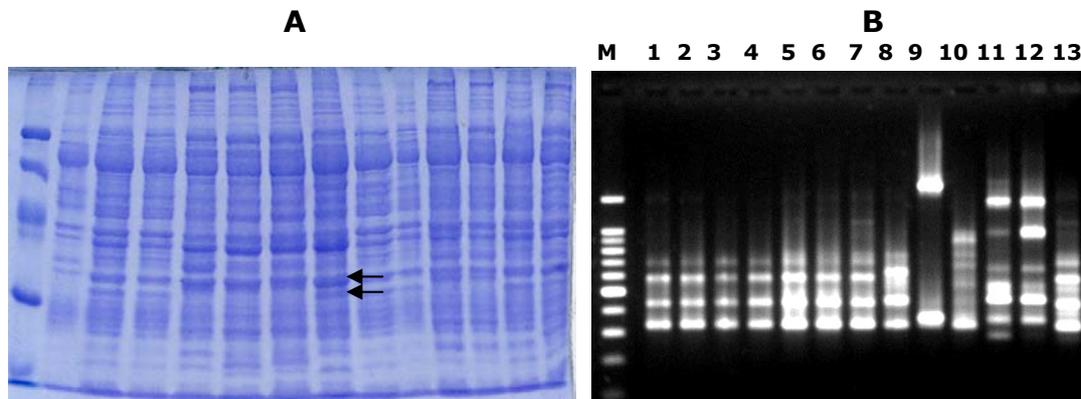


Abb. 4: **A** – Proteinanalyse an *M. bovis genitalium*-Feldisolaten mittels SDS-PAGE und Commaassieblau-Färbung mit geringen Unterschieden im antigenen Repertoire (Pfeil). **B** – RAPD-Analyse an *M. bovis genitalium*-Feldisolaten. Molekularmarker (Spur M), Isolate aus Bestand A - Zervix (Spur 1-4) und Vagina (Spur 5-8), Isolate aus Samenproben (Spur 9, 10, 12, 13), Typstamm (Spur 11).

4. Identifizierung und Charakterisierung Pathogenese-relevanter Moleküle

Material und Methode

Die Identifizierung und Charakterisierung von potentiell Pathogenese-relevanten Oberflächenproteinantigenen wurde mit Hilfe der Triton X-114 Phasenfraktionierung, der SDS-PAGE und der Westernblot-Analyse durchgeführt. Eine weit verbreitete Methode zur selektiven Isolierung und Analyse amphiphiler integraler Membranproteine ist die Phasenfraktionierung mittels Triton X-114, einem nicht-ionischen Detergens. Dabei wird durch die Interaktion amphiphiler Strukturen (z.B. Lipoproteine) mit den Mizellen des Detergens' eine Abtrennung von hydrophilen Elementen hervorgerufen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der durch das SDS denaturierten und in Polyanionen überführten Proteine wurde anschließend im Westernblot unter Verwendung von Kaninchen-Hyperimmunsereen und bovinen Feldsereen ihre Zell-Lokalisation (Membranständigkeit mit möglicher Oberflächenexposition, Zytoplasma) definiert (TORTSCHANOFF et al., 2005).

Zur Herstellung monospezifischer Antikörper gegen ausgewählte Proteinantigene wurden nach Auftrennung mittels SDS-PAGE die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und durch Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht. Ausgewählte Proteine wurden sodann aus der Membran herausgeschnitten, durch Ultraschall-Behandlung pulverisiert und zur Immunisierung von Kaninchen nach Standardprotokollen aufbereitet. Die Überprüfung der Spezifität der so hergestellten monospezifischen Antikörper erfolgte mit Hilfe der Westernblot-Analyse unter Verwendung verschiedener boviner Mykoplasmenarten (TORTSCHANOFF et al., 2005).

Die Lokalisation der einzelnen Proteinantigene wurde mit Hilfe des Kolonie-Immunoblots sowie mittels Trypsin-Behandlung und anschließender Westernblot-Analyse bestimmt. Beide Methoden dienen der Identifizierung

oberflächenexponierter integraler oder peripherer Membranproteine, wobei beim Kolonie-Immunoblot nach Transfer der Kolonien auf Nitrozellulosemembran Oberflächenepitope immunologisch sichtbar gemacht werden. Trypsin-Behandlung intakter Mykoplasmenzellen mit anschließender Westernblot-Analyse ermöglichte schließlich die Identifizierung von Oberflächenproteinen durch Sichtbarmachung entstandener Degradierungsprodukte. Darüber hinaus wurde nach Etablierung klonaler Linien mittels Kolonie-Immunoblots und Westernblot-Analyse geprüft, ob einige dieser Oberflächenproteinantigene der Phasen- und Größenvariation unterliegen.

