

# Nowotwory złośliwe a beztlenowce *Clostridium*

ZYGMUNT CYGAN, WIESŁAW CYGAN\*

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul Słowicza 2, 20-336 Lublin

\*Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego, al. Kraśnicka 100, 20-718 Lublin

Cygan Z., Cygan W.

## Cancers and anaerobic *Clostridium*

### Summary

The mechanism of the formation of prolonged anaerobiosis regions in solid tumors concluded by necrosis has been presented. These areas are often colonized by anaerobic *Clostridia*. From these regions dangerous clostridial infections may develop in the form of bacteremia or spontaneous, nontraumatic gangrene focuses in outlying skeletal muscles. Ischaemic sites are also a target of anti-tumor attacks in two different strategies: clostridial gene therapy, the latest well-tried clostridial-direct enzyme therapy (CDEPT) and a combination bacterial therapy (COBALT).

**Keywords:** anaerobiosis in tumors, clostridial infection, clostridial gene therapy

Procesom neoplazmogenezy towarzyszą zaburzenia sprzyjające powstawaniu mikrośrodków beztlenowych, najczęściej spotykanych w guzach litych (32). Przedstawiają one obszary niedotlenowane, hipoksyczne, nawet martwicze (17), a beztlenowy metabolizm znacznie obniża w nich pH i potencjał *redox* (32). Z takich zatem niedotlenowanych miejsc niejednokrotnie wychodzą groźne infekcje klostridialne (4, 9, 13, 19, 29). Poza tym aktualność zainteresowań tą problematyką tłumaczą wyłaniające się możliwości wykorzystania pewnych, niechorobotwórczych laseczek *Clostridium* w genowej terapii choroby nowotworowej (6, 7). Spektakularne wręcz osiągnięcia eksperymentalne w tej sprawie, ostatnio nawet popularyzowane w ogólnopolskiej prasie codziennej (34), rozbudziły zrozumiałe nadzieje nową perspektywą zwalczania tej prawdziwej plagi naszej cywilizacji (5).

Tak problemowo zakreślonej tematyki nie omawiano dotychczas w piśmiennictwie światowym w zwartej formie artykułu przeglądowego.

### Progresja nowotworów złośliwych i powstawanie w nich anaerobiozy

W początkowym okresie neoplazmogeneza jest procesem beznaczyniowym, a wzrost nowotworu w tej fazie (prevascular phase) ustaje po osiągnięciu średnicy 1-2 mm (23). Dotyczy to także guzów, które w momencie inicjacji są już *in situ* rakiem (piersi, płuc, okrężnicy, skóry). W stanie spoczynku (dormance) pozostają jednak różnie długo, nawet lata, dopóki nie wyodrębni się na drodze transformacji nowotworowej, np. w wyniku mutacji genu p53 (11), względnie aktywowania onkogenów ras (26), fenotyp angiogeny

komórek (angiogenic phenotype, cyt 23). Zapoczątkowany rozwój unaczynienia (*vascularisatio*) wiąże się z pobudzeniem angiogenezy (gr. angeion – naczynie, genesis – powstanie) w następstwie ekspresji proangiogennych cytokin, głównie czynników VEGF (vascular endothelial growth factor, cyt. 20) i ANG (angiogenic growth, cyt. 8). Wytwarzane w konsekwencji m.in. infiltracji makrofagowej i limfocytarnej zmian nowotworowych (3) stymulują rozwój komórek śródbłonna naczyniowego (8), co wpływa na wzrost *in loco* masy guza, a także rozsiew regionalny, nadto odległy przerzutów (8). Zatem cytokiny te w zasadniczym stopniu decydują o przebiegu złośliwym, progresywnym procesie chorobowym (23, 27). W tych bowiem warunkach nadążać może zaopatrywanie szybko proliferujących komórek nowotworowych w substancje odżywcze i tlen (28).

