

Mycoplasma bovis – hvad ved vi egentlig?

TEKST METTE BISGAARD PETERSEN¹, KASPAR KROGH² OG LIZA ROSENBAUM NIELSEN³

¹PH.D. STUDERENDE, INSTITUT FOR PRODUKTIONSDYR OG HESTE, KU SUND

²KVÆGFAGDYRLÆGE, VIDENCENTRET FOR LANDBRUG P/S

³PROFESSOR, DR.MED.VET., INSTITUT FOR PRODUKTIONSDYR OG HESTE, KU SUND

Siden 2011 har kvægbruget i Danmark oplevet en stigende interesse for og bekymring over sygdom forbundet med *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*). Samtidig har bakteriens komplekse patogenese og diffuse spredningsmønstre givet anledning til forvirring om, hvordan infektionen kan forebygges og bekæmpes.

Formålet med dette litteratur-review er derfor at beskrive eksisterende viden om patogenesen, smittespredning, kliniske tegn, behandling, risikofaktorer og diagnostik af *M. bovis* fra tidligere studier. Desuden gives et overblik over udviklingen af sygdom mm. relateret til *M. bovis* i Danmark.

Agens

Mycoplasmer er mikroorganismer, der tilhører klassen *Mollicutes*, og er de mindste prokaryote celler, som er i stand til at replikere sig selv. De har ingen cellevæg og er derfor resistente overfor antibiotika, der interfererer med cellevægssyntesen. Forholdet med værten varierer fra kommensal til opportunistisk eller primær patogen (1).

Værtens optag af bakterien

Optagelse af *M. bovis* kan ske gennem luftvejene, oralt eller via yveret. I yveret kan der ske spredning fra én kirtel til en anden. *M. bovis* menes også at spredes

hæmatogent, med spredning fra lungerne til leddene som eksempel (2). I flere studier er der rapporteret om fund af den samme *M. bovis*-stamme fra flere forskellige steder i kroppen, hvilket understøtter teorien om hæmatogen spredning af *M. bovis* (3). Desuden har Aebi et al. (3) fundet den samme stamme af *M. bovis* i dyr, der udviste kliniske tegn, såvel som i andre dyr, der ikke udviste kliniske tegn inden for samme besætning. Resultaterne af disse studier taler imod, at det skulle være forskellige stammer, der giver forskellige kliniske manifestationer, fx mastitis og lungebetændelse. Betydningen af stammeforskelle undersøges dog i netop disse år nærmere med nye metoder, herunder fuldgenomsekventering af både danske og udenlandske stammer på DTU Veterinærinstituttet.

Udskillelse af bakterien fra værten

Kalve

Klinisk raske dyr kan bære organismen i de øvre luftveje i lange perioder og på den måde fungere som et reservoir for infektionen i besætningen. *M. bovis* kan dyrkes fra næsesvabere hos kalve, der fodres med mælk kontamineret med *M. bovis*, også uden at de viser kliniske tegn på luftvejsinfektion (4). Isolation af *M. bovis* fra et dyr er derfor ikke ensbetydende