Die *in vitro*-Testung auf Adhärenz macht die Verwendung von bereits etablierten genitalen Zelllinien unumgänglich. Hierfür bewährt sich die 1951 aus dem weiblichen Genitaltrakt isolierten HeLa-Zellen, welche bereits für Adhärenz- und Invasionsstudien mit *M. gallisepticum* erfolgreich ihre Anwendung fanden (WINNER et al., 2000). Die angestrebten Bindungsstudien wurden daher an konfluierenden HeLa-Monolayern durchgeführt und erfolgten durch Inokulation von 10^5 KBE/ml *M. bovis genitalium* oder *U. diversum* (Typstämme) und Inkubation für 0,5, 2, 6, 10 bzw. 16 Stunden. Nach Waschen und Fixieren infizierter Zellen wurden Zell-assoziierte Mykoplasmen und Ureaplasmen mit Hilfe der doppelten Immunfluoreszenz-Technik (WINNER et al., 2000) unter Verwendung spezifischer anti-*M. bovis genitalium* und anti-*U. diversum* Antikörper sichtbar gemacht. Zur Differenzierung zwischen intra- und extrazellulärer Lokalisation wurden dabei extrazellulär gebundene Mykoplasmen/Ureaplasmen mit FITC-markierten spezifischen Hyperimmunserum in Reaktion gebracht bzw. immunologisch gefärbt und anschließend, nach Permeabilisierung der eukaryontischen Zellen, intrazelluläre Mykoplasmen mit Hilfe eines Texas Red-markierten Hyperimmunserums visualisiert. Die Ergebnisse der Bindungsstudien wurden mittels der Gentamicin-Resistenz-Methode überprüft (Winner et al., 2000).

Zur Identifizierung und Charakterisierung putativer Adhäsine wurden Kulturen von *M. bovis genitalium* und *U. diversum* mit den hergestellten monospezifischen Antikörpern sowie mit spezies-spezifischen Hyperimmunseren präinkubiert und hierbei mögliche Bindungsmoleküle abgesättigt. Anschließend wurde eine mögliche Hemmung der Adhärenz mittels HeLa-Zell-ELISA ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der Triton X-114 Phasenfraktionierung, der SDS-PAGE und der Westernblot-Analyse an ausgewählten *M. bovis genitalium*- und *U. diversum*-Isolaten und Referenzstämmen waren 3 *M. bovis genitalium*-spezifische (95 kD [MB95], 58 kD [MB58], 35 kD [MB35]) und 2 *U. diversum*-spezifische (50 kD [UD50], 45 kD [UD45]) Hauptimmunogene, welche sich in der Tritonfraktion darstellten, nachweisbar. Durch Herstellung monospezifischer Antikörper (msAk) gegen diese ausgewählten Proteinantigene konnte ein hilfreiches Mittel zur spezifischen Identifizierung dieser antigenen Determinanten zur Verfügung gestellt werden. Alle msAk gegen prädominante Triton-Phasen-Proteine erwiesen sich in der Westernblot-Analyse unter Verwendung verschiedenster boviner Mykoplasmenarten als hochspezifisch. Die Membranständigkeit der einzelnen Proteinantigene konnte mit Hilfe der Kolonie-Immunoblot-Technik sowie mittels Trypsin-Behandlung und anschließender Westernblot-Analyse bestätigt werden. Durch umfangreiche Untersuchungen an klonalen Populationen konnten erstmalig auch bei *M. bovis genitalium* (MB58 und MB35) und *U. diversum* (UD50) die Existenz von Phasenvariation, nicht jedoch das Phänomen der Größenvariation aufgezeigt werden (Abb. 5A).

