

Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



Sara Suhadolc Scholten

**VLOGA IN POMEN *MYCOPLASME CANIS*
V PATOGENEZI PLODNOSTNIH MOTENJ
IN UROGENITALNIH OBOLENJ PSOV**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2024

Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina
Veterinarska medicina

UDK 636.7.09:579.887:616.9-097:616.6-078:57.083(043.3)

Sara Suhadole Scholten, dr. vet. med

**VLOGA IN POMEN *MYCOPLASME CANIS* V PATOGENEZI
PLODNOSTNIH MOTENJ IN UROGENITALNIH OBOLENJ
PSOV**

Doktorska disertacija

**THE ROLE OF *MYCOPLASMA CANIS* IN THE PATHOGENESIS
OF INFERTILITY AND UROGENITAL DISEASES IN DOGS**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2024

Sara Suhadolc Scholten

Vloga in pomen *Mycoplasma canis* v patogenezi plodnostnih motenj in urogenitalnih obolenj psov

Delo je bilo opravljeno na:

- Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
- Kliniki za reprodukcijo in velike živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
- Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
- Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: prof. dr. Nataša Tozon

Izjava o delu

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

- predsednica: doc. dr. Darja Pavlin
- članica: prof. dr. Mojca Narat
- član: prof. dr. Robert Frangež

IZVLEČEK

Ključne besede: bolezni psov; okužbe z mikoplazmo – diagnostika – izolacija in čiščenje; moške urogenitalne bolezni – veterinarske; ženske urogenitalne bolezni – veterinarske; metagenomika; serološki testi; kemične analize krvi; verižna reakcija s polimerazo; psi

Namen doktorske naloge je bil razjasniti pomembnost okužbe z *M. canis* pri psih v patogenezi obolenj sečil in spolovil in z njimi povezanih plodnostnih motenj. V klinično študijo smo vključili 52 psov, od tega 7 psov z znaki obolenj sečil in spolovil, 14 psov s kliničnimi znaki plodnostnih motenj in 31 psov brez kliničnih znakov okužbe.

Povzročitelja smo dokazovali s pomočjo PCR (angl. *polymerase chain reaction*) metode v vaginalnih in prepucialnih brisih psov. Analizo sestave celotne bakterijske raznovrstnosti v vzorcih brisov smo nadgradili z metagenomskim pristopom. Prisotnost specifičnih protiteles smo ugotavljali z metodo DIBA (angl. *dot immunobinding assay*) in rezultate potrdili z metodo po Westernu. Pri pacientih smo poleg kliničnih znakov bolezni ugotavljali odstopanja v hematoloških in izbranih biokemijskih parametrih v krvi, odstopanja v analizi urina ter specifičnih parametrov analize plodnostnih motenj in skupine medsebojno primerjali.

Z metodo PCR smo *M. canis* dokazali pri 3/7 (43 %) pacientov z obolenji sečil in spolovil, pri 6/14 (43 %) pacientih s plodnostnimi motnjami in pri značilno nižjem deležu 6/31 (19 %) zdravih psov iz kontrolne skupine. Z metagenomsko analizo bakterijske sestave med skupinami nismo ugotovili značilnih razlik.

Prisotnost specifičnih protiteles na vsaj 1 od 5 izbranih sevov smo z metodo DIBA ugotovili pri 54/55 (98 %) vseh vzorcev. Pri vseh pacientih, razen pri 2 iz kontrolne skupine, smo zabeležili reakcijo na sev *M. canis Larissa*. Specifičnost reakcije smo potrdili z metodo po Westernu.

Rezultati doktorske naloge so nam v pomoč pri izboru ustreznih diagnostičnih metod, planu zdravljenja in spremljanju odgovora nanj pri pacientih s ponavljajočimi se vnetnimi obolenji sečil in spolovil ali plodnostnimi motnjami. Serološki presejalni testi so smiselni, vsaj pri pacientih s plodnostnimi motnjami. Za dokaz okužbe pa je najprimernejša uporaba specifične metode PCR za dokazovanje *M. canis*.

ABSTRACT

Key words: dog diseases; mycoplasma infections – diagnosis – isolation and purification; male urogenital diseases – veterinary; female urogenital diseases – veterinary; metagenomics; serologic tests; blood chemical analysis; Polymerase chain reaction; dogs

The aim of this dissertation was to investigate the role of *M. canis* infection in dogs with urogenital diseases and with fertility problems. The clinical study included 52 dogs; 7 dogs with urogenital disease symptoms, 14 dogs with fertility problems, and 31 healthy dogs.

The pathogen was detected by PCR (*polymerase chain reaction*) method on vaginal and preputial swabs. Swab samples were analysed to determine the full bacterial spectrum, and these analyses were extended by metagenomic analysis. The presence of antibodies was tested by the Dot-immunobinding assay (DIBA) method, while the results were confirmed by the Western Blot method. In addition to clinical signs, we looked for abnormalities in haematological and biochemical parameters in blood, urinalysis, and specific parameters of fertility disorders, and compared the groups with each other.

M. canis was detected by PCR method in 3/7 (43 %) patients with urogenital disorders, in 6/14 (43 %) patients with fertility disorders, and in a statistically significantly lower proportion of healthy dogs in the control group (6/31, 19 %). Metagenomic analysis of bacterial composition showed no significant differences between the groups.

The DIBA method showed the presence of specific antibodies against at least one of the five selected strains in 54/55 samples (98 %). With all patients, except two from the control group, we detected a reaction to the *M. canis Larissa* strain. The results of the DIBA test were confirmed by the Western Blot method.

The results of the thesis will help us to select appropriate diagnostic methods and treatment plan and to monitor the response to treatment in canine patients with chronic urinary tract diseases or fertility disorders. The results show that serological screening tests are useful at least for patients with fertility disorders. The specific PCR method is the most suitable for the detection of *M. canis* infections.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	4
ABSTRACT	5
KAZALO VSEBINE	6
KAZALO TABEL	10
SEZNAM OKRAJŠAV	14
1 UVOD	15
1.1 NAMEN	17
1.2 HIPOTEZE	17
2 PREGLED LITERATURE	18
2.1 POVZROČITELJ	18
2.2 PATOGENEZA OBOLENJ, KI JIH POVZROČAJO MIKOPLAZME	20
2.3 IMUNSKI ODGOVOR	24
2.4 KLINIČNA SLIKA	27
2.4.1 Okužbe sečil	27
2.4.2 Plodnostne motnje	28
2.4.3 Obolenja dihal	29
2.4.4 Druga obolenja pri psih	30
2.4.5 Prenos okužbe s psa na človeka	31
2.4.6 Zdravljenje in preventiva	31
2.5 METODE ZA UGOTAVLJANJE POVZROČITELJA	32
2.5.1 Mikrobiološka gojiščna metoda	32
2.5.2 Molekularne metode	32

2.6	SEROLOŠKE METODE	33
3	MATERIAL IN METODE	35
3.1	Psi, vključeni v raziskavo	35
3.2	Klinični pregled in ultrazvok sečil in spolovil	36
3.3	Odvzem vzorcev krvi za hematološke in biokemijske preiskave	36
3.4	Urinski vzorci	38
3.5	Odvzem brisov za citološki pregled in molekularne preiskave	38
3.6	Odvzem in pregled semena	38
3.7	Ugotavljanje povzročitelja z metodo PCR	40
3.7.1	Izolacija nukleinskih kislin	40
3.7.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	41
3.7.3	Dokazovanje produkta PCR v agaroznem gelu	41
3.7.4	Prečiščevanje produktov PCR in določanje nukleotidnega zaporedja	42
3.7.5	Analiza nukleotidnih zaporedij	43
3.7.6	Uporaba endogene kontrole	43
3.8	Metagenomska analiza vaginalnih in prepucialnih brisov	44
3.8.1	Analiza pomnožkov gena za 16S rRNA	44
3.9	Ugotavljanje specifičnih protiteles z metodo DIBA	45
3.10	Ugotavljanje specifičnih protiteles z metodo analize po Westernu	46
3.11	Statistične metode	47
4	REZULTATI	48
4.1	Klinični pregled in ultrazvočni pregled sečil in spolovil	48
4.2	Rezultati hematološke analize	52
4.2.1	Psi z obolenji sečil in spolovil	52

4.2.2	Psi s plodnostnimi motnjami	53
4.3	Rezultati analize izbranih biokemijskih parametrov	53
4.3.1	Psi z obolenji sečil in spolovil	53
4.3.2	Psi s plodnostnimi motnjami	54
4.4	Pregled urina	54
4.4.1	Urinski parametri pri psih z obolenji sečil in spolovil	54
4.4.2	Urinski parametri pri psih s plodnostnimi motnjami	55
4.4.3	Primerjava vrednosti urinskih parametrov med skupinami	56
4.5	Pregled semena	59
4.6	Ugotavljanje povzročitelja z metodo PCR iz vaginalnih in prepucialnih brisov	61
4.7	Analiza metagenoma	63
4.8	Ugotavljanje specifičnih protiteles z metodo DIBA	66
4.9	Potrditev prisotnosti protiteles v serumih z metodo analize po Westernu	68
5	RAZPRAVA	70
5.1	Plodnostne motnje	70
5.1.1	Samci	70
5.1.2	Samice	72
5.2	Obolenja sečil in spolovil	74
6	ZAKLJUČKI	81
7	POVZETEK	82
8	SUMMARY	84
9	ZAHVALE	86
10	LITERATURA	89
11	PRILOGE	98

Priloga 1	Pasme psov, vključenih v raziskavo	98
Priloga 2	Zbirne tabele hematoloških parametrov	99
Priloga 3	Zbirne tabele biokemijskih parametrov	101
Priloga 4	Zbirne tabele rezultatov urinskega pregleda	103
Priloga 5	Rezultati pregleda semena pri samcih iz kontrolne skupine	105
Priloga 6	Združeni rezultati molekularnih preiskav	106
Priloga 7	Celotna analiza metagenoma, razdeljena po skupinah	108
Priloga 8	Združeni rezultati PCR, DIBA in metagenomike	109
Priloga 9	Mnenje Komisije za dobrobit živali VF	111
Priloga 10	Soglasje lastnika živali za sodelovanje v klinični študiji	112
Priloga 11	Časovnica pregledov	113
Priloga 12	Klinični pregled – samice	114
Priloga 13	Klinični pregled – samci	115
Priloga 14	Pregled oploditvene sposobnosti	116
Priloga 15	Nastavitve spermoanalizatorja za pasje seme	117
Priloga 16	Članek: Association of <i>Mycoplasma canis</i> with fertility disorders in dogs: a case study supported by clinical examination.	118

KAZALO TABEL

Tabela 1: Mikoplazme, izolirane pri psih.....	19
Table 1: Mycoplasmas isolated in dogs.....	19
Tabela 2: Zastopanost samic in samcev po skupinah.....	35
Table 2: Representation of females and males by groups	35
Tabela 3: Porazdelitev telesne mase in starost psov po skupinah	36
Table 3: Weight distribution and age of dogs by groups.....	36
Tabela 4: Rezultati ultrazvočnega pregleda – samice	48
Table 4: Results of ultrasonographic examination – females.....	48
Tabela 5: Rezultati ultrazvočnega pregleda – samci	48
Table 5: Results of ultrasonographic examination – males.....	48
Tabela 6: Vrednost koncentracije hemoglobina pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil	52
Table 6: Hemoglobin concentration value in dogs in the urogenital group	52
Tabela 7: Vrednost koncentracije kreatinina pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil.....	53
Table 7: Creatinine concentration values in dogs in the urogenital and control groups	53
Tabela 8: Koncentracija bilirubina v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil.....	54
Table 8: Urinary bilirubin concentrations in dogs in the group with urogenital diseases	54
Tabela 9: Prisotnost glukoze v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil.....	55
Table 9: Presence of glucose in dogs in the group with urogenital diseases.....	55
Tabela 10: Prisotnost levkocitov v sedimentu urina pri samicah v skupini z obolenji sečil in spolovil	55
Table 10: Presence of leukocytes in bitches in the group with urogenital diseases	55
Tabela 11: Koncentracija bilirubina v urinu pri samicah v skupini s plodnostnimi motnjami	56
Table 11: Urinary bilirubin concentration in urine in bitches in the group with fertility disorders	56

Tabela 12: Prisotnost bakterij v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil	56
Table 12: Presence of bacteria in urine in dogs in the group with urogenital diseases	56
Tabela 13: Prisotnost krvi v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil	57
Table 13: Presence of blood in urine in dogs in the group with urogenital diseases.....	57
Tabela 14: Koncentracija bilirubina v urinu pri samicah med preiskovanimi skupinami.....	57
Table 14: Urinary bilirubin concentration in bitches between study groups.....	57
Tabela 15: Koncentracija bilirubina v urinu pri samicah iz skupine s plodnostnimi motnjami....	57
Table 15: Urinary bilirubin concentration in bitches from the fertility disorder group	57
Tabela 16: Prisotnost levkocitov v sedimentu urina pri samicah med preiskovanimi skupinami.	58
Table 16: Presence of leukocytes in urine in bitches between study groups.....	58
Tabela 17: Koncentracija bilirubina v urinu pri samcih med preiskovanimi skupinami.....	58
Table 17: Urinary bilirubin concentration in males between study groups.....	58
Tabela 18: Preglednica samcev s plodnostnimi motnjami	59
Table 18: Table of males with fertility disorders	59
Tabela 19: PCR rezultati po skupinah	63
Table 19: PCR results by groups	63
Tabela 20: Pozitivni DIBA rezultati na različno število sevov	67
Table 20: Positive DIBA results on different number of strains	67
Tabela 21: Pozitivne DIBA reakcije na oba seva <i>M. canis</i>	67
Table 21: Positive DIBA reactions to both <i>M. canis</i> strains	67
Tabela 22: DIBA rezultati pred in po zdravljenju	68
Table 22: DIBA results before and after treatment	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz dejavnikov virulence pri mikoplazmah.	21
Figure 1: Schematic diagram of virulence factors in mycoplasmas.	21
Slika 2: Shematski prikaz lokacij poglavitnih citadherenčnih in akcesornih proteinov bakterije <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	22
Figure 2: Schematic diagram of locations of major cytheadherence and accessory proteins in bacteria <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	22
Slika 3: Molekularni mehanizem človeških patogenih mikoplazm.	25
Figure 3: Molecular mechanism of human pathogenic mycoplasmas.	25
Slika 4: Shema interakcij med bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> in gostiteljevo celico.	26
Figure 4: Schematic of the interaction between the bacterium <i>Mycoplasma pneumoniae</i> and the host cell.	26
Slika 5: Videz kolonij mikoplazme pod mikroskopom.	32
Figure 5: Appearance of mycoplasma colonies under a microscope.	32
Slika 6: Ultrazvočna slika zadebeljene stene sečnega mehurja.	49
Figure 6: Ultrasonographic image of a thickened bladder wall.	49
Slika 7: Ultrazvočna slika cist na jajčniku.	50
Figure 7: Ultrasonographic image of ovarian cysts.	50
Slika 8: Ultrazvočna slika tekočine v maternici.	50
Figure 8: Ultrasonographic image of uterine fluid.	50
Slika 9: Ultrazvočna slika benigne hiperplazije prostate s cistami.	51
Figure 9: Ultrasonographic image of a benign prostatic hyperplasia with cysts.	51
Slika 10: Ultrazvočna slika tumorja na modih.	51
Figure 10: Ultrasonographic image of the testicular tumors.	51
Slika 11: Elektroforezni gel.	61
Figure 11: Electrophoresis gel.	61