Kluczowy wpływ na progresję choroby nowotworowej posiada, oprócz rozwoju angiogenezy, także supresja odporności komórkowej (23), ale w miejscowych nawrotach guzów, np. raka odbytnicy, podnosi się z kolei wyższość proliferacji nad angiogenezą i apoptozą (24).

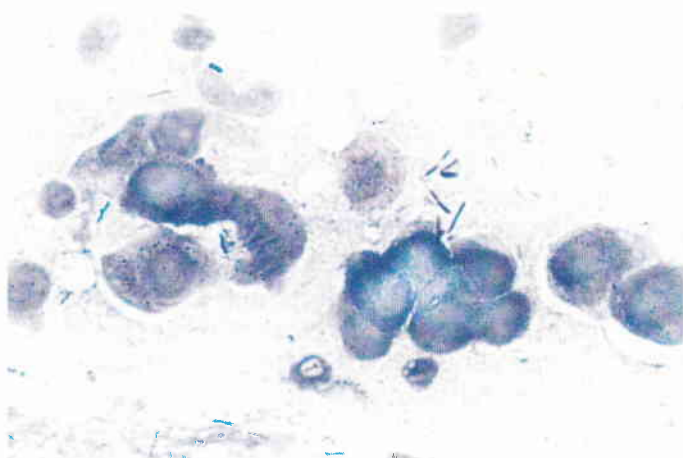
Powstawanie ognisk anaerobiozy w guzach złośliwych posiada złożony mechanizm, w którym uczestniczą procesy angiogenezy, proliferacji, nawet apoptozy, ale w sposób nieskoordynowany, w dodatku komplikowany defektem, ekspresją i mutacją szeregu struktur, nadto genów związanych z transformacją nowotworową (p53, TF, ras, bcl-2, cyt. 12, 28). Nadekspresja genów p53 i bcl-2 oddziałuje poprzez inhibitor surwiwinę antyapoptycznie (2), zatem zwiększając potencjał proliferacyjny komórek (10). Natomiast brak

waskularyzacji stabilizuje równowagę pomiędzy proliferacją a apoptozą do czasu ustalenia się fenotypu angiogenego (23). Inicjowane w guzach litych unaczynienie (15), głównie w zakresie mikrokrążenia, charakteryzuje się szeregiem strukturalnych i funkcjonalnych odchyłeń (32) przedstawiających chaos w architektonice waskularyzacyjnej (miejscowy brak w guzie kapilar, odcinkowa ich niedrożność, nadmierna krętość, zniekształcenia itp.), nadto zaburzenia reologiczne (m.in. agregacja płytek krwi, mikrozakrzepy, przerywany krwiobieg). Anomalie te, a także wyprzedzająca angiogenezę proliferacja komórek nowotworowych (17), najczęściej ogniskowa, sprzyjają powstawaniu obszarów niedotlenowanych w guzach litych (15), zwykle głowy, szyi i okężnicy, nadto sutka oraz glejaków wielopostaciowych mózgu (7). Powstałe bowiem niedokrwienie (*ischemia*), a w następstwie hipoksja napędzają angiogenezę umożliwiającą wzrost nowotworu (17). W tym patomechanizmie uczestniczą głównie prokoagulanty (28) i proangiogenne cytokiny (1, 20), w tym czynnik martwicy  $TNF-\alpha$  (27), ostatecznie doprowadzające w wyniku złożonych, współzależnych oddziaływań do wykrzepień śródnaczyniowych warunkujących tworzenie się obszarów martwiczych w guzach (17, 27). Ukształtowane w tych warunkach mikrośrodowisko beztlenowe, aczkolwiek pod względem anaerobiozy w poszczególnych zmianach przestrzennie niejednolite, charakteryzuje w szybko rosnących nowotworach złośliwych niższy stopień natlenowania ( $pO_2 < 10$  mg Hg, cyt. 16) niż w tkankach normalnych ( $pO_2$  43-66 mg Hg, cyt. 32). Jednocześnie obniżona kwasowość (pH 6,15-7,4, cyt. 32) w rezultacie tlenowo/beztlenowej aktywności metabolicznej mnożących się komórek powoduje spadek potencjału *redox* (w tkankach zdrowych  $Eh = 150$  mV).