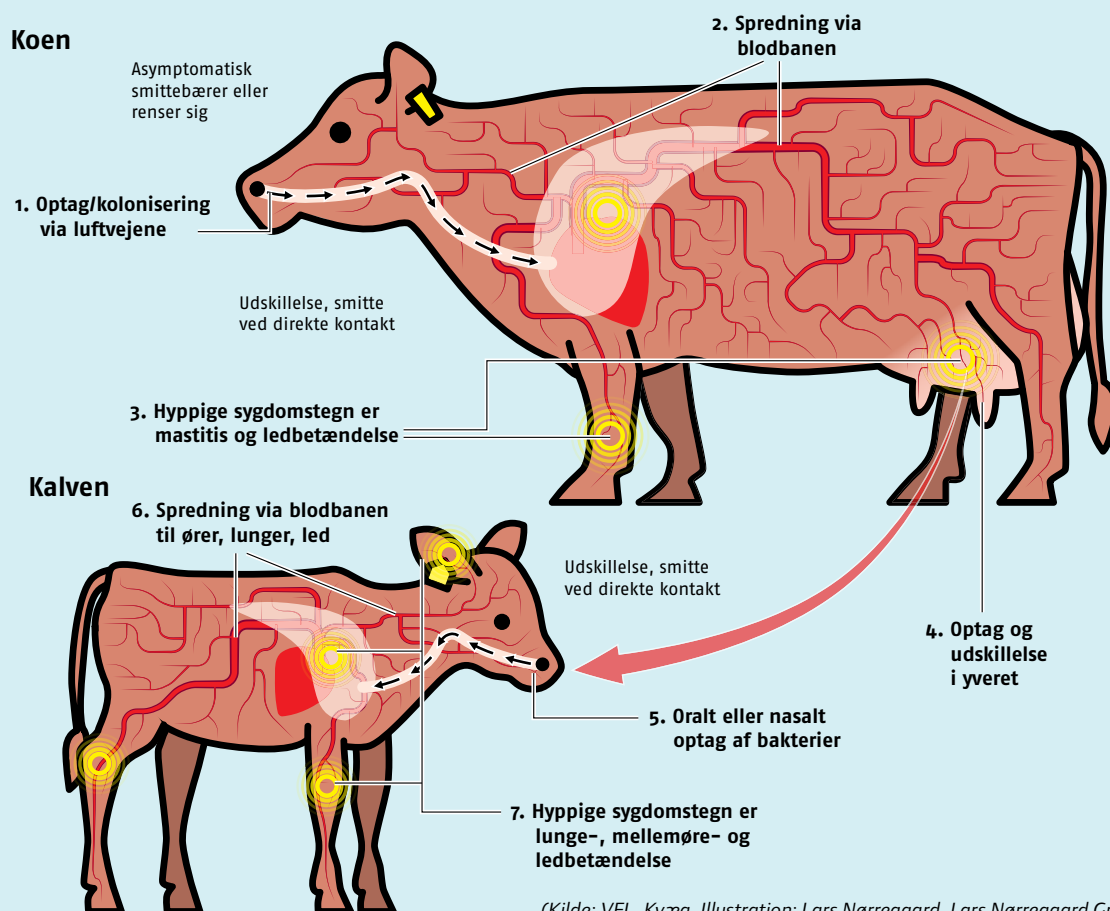
med sygdom, og *M. bovis* kan også isoleres fra både led med arthritis og normale led, samt fra lunger både med og uden lungebetændelse (2). Selv om kolonisering af næsehulen sandsynligvis går forud for infektion i de nedre luftveje, kan bakteriologisk dyrkning af næsesvabere ikke anvendes til at forudsige, hvilke dyr der vil udvikle infektion og læsioner i de nedre luftveje (5).

Køer

Udskillelse af *M. bovis* kan hos køerne ligeledes ske fra både klinisk syge dyr, men også fra smittede dyr, der ikke udviser kliniske tegn, som kan være en vigtig kilde til ko-til-ko spredning af *M. bovis* (6). *M. bovis* er isoleret fra forskellige kropsdele; konjunktiva, næsehulen og vulvovaginal-kanalen hos både klinisk påvirkede og asymptomatiske bærere, men de vigtigste steder for kolonisering og udskillelse af *M. bovis* menes at være de øvre luftveje og yveret (6). Køer med mastitis kan udskille op til 10⁸ colony-forming units (cfu)/ml af *M. bovis*, og mastitis er eksperimentelt blevet induceret efter inokulering med så lidt som 70 cfu/ml (7).

Variation i udskillelsesmønstret hos den enkelte ko kan variere fra dag til dag, så køen enten ikke udskiller, eller udskiller et højt antal bakterier. Derfor kan det være

Figur 1. Optagelse og spredning af *Mycoplasma bovis* i værten, samt kliniske tegn på sygdom.



(Kilde: VFL, Kvæg, Illustration: Lars Nørregaard, Lars Nørregaard Grafisk Design)

en god ide at tage gentagne prøver, hvis man ønsker at påvise bakterien (8). Et typisk mønster for en *M. bovis*-positiv besætning er, at der findes køer, der udskiller bakterien i mælken i flere måneder, muligvis år, til trods for at dyrene ikke udviser kliniske tegn. Der er ikke fundet studier, der beskriver smittespredningsmønstrene i besætninger, der har smitte til stede uden betydning for dyrenes sundhed i forhold til besætninger, hvor spredningen giver anledning til sygdom i besætningen. Dette undersøges i igangværende studier både i Danmark og flere andre steder i verden.