Slika 12: Elektroferogram	62
Figure 12: Electropherogram.....	62
Slika 13: Tridimenzionalna analiza metagenoma.....	65
Figure 13: Three-dimensional metagenomic analysis	65
Slika 14: Reakcije protiteles v serumih psov s specifičnimi proteini <i>M. canis</i> in <i>M. cynos</i>	69
Figure 14: Antibody reactions in dog sera with specific proteins of <i>M. canis</i> and <i>M. cynos</i>	69
Slika 15: Reakcija protiteles s proteinoma mase 55 kDa in približno 40 kDa	69
Figure 15: Reaction of antibodies with proteins of mass 55 kDa and approx. 40 kDa	69

SEZNAM OKRAJŠAV

ANOVA	enosmerna analiza variance
BLAST	računalniški program za primerjavo primarnih informacij o biološkem zaporedju (angl. b asic l ocal a lignment s earch t ool)
bp	bazni par
BURST	računalniški program za klasifikacijo metagenomov
CARDS TX	v skupnosti pridobljeni akutni respiratorni distressni sindrom (angl. c ommunity a cquired r espiratory d istress s yndrom)
CASA	računalniško podprta analiza sperme (angl. c omputer- a ssisted s perm a nalysis)
DIBA	metoda točkastega imunskega odtisa (angl. d ot i mmunobinding a ssay)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. e thylenediaminetetraacetic a cid)
ELISA	encimskoimunski test (angl. e nzyme- l inked i mmunosorbent a ssay)
IGS	intergenski odsek (angl. i ntergenic s pacer)
KEGG	Kjotska enciklopedija genov in genomov (angl. K yoto e ncyclopedia of g enes and g enomes)
KO	KEGG ortologija (angl. K EGG o rthology)
Mbp	mega bazni par (10^6 nukleotidov)
OTU	operacijske taksonomske enote (angl. o perational t axonomic u nits)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. p olymerase c hain r eaction)
PVDF	poliviliniden fluorid, $-(C_2H_2F_2)_n-$
RT-qPCR	verižna reakcija PCR v realnem času

1 UVOD

Bakterije, ki pripadajo rodu *Mycoplasma*, najdemo v različnih gostiteljih: v človeku, rastlinah in živalih. Številne vrste so patogene in povzročajo različna bolezenska stanja, npr. artritis, neplodnost, okužbe in vnetja dihal in anemijo. Mikoplazme večinoma naseljujejo sluznice dihal, sečil in spolovil, oči, prebavil, mlečne žleze in sklepe vretenčarjev (1).

V zadnjih 70 letih je bilo pri psih izoliranih 15 različnih vrst mikoplazem ter 2 še nepopolno opisani in nepoimenovani mikoplazmi (2). Med mikoplazmami, ki lahko povzročajo obolenja sečil in spolovil pri psih, je najpogosteje omenjena bakterija *Mycoplasma canis* (*M. canis*) (3). Mikoplazme sicer pogosto najdemo tudi v brisih ali izločkih sečil in spolovil zdravih psov, pri katerih poročajo o visokih deležih pozitivnih, tako samcev (30–50 %) kot samic (23–75 %) (4). Ugotovitve med posameznimi kliničnimi raziskavami se močno razlikujejo. V eni od raziskav so iz urina psov s ponavljajočimi se vnetji sečil *M. canis* izolirali le pri 4/100 (4 %) psov (3), medtem ko so v drugi raziskavi, v katero je bilo vključenih le 9 psov z vnetjem različnih delov sečil in spolovil, *M. canis* uspešno izolirali pri vseh 9/9 pacientov iz vzorcev urina, biopta stene sečnega mehurja ali moda in nadmodka ter iz ejakulata (5). V raziskavi, v kateri so analizirali prisotnost bakterijskih vrst iz semenske tekočine, so pri 95 psih z gojiščno preiskavo izolirali bakterijo *Mycoplasma spp.* v 57,9 odstotka (55/95). Poleg tega so iz vseh vzorcev izolirali tudi različne vrste aerobnih bakterijskih vrst v 28,4 odstotka (27/95) in anaerobnih bakterijskih vrst v 13,7 odstotka (13/95) (6). Zaradi razlik v rezultatih pri različnih študijah obstaja potreba po standardiziranem in zanesljivem rutinskem testu, ki bi omogočil dokazovanje okužbe z *M. canis* v klinični diagnostiki. Ker je okužba z *M. canis* pogosto latentna in poteka brez očitnih kliničnih znakov, jo v praksi hitro spregledamo. Za postavitev zanesljivih diagnostičnih metod in vzpostavitev zdravljenja je pomembno dobro poznavanje poteka bolezni. Pri tem so nam lahko v pomoč rezultati tudi umetno povzročenih okužb. Laber in sodelavci so izvedli študijo, v kateri so z eksperimentalno okužbo z *M. canis* skozi semenovoda povzročili kronično vnetje mod in nadmodka pri 50 odstotkih psov (2/4), zmanjšana gibljivost in število poškodovanih spermijev pa je bila ugotovljena pri vseh pacientih (4/4) (7). Tudi neplodnost pri psih je pomemben, a slabo raziskan problem, predvsem pri vzrejnih živalih. Najpogostejši vzroki neplodnosti so hormonske nepravilnosti, okužbe in vnetja, nevrološke disfunkcije, anatomske nepravilnosti ter tumorska obolenja, vendar še vedno ostaja

velik delež (70–74 %) primerov neplodnosti psov nepojasnen. Pomembna je tudi genetska predispozicija (8). Možen vzročni dejavnik neplodnosti je tudi bolezen sečil in spolovil, ki ga povzroča *M. canis*, na kar kažejo izsledki nekaterih kliničnih raziskav. Doig in sodelavci so mikoplazme izolirali kar iz 88 odstotkov vulvovaginalnih brisov (67/75), 85 odstotkih prepucialnih brisov (51/61) in v 72 odstotkih (18/25) vzorcev semena, pri čemer je bil delež uspešnih izolacij nekoliko večji pri neplodnih psih in psih z genitalnimi boleznimi ter značilno večji le pri samcih. Pri neplodnih samicah z gnojnim nožničnim izcedkom so izolirali mikoplazme v primerljivem deležu (88 %) kot v celotni preiskovani populaciji samic (9). Z naraščanjem števila novih diagnostičnih metod in pojavom novih znanj o poteku obolenja, povzročenim z *M. canis*, in njegovem pomenu za zdravje psov, smo en korak bližje temu, da pridobljena znanja ustrezno umestimo v rutinsko klinično diagnostiko.

1.1 NAMEN

Namen doktorske disertacije je bil:

- ugotoviti pogostnost prisotnosti *M. canis* pri psih;
- ugotoviti njeno vlogo pri razvoju klinično zaznavnih obolenj sečil in spolovil ali celo trajnih okvar, ki povzročajo neplodnost;
- spremljati morebitne zaznavne ultrazvočne spremembe sečil in spolovil;
- spremljati morebitna zaznavna hematološka in biokemijska odstopanja;
- ugotovitve uporabiti v klinični praksi z namenom izbire ustrezne diagnostične metode za potrditev okužbe in ustrezen protokol zdravljenja ter spremljanja uspešnosti terapije.

1.2 HIPOTEZE

Postavili smo si pet delovnih **hipotez**.

1. Psi z obolenji sečil in spolovil, ki imajo sočasno okužbo z *M. canis*, imajo izrazitejšje klinične znake primarne bolezni in so slabše odzivni na zdravljenje s priporočenimi antibiotiki za tovrstna obolenja.
2. Okužba z *M. canis* je lahko vzrok plodnostnih motenj pri psih.
3. Okužba z *M. canis* povzroči spremembe v spermogramu in negativno vpliva na kvaliteto tako svežega kot zamrznjenega semena.
4. *M. canis* izzove humoralni imunski odziv, ki bi ga bilo mogoče uporabiti v rutinskih diagnostičnih postopkih.
5. Na kroničnost okužbe z *M. canis* in odzivnost na terapijo vpliva imunski odziv gostitelja.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 POVZROČITELJ

Bakterija *Mycoplasma canis* spada v razred Mollicutes (lat. *mollis* 'mehko', *cutis* 'koža'). So najmanjše in najpreprostejše bakterije, ki so prostoživeče in sposobne samopomnoževanja (10). Za skupino bakterij, ki jih uvrščamo v razred Mollicutes, uporabljamo splošen izraz »mikoplazme« ali »molikuti«. Zavzemajo vse vrste znotraj razreda Mollicutes (11). Skupna morfološka značilnost mikoplazem, ki jih razlikuje od drugih bakterij, je odsotnost celične stene. Filogenetska analiza gena 16S rRNA predvideva, da mikoplazme izvirajo iz rodu *Clostridia* zaradi regresivne evolucije in zmanjšanja genoma. Mikoplazme so »idealni paraziti«, saj okužba za gostitelja navadno ni smrtna, nekatere vrste pa lahko pri ljudeh in živalih povzročijo težja obolenja (12). V naravi so mikoplazme razširjene pri ljudeh, sesalcih, plazilcih, ribah, členonožcih in rastlinah (10). Delimo jih na hemotropne in nehemotropne vrste (2).

Mikoplazme iz rodu *Mycoplasma*, *Ureaplasma* in *Acholeplasma* so prisotne kot del normalne sluznične flore (13). Prilagodile so se na parazitsko življenje v svojih gostiteljih, kjer se nahajajo predvsem na sluznicah dihal, sečil in spolovil (14). V dolžino merijo približno 300–800 nm in zlahka prehajajo skozi odprtine v celični membrani, ki so široke 300–450 nm. Po svoji naravi so mikoplazme selektivne bakterije, ki za rast potrebujejo holesterol ali ureo (2). Zaradi odsotnosti celične stene so odporne proti encimu lizocimu in antibiotikom, ki zavirajo rast celične stene, npr. penicilin, cefalosporini, vankomicin in bacitracin (13).

Živalske mikoplazme izven gostitelja preživijo različno dolgo, odvisno od vrste, vlažnosti in temperature okolja (13). Primerjalne študije obstojnosti živalskih mikoplazem v različnih okoljskih razmerah so pokazale, da nekatere vrste mikoplazem, suspendirane v tekočem mediju, navadno preživijo 59–185 dni pri temperaturah 4, 30 in 37 °C ali na sobni temperaturi ne glede na količino dodanih hranil (medij s konjskim serumom in ekstraktom kvasovk ali brez njega). V suhih pogojih so najobstojnejše pri 4 °C. Mikoplazmam ustreza nekoliko bolj bazično okolje (pH 7,5) (15). Prisotnost organskega materiala (npr. tkivo gostitelja, telesne tekočine) ugodno vpliva na njihovo preživetje in razmnoževanje (13). Zaradi omejene presnovne sposobnosti, ki je posledica njihovega majhnega genoma, in dejstva, da nimajo celične stene, so zelo zahtevne za gojitev v laboratoriju (16).

Prvi dokumentiran zapis o pojavu mikoplazem pri psih sega v leto 1934 (17). Čeprav Chalker in sodelavci (2) navajajo, da je bilo v letih od 1965 do 2005 manj kot 50 objav o okužbah z mikoplazmami pri psih, so v zadnjih 70 letih (1935–2005) iz različnih vzorcev izolirali 15 različnih vrst mikoplazem ter dve še nepopolno opisani in poimenovani mikoplazmi (2) (Tabela 1).

Tabela 1: Mikoplazme, izolirane pri psih. Prilagojeno po (2).
 Table 1: Mycoplasmas isolated in dogs. Adapted from (2).