Da durch das An- und Abschalten der Expression von Oberflächenproteinen nicht nur für die Immunevasion relevante antigene Charakteristika der Mykoplasmenoberfläche verändert werden, sondern insbesondere auch deren Pathogenese-relevanten, funktionellen Eigenschaften, war anzunehmen, dass das Phänomen der Phasenvariation der untersuchten Oberflächenproteine auch zur Infektionsstrategie beiträgt. Eine der Pathogenese-relevanten, funktionellen Eigenschaften von Mykoplasmen ist die Fähigkeit sich eng an die Wirtstargetzellen anzuheften, wobei die Adhärenzfähigkeit von genitalen Mykoplasmen sich als wesentliche Voraussetzung für die Kolonisierung des Genitaltraktes und sich somit als initiale Phase einer möglichen Infektion darstellt.

In vitro Bindungsstudien waren unter Verwendung von HeLa-Zellen erfolgreich durchführbar, wobei die Adhärenz boviner Mykoplasmen/Ureaplasmen an HeLa-Zellen bereits nach halbstündiger Inkubation ohne Verbesserung der Adhäsion bei Verlängerung der Inkubationszeit erfolgte. Das ausnahmslos extrazelluläre Anhaften und somit das Unvermögen von *M. bovis genitalium* und *U. diversum* zur Zellinvasion konnte mit Hilfe der doppelten Immunfluoreszenz-Mikroskopie verifiziert und mittels Gentamicin-Resistenztest bestätigt werden (Abb. 5B).

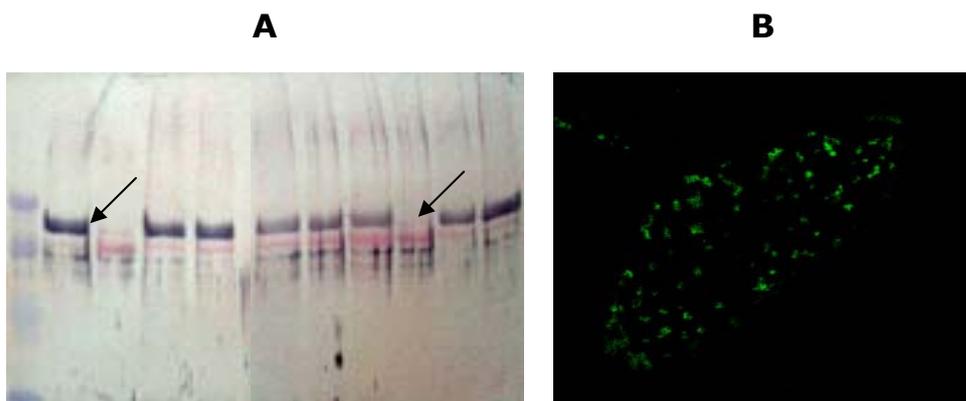


Abb. 5: **A** – MB58-Phasenvariation (Pfeile) bei *M. bovis genitalium*-Feldisolaten unter Verwendung von anti-MB58 msAk. **B** – Zytadhärenz von *M. bovis genitalium* an HeLa-Zellen.

Zur Identifizierung und Charakterisierung putativer Adhäsine wurden *M. bovis genitalium*- und *U. diversum*-Kulturen mit den hergestellten monospezifischen Antikörpern und spezies-spezifischer Hyperimmunsereen präinkubiert und hierbei mögliche Bindungsmoleküle abgesättigt. In Vorversuchen zeigten die dabei eingesetzten msAks und Hyperimmunsereen weder im Wachstumshemmungstest noch bei der Keimzahlüberprüfung vor und nach Inkubation einen Einfluss auf die Bakterienviabilität. Die Dosis-abhängige und die Viabilität der Mykoplasmen nicht beeinflussende Hemmung der Adhärenz durch spezifische Antikörper wurde mittels HeLa-Zell-ELISA ermittelt. Hierbei standen msAks gegen 3 *M. bovis genitalium*- und 2 *U. diversum*-spezifischen Hauptimmunogenen (Triton-Phasen-Proteine) zur Verfügung. Als Kriterium zum tatsächlichen Nachweis einer Adhärenz-inhibierenden Aktivität durch Blockieren möglicher Adhäsionsproteine mittels msAks wurde eine minimale Bindungsreduktion von 20 % festgelegt. Nach Inkubation mit msAks und

Hyperimmunseren konnte die folgende partielle Hemmung der Zytadhärenz von *M. bovis genitalium* und *U. diversum* an HeLa-Zellen ermittelt werden:

	Hyperimmunserum (HI) monospezifische Antikörper	Hemmung der Adhärenz in %
<i>M. bovis genitalium</i>	HI	88
<i>M. bovis genitalium</i>	anti-MB95	13
<i>M. bovis genitalium</i>	anti-MB58*	50
<i>M. bovis genitalium</i>	anti-MB35*	20
<i>U. diversum</i>	HI	90
<i>U. diversum</i>	anti-UD50*	45
<i>U. diversum</i>	anti-UD45	18

* phasenvariables Oberflächenprotein

Somit konnte erstmals die Beteiligung von phasenvariablen Oberflächenproteinen am Adhärenzgeschehen auch bei genitaler Mykoplasmen des bovinen Genitaltrakts aufgezeigt werden.

Das Auftreten chronischer Verlaufsformen von Infektionskrankheiten wird vor allem durch Strategien ermöglicht, die ein Umgehen der vielfältigen Abwehrmechanismen des jeweiligen Wirtes erlauben. Als hauptsächliche Adaptions- oder Überlebensstrategie von Mykoplasmen wird die phänotypische Variabilität innerhalb einer Gesamtpopulation angesehen. Diese Virulenzstrategie führt dazu, daß Teilpopulationen mit bestimmten Eigenschaften bei veränderter Umgebung einen selektiven Vorteil besitzen. Dies kann einerseits durch gezielte Änderung der Expression entsprechender Gene in Abhängigkeit vom umgebenden Milieu oder andererseits durch umgebungsunabhängiges Bereitstellen eines ausreichend großen Repertoires genetischer und damit phänotypischer Varianten erreicht werden (CITTI u. ROSENGARTEN, 1997; RAZIN et al., 1998; ROSENGARTEN, 1998; ROSENGARTEN u. WISE, 1990; WISE, 1993). Auch bovine genitale Mykoplasmen dürften den Mechanismus der ständigen Änderung der Membranproteine durch Variation in ihrer Expression oder hinsichtlich ihrer Molekülgröße nutzen, um vor allem lokalen Immunreaktionen und Zyklus-bedingte Milieuänderungen erfolgreich zu begegnen.

Die Bindung eines Bakterium an ihre Wirtstargetzelle stellt die initiale Phase und somit das auslösende und entscheidende Ereignis zum Angehen einer Infektion dar. Bei Mykoplasmen erscheint das Adhärenzgeschehen häufig multifaktoriell bedingt. In zahlreichen Studien konnten neben der vorrangigen Beteiligung von Hauptadhäsinen das Mitwirken von akzessorischen Membranproteine und zytoskeletale Elemente am Bindungsprozeß aufgezeigt werden (KRAUSE, 1996; LAYH-SCHMITT et al., 1995; RAZIN u. JACOBS, 1992; RAZIN et al., 1998). Zur Charakterisierung von Adhärenzmechanismen ist daher die Identifizierung von Zytadhäsinen und deren Kofaktoren unumgänglich. Zu diesem Zweck wurde die Adhärenz-hemmende Aktivität von monospezifischen Antikörpern gegen prädominant immunogene Proteine boviner Mykoplasmen mittels HeLa-Zell-ELISA bestimmt. Dabei konnten variablen Oberflächenlipoproteinen als Adhärenz-beteiligte Komponenten identifiziert werden. Variable Lipid-modifizierte Membranproteine, die als Adhäsine fungieren, wurden bereits bei verschiedenen Mykoplasmenarten beschrieben und charakterisiert (ATHAMNA et al., 1997;

HENRICH et al., 1996; NOORMOHAMMADI et al., 1997; RAZIN et al., 1998). Vermutliche basiert die Fähigkeit der Modulation adhäsiver Oberflächeneigenschaften auf jener Virulenzstrategie, die zunächst in der Initialphase einer Infektion die Kolonisierung des Schleimhautepithels fördert und schließlich für die systemische Ausbreitung des nicht-adhären Phänotyps im Wirtsorganismus sorgt.

Literatur

ATHAMNA, A., ROSENGARTEN, R., LEVISOHN, S., KAHANE, I., YOGEV, D. (1997): Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. Infect. Immun. 65, 2468-2471.

BENDJENNAT, M., BLANCHARD, A., LOUTFI, M., MONTAGNIER, L., BAHRAOUI, E. (1999): Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. Infect. Immun. 67, 4456-4462.