Selvom *M. bovis* er blevet isoleret fra vaginalsekret hos køer ved kælvning (9) og er blevet forbundet med medfødt sygdom hos kalve (10), er vertikal transmission sjældent beskrevet, og dets rolle i transmissionen af *M. bovis* inden for og mellem besætninger er ukendt. *M. bovis* kan også findes i sæd (11) og må derfor antages at kunne smitte ved naturlig bedækning og måske også ved inseminering,

hvor risikoen dog vil afhænge af, om sæden er behandlet, så bakterierne er inaktiveret eller fjernet. Jævnfør gældende lovgivning på området skal al tyresæd, der anvendes til kunstig inseminering i EU behandles på en sådan måde, at forekomsten af mycoplasmer mv. effektivt reduceres (pt. anvendes i Danmark en blanding af streptomycin, penicillin, lincomycin og spectinomycin).

Studier, der undersøger eventuel udskillelse i fæces og urin, mangler i litteraturen. Bennett og Jasper (7) isolerede *M. bovis* fra mediastinale lymfeknuder, uterus, trachea og urin i blæren, men påstanden blev ikke uddybet yderligere, så betydningen heraf er usikker.

Kliniske tegn

Kalve

Hos kalve er kliniske symptomer forbundet med *M. bovis* ofte pneumoni, otitis media og arthritis, men otitis interna, meningitis og tendinitis/bursitis er også rapporteret (1). Eksperimentelle studier

har vist at *M. bovis* alene kan forårsage pneumoni hos kalve, men andre patogener er ofte isoleret sammen med *M. bovis* ved pneumoni (2). Bakterien kan således have forskellige sygdomsmanifestationer, men også mange andre patogener kan være involveret i eller forårsage de samme kliniske symptomer som *M. bovis*, fx *Salmonella* Dublin ved arthritis og pneumoni, *Moraxella bovis* ved konjunktivitis og *Mannheimia haemolytica* ved pneumoni.

Køer

I voksent kvæg manifesterer klinisk sygdom relateret til *M. bovis* sig oftest som mastitis, men arthritis, pneumoni og otitis media kan også forekomme. Ved mastitis rammes ofte mere end én kirtel, og i et eksperimentelt studium blev de første kliniske forandringer i mælken observeret 5-6 dage efter inokulation med 70 cfu/ml i én kirtel. Efter 19-21 dage havde alle fire køer i undersøgelsen kliniske tegn i alle kirtler, og 11 ud af 16 kirtler hos de fire køer viste stadig kliniske tegn 56 dage

efter inokulation (kun én ko udviste ikke længere kliniske tegn) (7). Den daglige mælkeydelse falder ofte under sygdomsforløbet, men hvor meget varierer fra ko til ko fra et lille fald i ydelsen til næsten ophørt ydelse.

M. bovis er isoleret fra konjunktiva, men det er ikke et patogen, der typisk forbindes med konjunktivitis eller andre sygdomme i øjnene hos kvæg (6).

Der er ikke meget litteratur tilgængeligt om de langsigtede konsekvenser for kvæg, der er inficeret med *M. bovis*, selvom den generelle anbefaling er udsætning af inficerede dyr (6). I et studium i en besætning på 1.500 lakterende køer forsøgte man at benytte en separationsstrategi til at få kontrol over et *M. bovis*-udbrud. I begyndelsen af udbruddet havde ejeren valgt at udsætte alle køer, der var dyrkningspositive for *M. bovis* og som havde/udviklede klinisk mastitis eller var faldet kraftigt i mælkeydelse. Dyrkningspositive køer, der ikke havde kliniske tegn på mastitis eller kraftigt fald i mælkeydelse, blev separeret fra i en anden stald, malket efter de dyrkningsnegative køer, og derefter fulgte man bl.a. mælkeydelsen i de to grupper. Der fandtes ikke signifikant forskel i mælkeydelsen hos de 60 køer, der oprindeligt var dyrkningspositive, ikke udviklede sygdom og blev dyrkningsnegative igen, sammenlignet med ikke-inficerede kontrolkøer fra hovedbesætningen (12). Dette tyder på, at man skal være tilbageholdende med at bruge positive PCR-resultater for køer uden kliniske tegn som udsætningskriterium. Derimod giver det mening at forsøge at stoppe smittespredningen fra dem ved fx at malke dem sidst, sørge for smitteforebyggelse under malkningen og separation af smittede dyr.