Vrsta	Gostitelj	Potencialni povzročitelj bolezni	Organ, iz katerega so bile izolirane
1 <i>Acholeplasma laidlawii</i>	različni		srčne zaklopke, osrčnik
2 <i>Mycoplasma arginini</i>	pes, mačka, koza, ovca		ledvica
3 <i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	govedo, pes	pljučnica	očesna veznica
4 <i>Mycoplasma canis</i>	govedo, pes, človek	endometritis, epididimitis, pljučnice, vnetje sečil	konjunktiva, ledvica, jetra, bezgavke, vranica
5 <i>Mycoplasma cynos</i>	pes	pljučnica	očesna veznica, nosna votlina
6 <i>Mycoplasma edwardii</i>	pes	pljučnica	nosna votlina, bezgavke
7 <i>Mycoplasma felimitum</i>	pes, mačka	pljučnica	
8 <i>Mycoplasma felis</i>	pes, konj, mačka, človek		
9 <i>Mycoplasma gateae</i>	pes, mačka	pljučnica	
10 <i>Mycoplasma maculosum</i>	pes		nosna votlina
11 <i>Mycoplasma molare</i>	pes		
12 <i>Mycoplasma opalescens</i>	pes		
13 <i>Mycoplasma spumans</i>	pes	pljučnica, artritis	sečni mehur, cerebrospinalna tekočina, očesna veznica
14 <i>Mycoplasma</i> sp. sev HRC689	pes	kolitis	kolon, bezgavke
15 <i>Mycoplasma</i> sp. sev VJC 358	pes		
16 <i>Ureaplasma canigenitalium</i>	pes		
17 * <i>Mycoplasma. haemocanis</i>			

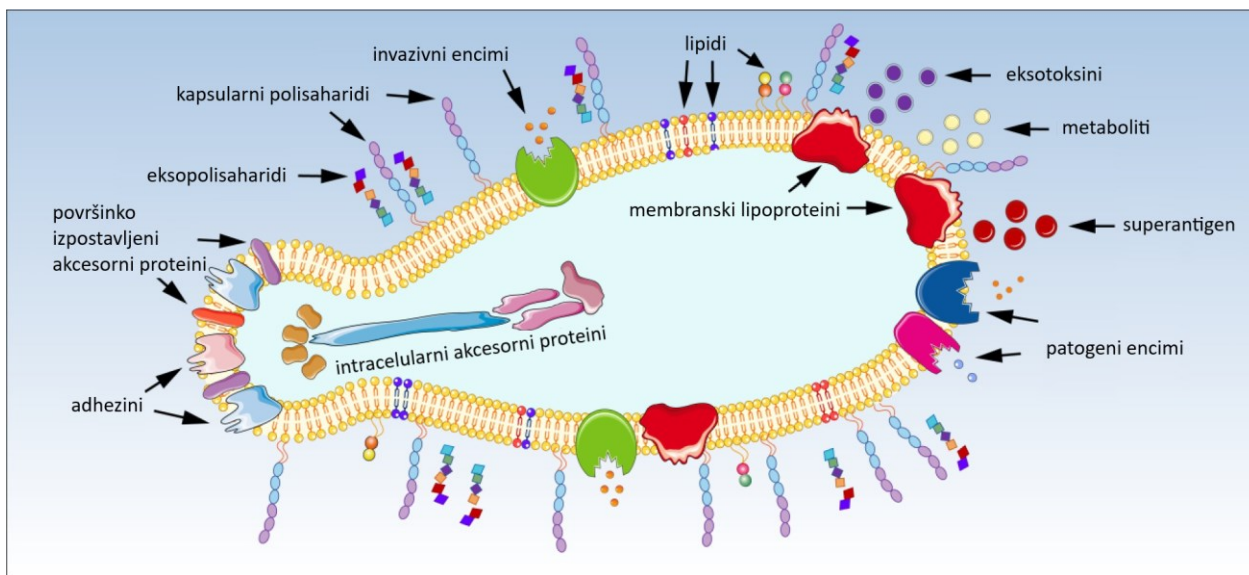
* še ni bila izolirana na gojitvenem mediju

Ker imajo mikoplazme izjemno majhen genom (0,58–2,20 Mbp), imajo tudi omejene presnovne zmožnosti za razmnoževanje in preživetje (18). Bujon in agar gojišča za gojenje mikoplazem je treba obogatiti z več rastnimi dejavniki, vključno s konjskim serumom, izvlečkom kvasa, hranilnimi snovmi (glukoza, arginin ali sečnina) ter indikatorji in zaviralci, ki preprečijo rast drugih mikroorganizmov (19). Okužbe z mikoplazmami pri psih so po do sedaj znanih podatkih povezane s pojavom anemije in obolenji dihal, sečil in spolovil. Ker so mikoplazme prisotne tudi v sečilih in spolovilih zdravih psov, je njihova vloga pri razvoju kliničnih in subkliničnih obolenj sečil in spolovil pri psih še vedno nepojasnjena (5).

Bakterija *M. canis* lahko okuži številne sesalske gostitelje (2, 20). V večini primerov velja za del fiziološke flore sluznic (4). Omenjena je kot komenzalni ali oportunistični dejavnik pri razvoju bolezni dihal sečil in spolovil psov (2). *M. canis* lahko povzroča obolenja sečil in pljučnice, endometritis, epididimitis, prostatitis, orhitis ter plodnostne motnje (2, 5, 21). Izolirali so jo iz ustne votline, sapnika, pljuč, sečil, spolovil, očesne veznice, ledvic, jeter, bezgavk, vranice in iz vzorcev možganskega tkiva psov z meningoencefalitisom (2, 20).

2.2 PATOGENEZA OBOLENJ, KI JIH POVZROČAJO MIKOPLAZME

O nalezljivosti in patogenezi pasjih mikoplazem je malo znanega (16, 17). Mikoplazme so zaradi svoje omejene biosintetske zmožnosti paraziti. V gostitelju se razmnožujejo in praviloma vztrajajo v njem zelo dolgo (10). Razvile so različne mehanizme za izogibanje gostiteljevemu imunskemu sistemu ter za prenos in kolonizacijo na novega gostitelja (18). Ti mehanizmi vključujejo posnemanje gostiteljevih antigenov, preživetje v fagocitnih in nefagocitnih celicah in ustvarjanje fenotipske variabilnosti (10). Živalske mikoplazme za uspešno kolonizacijo gostitelja potrebujejo zmožnost pričvrstitve, ki je tudi glavni dejavnik njihove virulence (18) (Slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz dejavnikov virulence pri mikoplazmah

Dejavniki virulence pri mikoplazmah so invazivnost, toksinom podobne snovi, eksotoksini, encimi in nekatere komponente membrane. Invazivnost mikoplazem vključuje adhezine in pomožne beljakovine, kapsularne polisaharide, invazivne encime in biofilme. Toksinom podobne snovi vključujejo presnovke, kot so H_2O_2 , NH_3 in H_2S . Nekateri mikoplazme izločajo eksotoksine (CARDS TX, hemolizin) in lipolitične encime, peptidaze, fosfataze, ekto-ATPaze, citotoksične nukleaze, nukleotidaze, pomembne v patogenezi obolenja. Povzeto in prirejeno po (22).

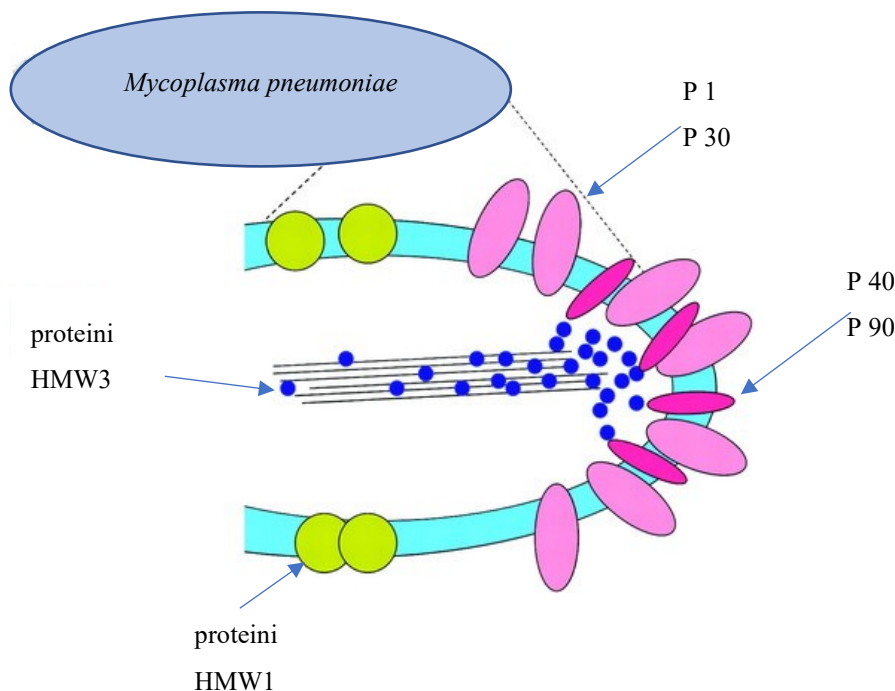
Figure 1: Schematic diagram of virulence factors in mycoplasmas

Factors of virulence in mycoplasmas include invasiveness, toxin-like substances, exotoxins, pathogenic enzymes, and some membrane components. Mycoplasma invasiveness includes adhesins and auxiliary proteins, capsular polysaccharides, invasive enzymes, and biofilms. Toxin-like substances include metabolites such as H_2O_2 , NH_3 and H_2S . Some mycoplasmas secrete exotoxins (CARDS TX, hemolysin) and pathogenic enzymes (lipolytic enzymes, peptidases, phosphatases, ecto-ATPases, cytotoxic nucleases, nucleotidases). Adapted and summarized from (22).

Za nekatere vrste mikoplazem (npr. *M. cynos*) je znano, da lahko po naravni okužbi v pljučih psov vztrajajo tudi do tri tedne. *M. cynos* v pljučnem tkivu povzroči lokalno vnetno reakcijo, ki vodi v uničenje bronhialnih epitelnih cilij in alveolno infiltracijo z nevtrofilnimi granulociti in makrofagi. Do serokonverzije naj bi prišlo približno 4–5 tednov po okužbi z *M. cynos* (23). Ni znano, ali specifična protitelesa ščitijo pred ponovno okužbo z isto vrsto mikoplazem in ali po preboleli okužbi obstaja navzkrižna imunost proti drugim vrstam mikoplazem.

Mikoplazme, ki niso sposobne pritrditve na gostiteljeve celice, so avirulentne, saj niso zmožne kolonizacije (10). Najbolje raziskan je mehanizem vezave na specifične receptorje pri *M. pneumoniae*. Na enem od polov mikroba je zoženi celični podaljšek, ki ga imenujemo konica organela in služi za pritrnitev. Površinski 169-kDa velik protein P 1 in 30-kDa velik protein P 30

se nahajata na konici organela virulentne *M. pneumoniae* in zagotavljata polarnost v procesu pritrditve na celico. Oba proteina izzoveta močan imunski odziv (18) (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz lokacij poglavitnih citadherenčnih in akcesornih proteinov bakterije *Mycoplasma pneumoniae*. Povzeto in prirejeno po (24).

Figure 2: Schematic diagram of locations of major cytoadherence and accessory proteins in bacteria *Mycoplasma pneumoniae*. Adapted and summarized from (24).

Po uspešni pritrditvi na celice sluznic (mukoznih površin) mikoplazme navadno vstopijo v gostiteljsko celico, kjer izkoriščajo njene celične mehanizme za svoje potrebe. Opisanih je bilo več različnih mehanizmov vstopanja mikoplazem v gostiteljeve celice, ki poškodujejo celice in povzročajo bolezenska stanja:

- a) Pridobivanje hranil: Genomska analiza mikoplazem je razkrila, da imajo mikoplazme omejeno biosintetsko sposobnost (25, 26). V evoluciji so izgubile večino genov, ki so odgovorni za biosintezo aminokislin, maščobnih kislin, kofaktorjev in vitaminov, zato so odvisne od gostiteljevega mikrookolja za oskrbo s celotnim spektrom prekursorjev za biosintezo potrebnih makromolekul (26). Prevezemanje hranil iz gostiteljevega okolja lahko zmoti celovitost in spremeni funkcije gostiteljeve celice (18).

- b) Poškodbe zaradi adherence: Pritrditev mikoplazme na površino gostiteljeve celice lahko vpliva na izražanje membranskih receptorjev ali na transportne mehanizme gostiteljeve celice (18). Membrana gostiteljeve celice je prav tako občutljiva na toksične produkte, kot so citotoksični presnovki in encimi pritrjenih mikoplazem. Eksperimentalno so dokazali oksidativne poškodbe membrane gostiteljevih celic kot posledice izločanja peroksidnih in superoksidnih radikalov iz pritrjenih mikoplazem (27). Mikoplazme aktivirajo endogene membransko vezane fosfolipaze, kar lahko sproži specifično signalno kaskado ali sprosti citolitične lizofosfolipide, ki so sposobni poškodovati membrano gostiteljeve celice (28).
- c) Poškodbe zaradi tesnega stika: Takšne poškodbe je mogoče najti le med molikuti, ki za rast potrebujejo neesterificiran holesterol (npr. *Mycoplasma fermentans*). Zaradi poškodbe/zlitja mikoplazme z gostiteljevo celico pride do sproščanja hidrolitičnih encimov (fosfolipaz, proteaz in nukleaz), kar vodi v funkcionalno spremembo gostiteljeve celice (10).
- d) Citopatski učinki: Različni encimi (sialidaza, nevraminidaza), ki mikoplazmam omogočajo pritrditev na evkariontsko celico, lahko povzročijo tudi citopatski učinek (18, 29).

Najpomembnejši mehanizem za preživetje mikoplazem v gostitelju je izogibanje gostiteljevemu imunskemu sistemu. Glavna mehanizma sta molekulska mimikrija in fenotipska variabilnost, ki mikoplazmam omogočata, da jih gostiteljev imunski sistem ne prepozna (30). Molekulska mimikrija se nanaša na antigenske epitope, ki so skupni mikoplazmam in gostiteljevim celicam; predlagani so kot domnevni dejavniki, vključeni v izogibanje gostiteljevim obrambnim mehanizmom ali indukcijo lastnih protiteles pri okužbah z nekaterimi mikoplazmami (18). Pogost način za doseganje fenotipske plastičnosti pri mikoplazmah je »antigenska variacija«, izraz, ki se nanaša na povratno pridobivanje ali izgubo površinskih membranskih komponent (30, 31). Te površinske komponente, ki v mikroorganizmih vključujejo komponente flagel, pilijev ali zunanje membrane, so glavne tarče za odziv gostiteljevih protiteles. Zato sposobnost mikroorganizma, da hitro spremeni površinski antigenski repertoar in posledično spreminja imunogenost teh komponent, omogoči mikroorganizmu, da se izogne odkrivanju ali prehiteva gostiteljev imunski sistem. Ker mikoplazme nimajo celične stene, so njihove spremenljive površinske komponente membranski lipoproteini (32). Moduliranje imunskega sistema s citokini se vse pogosteje opisuje kot ena najpomembnejših virulentnih lastnosti številnih bakterij (30). Citokini s svojimi številnimi učinki na evkariontske gostiteljeve celice pomembno vplivajo na razvoj patoloških sprememb.