### Clostridia w guzach złośliwych

Powstawanie w proliferujących nowotworach mikrośrodowisk anaerobowych usposabia do osiedlania się w nich laseczek *Clostridium* (15). Ich źródłem dla guzów jelit, nadto wątroby jest – z racji uwarunkowań topograficznych – przewód pokarmowy. Natomiast w nowotworach usytuowanych poza nim, np. w górnych odcinkach ciała (płuca, krtani, jama nosowo-gardłowa, nawet gruczoł tarczowy), sugeruje się jeszcze drogę aerogenną kolonizacji klostridialnej (5).

Spośród lokalizujących się predylekcyjnie w guzach beztlenowców *Clostridium* wymieniane są przede wszystkim chorobotwórcze gatunki *C. perfringens* i *C. septicum* (5, 13), a z nietoksynogennych taksonów głównie *C. sporogenes* i *C. oncolyticum*, poza tym *C. beijernickii* oraz *C. butyricum* (5, 7). Powyższe laseczki zwykle występują w małej liczbie, dopiero przy współdziałaniu czynników podwyższonego ryzyka mogą być uwidaczniane już w rozmazach bezpośrednich tkanek guza (ryc. 1). Wyróżniającą cechą większości stwierdzanych gatunków jest łatwość ich zarodnikowania (ryc. 2). Podkreślić należy, że beztlenow-



Ryc. 1. Laseczki *C. perfringens* A (preparat odciskowy z gruczolaka jelita grubego, pow. 700 $\times$ , wg 5)



Ryc. 2. Zarodnikujące laseczki *C. sporogenes* (szczep z raka tarczycy, pow. 700 $\times$ , wg 5)

ce *Clostridium*, nawet apatogenne, po osiągnięciu miejsca proliferujących komórek wywołują ich cytolizę pogłębiającą hipoksję, która z kolei wzmacnia angiogenezę odgrywającą kluczową rolę w progresji choroby nowotworowej (wzmocniona inwazyjność, przyspieszone przerzuty, cyt. 23). Co więcej, leczenie napromienianiem i chemioterapią, wywołujące niedotlenowanie tkanek guza, zwiększa zagrożenie skolonizowania ich przez laseczki *Clostridium* (15).

### Zakażenia klostridialne w chorobie nowotworowej

W przebiegu choroby nowotworowej, w tym białaczek (szpikowych, limfatycznych), niejednokrotnie występują, zwłaszcza w sytuacjach usposabiających, zakażenia klostridialne rozwijające się jako bakteremie (4), względnie groźniejsze, gdyż przebiegające w formie spontanicznych, odległych, w dodatku – co frapujące – atraumatycznych ognisk zgorzelowych mięśni (5, 13, 19, 29). Te ostatnie zachorowania, wcale nierzadkie (dotychczas opisano kilkadziesiąt przypadków, cyt. 19), z reguły zaskakują chorego, bowiem mogą nawet wyprzedzać skryty proces toczący się w organizmie proliferacji onkogennej (*occult malignancy process*, cyt. 14).