Figur 1 illustrerer kliniske tegn og smittespredningen for det enkelte dyr.

Behandling

M. bovis er naturligt resistent over for antibiotika, der interfererer med cellevæggen, β -lactamer (herunder penicillin og cephalosporin) og vancomycin. Mens in-vitro studier viser, at *M. bovis* er følsom for forskellige antibiotika som tetracycliner og makrolider, viser in-vivo studier og praktiske erfaringer mere varierende

resultater. Behandling giver ofte meget ringere resultater, end hvad man kunne forvente ud fra in-vitro studierne. Behandling af *M. bovis*-relateret sygdom er i praksis ofte uden eller med minimal virkning, og skal fortsættes i en længere periode (13). Man skal huske på, at dyrene i eksperimentelle studier ofte behandles tidligt i sygdomsforløbet, og som nævnt tidligere, er luftvejsinfektioner ofte blandede infektioner, så påvisning af *M. bovis* fra en besætning eller et dyr er ikke nødvendigvis ensbetydende med klinisk sygdom med *M. bovis* som primært patogen.

Smitteveje og risikofaktorer

Smitte inden for besætningen

M. bovis har traditionelt set været klassificeret som et smitsomt mastitispatogen, der smitter fra yver til yver via malkemaskinen, men det er ikke den eneste måde, hvorpå smittespredningen kan foregå. Ovennævnte forsinkelse mellem udskillelsen af *M. bovis* og kliniske forandringer i mælken kan være en vigtig medvirkende årsag til ko-til-ko spredning af agens. Hvorvidt hæmatogen spredning fra de øvre luftveje til yveret er en vigtig del af patogenesen er ikke kendt i detaljer, men *M. bovis* kan isoleres fra nares hos køer med mastitis (14). *M. bovis* kan som nævnt også isoleres fra de øvre luftveje, og indirekte kontakt er en potentiel smittevej, for eksempel ved næse-til-næse kontakt eller ved deling af drikkekar og fodertrug. For kalve er fodring med *M. bovis*-forurenede mælk en kendt risikofaktor for kolonisering med *M. bovis*, men resulterer ikke altid i sygdom (4)(1).

Studier, der undersøger variationen af *M. bovis* fra fx asymptomatiske bærere og syge dyr fra samme besætning, finder en høj grad af homogenitet i isolaterne (15). Dette antyder, at det er udviklingen af flok-immunitet, der efter en periode med kliniske symptomer fører til færre kliniske tegn, snarere end en ændring i den bakterielle DNA. Det skal dog bemærkes, at i tidligere undersøgelser blev bakterierne undersøgt ved hjælp af »pulsed-field gel-elektrophorese« (PFGE), der forventes at have mindre diskriminatorisk evne end nyere mere følsomme metoder, fx fuldgenomsekvente-

ring, til at differentiere mellem stammer af forskellige oprindelse. Derfor er studier i potentielle bakterielle faktorer, der kan forklare forskellige kliniske udtryk samt immunreaktioner, iværksat.

Håndtering i besætningen

For at mindske spredning af *M. bovis* i en besætning må anbefalingen være, at det frarådes at fodre kalvene med mælk fra køer med mastitis eller restmælk, medmindre den pasteuriseres, at holde syge dyr eller dyr, der vides at udskille *M. bovis*, adskilt fra raske dyr, samt at minimere stress hos dyrene. I praksis kan dette være vanskeligt, og da vil god hygiejne og strikt sektionering i mindre hold i staldafsnit med kalve og ungdyr være en løsning.

Generelt har forsøg med at vaccinere mod *M. bovis* ikke givet de ønskede resultater, og der er endnu ikke vacciner til rådighed med dokumenteret effekt (6).