BIELANSKI, A., DEVENISH, J., PHIPPS-TODD, B. (2000): Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis genitalium* in semen on fertilization and association with in vitro produced morula and blastocyst stage embryos. Theriogenology 53, 1213-1223.

BUTLER, J. A., PINNOW, C. C., THOMSON, J. U., LEVISOHN, S., ROSENBUSCH, R. F. (2001): Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to investigate *Mycoplasma bovis* outbreaks. Vet. Microbiol. 78, 175-181.

BRANK, M., LE GRAND, D., POUMARAT, F., BEZILLE, P., ROSENGARTEN, R., CITTI, C. (1999): Development of a recombinant antigen for antibody-based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6, 861-867.

CITTI, C., ROSENGARTEN, R. (1997): Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis. Wien. Klin. Wochenschr. 109, 562-568.

EAGLESOME, M. D., GARCIA, M. M. (1990): The effect of *Mycoplasma bovis* on fertilization processes in vitro with bull spermatozoa and Zona-free hamster oocytes. Vet. Microbiol. 21, 329-337.

EAGLESOME, M. D., GARCIA, M. M. (1997): Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. Sci. Tech. 16, 215-225.

FELDNER, J., GÖBEL, U., BREDT, W. (1982): *Mycoplasma pneumoniae* adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody. Nature 298, 765-767.

GHADERSOHI, A., COELEN, R.J., HIRST, R.G. (1997): Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. Vet. Microbiol. 56:87-98.

GIRÓN, J. A., LANGE, M., BASEMAN, J. B. (1996): Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. Infect. Immun. 64, 197-208.

HENRICH, B., KITZEROW, A., FELDMANN, R.-C., SCHAAL, H., HADDING, U. (1996): Repetitive elements of the *Mycoplasma hominis* adhesin P50 can be differentiated by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 64, 4027-4034.

HILLIER, S., WITKIN, S. S., KROHN, M. A. (1993): The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. Obstet. Gynecol. 81, 941-948.

- HOTZEL, H., SACHSE, K., PFÜTZNER, H. (1996): Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. J. Appl. Bacteriol. 80, 505-510.
- INFANTE-MARTINEZ, F., AGUADO, J., EDUARD-JASPER, D. (1999): Mastitis outbreak due to *Mycoplasma californicum* and *Mycoplasma canadense* in a commercial dairy herd in the state of Jalisco, Mexico. Rev. Latinoam. Microbiol. 41, 117-120.
- JACKSON, G., BOUGHTON, E. (1991): A mild outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma bovigenitalium*. Vet. Rec. 129, 444-446.
- JASPER, D. E. (1981): Bovine mycoplasmal mastitis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 25, 121-157.
- KOBAYASHI, H., HIROSE, K., WORARACH, A., PAUGTES, P., ITO, N., MOROZUMI, T., YAMAMOTO, K. (1998): In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. J. Vet. Med. Sci. 60:1299-1303.
- KRAUSE, D.C. (1996): *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. Mol. Microbiol. 20, 247-253.
- KREUSEL, S., BOCKLISCH, H., PFÜTZNER, H., BRYNS, A., LEIRER, R., ZIEGENHALS, U. (1989): Experimentelle Infektion von Bullen mit *Mycoplasma (M.) bovis* und *M. bovigenitalium*. Arch. Exp. Veterinärmed. 43, 705-712.
- LAYH-SCHMITT, G., HILBERT, H., PIRKL, E. (1995): A spontaneous hemadsorption-negative mutant of *Mycoplasma pneumoniae* exhibits a truncated adhesin-related 30-kilodalton protein and lacks the cytoadherence-accessory protein HMW1. J. Bacteriol. 177, 843-846.
- LINGWOOD, C. A., QUINN, P. A., WILANSKY, S., NUTIKKA, A., RUHNKE, H. L., MILLER, R. B. (1990): Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. Biol. Reprod. 43, 694-697.
- ter LAAK, E. A., NOORDERGRAAF, J. H., DIELTJES, R. P. (1992): Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves. Zentralbl. Veterinärmed B 39, 553-562.
- KIRK, J. H., GLENN, K., RUIZ, L., SMITH, E. (1997): 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. 211, 1036-1038.
- KOBAYASHI, H., HIROSE, K., WORARACH, A., PAUGTES, P., ITO, N., MOROZUMI, T., YAMAMOTO, K. (1998): In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. J. Vet. Med. Sci. 60, 1299-1303.
- LO, S., HAYES, M., TULLY, J., WANG, R., KOTANI, H., PIERCE, P., ROSE, D., SHIH, J. (1992): *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 357-364.
- MACKIE, D. P., BALL, H. J., LOGAN, E. F. (1986): *Mycoplasma californicum* mastitis in the dry dairy cow. Vet. Rec. 119, 350-351.
- MILLER, R., CHELMONSKA-SOYTA, A., SMITS, B., FOSTER, R., ROSENDAL, S. (1994): *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 10, 479-490.
- NICOLET, J. (1996): Animal mycoplasmoses: a general introduction. Rev. Sci. Tech. 15, 1233-1240.