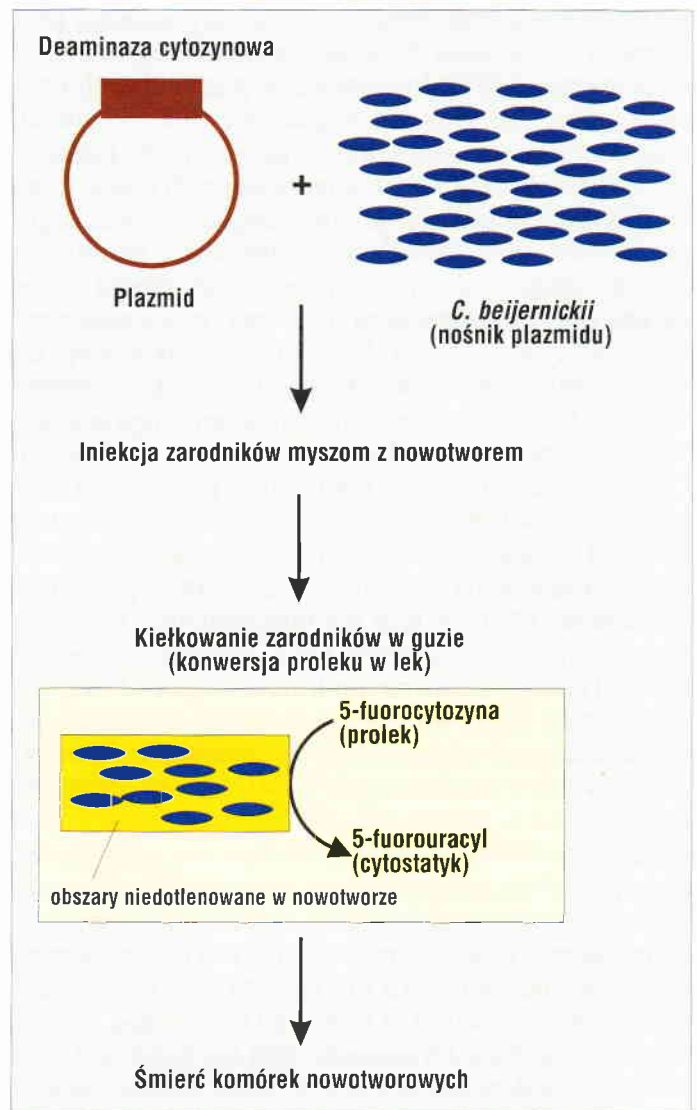
Spośród czynników ryzyka infekcji klostridialnej w chorobie nowotworowej wymienia się przede wszystkim: niedrożność jelita (powodem jest egzofityczny wzrost guza, rak włóknisty, naciek białaczkowy w ścianie itp.) oraz cukrzycę, nadto cykliczną neutropenię, a także mielotoksyczne działanie cytostatyków i radioterapii (5, 9, 14, 29, 33). Nakładające się oddziaływanie kilku tych zagrożeń wielokrotnie zwiększa groźbę zakażenia. Zapoczątkuje je wykiełkowanie w miejscach anaerobiozy toksynogennego beztlenowca, a przy obniżonej jeszcze oporności organizmu spełnione zostają wszystkie wymogi formuły Altemeiera i Culbertsona, że

$$I \text{ (infekcja)} = \frac{\text{liczba zarazka} \times \text{chorobotwórczość}}{\text{oporność tkanek}}$$

Niezbyt zrozumiały jest rozwój zakażenia w odległych od źródła laseczek *Clostridium* (przewód pokarmowy) mięśniach szkieletowych. Próbuje się to tłumaczyć dużą aerotolerancją dwóch najczęściej uwikłanych w rozwój toksoinfekcji gatunków, tj. *C. septicum* i *C. perfringens* (9, 29). Dominację w tych zakażeniach laseczek *C. septicum*, ostatnio najczęściej opisywaną, częściowo wyjaśnia łatwość ich zarodnikowania w organizmie i potrzeba 300-krotnie mniejszej dawki wywołującej martwicę mięśni (*myonecrosis anaerobica*, cyt. 29). Powyższe infekcje przebiegają z nadzwyczaj wysoką śmiertelnością, na ogół nie spadającą poniżej 70% (4, 29).