Smitte mellem besætninger

Der foreligger meget få studier af, hvordan *M. bovis* spredes mellem besætninger. Indkøb af nye dyr menes at være den største risikofaktor for introduktion af *M. bovis*-relateret sygdom i besætningen. Dette kan enten være ved introduktion af smittebærere uden kliniske tegn, eller hvis symptomfri smittebærere i besætningen udvikler klinisk sygdom, fordi de bliver stressede af indkøb af nye dyr. Det vil være relevant at undersøge handelsmønstre som en risikofaktor for *M. bovis*-infektion, men sådanne undersøgelser findes pt. ikke i litteraturen.

Besætningsstørrelse er desuden beskrevet som en risikofaktor af flere forfattere. Jo større besætning, desto større risiko for positiv dyrkning af *M. bovis* fra tankmælken (16). Der er dog ikke påvist mange risikofaktorer for smitte mellem besætninger, og derfor er studier i risikofaktorer for smitte mellem besætningerne og udbrud iværksat her i Danmark.

Diagnose

Det kliniske billede tillader ikke, at der nemt kan skelnes mellem sygdom relateret til *M. bovis* og andre årsager, derfor bør diagnosen på enkeltdyrsniveau verificeres ved påvisning af bakterien (dyrkning eller PCR) eller en titerstigning i antistoffer mod *M. bovis* (ELISA).

Dyrkning

Dyrkning af bakterien har tidligere været den foretrukne metode til diagnosticering af *M. bovis*. Dyrkning af *M. bovis* er dog både tidskrævende, dyrt og kompliceret, og det kræver 3-10 dage at frembringe synlige kolonier. Specielle transportmedier, der bl.a. indeholder antibiotika for at regulere væksten af andre bakterier, skal bruges til transport af prøver, og forkert håndtering af prøverne kan påvirke resultatet af dyrkningen.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Flere forskellige PCR-kits er beskrevet i litteraturen som værende brugbare til at påvise *M. bovis* i mælk og andre kropsvæsker. Sammenlignet med dyrkning har kitene ofte en sammenlignelig sensitivitet og specificitet (17)(18), når der opformes levende, såvel som dødt DNA, og PCR er mindre tidskrævende og oftest billigere end dyrkning (17).

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Antistoffer, primært immunglobulin-G (IgG) rettet mod *M. bovis*, kan påvises i serum 1-2 uger efter smitte via luftvejene (19) og i både serum og mælk 1-2 uger efter intramammær inokulering (20). Der er ikke mange studier, der viser, hvor længe antistofniveauet mod *M. bovis* i serum forbliver højt, men i et vaccinationsstudium havde kalvene høje ELISA-titre 6 måneder efter vaccination uden at være blevet udsat for smitte med *M. bovis* (19). IgG i både mælk og serum forblev i et andet studium over den positive grænseværdi i minimum 45 dage efter intramammær inokulation (20). Ofte er inokulationsdosis i eksperimentelle studier dog høje og derfor ikke nødvendigvis repræsentative for forholdene i besætninger.

Det er ikke klart, om maternelle antistoffer virker beskyttende imod *M. bovis*-relateret sygdom hos kalvene, men i ét studium blev der ikke fundet nogen sammenhæng mellem antistoffer mod *M. bovis* i de første 2 uger af livet og forekomsten af lungebetændelse hos råmælks-fodrede kalve (21).

Enkeltdyrsniveau

Den hyppigst beskrevne metode til påvisning af *M. bovis* hos køer har været dyrk-

ning af mælkeprøver, og hos kalve er det dyrkning af svabere fra de øvre luftveje. Men *M. bovis* kan også isoleres fra fx led og lymfeknuder. PCR bliver mere og mere populært, og *M. bovis* er påvist ved PCR fra mælk, næse- og konjunktiva-svabere (18) samt post mortem på lungevæv (17).

Antistoffer rettet mod *M. bovis* kan påvises i mælk fra køer, der har haft *M. bovis*-mastitis inden for de sidste 9 uger, hvilket støtter, at ELISA har potentiale til at blive anvendt til diagnosticering af *M. bovis* mastitis hos malkekvæg (22). På trods af at der ikke er mange videnskabelige artikler på området, konkluderes det ofte, at serologi er mest anvendeligt som del i besætningsdiagnostik eller overvågningsprogrammer, men ikke er egnet til enkeltdyrsdiagnostik (6). Derfor er der i bl.a. Danmark studier i gang, der undersøger sammenhæng mellem antistoffer i blod og mælk og PCR-reaktioner på enkeltdyrsniveau.