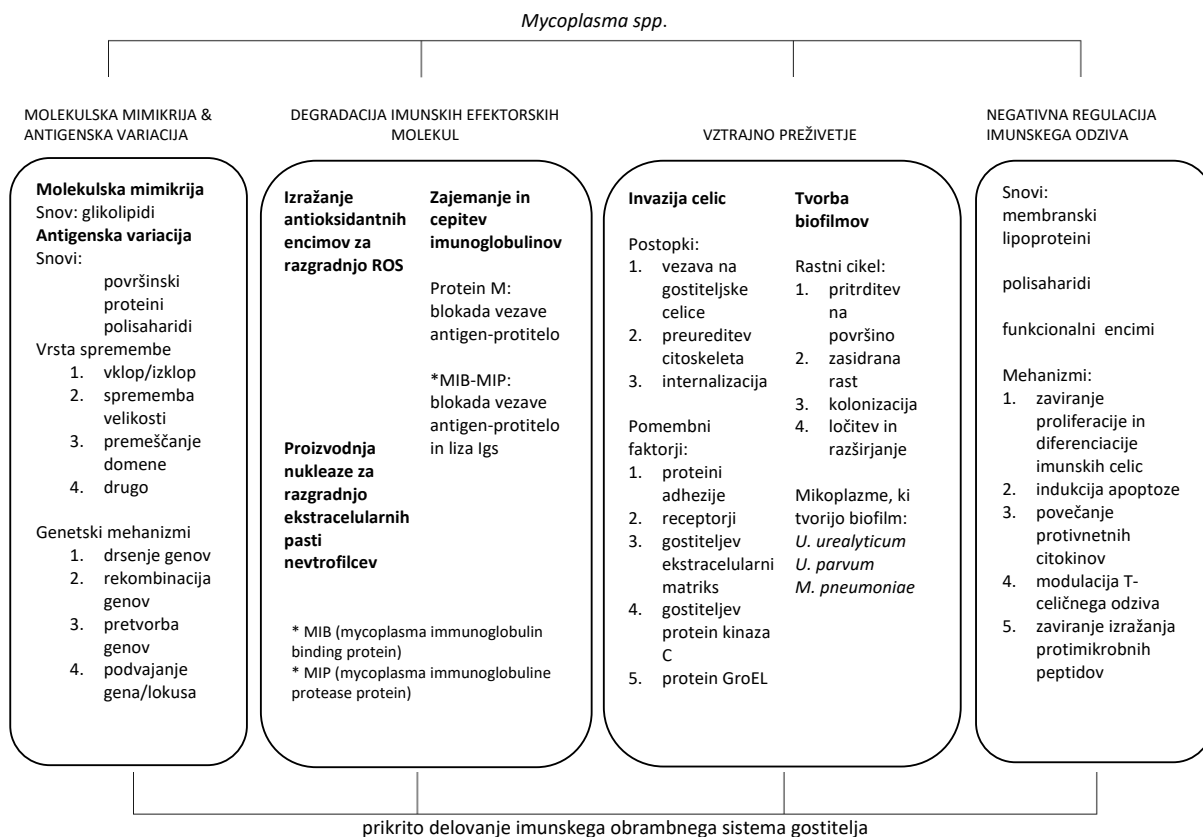
Raziskave kažejo, da se mikoplazme na ta način uspešno izogibajo fagocitozi. Imunomodulacijski vplivi so odvisni od vpletenih imunskih celic in bakterije *Mycoplasma spp.* (18).

Dosedanje študije niso razjasnile mehanizma patogeneze *M. canis*. Michaels in sodelavci (20) so potrdili, da je *M. canis*, ki so jo izolirali iz možganov obolelega psa, *in vitro* sposobna sprožiti spremembe v gostiteljevi celici. S površin sluznic se okužba z *M. canis* nato širi na sekundarna mesta okužbe in povzroči vnetje in neposredno poškodbo gostiteljevih celic. *M. canis* so s pomočjo fluorescentne mikroskopije najpogosteje ugotovili pritrjeno na robove gostiteljevih celic v enem sloju ali pa v neposredni bližini jeder, kar potrjuje sposobnost *M. canis*, da prodira v celice (20). Encim sialidaza, ki jo *M. canis* izloča, je potenten virulenčni faktor, ki spodbuja kolonizacijo mikroorganizmov, vdor v tkivo gostitelja ter poškodbo sialiliranih gostiteljevih receptorjev (33). Odsotnost citopatskega učinka *M. canis* na katero koli vrsto celice gostiteljice, kolonizirane *in vitro*, je dokaz, da je za razvoj meningoencefalitisa ali drugih bolezni potrebnih več dejavnikov, ki sprožijo odziv gostitelja ter posledično vplivajo na nadaljnjo kolonizacijo (20). Brown in sodelavci (34) so poskušali ugotoviti razlike med različnimi sevi *M. canis*. Primerjali so genom tipskega seva *M. canis PG14*, izoliranega iz grla psov z izolati iz spolovil ali možganov psov. Podobnost nukleotidnega zaporedja med pari sevov je 98-odstotna, genomski pripisi pa so si podobni. Spremembe zaporedja med preiskovanimi sevi na katalitičnih mestih *M. canis* sialidaze verjetno pojasnijo razlike v sevu in v specifični aktivnosti tega encima in posledično njegovi virulentnosti (34).

2.3 IMUNSKI ODGOVOR

Zapletena interakcija med mikoplazmami in gostiteljevim imunskim sistemom vključuje specifične in nespecifične imunske odgovore. Zaščitni obrambni mehanizmi vključujejo nastajanje in prisotnost specifičnih protiteles različnih razredov in podrazredov lokalno in sistemsko, stimulacijo celično posredovane imunosti ter opsonizacijo in fagocitozo povzročiteljev. Z vdorom mikoplazme v gostiteljevo celico se sprožijo reakcije, ki so pomembne za odpornost in zaščito pred mikoplazmami. Mikoplazme izzovejo številne nespecifične imunomodulacijske učinke imunskih celic gostitelja. Infekcija na limfocite B ali T lahko deluje zaviralno ali poliklonalno stimulatивно, sproži sintezo citokinov, poveča citotoksičnost makrofagov, celic T in naravnih celic ubijalk,

poveča izražanje membranskih receptorjev in dopolnjuje kaskado preostalih mehanizmov (10) (Slika 3).

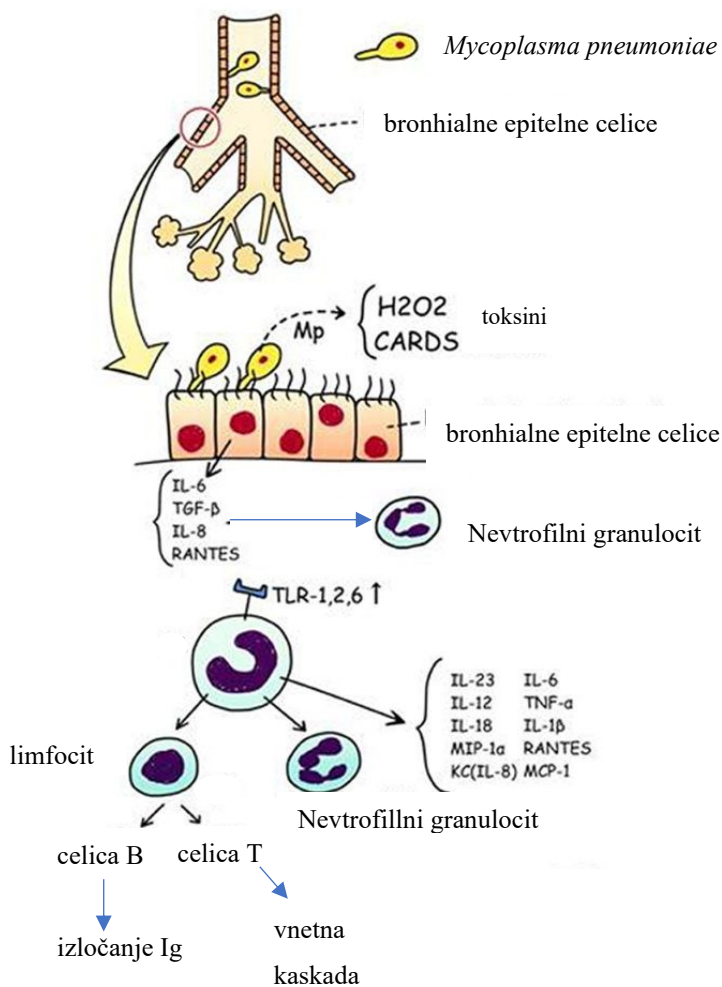


Slika 3: Molekulski mehanizem človeških patogenih mikoplazm z namenom izogibanja imunskemu napadu gostitelja. Povzeto in prirejeno po (35).

Figure 3: Molecular mechanism of human pathogenic mycoplasmas to evade the host immune attack. Adapted and summarized from (35).

Mikoplazme so sposobne stimulirati ali okrniti funkcijo limfocitov na nespecifičen, poliklonalen način, in sicer tako *in vitro* kot *in vivo*. Poleg vpliva na različne podskupine limfocitov mikoplazme in mikoplazemske celične komponente modulirajo aktivnosti makrofagov in celic ubijalk ter tako sprožijo produkcijo najrazličnejših citokinov in kemokinov. Mikoplazme ob okužbi stimulirajo izločanje proinflammatoryh citokinov, kot sta tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF- α , angl. *tumor necrosis factor-alfa*), interleukin-1 (IL-1) in interleukin-6 (IL-6) iz makrofagov in citokinov. Ti imajo pomembno vlogo pri modulaciji imunskega sistema in vnetnem odgovoru. Nekatere

mikoplazme sprožijo sintezo in izločanje interleukina-10 (IL-10), interleukina-13 (IL-13), pa tudi transformirajočega rastnega faktor- β (TGF- β , angl. *transforming growth factor-beta*). Ti zavrejo imunske mehanize gostitelja, saj zmanjšajo proizvodnjo vnetnih citokinov in proliferacijo limfocitov (10, 36–38) (Slika 4).



Slika 4: Shema interakcij med bakterijo *Mycoplasma pneumoniae* in gostiteljevo celico. Povzeto in prirejeno po (39).
Figure 4: Schematic of the interaction between the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* and the host cell. Adapted and summarized from (39).

Z eksperimentalno endobronhialno inokulacijo pri psih z *M. cynos* je bil dokazan razvoj pljučnice z izgubo in uničenjem bronhialnih epiteljskih cilij in alveolno infiltracijo nevtrofilnih granulocitov

in makrofagov (23). Dokazano je bilo tudi, da se v prvih treh tednih po okužbi z *M. cynos* pri 67 odstotkih okuženih psov titer specifičnih protiteles podvoji, kar je v neposredni povezavi s pojavom kliničnih znakov bolezni (40).

V raziskavi, ki smo jo opravili pri nas v letih 2008 in 2009, smo pri 34 delovnih psih brez kliničnih znakov obolenj s pomočjo DIBA testa dokazali prisotnost specifičnih protiteles proti *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare*. Specifična protitelesa proti vsaj eni mikoplazmi so bila dokazana kar pri 94,1 odstotka psov, 20,6 odstotka jih je bilo pozitivnih samo na *M. canis*, 23,5 odstotka je bilo pozitivnih samo na *M. cynos*, nobeden pa ni bil pozitiven samo na *M. molare*. Z metodo po Westernu smo pri vseh (7/7) izbranih serumih ugotovili reakcije protiteles z izbranimi serumi s specifičnimi proteini *M. canis* in *M. cynos* (41). Podobnih podatkov o pojavu specifičnih protiteles pri okužbi z *M. canis* v literaturi nismo zasledili.

2.4 KLINIČNA SLIKA

2.4.1 Okužbe sečil

Okužba sečil, pri kateri virulentni mikrobi vdrejo in se razmnožujejo v sečilih, lahko sproži vnetje sečil. Najpogostejši povzročitelji so bakterije in večina bakterijskih okužb sečil se pojavi kot posledica retrogradne migracije patogenov skozi spolovila in sečnico v mehur, sečevode in eno ali obe ledvici. Rektalne, perinealne in genitalne bakterije so glavni rezervoar za okužbo (42).

Okužbe spolovil in sečil lahko potekajo akutno ali kronično ter lahko vodijo zaradi ponavljajočih se vnetij ali reinfekcije do rezistentne okužbe ter sočasna obolenja, ki vodijo do nepopolne ozdravitve in slabšanja kliničnega stanja živali do odločitve za evtanazijo (5, 43).

Izsledki raziskav kažejo, da so mikoplazme možni samostojni ali sekundarni povzročitelji okužb sečil, zlasti *M. canis*. Ülgen s sodelavci (3) je pri 75 odstotkih (3/4) psov s pomočjo gojiščne preiskave urina izoliral čisto kulturo *M. canis*, pri 1 pa mešano kulturo. Jang in sodelavci (44) so pri 68 odstotkih (41/60) psov s pomočjo gojiščne preiskave urina izolirali mikoplazme, pri 32 odstotkih psov (19/60) pa mešano kulturo. Pri 83 odstotkih psov (24/29) je bila izolirana čista kultura *M. canis*. V klinični raziskavi, v katero je bilo vključenih 122 psic (intaktne in sterilizirane), so bile mikoplazme izolirane pri tretjini psic (41/122; 34 odstotkov), najpogosteje potrjena vrsta pa je bila prav *M. canis* (26/122; 21 odstotkov) (45). Pri 30 intaktnih psih je bila *M. canis* potrjena

v 60 odstotkih (18/30), pri 11 steriliziranih pa v 73 odstotkih (8/11). V različnih fazah reprodukcijskega ciklusa psic se delež pozitivnih izolatov mikoplazem ni pomembno razlikoval. V vzorcih (n = 35), ki so bili odvzeti neposredno iz materničnega roga med ovarihisterekтомijо, pa mikoplazem niso izolirali (45). Tretja raziskava, v katero je bilo vključenih 91 zdravih psic, je *M. canis* dokazala v 41,8 (38/91) odstotka vzorcev vaginalnih brisov (46). Vse znane raziskave dokazujejo, da je bakterija *M. canis* pogosta tudi pri zdravih psicah (46).

M. canis pri psih z obolenji spodnjih sečil so z gojiščno preiskavo urina v eni študiji uspeli dokazati le v 4 od 100 urinskih vzorcev in od tega v 3 primerih v čisti kulturi (3), za razliko od druge raziskave, v kateri je bilo pozitivnih kar 7 od 9 brisov psov z znaki bolezni sečil in spolovil. Sedem psov, pri katerih je bila *M. canis* tudi izolirana v čisti kulturi, je imelo ponavljajoče znake vnetja s hematurijo, pri psu s kroničnim gnojnim vnetjem nadmodka in pri psu s kroničnim prostatitisom pa je bila *M. canis* prisotna v mešani kulturi (5). Mikoplazme med okužbo najdemo na površini sluznic, pa tudi v spodaj ležečih tkivih, zato sam urinski vzorec ni primeren za določanje števila mikroorganizmov oziroma ugotavljanje prisotnosti okužbe ter resnosti kliničnih znakov (5). Ker najdemo *M. canis* v sečilih in spolovilih tudi pri zdravih psih, je pomen potrditve okužbe težko povezati s prisotnostjo nekaterih kliničnih znakov (3).

2.4.2 Plodnostne motnje

Neplodnost pri samicah je opredeljena kot nezmožnost uspešno obrejiti plodno samico v času ovulacije (8) in nezmožnost spočetja in rojstva mladičev, tudi če so večkrat parjene z znanim plodnim samcem v času ovulacije (47).