### Klostridialna terapia genowa nowotworów

Ograniczeniem konwencjonalnej chemioterapii, mimo wprowadzania coraz to nowszych cytostatyków (25), wciąż pozostaje zbyt mała ich selektywność w działaniu na komórki nowotworowe, tj. z wyłączeniem zdrowych (7, 25). Wypróbowywana w tym kontekście klostridialna terapia genowa wnosi nową możliwość przedstawianą w dwóch najlepiej rokujących, ale odmiennych strategiach leczniczych (7, 18, 21). Pierwsza z nich, tzw. CDEPT (clostridial-directed enzyme prodrug therapy, cyt. 21) polega na wykorzystaniu izolowanych z *E. coli* plazmidów, zatem nie spotykanych w komórkach eukariotycznych, a ekspresjonujących wytwarzanie enzymów odpowiedzialnych za konwersję nieaktywnych proleków w potężne cytostatyki, np. 5-fluorocytozyny w 5-fluorouracyl (wpływ dezaminazy cytozynowej, cyt. 7), względnie pochodnej dwunitrobenzamidów (związek CB 1954) w metabolit o silnych właściwościach alkilujących (efekt działania nitroreduktazy, cyt. 18, 21). Niszczenie komórek w litych guzach osiągnąć można stosując – po wyprzedzającym podaniu proleku – implantację w ich tkanki kapsulek z enzymem (22), względnie wstrzykując dożylnie specjalnie skonstruowany nośnik klostridialny (*C. beijernickii*, *C. butyricum*) plazmidu, specyficznie osiągający docelowe miejsca hipoksyczno-martwicze w nowotworach (7), co ilustruje ryc. 3.



Ryc. 3. Klostridialna terapia genowa metodą CDEPT (wg 7)

Obszary niedotlenowania i martwicy, które występują w litych nowotworach, także w ich przerzutach do wątroby wielkości  $> 1 \text{ cm}^3$  (25-75% masy), limitują skuteczność konwencjonalnej metody leczenia cytostatykami i napromieniowaniem. Ominięcie powyższych ograniczeń realizuje inny pomysł, drugiej z kolei klostridialnej strategii genowej prowadzonej metodą COBALT (combination bacteriolytic therapy, cyt. 6). Wykorzystuje ona nietoksykogenny, specjalnie wyselekcjonowany szczep *C. novyi* NT, tj. z usuniętym genem toksyny letalnej (6). W ten sposób zmienił drobnostrój zachował łatwość zarodnikowania i zdolność równomiernego zasiedlania nieunaczynionych regionów w implantowanych podskórnie atymicznym myszom guzach (rak, czerniak). Kiełkując w nich powiększa się obszar pierwotnej martwicy. Niszczeniu bowiem ulegają nie tylko komórki rakowe uszkodzone niedokrwiem, ale także żywe z pogranicza unaczynionej i awaskularnej części nowotworu. Działanie destruktywne samego *C. novyi* NT kończy się jednak w miejscach dobrze ukrwionych i natlenowanych. W skojarzonej jednak terapii metodą COBALT

dołącza się jeszcze wpływ podanego *ex post* cytostatyku rozkładającego DNA komórek nowotworowych (cytoksan, mitomycyna) lub wywołującego zapasę krwiobiegu w guzach (dolastatyna), co sprawia, że zniszczeniu ulegają także silnie unaczynione obrzeża nowotworu (6). W rezultacie całkowita likwidacja zmian proliferacyjnych występuje w ciągu zaledwie 16 godzin trwania eksperymentu na myszach (6).

Powyższe kierunki badań z perspektywą włączenia do terapii ciągle wykrywanych, nowych inhibitorów angiogenezy (TNP-470, FR-118487) zapowiadają dalszy postęp w dążeniu do wywoływania recesji nie tylko pierwotnych guzów, ale także ich okolicznych i odległych przerzutów (31). Poza tym wielkie nadzieje wiąże się z apoptozą (nagroda Nobla 2002), zwłaszcza w określeniu roli pro/antyapoptycznych białek (30) w leczeniu trapiących ludzkość chorób cywilizacyjnych (nowotwory, zawał, procesy zwyrodnieniowe układu nerwowego, także wynikające z autoagresji). Przyszłość pokaże, ile z tych doświadczalnych osiągnięć przejdzie pomyślnie fazę badań klinicznych i znajdzie zastosowanie w praktyce lekarskiej.