Besætningsniveau

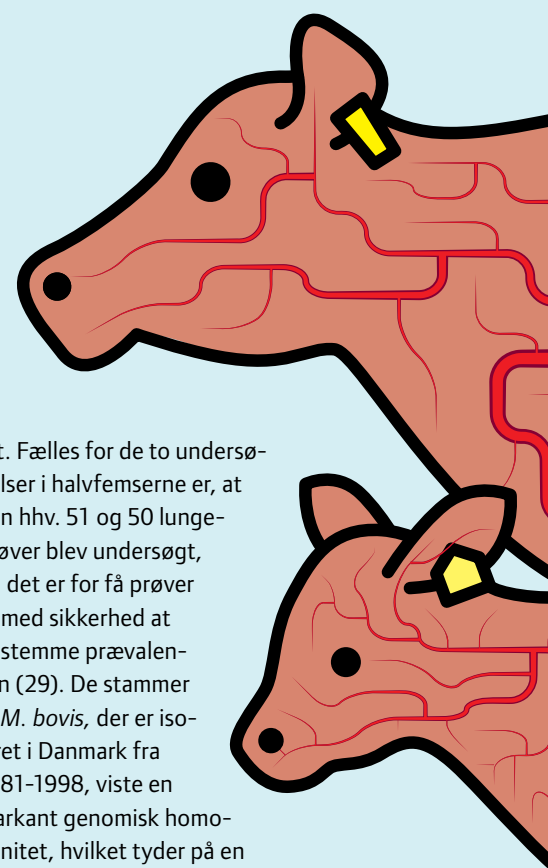
Dyrkning af tankmælksprøver er et godt værktøj til rutinemæssig overvågning af malkekvægsbesætninger for at identificere besætninger med *M. bovis*-inficerede køer (16), og PCR er også blevet anvendt til samme formål (23). Hos kalve har niveauet af antistoffer mod *M. bovis* i serum været brugt til at verificere tilstedeværelsen af *M. bovis* blandt dyrene, men antistofniveauet korrelerede ikke med risikoen for at blive behandlet for en luftvejsinfektion (24).

Køer med mastitis udskiller antistoffer i store mængder i mælken, og det gør køer med *M. bovis* infektion i andre kropsdele muligvis også. Det forekommer derfor sandsynligt, at det er muligt at måle antistoffer i prøver fra tankmælken. Men der findes endnu ingen publicerede studier, der viser, hvorvidt eller hvordan ELISA kan anvendes fornuftigt på tankmælksprøver som diagnostisk redskab for *M. bovis*, men undersøgelser heraf er i gang her i Danmark.

Danske forhold

Det første beskrevne tilfælde af *M. bovis*-mastitis hos kvæg blev diagnosticeret i USA i 1961 (25). I Danmark blev det første beskrevne tilfælde af *M. bovis*-mastitis diagnosticeret i 1984, mens *M. bovis*

første gang blev isoleret fra lungerne af dansk kvæg i 1981 (26). I 1980'erne var forekomsten af *M. bovis* isoleret fra lungevæv lav (5 ud af 911 lungeprøver = 0,5 %) (27). I begyndelsen af halvfemserne (1993-1994) var forekomsten stadig meget lav (1 ud af 72 lunger = 1,4 %), beregnet ud fra *M. bovis*-isolater blandt kalve indsendt med en anamnese om lungebetændelse (28). I 1999, var forekomsten tilsyneladende steget til 24 % (12 ud af 50 lunger), baseret på lunger fra kalve med lungebetændelse indsendt til rutinemæssig diagnostik på Veterinærinstitut-



tet. Fælles for de to undersøgelser i halvfemserne er, at kun hhv. 51 og 50 lungeprøver blev undersøgt, og det er for få prøver til med sikkerhed at bestemme prævalensen (29). De stammer af *M. bovis*, der er isoleret i Danmark fra 1981-1998, viste en markant genomisk homogenitet, hvilket tyder på en fælles epidemiologisk stamme, og at *M. bovis*-genomet har været stabilt i en betydelig tidsperiode (30) – i det mindste baseret på de metoder, der har været tilgængelige hidtil.