V retrospektivni raziskavi 88 pasjih samcev, razdeljenih v 3 različne skupine (psi brez plodnostnih težav (n=28), psi z benigno hiperplazijo prostate (n = 18) in psi s plodnostnimi težavami (n = 42), je bila od mikoplazem samo *M. canis* izolirana v 50 odstotkih (5/10) pri psih brez plodnostnih težav, v 54,5 odstotka (6/11) v skupini psov z benigno hiperplazijo prostate in v skupini psov s plodnostnimi težavami v 56,6 odstotka (17/30) (21). Doig in sodelavci (9) so v raziskavi, v katero je bilo vključenih 136 psov (75 samic in 61 samcev) z različno reprodukcijsko zgodovino, potrdili različne vrste mikoplazem v 88 odstotkih (67/75) vulvovaginalnih brisov, v 85 odstotkih (51/61) prepucialnih brisov in v 72 odstotkih (18/25) vzorcev semenske tekočine. *M. canis* je bila

najpogosteje izolirana mikoplazma pri obeh spolih. Pri samicah je bil delež pozitivnih na *M. canis* v vulvovaginalnih brisih 58-odstoten (39/67), pri samcih pa je bila mikoplazma prisotna v 84 odstotkih (51/61) iz prepucialnih brisov in v 33 odstotkih (6/18) vzorcev semenske tekočine (9). Prav tako lahko v ejakulatih psov brez plodnostnih obolenj najdemo bakterije in/ali mikoplazme, pri katerih se lahko zmanjšana kakovost semena pokaže šele čez čas (21, 48). Pri 55 zdravih psicah, ki so jih Gunay in sodelavci (49) testirali z uporabo gojiščne preiskave vzorcev, odvzetih z brisom vagine, materničnega vratu in maternice, mikoplazem niso potrdili.

V eksperimentalni študiji (iz leta 1977), v kateri so pse inokulirali z mikoplazmami skozi *ductus deferens*, se je število spermatozoev s spremenjeno morfologijo (napakami) značilno povečalo, pojavile so se lokalne vnetne reakcije v spolnih žlezah z znaki akutnega orhitisa in epididimitisa. S pomočjo mikrobiološke preiskave semena je bila mikoplazma izolirana samo pri 1 psu, pri katerem je bila dokazana *M. canis* (7).

2.4.3 Obolenja dihal

Večino mikoplazem najdemo v zgornjih dihalih zdravih živali (50). Post mortem lahko mikoplazme izoliramo tudi pri psih s pljučnicami, v pljučih zdravih psov pa običajno niso prisotne. Pri psih z virusno pljučnico lahko mikoplazme, ki se iz zgornjih dihal razširijo v spodnja dihala, posledično povzročijo tudi okužbo pljuč in/ali plevralnega prostora kot sekundarni oportunistični patogen. Zanimivo je, da so bile mikoplazme iz izpirkov sapnika in bronhov izolirane pri 25 odstotkih klinično zdravih psov in pri 21 odstotkih psov z obolenji spodnjih dihal (13). Čeprav ni verjetno, da bi bila *M. cynos* primarni povzročitelj pljučnice pri psih, je lahko eden od mnogih prisotnih sočasnih patogenov (13).

V eni od kliničnih študij, v kateri so ugotavljali prisotnost različnih patogenov (pasji respiratorni koronavirus, pasji pnevmovirus, influenza A in *M. cynos*) v nosnih in orofaringealnih brisih 572 psov, od katerih je bilo 381 (66,6 odstotka) psov s kliničnimi znaki bolezni dihal, je bila *M. cynos* dokazana le pri 0,9 odstotka vzorcev z metodo PCR, čeprav je bilo 45 odstotkov (236 /525) psov serološko pozitivnih na *M. cynos* (51).

Opisan je bil tudi primer oralnega prenosa okužbe v leglu psov pasme zlati prinašalec. Iz žrelnega brisa matere so izolirali *M. cynos* in *M. canis*, pri mladičih pa je bila iz vzorca pljuč izolirana le

M. cynos, ki je lahko vzrok za bronhopnevmonije in plevritis, še posebej če so rutinske mikrobiološke preiskave vzorcev negativne (52).

Natančna vloga najpogostejših mikoplazem pri psih, *M. canis* in *M. cynos* kot primarnega povzročitelja obolenj dihal, ni znana. Izsledki kažejo, da so mikoplazme lahko prisotne v sluznici ustne votline zdravih psov. Zato dokaz mikoplazem z molekularnimi metodami v bronhoalveolarnih izpirkih ne potrjuje, da so mikoplazme primarni povzročitelj okužbe spodnjih dihal (53). Če primerjamo skupine psov z eozinofilno bronhopnevmopatijo s psi s kroničnim bronhitisom in zdrave, ni značilnih razlik v prisotnosti vrst *M. canis*, *M. cynos* in *B. bronchiseptica*, dokazanih z metodo qPCR (53).

Na osnovi izolacije *M. cynos* iz vzorcev pri psih v zavetiščih lahko domnevamo, da se psi okužijo v prvih dveh tednih po nastanitvi. Enaindvajset dni ali več po nastanitvi pa se je pri psih delež potrjenih okužb z *M. cynos* znižal, kar lahko kaže na aktiven imunski odziv (54).

Kužne bolezni dihal pri psih so običajno povezane z več povzročitelji in predstavljajo pomemben zdravstveni problem predvsem v vzrejališčih in zavetiščih psov po vsem svetu. V izpirkih zgornjih dihal, sapnika in bronhov so z izolacijo na gojišču in PCR ter sekveniranjem dokazali prisotnost le *M. cynos*. Rezultati kažejo, da so za okužbo z *M. cynos* dovzetnejši mlajši psi, pri katerih je bila pogosteje izolirana iz spodnjih, redkeje pa iz zgornjih dihalnih poti. Tudi sicer so zaradi potencialne kontaminacije iz ustne votline primernejši brisi ali vzorci spodnjih dihal. *M. cynos* je bila v omenjeni študiji tudi edina mikoplazma, izolirana iz aerosola v vzrejališčih. Podobno kot druge mikoplazme je verjetno tudi *M. cynos*, pod ugodnimi pogoji, sposobna preživeti v aerosolu dalj časa, zato je okolje lahko potencialni vir okužbe (54).

2.4.4 Druga obolenja pri psih

Pri psih z idiopatskim meningoencefalitisom je bila nepričakovano izolirana *M. canis*, čeprav ni verjetno, da bi lahko bila primarni povzročitelj (20). Pri psu so v peritonealni tekočini, odvzeti med laparotomijo zaradi ugrizne rane, dokazali *M. edwardii* in *M. maculosum*. Pacient ni prejel ciljane antibiotične terapije, ker se je klinično stanje izboljševalo. Prisotnost obeh mikoplazem v trebušni votlini je po vsej verjetnosti posledica ugrizne rane, saj sta pogosto izolirani iz žrela psov (55). Barton in sodelavci (56) poročajo o izolaciji *M. spumans* pri psu s poliartritisom. Bowe in sodelavci

(57) so v eksperimentalni študiji pri 8 tednov starih mladičih pasme nemški bokser dokazali, da je sev *Mycoplasma* HRC-689 povzročil spremembe v debelem črevesju (limfocitna infiltracija sluznice, limfocitni submukozni perivaskulitis, povečanje pripadajočih bezgavk), ni pa povzročil granulomatoznega kolitisa. Dokazali so, da so psi razvili protitelesa proti sevu *Mycoplasma* HRC-689.

2.4.5 Prenos okužbe s psa na človeka

Leta 2018 v dostopni literaturi zasledimo poročilo o prvi izolaciji *M. canis* iz vzorcev človeškega tkiva po ugrizu psa. Pri 62-letni bolnici je bila *M. canis* izolirana v čisti kulturi in potrjena z metodo PCR. Ciljane antimikrobne terapije pacientka ni prejela, saj je za ozdravitev zadoščala obsežna toaleta rane (58).

V letu 2021 je bil opisan podoben primer okužbe skozi ugrizno rano psa 11-mesečnega dojenčka, ki je utrpel poškodbo zgornjega dela lobanje. V vzorcih epiduralnega prostora in možganov je bila potrjena s pomočjo preiskave MALDI-TOF (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*) *M. canis*. Po 191 dneh bolnišnične oskrbe je bil dojenček odpuščen v domačo oskrbo brez zaznavnih posledic okužbe ob poškodbi (59).

2.4.6 Zdravljenje in preventiva

Testiranje občutljivosti mikoplazem na antimikrobna sredstva se ne izvaja rutinsko, ker je postopek zahteven, zamuden in potrebuje posebne tehnike in gojiščne medije za samo izvedbo. Glede na občutljivost *in vitro* se priporoča uporaba tetraciklinskih antibiotikov, antibiotikov iz skupine makrolidov, linkozamidov, fluoriranih kinolonov, aminoglikozidnih antibiotikov in kloramfenikola (13). Mikoplazme so zaradi odsotnosti celične stene rezistentne na β -laktamske antibiotike, ki so terapija prvega izbora pri okužbah sečil (13).

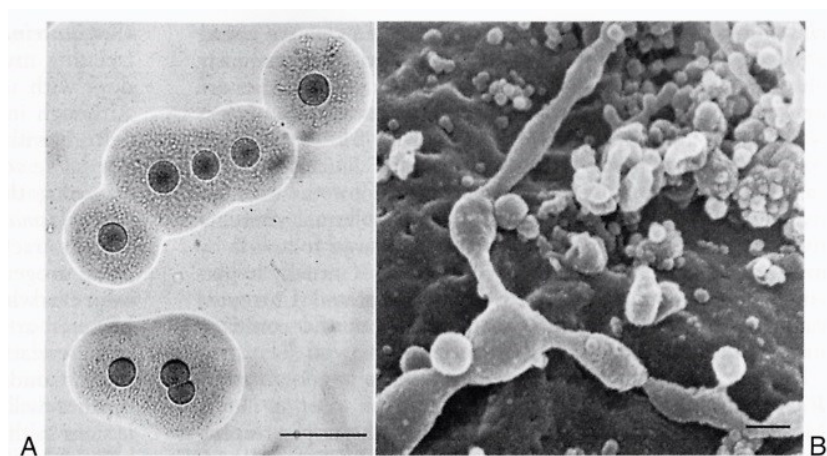
Zaščitnega cepiva, ki bi učinkovito preprečilo okužbo z mikoplazmami pri psih, mačkah ali drugih vrstah živali, še ni na voljo. Intranazalna imunizacija miši je bila v eksperimentalnih študijah najučinkovitejša, vendar z vključitvijo mukoznega adjuvansa (kolera toksin), ki izboljša imunski odziv na antigene cepiva (13). *M. pneumoniae* je eden pogostejših vzrokov za pljučnice pri ljudeh, ki živijo v isti skupnosti (angl. *community-acquired pneumonia*). Izsledki iz raziskave, ki je bila

opravljena na miših, kažejo, da cepljenje z inaktiviranim cepivom proti *M. pneumoniae* pri njih ne prepreči vnetja ob ponovni okužbi (60).

2.5 METODE ZA UGOTAVLJANJE POVZROČITELJA

2.5.1 Mikrobiološka gojiščna metoda

Gojitev mikoplazem na gojiščih je izjemno zahtevna in zamudna, saj rastejo zelo počasi, običajno več tednov (61). Večino vrst mikoplazem lahko gojimo v laboratoriju tako v tekočem kot v trdnem mediju, ki je pripravljen tako, da vsebuje najmanj jušno osnovo, ekstrakt kvasa, konjski serum in dodatke (D-glukoza, arginin, urea). Dodatki, ki se dodajo v medij, se razlikujejo glede na vrsto mikoplazme, ki jo želimo gojiti (62). Gojiščna preiskava je za dokazovanje povzročitelja metoda izbora, vendar je dostopnost specializiranih laboratorijev relativno omejena (61). Na podlagi videza kolonij pod mikroskopom ni mogoče razlikovati posamezne vrste mikoplazem (2) (Slika 5).



Slika 5: Videz kolonij mikoplazme pod mikroskopom (A); mikoplazme, ki kolonizirajo površino epitelijskih celic (B). Povzeto po (13).

Figure 5: Appearance of mycoplasma colonies under a microscope (A); mycoplasmas colonizing the surface of epithelial cells (B). Adapted from (13).

2.5.2 Molekularne metode

Molekularna diagnostika na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR angl. *polymerase chain reaction*) je metoda izbora za določanje patogenov v kliničnih vzorcih, pa tudi za dokazovanje v vzorcih kultur (16). Pomnoževanje tarčnega odseka DNA z metodo PCR temelji na uporabi

specifičnih začetnih oligonukleotidov in termostabilnega encima polimeraze, ki v ponavljajočih ciklih denaturacije in prileganja specifičnih oligonukleotidov pomnoži tarčni odsek DNA (63). Čeprav je o molekularni genetiki pasjih mikoplazem malo znanega, so leta 2004 s primerjavo genske sekvence za 16S rRNA in intergenske sekvence med genoma za 16S in 23S rRNA primerjali večino pasjih mikoplazem med seboj (23).

Nadgradnja metode PCR je kvantitativni PCR v realnem času (qPCR, angl. *quantitative PCR*), ki omogoča detekcijo in kvantifikacijo pomnoženih produktov PCR na osnovi zaznavanja fluorescence na koncu vsakega cikla (64).

V zadnjem desetletju so se z uporabo novega načina sekvenciranja, ki temelji na sekvenciranju markerskih genov, kot je npr. gen za ribosomalno 16 S RNA (metataksonomika) ali naključno »shotgun« sekvenciranja (metagenomika), močno razmahnile študije združb mikroorganizmov (65, 66). Te metode omogočajo vpogled v različne združbe mikroorganizmov tako s taksonomskega kot tudi funkcionalnega profila (66). Metagenomika z uporabo »shotgun« sekvenciranja je veliko širša metoda, saj z njo zaznamo tako bakterije, arheje, viruse kot tudi evkariontsko DNA, medtem ko je metataksonomika z uporabo markerskih genov veliko bolj omejena na določeno skupino organizmov npr. samo na bakterije (65).