### Piśmiennictwo

- Aebersold D. M., Burri P., Beer K. T., Laissue V., Djonov V., Greiner R. H., Semenza G. L.: Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  – a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001, 61, 2911-2916.
- Ambrosini G., Adida C., Altieri D. C.: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 1997, 3, 917-912.
- Arias V., Soares F. A.: Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphomas and florid follicular hyperplasia – a morphometric study. *Leuk. Lymph.* 2000, 40, 157-166.
- Bodey G. P., Rodriguez S., Fainstein V., Elting L. S.: Clostridial bacteremia in cancer patients. A 12-year experience. *Cancer* 1991, 67, 1928-1942.
- Cygan W. Z.: Zmiany nowotworowe, zapalne i rozrostowo-zwyrodnieniowe jelita grubego oraz tarczycy a występowanie w nich beztlenowców *Clostridium*. Praca doktorska. Akademia Medyczna. Lublin 2001.
- Dang L. H., Bettgowda C., Huso D. L., Kinzler K. W., Volgstein B.: Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 98, 15155-15160.
- Fox M. E., Lemmon M. J., Mauchline M. L., Davis T. O., Giaccia A. J., Minton N. P., Brown J. M.: Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy – in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Therapy* 1996, 3, 173-176.
- Hartmann A., Kunz M., Köstlin S., Gillitzer R.: Hypoxia induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1999, 59, 1578-1583.
- Johnson S., Driks M. R., Tweten R. K., Ballard J., Stevens D. L., Anderson D. J., Janoff E. N.: Clinical courses of seven survivors of Clostridium septimum infection and their immunologic responses to  $\alpha$  toxin. *Clin. Infect. Dis.* 1994, 19, 761-764.
- Kawasaki H., Toyoda M., Shinohara H., Okuda J., Yamamoto T.: Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001, 91, 2026-2032.
- Kieser A., Weich H. A., Brandner G.: Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994, 9, 963-969.
- Kinoshita M., Johnson D. L., Shatney C. H., Lee Y. L., Mochizuki H.: Cancer cells surviving hypoxia obtain hypoxia resistance and maintain anti-apoptotic potential under reoxygenation. *Int. J. Cancer* 2001, 91, 322-326.
- Kornbluth A. A., Danzig J. B., Bernstein L. H.: Clostridium septimum and associated malignancy. *Medicine* 1989, 68, 30-37.
- Kudsk K.: Occult gastrointestinal malignancies producing metastatic Clostridium septimum infections in diabetic patients. *Surgery* 1992, 112, 765-772.
- Lambin P., Theys J., Landuyt W., Rijken P., Kogel A., Schueren E., Rodkiss R., Fowler J.: Colonisation of Clostridium in the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumours. *Anaerobe* 1998, 4, 183-188.
- Lartigau E., Le Ridant A. M., Lambin P., Weeger P., Martin L., Sigal R., Lusinchi B., Eschwege M. D., Guichard M.: Oxygenation of head and neck tumors. *Cancer* 1993, 71, 2319-2325.
- Leek R. D., Landers R. J., Harris A. L., Lewis C. E.: Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 1999, 79, 991-995.
- Lemmon M. J., Zijl V. P., Fox M. E., Mauchline M. L., Giaccia A. J., Minton N. P., Brown J. M.: Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Therapy* 1997, 4, 791-796.
- Lovimer J. W., Eidus L. B.: Invasive Clostridium septimum infection in association with colorectal carcinoma. *Canad. J. Surg.* 1994, 37, 245-249.
- Marshall Z., Cramer T., Höcker M., Finkenzeller G.: Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001, 48, 87-96.
- Minton N. P., Mauchline M. L., Lemmon M. J., Brehm J. K., Fox M., Michael N. P., Giaccia A., Brown J. M.: Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. *FEMS Microbiol. Rev.* 1995, 17, 357-364.
- Nishiyama T., Kawamura Y., Kawamoto K., Matsumura H., Yamamoto N., Ito T.: Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Res.* 1985, 45, 1753-1761.
- O'Byrne K. J., Dalgleish A. G., Browning M. J., Steward W. P., Harris A. L.: The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Europ. J. Cancer* 2001, 36, 151-169.
- Onodera H., Maetani S., Kawamoto K., Kan S., Kondo S., Imamura M.: Pathologic significance of tumor progression in locally recurrent rectal cancer. *Dis. Colon Rect.* 2000, 43, 775-781.
- Pawlicki M., Wiczyńska B.: Nowe leki przeciwnowotworowe – postęp czy stagnacja? *Nowotwory* 2001, 51, 507-514.
- Rak J., Mitsuhashi Y., Sheehan C.: Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res.* 2000, 60, 490-498.
- Robak T.: Biologia i farmakologia cytokin. PWN, Warszawa, 1995, s. 255.
- Sierko E., Zawadzki R. J., Wojtukiewicz M. Z.: Czynniki układu homeostazy a angiogeneza w nowotworach. *Nowotwory* 2001, 51, 399-409.
- Stevens D. L., Musher D. M., Watson D. A., Eddy H., Hamill R. J., Georkey F., Rosen H., Mader J.: Spontaneous, nontraumatic gangrene due to Clostridium septimum. *Rev. Infect. Dis.* 1990, 12, 286-296.
- Szala S.: Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. *Nowotwory* 2000, 50, 111-121.
- Tanaka T., Konno H., Baba S., Kanai T., Matsumoto K., Matsuda I., Ohba K., Kamiya K., Nakamura S.: Prevention of hepatic and peritoneal metastases by the angiogenesis inhibitor FR-118487 after removal of growing tumor in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 2001, 92, 88-94.
- Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P.: Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989, 49, 6449-6465.
- Wróbel T., Mazur G., Kaczmarek P.: Leczenie zakażeń w przebiegu neutropenii. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1999, 110, 251-257.
- Zaloga M. T.: Dział nauka: Rak padł. *Gazeta Wyborcza* 2001, 28 XI, 14.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6/13, 20-853 Lublin