I juni og september-november 2013, samt januar-februar og juni-juli 2014 er der gennemført fire nationale tankmælks-screeninger, hvor alle danske malkekvægsbesætninger har fået målt *M. bovis* antistoffer ved ELISA på tankmælk. Den serologiske prævalens ved de 3 første runder var hhv. 21 %, 7 % og 11 % ved en grænseværdi på 37 ODC %, som foreslået af ELISA producenten (Mycoplasma Bovis >

ELISA kit, Bio-X Diagnostics). Desuden blev tre tankmælksundersøgelser af alle malkekvægsbesætninger udført i efteråret 2011, 2012 og 2013, hvor alle prøver blev testet ved hjælp af PCR (PathoProof mastitis kit, Thermo Fisher Scientific). Her var hhv. 1,7 %, 2,0 % og 1,6 % positive ved en Ct-værdi < 40. Baseret på denne tankmælksovervågning synes der ikke at

være en sket stigning i forekomsten af *M. bovis*-smittede besætninger i Danmark (31).

I øjeblikket forsøger adskillige projekter, inkl. tre ph.d.-projekter og tre specialeprojekter ved DTU Veterinærinstituttet og Københavns Universitet at bibringe ny viden om *M. bovis* i Danmark. Projekterne fokuserer på hhv. spredningen af *M. bovis*

inden for besætningen, mellem besætningerne og den molekylære karakterisering af *M. bovis*-stammer fra Danmark, samt årsagsfaktorer til udbruddenes sværhedsgrad og varighed og effekten af *M. bovis* på reproduktion og mælkeydelse. Endvidere vil værdien og fortolkningen af de tilgængelige diagnostiske test blive evalueret i disse projekter. ■