2.6 SEROLOŠKE METODE

Metodo PCR uporabljamo za odkrivanje mikoplazem iz vzorcev kulture in kliničnih vzorcev ter za natančno določanje posameznih vrst. To je sicer bolj občutljiva metoda kot gojiščna preiskava, ne razloči pa med aktivno in kronično okužbo. V preteklosti so pasje mikoplazme potrjevali s serološkimi metodami, ki so bile odvisne od specifičnih antiserumov za vsako posamezno vrsto ali seroskupino. Za uspešno razlikovanje različnih vrst pasjih mikoplazem so bile uporabljene metode zaviranja rasti, imunofluorescenca, zaviranje presnove in dvojna imunodifuzija. Vendar se pri nekaterih vrstah pojavljajo navzkrižne reakcije, poleg tega pa antiserumi niso na voljo v večini diagnostičnih laboratorijev (25). Metoda točkastega imunskega odtisa (angl. DIBA – *dot immunobinding assay*) je lahko primeren test za identifikacijo mikoplazem. Vendar na specifičnost in občutljivost testa vplivajo navzkrižne reakcije, ki so lahko posledica skupnih antigenov med posameznimi vrstami mikoplazem ali sočasnih okužb z drugimi vrstami (67). Prednosti

encimskoimunskega preizkusa (angl. ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) sta enostavnost uporabe in uporaba za veliko število preiskovanih vzorcev hkrati (68). ELISA je biokemični test, ki uporablja protitelesa in encimsko posredovano spremembo barve za odkrivanje prisotnosti katerega koli antigena (beljakovine, peptidi, hormoni) ali protitelesa v danem vzorcu (69). Elektroforezo na poliakrilamidnem gelu (angl. PAGE – *polyacrylamide gel electrophoresis*) za ugotavljanje različnih proteinov celice sta prvič pri mikoplazmah uporabila Razin in Rottem (70). Metodo je leta 1970 Laemmli (71) optimiziral z uvedbo natrijevega dodecil sulfata (angl. SDS – *sodium dodecyl sulfate*) in jo uporablja večina laboratorijev. Prednost je, da ločimo beljakovine na podlagi molekulske mase. Ta metoda je primerna za večino aplikacij in omogoča neposredno primerjavo med različnimi vzorci, ki se izvajajo na istem gelu (72). Metoda po Westernu je metoda za analizo proteinskih antigenov. Ločene proteine prenesemo z gela na membrano s pivnanjem (angl. *blotting*). Položaj antigena na membrani lahko določimo z vezanjem označenih protiteles in dobimo podatek o velikosti antigena. Prednost te metode je v tem, da so antigeni izpostavljeni na membrani in imobilizirani (73, 74).

3 MATERIAL IN METODE

V raziskavo smo vključili 52 psov pacientov Klinike za male živali Veterinarske fakultete, katerih lastniki so s podpisom pristali na sodelovanje v raziskovalni nalogi (Prilogi 9 in 10).

3.1 Psi, vključeni v raziskavo

V raziskavo smo vključili 7 psov z znaki obolenj sečil in spolovil, 14 psov s plodnostnimi motnjami ter 31 klinično zdravih psov.

Kriteriji za vključitev pacienta v skupino z obolenji sečil so bili: disurija, strangurija, hematurija, polakiurija, lizanje področja spolovil, nehotno uriniranje v stanovanju ter ponavljajoči se uroinfekti.

Kriteriji za vključitev samic v skupino s plodnostnimi motnjami so bili: nezmožnost obrejitve/parjenja, nenormalni potek ciklusa, spontana prekinitve brejosti.

Kriteriji za vključitev samcev v skupino s plodnostnimi motnjami so bili: nezmožnost kopulacije ali ejakulacije, slaba kakovost semena, bolezn prostate.

V kontrolno skupino so bili vključeni klinično zdravi pacienti, ki niso imeli kroničnih bolezni, zaradi katerih bi prejeli terapijo, in so bili brez znakov obolenj sečil ali plodnostnih motenj na podlagi zgoraj opredeljenih kriterijev.

Podatki o zastopanosti samcev in samic so zbrani v tabeli 2.

Tabela 2: Zastopanost samic in samcev po skupinah
Table 2: Representation of females and males by groups

skupine psov	samice			samci			skupaj
	intaktna	sterilizirana	skupaj	intakten	kastriran	skupaj	
obolenja sečil in spolovil	2	3	5	1	1	2	7
plodnostne motnje	10	-	10	4	-	4	14
kontrolna	4	10	14	12	5	17	31
skupaj	16	13	29	17	6	23	52

V raziskavo so bili vključeni psi različnih pasem (Priloga 1).

Telesna masa in starost psov, ki so bili vključeni v raziskavo, so prikazani v tabeli 3.

Tabela 3: Porazdelitev telesne mase in starost psov po skupinah
 Table 3: Weight distribution and age of dogs by groups

skupine psov	samice		samci		skupaj	
	povprečna telesna masa (kg)	povprečna starost (leta)	povprečna telesna masa (kg)	povprečna starost (leta)	povprečna telesna masa (kg)	povprečna starost (leta)
obolenja sečil in spolovil	18,88 ± 14,14	3,60 ± 3,44	14,80 ± 1,41	7,50 ± 2,12	17,71 ± 11,73	4,71 ± 3,50
plodnostne motnje	29,99 ± 6,11	4,40 ± 1,84	26,75 ± 14,97	5,00 ± 0,82	29,06 ± 8,94	4,57 ± 1,60
kontrolna skupina	16,14 ± 6,83	7,07 ± 3,85	24,11 ± 14,56	6,29 ± 3,57	20,51 ± 12,23	6,65 ± 3,66
skupaj	21,39 ± 10,18	5,55 ± 3,46	23,76 ± 13,92	6,17 ± 3,16	22,44 ± 11,91	5,83 ± 3,31

Vrednosti so podane kot srednja vrednost ± standardni odklon.

3.2 Klinični pregled in ultrazvok sečil in spolovil

Pri vseh psih smo odvzeli anamnezo in opravili klinični pregled (Priloga 11–13).

Pri psih z obolenji sečil in spolovil smo se pri anamnezi osredotočali na lastnikova opažanja (polakiurija, hematurija, inkontinenca, lizanje področja genitalij, prisotnost izcedka), ali je bil pacient že terapijan zaradi ponavljajočih se vnetij sečil, kdaj je bil terapijan in s katerim antibiotikom, ali se je na terapijo odzval, kakšna so bila opažanja ob kontrolnem pregledu in reprodukcijski status (intakten/intaktna ali kastriran/sterilizirana). Pri fizikalnem pregledu smo se poleg splošne ocene kliničnega stanja osredotočali na zunanja spolovila (prisotnost izcedka, morebitne poškodbe kože/sluznic spolovila zaradi lizanja, prisotnost bolečine ob pregledu).

Pri psih s plodnostnimi motnjami smo se v anamnezi osredotočali na potek ciklusa pri psicah, število uspešnih paritev, število mladičev v leglu, ali je bilo seme že kdaj odvzeto in pregledano, življenjsko okolje in morebitno zdravljenje. Pri fizičnem pregledu smo se osredotočali na zunanja spolovila (oblika, prisotnost izcedka, prisotnost otekline in/ali bolečine ob pregledu), izraženost in velikost mod in pregledali abdomen (velikost, oblika, prisotnost bolečine). Z ultrazvočnim pregledom spolovil in sečil, ki smo ga opravili pri vseh pacientih, smo pri samicah pregledovali jajčnike, jajcevote, maternico, sečni mehur ter potek in prehodnost sečnice. Z ultrazvočnim pregledom smo pri samcih pregledovali moda, prostato, sečni mehur ter potek in prehodnost sečnice.

3.3 Odvzem vzorcev krvi za hematološke in biokemijske preiskave

Vsem psom smo odvzeli vzorec venske krvi (2–5 mL, odvisno od velikosti psa) s punkcijo *vene cephalice antebrachii*, *vene saphenae* ali *vene jugularis* za meritve hematoloških in biokemijskih parametrov.

Za meritve hematoloških parametrov smo vzorce odvzeli v 0,5 mL velike epruvete z dodanim antikoagulantom K₃EDTA (BD Microtainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, ZDA). Analizo smo opravili znotraj 1 ure po odvzemu vzorcev krvi na avtomatskem laserskem hematološkem analizatorju ADVIA 120 (Siemens, München, Nemčija), ki deluje po principu pretočne citometrije z lasersko svetlobo in se ga uporablja v veterinarski medicini. S tem analizatorjem smo določili skupno število levkocitov, koncentracijo eritrocitov, koncentracijo hemoglobina, hematokrit, število trombocitov in diferencialno belo krvno sliko.

Za pridobitev seruma, v katerem smo določili izbrane biokemijske parametre, smo vzorce krvi odvzeli v 4-mL epruvete z gelom in dodanim aktivatorjem koagulacije krvi (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Avstrija). Vzorce krvi smo pol ure hranili pri sobni temperaturi in jih nato centrifugirali 10 minut pri 1300 x g. Serum smo uporabili za merjenje koncentracije sečnine, kreatinina, progesterona, ščitničnih hormonov, določanje celokupnih proteinov in imunoglobulinov.

Biokemijske parametre smo izmerili spektrofotometrično z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona (Randox, Crumlin, Združeno kraljestvo). Uporabili smo tovarniško izdelane reagenčne komplete (Randox, Crumlin, Združeno kraljestvo).

Vsebnost proteinov in globulinov v serumu smo izmerili na aparaturi NanoDrop Lite (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ZDA), ki deluje po principu UV spektrofotometrične tehnike in je namenjen za merjenje mikrovolumskih količin proteinov v preiskovanih serumih po standardu IgG. Koncentracije so izražene v g/L.

Serum 2 psov, ki sta imela plodnostne motnje, smo poslali v komercialni laboratorij IDEXX (Vet Med Labor GmbH, Kornwestheim, Nemčija), v katerem so določili koncentracijo TSH in ščitničnega hormona T4.

V Laboratoriju za klinično patologijo Veterinarske fakultete smo pri 2 samicah z namenom parjenja v serumu merili koncentracijo progesterona z imunološkim analizatorjem MiniVIDAS (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francija), ki deluje po principu tehnike ELFA (angl. *enzyme linked fluorescent assay* – encimskoimunski test s fluorescenčno detekcijo iskane substance).

Za preiskave, ki smo jih izvajali serijsko, smo vzorce seruma shranili z zamrzovanjem pri –80 °C.

3.4 Urinski vzorci

Vzorci urina smo odvzeli s kateterizacijo oz. cistocentezo in jih shranili v sterilne plastične epruvete. Takoj po odvzemu smo izvedli semikvantitativni pregled urina s testnim trakom na urinskem analizatorju CLINITEK Status (Siemens, Erlangen, Nemčija), s katerim smo določili več parametrov hkrati: pH, relativno gostoto, prisotnost glukoze, beljakovin, ketonov, bilirubina, eritrocitov, levkocitov, urobilinogena in nitritov. Specifično gostoto urina smo določili z refraktometrom (Euromex, Arnhem, Nizozemska). Takoj zatem smo urin centrifugirali 10 minut pri 800 x g za mikroskopski pregled urinskega sedimenta. Za preiskave, ki smo jih izvajali serijsko, smo vzorce seruma in urinskega supernatanta shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Odvzem brisov za citološki pregled in molekularne preiskave

Brise smo za obe preiskavi odvzeli ločeno s sterilno vatenko (Copan FLOQSwabs, Brescia, Italija). Na predmetnih stekelcih smo pripravili preparate za citološko preiskavo in jih posušili na zraku. Posušene razmaze smo pobarvali po May-Grunwald-Giemsu in ocenili preparat pod svetlobnim mikroskopom. Na osnovi citoloških kriterijev smo določili fazo reprodukcijskega cikla. Obenem smo v brisih preverili morebitno prisotnost vnetnih celic, bakterij in drugih neceličnih struktur. Brise, namenjene za molekularno preiskavo, smo do izolacije hranili pri $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali manj.

3.6 Odvzem in pregled semena

Seme smo odvzeli z digitalno manipulacijo in takoj po odvzemu določili barvo, vonj, konsistenco in količino pridobljenega semena ter vzorce pregledali mikroskopsko. Skupno in progresivno gibljivost semenčic v vzorcu smo določali s pomočjo računalniške analize CASA (HTM-IVOS, version 12, Beverly, MA, ZDA). Pred analizo smo vzorce inkubirali 10 minut v vodni kopeli, ogreti na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preiskavo smo opravili s pomočjo Maklerjeve kamrice (Sefi-Medical Instruments; Haifa, Izrael), ogrete na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. V kamrico smo odmerili $5\text{ }\mu\text{L}$ vzorca ter opravili meritve na 3 naključno izbranih poljih. Pri vsakem vzorcu smo opravili 2 meritvi, pri izračunih pa upoštevali njune povprečne vrednosti. Koncentracijo semenčic smo določali na 2 načina, in sicer s pomočjo sistema CASA (sočasno z določanjem gibljivosti) ter uporabo Neubauerjeve števne kamrice. Koncentracijo semenčic s pomočjo števne kamrice smo določali po razredčitvi semena z destilirano vodo v razmerju 1 : 100 (seme : destilirana voda). Pri vsakem vzorcu smo prešteli vsaj 10 polj, nato pa izračunali končno koncentracijo.

Integriteto celične membrane smo določali z uporabo supravitalnega barvanja eozin/nigrozin ter testom HOS. Za supravitalno barvanje smo uporabili 1,5-odstotno raztopino eozina (Eosin Y, Merck, Darmstadt, Nemčija) ter 10-odstotno raztopino nigrozina (Nigrosin, Merck, Darmstadt, Nemčija) v destilirani vodi. Iz skupnega vzorca semena smo odvzeli 50 μ L ter ga prestavili v drugo epruveto. Semenu smo dodali 100 μ L 1,5-odstotne raztopine eozina ter po polminutni inkubaciji pri sobni temperaturi dodali še 150 μ L 10-odstotne raztopine nigrozina. Po dobrem premešanju vzorca smo na predmetnici pripravili razmaz in ga posušili na grelni plošči, ogreti na 37 °C. Pregled razmazov smo opravili s fazno-contrastnim mikroskopom Olympus, BH-2 (Olympus, Tokio, Japonska) pri 1000-kratni povečavi. Pri vsakem vzorcu smo pregledali minimalno 200 semenčic ter določili odstotek eozin negativnih (neobarvane glave) ter odstotek pozitivnih (rdeče obarvana glava) semenčic. Test HOS smo opravili z uporabo raztopine s 100 mOsm/L, pripravljene iz 9 g fruktoze, 5,58 g trinatrijevega citrata dihidrata ter destilirne vode do 1000 mL. V manjšo epruveto (5 mL) smo odpipetirali 1 mL hipoozmotske raztopine in jo ogreli na 37 °C. Raztopini smo dodali 100 μ L preiskovanega semena in inkubirali nadaljnjih 30 minut pri 37 °C. Iz raztopine smo po zaključeni inkubaciji naredili razmaz na ogreti predmetnici ter ga posušili na grelni plošči (37 °C). Posušene vzorce smo fiksirali in obarvali po enakem postopku kot vzorce za morfološko analizo. Obarvane vzorce semena smo preiskali z mikroskopom pod 400-kratno povečavo. Pri vsakem vzorcu smo preiskali minimalno 200 semenčic ter izračunali odstotek HOS pozitivnih semenčic. Končni odstotek HOS pozitivnih semenčic smo dobili po odštetju deleža tistih semenčic, ki so imeli zavite repe že pred izvedbo testa HOS (morfološka analiza vzorca).