**THOMAS A., BALL H., DIZIER I., TROLIN A., BELL C., MAINIL J., LINDEN A.: Izolacja *Mycoplasma sp.* z dolnego odcinka układu oddechowego zdrowego bydła oraz bydła z chorobami układu oddechowego w Belgii. (Isolation of *Mycoplasma species* from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory diseases in Belgium). *Vet. Rec.* 151, 472-476, 2002 (16)**

W okresie 1997-2000 przebadano w kierunku zakażenia *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. canis*, *M. bovirhinis*, *M. arginini*, *M. alkalescens*, *M. bovinitalium*, *M. laidlawii* i *Ureaplasma diversum* 150 zdrowych cieląt i 238 cieląt ze schorzeniami układu oddechowego. Wiek badanych zwierząt nie przekraczał 14 miesięcy. W 84% populacji oskrzelowo-pęcherzykowych pochodzących od zdrowych osobników nie występowały mykoplazmy. Od 8 (16%) zdrowych cieląt wyosobniono *M. bovirhinis*. Mykoplazmy wyizolowano od 86 (78,2%) zwierząt z nawracającymi chorobami układu oddechowego, *M. bovis* izolowano z populacji oskrzelowo-pęcherzykowych 39 (35,5%) zwierząt z nawrotowymi i 10 (50%) zwierząt z ostrymi chorobami układu oddechowego, a także z 20% pośmiertnie pobranych próbek tkanki płucnej. W 44% przypadków zakażeniu *M. bovis* towarzyszyło zakażenie innymi gatunkami mykoplazm. *M. dispar* izolowano od 45,5% cieląt z nawracającymi chorobami układu oddechowego, często łącznie z *M. bovis*. Natomiast *M. canis* wyosobniono od 40,9% cieląt z nawrotami chorób układu oddechowego. Ten gatunek mykoplazm izolowano po raz pierwszy od bydła na terenie Belgii.