References

- (1) Maunsell, F. P.; Donovan, G. A. *Mycoplasma bovis* infections in young calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract. 2009, 25, 139-77.
- (2) Gagea, M. I.; Bateman, K. G.; Shanahan, R. A.; van, D. T.; McEwen, B. J.; Carman, S.; Archambault, M.; Caswell, J. L. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. J. Vet. Diagn. Invest 2006, 18, 29-40.
- (3) Aebi, M.; Bodmer, M.; Frey, J.; Pilo, P. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. Vet. Microbiol. 2012, 157, 363-368.
- (4) Bennett, R. H.; Jasper, D. E. Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. Cornell Vet. 1977, 67, 361-373.
- (5) Soehnlen, M. K.; Aydin, A.; Murthy, K. S.; Lengerich, E. J.; Hattel, A. L.; Houser, B. A.; Fenton, G. D.; Lysczek, H. R.; Burns, C. M.; Townsend, A. M.; Brooks, J. W.; Wolfgang, D. R.; Jayarao, B. M. Epidemiology of *Mycoplasma bovis* in pennsylvania veal calves. Journal of Dairy Science 2012, 95, 247-254.
- (6) Maunsell, F. P.; Woolums, A. R.; Francoz, D.; Rosenbusch, R. F.; Step, D. L.; Wilson, D. J.; Janzen, E. D. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. J. Vet. Intern. Med. 2011, 25, 772-783.
- (7) Bennett, R. H.; Jasper, D. E. Bovine mycoplasma mastitis from intramammary inoculation of small numbers of *Mycoplasma bovis*. I. Microbiology and Pathology. Veterinary Microbiology; 1977, 2, 341-355.
- (8) Biddle, M. K.; Fox, L. K.; Hancock, D. D. Patterns of mycoplasma shedding in the milk of dairy cows with intramammary mycoplasma infection. Journal of the American Veterinary Medical Association; 2003, 223 (8), 1163-1166.
- (9) Feenstra, A.; Bisgaard, M. E.; Friis, N. F.; Meyling, A.; Ahrens, P. A field study of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. J. Vet. Med. 1991, 38, 195-202.
- (10) Stipkovits, L.; Rady, M.; Glavits, R. Mycoplasma arthritis and meningitis in calves. Acta Vet. Hung. 1993, 41, 73-88.
- (11) Hazelton, M.; Sheehy, P.; Bosward, K.; Dwyer, C.; Leighton, N.; Morton, J.; House, J. Prevalence of *Mycoplasma* spp. in dairy bulls and considerations for herd biosecurity. Proceedings of the XXVIII World Buiatrics Congress. 2014, 81.
- (12) Brown, M. B.; Shearer, J. K.; Elvinger, F. Mycoplasma mastitis in a dairy herd. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1990, 196, 1097-1101.
- (13) Francoz, D.; Fecteau, G.; Desrochers, A.; Fortin, M. Otitis media in dairy calves: a retrospective study of 15 cases (1987 to 2002). Can. Vet. J. 2004, 45, 661-666.
- (14) Punyapornwithaya, V.; Fox, L. K.; Hancock, D. D.; Gay, J. M.; Alldredge, J. R. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the Herd: a case study from Idaho, USA. Prev. Vet. Med. 2010, 93, 66-70.
- (15) Arcangioli, M. A.; Aslan, H.; Tardy, F.; Poumarat, F.; Le, G. D. The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in french calf feedlots. Vet. J. 2012, 192, 96-100.
- (16) Pinho, L.; Thompson, G.; Machado, M.; Carvalho, J. Management practices associated with the bulk tank milk prevalence of *Mycoplasma* spp. in dairy herds in northwestern Portugal. Prev. Vet. Med. 2013, 108, 21-27.
- (17) Cai, H. Y.; Bell-Rogers, P.; Parker, L.; Prescott, J. F. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. J. Vet. Diagn. Invest 2005, 17, 537-545.
- (18) Sachse, K.; Salam, H. S.; Diller, R.; Schubert, E.; Hoffmann, B.; Hotzel, H. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. Vet. J. 2010, 186, 299-303.
- (19) Nicholas, R. A.; Ayling, R. D.; Stipkovits, L. P. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. Vaccine 2002, 20, 3569-3575.
- (20) Byrne, W.; Markey, B.; McCormack, R.; Egan, J.; Ball, H.; Sachse, K. Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. Vet. Rec. 2005, 156, 767-771.
- (21) Van Donkersgoed, J.; Ribble, C. S.; Boyer, L. G.; Townsend, H. G. Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. Can. J. Vet. Res. 1993, 57, 247-254.
- (22) Byrne, W. J.; Ball, H. J.; Brice, N.; McCormack, R.; Baker, S. E.; Ayling, R. D.; Nicholas, R. A. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. Vet. Rec. 2000, 146, 368-369.
- (23) Justice-Allen, A.; Trujillo, J.; Goodell, G.; Wilson, D. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. J. Dairy Sci. 2011, 94, 3411-3419.
- (24) Martin, S. W.; Bateman, K. G.; Shewen, P. E.; Rosendal, S.; Bohac, J. G.; Thorburn, M. A group level analysis of the associations between antibodies to seven putative pathogens and respiratory disease and weight gain in Ontario feedlot calves. Can. J. Vet. Res. 1990, 54, 337-342.
- (25) Hale, H. H.; Helmboldt, C. F.; Plastry, W. N.; Stula, E. F. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. Cornell Veterinarian 1962, 52, 582-591.
- (26) Friis, N. F. *Mycoplasma-bovis*-induced mastitis in cattle in Denmark. Nord. Vet. Med. 1984, 36, 324-325.
- (27) Friis, N. F.; Krogh, H. V. Isolation of *Mycoplasmas* from danish cattle. Nordisk Veterinærmedicin 1983, 35, 74-81.
- (28) Tegtmeyer, C.; Uttenthal, A.; Friis, N. F.; Jensen, N. E.; Jensen, H. E. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from danish calves. Zentralbl. Veterinärmed. B 1999, 46, 693-700.
- (29) Kusiluka, L. J.; Ojeniyi, B.; Friis, N. F. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in danish cattle. Acta Vet. Scand. 2000, 41, 139-146.
- (30) Kusiluka, L. J.; Kokotovic, B.; Ojeniyi, B.; Friis, N. F.; Ahrens, P. Genetic variations among *Mycoplasma bovis* strains isolated from danish cattle. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 192, 113-118.
- (31) Krogh, K.; Bisgaard Petersen, M.; Rosenbaum Nielsen, L. Interpretation of *Mycoplasma bovis* tests in bulk tank milk and DHI-samples from cattle herds. Proceedings of the XXVIII World Buiatrics Congress 2014, 63.