Morfološke analize smo opravljali na svežih vzorcih semena. Morfološke spremembe na semenčicah smo ugotavljali na razmazih semena, ki so bili obarvani po May-Grunwald-Giemsu. Na predmetnem stekelcu smo pripravili razmaz semena in ga posušili na grelni plošči, ogreti na 37 °C. Pripravljen razmaz semena smo fiksirali s formalinsko raztopino (125 mL 35-odstotnega formalina, 10 g NaCl, 0,5 g NaHCO₃ in destilirana voda do 1000 mL). Fiksacija preparatov je trajala 30 minut, in sicer s potopitvijo vzorcev v pripravljeno raztopino formalina. Fiksirane vzorce smo nato barvali 16 ur v raztopini po May-Grunwald-Giemsu (16 mL Giemsa barvila®, 8 mL Soerensenovega fosfatnega pufra, s pH 7, 140 mL destilirane vode). Preparate smo pregledali pod mikroskopom pri 400-kratni povečavi. Na vsaki predmetnici smo preiskali 200 semenčic in določili

skupni odstotek morfološko normalnih semenčic (MNS) ter odstotek semenčic s posameznimi morfološki napakami (MAS).

3.7 Ugotavljanje povzročitelja z metodo PCR

3.7.1 Izolacija nukleinskih kislin

Celokupne nukleinske kisline smo izolirali iz vzorcev brisov prepucija in vagine ter semenske tekočine. Pred postopkom izolacije smo brise namočili v 2 mL PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA) in jih 2 minuti stresali z vibracijskim stresalnikom Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Latvija). Nato smo tekoči del vzorca prelili v 2-mL vijalo in jih do uporabe hranili v zamrzovalni skrinji pri -60°C ali manj. Nukleinske kisline smo po navodilu proizvajalca izolirali s kompletom reagentov QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Germantown, MD, ZDA), ki je namenjen za izolacijo molekul RNA in DNA ter temelji na kombinaciji selektivne vezave nukleinskih kislin na membrano na osnovi silicijevega dioksida. Za izolacijo smo uporabili 140 μL vzorca, ki smo ga predhodno odmrznili. Ob koncu postopka smo izolirano DNA raztopili s 60 μL elucijskega pufru in jo do nadaljnjih preiskav shranili pri temperaturi -60°C ali manj.

Pred začetkom izolacije smo po navodilih proizvajalca pripravili pufer za spiranje AW1, ki smo mu dodali 98 mL 96-odstotnega etanola in pufer za spiranje z oznako AW2, ki smo mu dodali 66 mL 96-odstotnega etanola. Pripravili smo nosilno RNA (cRNA) tako, da smo jo raztopili v 310 μL pufra AVE (sestavljeno iz vode, proste RNA-ze in 0,04-odstotnega natrijevega azida) in po 60 μL tako pripravljene raztopine porazdelili v 1,5-mL epruvete. cRNA pomaga pri vezavi virusne RNA na silikonsko membrano, ki je vgrajena v kolono kita, predvsem ko gre za manjše število tarčnih molekul. Prav tako cRNA ščiti molekule RNA pred tistimi RNA-zami, ki preživijo delovanje liznega pufru. Liznemu pufru z oznako AVL smo dodali cRNA v razmerju 560 μL pufra AVL in 5,6 μL raztopljenega cRNA za en vzorec.

V 560 μL pripravljene liznega pufru smo dodali 140 μL vzorca, premešali na koničnem mešalu 15 sekund in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Nato smo vzorec na hitro centrifugirali približno 15 sekund, dodali 560 μL 96-odstotnega etanola, premešali na koničnem mešalu 15 sekund in spet takoj centrifugirali. V označene kolone smo odmerili 630 μL vzorca (polovico),

centrifugirali eno minuto na 6000 x g, dodali še drugo polovico vzorca in spet centrifugirali 1 minuto na 6000 x g. Zaprte kolone smo prestavili v nove epruvete, dodali 500 µL puфра AW-1 in spet centrifugirali 1 minuto na 6000 x g, ponovno zamenjali epruvete, dodali 500 µL puфра AW-2 in centrifugirali 3 minute pri 20.000 x g. Po končanem centrifugiranju smo kolone prestavili v nove epruvete in še enkrat centrifugirali eno minuto pri 20.000 x g. Na koncu smo vezane nukleinske kisline raztopili z elucijskim puфrom AVE, tako da smo v kolono dodali 60 µL puфра AVE, inkubirali eno minuto pri sobni temperaturi ter centrifugirali eno minuto na 6000 x g, eluent smo shranili pri -70 °C.

3.7.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za detekcijo mikoplazem smo uporabili konvencionalni PCR, ki temelji na pomnoževanju 600 bp dolgega odseka gena za 23S ribosomalno RNA različnih vrst mikoplazem (75) in specifični PCR, ki pomnožuje 247 bp dolg intergenski odsek (IGS) genoma med genoma za 16S in 23S rRNA *M. canis* (23). Za pomnoževanje odseka genoma za 23S RNA smo uporabili začetne oligonukleotide Myc-23s-F1388: 5' GTT TCC TGG GCA AGG TTC 3' in Myc-23s-R1982: 5' CCG TTA TAG TTA CGG CCG CC 3'. Za pomnoževanje IGS smo uporabili Myc1-IGS: 5' CAC CGC CCG TCA CAC CA 3' in specifični začetni oligonukleotid *M. canis*-R 5' CTG TCG GGG TTA TCT CGA C 3'. Za pripravo 20 µL PCR reakcije smo uporabili 10 µL dvakrat že komercialno pripravljene mešanice DreamTaq Green PCR Master Mix (Fermentas, Vilna, Litva), 6 µL dvakrat destilirane vode, 1 µL (20 pmol) začetnega nukleotida Myc-23s-F1388 in 1 µL (20 pmol) Myc-23s-R1982 oziroma 1 µL (20 pmol) Myc1-IGS in 1 µL (20 pmol) začetnega nukleotida *M. canis*-R. Na koncu smo dodali 2 µL vzorca genomske DNA. Vzorce smo vstavili v ciklični termostat ABI 2700 (Applied Biosystems, Waltham, MA ZDA) in uporabili temperaturni program za izvedbo reakcije: začetna denaturacija 5 minut pri 95 °C, 35 ponovitev s polminutno denaturacijo pri 95 °C, polminutnim prilagajanjem začetnih oligonukleotidov in enominutnim pomnoževanjem novih kopij tarčnega gena. Reakcijo smo zaključili s petminutnim pomnoževanjem tarčnega gena pri 72 °C. Pri vsakem testu smo uporabili pozitivno in negativno kontrolo.

3.7.3 Dokazovanje produkta PCR v agaroznem gelu

Pripravili smo 1,8-odstotni agarozni gel. V stekleno čašo smo odtehtali 2,2 g agaroze v prahu (Agarose, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA) in dodali 120 mL enkratnega puфра tris-acetat-

EDTA (TAE, angl. *tris-acetate-EDTA*), ki smo ga pripravili iz 10-kratnega pufra TAE (UltraPure TAE Buffer, 10X, Invitrogen, Waltham, MA, ZDA). S segrevanjem v mikrovalovni pečici smo raztopino segreli do vrelišča in počakali, da se je agarozna popolnoma raztopila. Raztopino smo ohladili na približno 50 °C, jo vlili v model, zatisnjen z gumijasto oblogo na obeh koncih, vstavili glavnik in počakali, da se je gel strdil. Gel smo skupaj z modelom brez tesnil prenesli v kadičko za elektroforezo, napolnjeno s pufrom TAE. V vdolbine v gelu smo nanесли 20 µL produkta PCR, ki je že vseboval nalagalni pufer. Poleg vzorcev smo v prvo in zadnjo vdolbinico gela nanесли tudi standardni označevalec velikosti DNA (GeneRuler, 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Vilna, Litva). Ločevanje fragmentov DNA po velikosti je potekalo približno 45 minut pri sobni temperaturi pri električni napetosti 120 V. Kot usmernik električnega toka smo uporabili Power Pack P25 (Biometra, Göttingen, Nemčija). Gel smo po končani elektroforezi obarvali z raztopino etidijevega bromida (BioRad, Hercules, CA, ZDA) in ga po 15 minutah barvanja sprali z vodo. Rezultate smo odčitali z UV transiluminatorjem (Gel Doc 1000, Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA).

3.7.4 Prečiščevanje produktov PCR in določanje nukleotidnega zaporedja

Primerno dolge produkte PCR, pomnožene z začetnimi oligonukleotidi Myc-23s-F1388 in Myc-23s-R1982, ki smo jih izrezali iz agaroznega gela, smo očistili s komercialnim kompletom FastGene Gel/PCR Extraction kit (Nippon Genetics Europe, Düren, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Izrezani kos agaroznega gela z želenim produktom PCR smo vstavili v 1,5-mL epruveto, dodali 500 µL Binding buffer GP1 (Nippon Genetics Europe, Düren, Nemčija), dobro premešali na koničnem mešalu in inkubirali 10–15 minut pri 55 °C, da se je gel popolnoma raztopil. Za vezavo DNA smo 800 µL raztopine prenesli na kolono FastGene GP (Nippon Genetics Europe, Düren, Nemčija) in centrifugirali 30 sekund pri 16.000 x g, tekočo fazo v zbirni epruveti smo odstranili in v kolono dodali 600 µL pufra za spiranje (Wash buffer GP2, Nippon Genetics Europe, Düren, Nemčija) ter centrifugirali 30 sekund pri 16.000 x g. Po končanem centrifugiranju smo kolono prestavili v čisto, suho epruveto in centrifugirali kolono še 2 minuti pri 16.000 x g, da smo iz nje popolnoma odstranili pufre, ter kolono prestavili v novo 1,5-mL epruveto. Za elucijo vezane DNA smo v kolono dodali 30 µL elucijskega pufra (Elution Buffer GP3, Nippon Genetics Europe, Düren, Nemčija) in pustili 2 minuti, da se je DNA popolnoma raztopila. Po končani inkubaciji smo

kolono centrifugirali 2 minuti pri 16.000 x g, da se je DNA izločila iz kolone. Kolono smo zavrgli, ekstrahirane produkte PCR pa smo shranili pri 4 °C do uporabe.

Tako očiščene produkte PCR smo poslali v laboratorij Macrogen na Nizozemskem (www.macrogen.com, Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska), kjer so izvedli določanje nukleotidnega zaporedja po Sangerjevi metodi.

3.7.5 Analiza nukleotidnih zaporedij

Zbrane podatke o nukleotidnem zaporedju smo analizirali s programom Finch TV Verzija 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, WA, ZDA) in jih primerjali z že znanimi podatki v GenBank (76) s programom BLAST (angl. *basic local alignment search tool*) (77).

3.7.6 Uporaba endogene kontrole

Za ugotavljanje kakovosti odvzetega vzorca smo uporabili endogeno kontrolo 18S rRNA, Applied Biosystems® Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ZDA), ki vsebuje začetne oligonukleotide in sondo, ki pomnožuje odsek ribosomalne 18S rRNA. Ta se nahaja v dednini vseh evkariontskih celic živalskih vrst, kar smo uporabili za primerjavo kakovosti odvzetih brisov. Za pomnoževanje 18S rRNA smo uporabili metodo obratnega prepisa z reverzno transkriptazo in verižno reakcijo PCR v realnem času. Za pripravo 15 µL mešanice PCR smo uporabili 7,5 µL 2x RT-PCR pufra (AgPath-ID One-Step RT-PCR master mix, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ZDA), 0,6 µL 25x RT-PCR encimske mešanice, 0,75 µL Applied Biosystems Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ZDA), 4,15 µL destilirane vode ter na koncu 2 µL vzorca. Vzorce smo vstavili v ciklični termostat »real time PCR« aparature QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Waltham, MA, ZDA) in uporabili temperaturni program za izvedbo reakcije: obratni prepis z reverzno transkriptazo 10 minut pri 45 °C, denaturacijo reverzne transkriptaze in aktivacijo polimeraze 10 minut pri 95 °C, 40 ponovitev s 15 sekund denaturacije pri 95 °C in prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde ter pomnoževanje novih kopij tarčnega gena pri 60 °C 45 sekund, v zadnjem koraku poteka tudi odčitavanje nastale fluorescence.

3.8 Metagenomska analiza vaginalnih in prepucialnih brisov

Vaginalne in prepucialne brise smo na metagenomsko analizo poslali v laboratorij v ZDA (Diversigen Inc., New Brighton, MN, ZDA), ohlajene pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Metagenomska analiza nam omogoča analizo celotne bakterijske raznovrstnosti.

3.8.1 Analiza pomnožkov gena za 16S rRNA

Izolacija celokupne DNA

Vzorci so izolirali s kompletom DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Germantown, MD, ZDA) na aparaturi QiaCube HT (Qiagen, Germantown, MD, ZDA) z zbijanjem s kroglicami v ploščicah Powerbead Pro Plates (Qiagen, Germantown, MD, ZDA).

Kvantifikacija DNA

Vzorci so kvantificirali z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času z uporabo začetnih oligonukleotidov za variabilno regijo 4 (515f/806r) gena za 16S rRNA.

Priprava knjižnic in sekvenciranje

Knjižnice gena za 16S rRNA so pripravili po protokolu, ki so ga opisali Gohla in sodelavci (2016). Pomnoževanje variabilne regije V4 (515f/806r) gena 16S rRNA je potekalo z DNA-polimerazo KAPA HiFi. Knjižnice so sekvencirali na sistemu Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, ZDA) z obeh koncev (odčitki $2 \times 250\text{ bp}$) in kompletom MiSeq v3 (Illumina, San Diego, CA, ZDA).

Nadzor kakovosti zaporedij

Zaporedja DNA so filtrirali za nizko kakovost (vrednost $Q < 30$) in dolžino ($< 50\text{ bp}$) ter zaporedja adapterjev odstranili z orodjem Cutadapt (Illumina, San Diego, CA, ZDA). Pare odčitkov v formatu FastQ so na osnovi prekrivanja združili v enotne soseske (angl. *contigs*) v formatu FASTA s programskim orodjem SHI7.