- NOORMOHAMMADI, A. H., MARKHAM, P. F., WHITHEAR, K. G., WALKER, I. D., GUREVICH, V. A., LEY, D. H., BROWNING, G. F. (1997): *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infect. Immun.* 65, 2542-2547.
- PFÜTZNER, H., SACHSE, K. (1996): *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 15, 1477-1494.
- PHILPOTT, M. (1993): The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.* 149, 339-369.
- RAZIN, S., JACOBS, E. (1992): Mycoplasma adhesion. *J. Gen. Microbiol.* 138, 407-422.
- RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. (1998): Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094-1154.
- ROSENGARTEN, R. (1998): Infektionen durch Mykoplasmen: Neue Aspekte zur Erregerbiologie und Pathogenese. *Antibiotika Monitor* 2, 3-12.
- ROSENGARTEN, R., WISE, K. S. (1990): Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science* 247, 315-318.
- RUHNKE, H. L. (1994): Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. In WHITFORD, H. W., R. F. ROSENBUSCH, AND L. H. LAUERMAN (editors). *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. 1st Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 56-62.
- SIMECKA, J. W., DAVIS, J. K., DAVIDSON, M. K., ROSS, S. E., STADTLÄNDER, C. T. K.-H., CASSELL, G. H. (1992): Mycoplasma diseases of animals. In: MANILOFF, J., McELHANEY, R. N., FINCH, L. R., BASEMAN, J. B. (Hrsg.): *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington D. C., S. 391-415.
- SPERGSEER, J., AURICH, C., AURICH, J.E., ROSENGARTEN, R. (2002): High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Vet. Microbiol.* 87:119-129.
- SPRECHER, D. J., COE, P. H., WALKER, R. D. (1999): Relationships among seminal culture, seminal white blood cells, and the percentage of primary sperm abnormalities in bulls evaluated prior to the breeding season. *Theriogenology* 51, 1197-1206.
- TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P. M. (1997): Genital mycoplasma infection. *Wien. Klin. Wochenschr.* 109, 578-583.
- TORTSCHANOFF, M., AURICH, C., ROSENGARTEN, R., SPERGSEER, J. (2005): Phase and size variable surface-exposed proteins in equine genital mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 110:301-306.
- Van KUPPEVELD, F.J., van der LOGT, J.T., ANGULO, A.F., van ZOEST, M.J., QUINT, W.G., NIESTERS, H.G., GALAMA, J.M., MELCHERS, W.J. (1992): Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2606-2615.
- VASCONCELLOS CARDOSO, M., BLANCHARD, A., FERRIS, S., VERLENGIA, R., TIMENETSKY, J., FLORIO DA CUNHA, R. A. (2000): Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet. Microbiol.* 72, 241-250.

VISSER, I. J., ter LAAK, E. A., JANSEN, H. B. (1999): Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology* 51, 689-697.

WATSON, H. L., BLALOCK, D. K., CASSELL, G. H. (1990): Variable antigens of *Ureaplasma urealyticum* containing both serovar-specific and serovar-cross-reactive epitopes. *Infect. Immun.* 58, 3679-3688.

WINNER, F., ROSENGARTEN, R., CITTI, C. (2000): In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* 68:4238-4244.

WISE, K. S. (1993): Adaptive surface variation in mycoplasmas. *Trends Microbiol.* 1, 59-63.

ZHANG, Q., WISE, K.S. (1996): Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent *vaa* genes. *Infect. Immun.* 64, 2737-2744.