Analiza operacijskih taksonomskih enot

Zaporedja so združili v operacijske taksonomske enote (angl. OTUs – *operational taxonomic units*) z uporabo zaprtega referenčnega pristopa na osnovi 97-odstotne identičnosti z zaporedji v podatkovni zbirki GreenGenes in z uporabo poravnave z vrzeli z metodo BURST. Povezave so prekinili z minimaliziranjem skupnega števila edinstvenih OTUs. Za taksonomski pripis so vsakemu vhodnemu zaporedju določili najnižjega skupnega prednika, ki je bil skladen v vsaj 80 odstotkih vseh referenčnih zaporedij, vezanih na najboljši zadetek. Vzorci z manj kot 1000

zaporedji so izločili iz nadaljnje analize. OTUs so merili z njihovo relativno zastopanostjo; to različico tabele OTUs so uporabili za vse nadaljnje analize. Za strnjene preglednice so tabelo OTUs strnili na ravni bakterijske vrste in debla v skladu z že opisano taksonomijo najnižjega skupnega prednika. Taksoni, ki jim taksonomije za določeno taksonomsko raven niso mogli nedvoumno pripisati, so za to raven opisani kot »drugo« (angl. *other*).

Funkcijska analiza

Zaporedjem so pripisali ortološke skupine po Kjotski enciklopediji genov in genomov (angl. KEGG KO – *Kyoto encyclopedia of genes and genomes orthology*) in s pomočjo programskega paketa za bioinformatiko PICRUST. (angl. *phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states*). KO (angl. *KEGG orthology*) so strnili na ravni 3 KEGG-poti in modulov.

Raznolikost alfa in beta

Cenilke raznolikosti alfa oz. raznolikosti znotraj vzorca (filogenetska raznolikost celotnega drevesa Faith–PD–Whole Tree, cenilke Chao1 in cenilke Shannon) in opaženo število OTUs so izračunali iz rarefakcijske tabele. Raznolikost beta oz. raznolikost med vzorci so izračunali na osnovi filtrirane tabele OTUs ter tehtane in netehtane razdalje UniFrac s programskim orodjem QIIME 1.9.1. (angl. *quantitative insights into microbial ecology*). Bray–Curtisove razdalje (mera raznolikosti beta) so izračunali iz modulov KEGG in relativne zastopanosti encimov s programskim orodjem QIIME 1.9.1. OTUs, nastavljene na najmanjšo dovoljeno globino za vzorec (1.000), so strnili s programskim orodjem QIIME v 1.9.1.

3.9 Ugotavljanje specifičnih protiteles z metodo DIBA

Za dokazovanje specifičnih protiteles proti mikoplazmam smo uporabili metodo DIBA. Membrano PVDF (Immobilon-P PVDF Membrane, Merck Millipore, Burlington, MA, ZDA; velikost por 0,45 µm) smo aktivirali v 100-odstotnem metanolu (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA) in spirali v destilirani vodi. S pipeto smo na membrano nanесли 2 µL ustrezne razredčitve antigena (celični lizat različnih sevov mikoplazem: *M. canis Larissa*, *M. canis PG14*, *M. cynos 896*, *M. cynos 2296* in *M. molare*) in jo 1 uro inkubirali v blokadi 0,5-odstotnega Tween-PBS (Tween 20, Merck Millipore, Burlington, MA, ZDA) v fosfatnem pufru (Dulbecco's phosphate buffered saline,

Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA) pri sobni temperaturi za blokiranje prostih vezavnih mest. Trakove smo nato inkubirali v preiskovanem serumu (redčitev 1 : 100) uro in pol pri sobni temperaturi. Trakove membrane smo spirali trikrat 10 minut s pufrom 0,05 odstotnega Tween-PBS. Po spiranju smo trakove membran 1 uro inkubirali v raztopini s sekundarnimi kunčjimi protitelesi proti pasjim protitelesom (Rabbit Anti-dog IgG, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA), konjugiranih s hrenovo peroksidazo, predhodno razredčenih v PBS v razmerju 1 : 1000 pri sobni temperaturi. Sledilo je ponovno spiranje dvakrat 10 minut v 0,05-odstotnem Tween 20 v PBS in nato desetminutno spiranje v PBS. Po spiranju smo membrano delno osušili in jo prelili s substratom True Blue (KPL, Gaithersburg, MD, ZDA) za vizualizacijo reakcije. Potem smo membrano za 30 sekund potopili v PBS, ki je reakcijo zaustavil.

3.10 Ugotavljanje specifičnih protiteles z metodo analize po Westernu

Proteine celičnih lizatov mikoplazem (*M. canis Larissa*, *M. canis PG14* in *M. cynos*) smo ločili s postopkom gelske poliakrilamidne elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE). Uporabili smo prirejeno metodo po Laemmliju (71). Uporabili smo predpripravljen NuPAGE Bis-Tris gel z 10 ali 15 žepki (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ZDA). Za ločevanje vzorcev smo uporabili elektroforezni sistem Xcell SureLock Mini Cell (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ZDA). Na gel smo nanašali vzorce, redčene v 5 x Laemmli nanašalnem pufu in 20 x DTT (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ZDA), ki smo jih pred nanosom na gel inkubirali pri 95 °C 10 minut. Ločevanje je potekalo do 70 minut pri 180 V. Za lažje sledenje poteku elektroforeze ter preverjanje velikosti proteinov na poliakrilamidnem gelu ali membrani PVDF smo uporabili velikostni standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ZDA). Po končani elektroforezi smo gel pobarvali z reverzibilnim barvilom Ponceau S (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA), nato pa proteine iz gela prenesli na membrano PVDF (0,45 µm, Immobilon-P, Millipore, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA) v sistemu Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA). Prenos je potekal 90 minut pri 100 V. Membrano PVDF s prenešenimi proteini smo uporabili za imunsko določanje iskanih proteinov z uporabo specifičnih protiteles. Membrano smo 1 uro blokirali v pufu PBS z dodanim 0,5-odstotnim Tween 20 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, ZDA). Temu je sledila

inkubacija v ustrezno redčeni raztopini serumov, ki je trajala 1 uro. Membrano smo po inkubaciji v serumu trikrat sprali v pufru PBS z 0,05-odstotnim Tween 20 in jo nato 45 minut inkubirali v sekundarnih protitelesih, redčenih 1 : 1000. Sekundarna protitelesa, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo, so se vezala na primarna protitelesa in omogočila, da smo lahko vizualno zaznali obarvane proteinske lise. Po dodatnem spiranju z 0,05-odstotnim Tween 20-PBS smo na membrano nanesli kromogeni substrat TrueBlue (KPL, Gaithersburg, MD, ZDA), ki je v stiku s hrenovo peroksidazo povzročil spremembo barve na delu membrane, kjer so vezana sekundarna protitelesa. Modro obarvanje dela membrane povzroči, da vidimo, pri katerem proteinu je prišlo do imunske reakcije.

3.11 Statistične metode

Rezultate smo statistično analizirali s programom SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, ZDA). Za vse podatke smo izračunali opisno statistiko in določili srednje vrednosti in standardno napako. Statistično metodo Shapiro-Wilk smo uporabili za ugotavljanje normalnosti porazdelitve podatkov. Če so bili podatki normalno porazdeljeni (Shapiro-Wilk test $> 0,05$), smo statistično pomembne razlike med preučevanimi skupinami statistično analizirali s parametričnimi testi oziroma na podlagi enosmerne analize variance (ANOVA), ki ji je sledil Holm-Sidakov test za večkratne primerjave. Če podatki niso bili normalno razporejeni (Shapiro-Wilk test $< 0,05$), smo statistično pomembne razlike med preučevanimi skupinami analizirali z neparametričnimi statističnimi testi, in sicer Kruskal-Wallisovim testom in testom hi-kvadrat, kjer smo v primeru statistično značilnih razlik uporabili Fisher-Exact test za primerjavo dveh skupin. Upoštevana stopnja statistične značilnosti je 0,05.

4 REZULTATI

4.1 Klinični pregled in ultrazvočni pregled sečil in spolovil

Klinični pregled in ultrazvočni pregled smo opravili pri vseh 52 pacientih.

Ultrazvočne ugotovitve in odstopanja pri samicah so zbrana v tabeli 5.

Tabela 4: Rezultati ultrazvočnega pregleda – samice
 Table 4: Results of ultrasonographic examination – females

	sečni mehur		jajčniki		maternica		ster.	število psic
	bp	zad. stena	bp	ciste	bp	tekočina		
obolenja sečil in spolovil	4	1						5
plodnostne motnje			9	1	8	2		10
kontrolna skupina			4		3	1	10	14
								29

bp – brez posebnosti; ster. – sterilizirana; zad. stena – zadebeljena stena

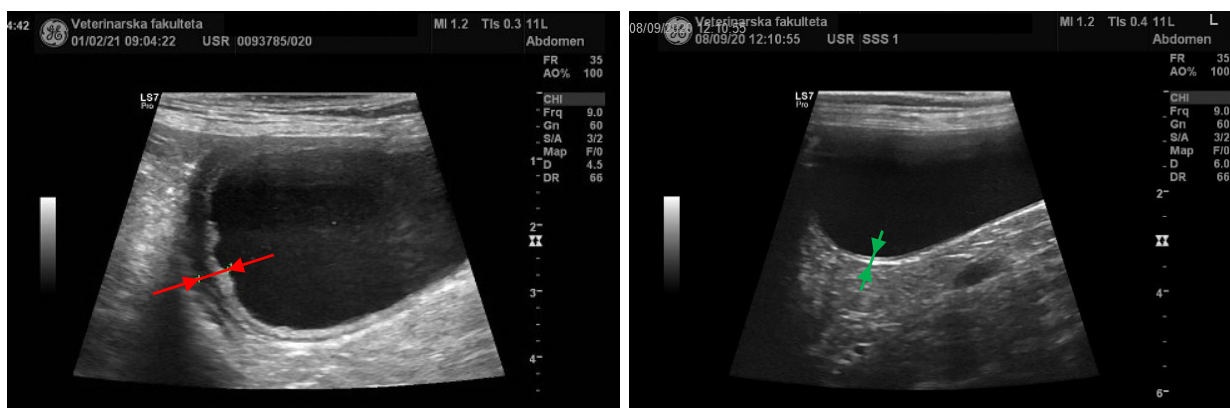
Ultrazvočne ugotovitve in odstopanja pri samcih so zbrana v tabeli 5.

Tabela 5: Rezultati ultrazvočnega pregleda – samci
 Table 5: Results of ultrasonographic examination – males

	s. mehur	moda			prostata			število psov
	bp	bp	kastr.	t. mod	bhp	bp	ciste	
obolenja sečil in spolovil	1	1					1	2
plodnostna motnje		4				3	1	4
kontrolna skupina		10	5	2	3	10	4	17
								23

s. mehur – sečni mehur; bp – brez posebnosti; kastr. – kastrat; t. mod – tumor na modih; bhp – benigna hiperplazija prostate

S kliničnim pregledom smo pri pacientih iz skupine z obolenji sečil in spolovil pri enem samcu ugotovili prisotnost bolečine ob palpaciji trebuha, pri dveh samicah pa minimalno količino izcedka iz zunanjega spolovila. Ultrazvočno smo le pri 1 psici od 5 s ponavljajočimi se uroinfekti ugotovili zadebeljeno steno sečnega mehurja (Slika 6), debelina stene je bila 5 mm. Pri klinično zdravih psih je debelina stene mehurja 1,4–1,6 mm, ko je zmerno napolnjen, in 2,3 mm, ko je skoraj prazen (78).



Slika 6: Ultrazvočna slika zadebeljene stene sečnega mehurja (med puščicama; debelina 5 mm) – levo. Desno – slika stene sečnega mehurja pacienta iz kontrolne skupine (med puščicama; debelina 1,3 mm).

Figure 6: Ultrasonographic image of a thickened bladder wall (between the arrows; 5 mm thick) – left. Right – image of the bladder wall of a patient from the control group (between arrows; thickness 1.3 mm).

Na podlagi citološkega pregleda vaginalnega brisa so bile vse samice v skupini z obolenji sečil in spolovil v fazi anestrusa.

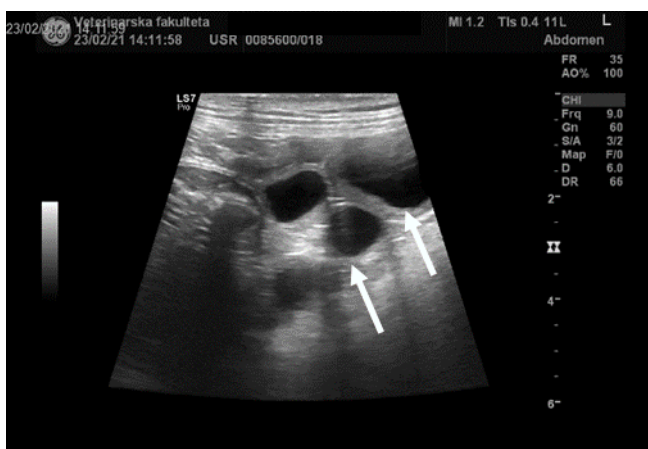
V skupini z obolenji sečil in spolovil sta bila pregledana tudi 2 samca (en kastrat in en intakten). Pri intaktnem samcu smo v prostati ugotovili ultrazvočno vidne ciste brez zaznavnih kliničnih znakov.

S kliničnim pregledom pri pacientih iz skupine s plodnostnimi motnjami nismo ugotovili kliničnih odstopanj. Pregledali smo 10 samic. Samo pri 2 samicah smo z ultrazvočno preiskavo opazili tekočino v lumnu maternice in pri 1 ciste na jajčnikih. Na podlagi citološkega pregleda vaginalnega brisa so bile 4 samice v fazi estrusa, 5 v fazi diestrusa in ena v fazi anestrusa. Pri 1 samici smo ugotovili ciste na jajčnikih (Slika 7), kar je lahko razlog za neuspešno oploditev. Samica je bila v fazi estrusa; lastniki so jo že v prejšnji gonitvi parili, vendar parjenje ni bilo uspešno.



Slika 7: Ultrazvočna slika cist na jajčniku (puščici) pri psici v fazi estrusa
Figure 7: Ultrasonographic image of ovarian cysts in a bitch (arrows) in the estrus phase

Pri 2 samicah smo v lumnu maternice ugotovili tekočino. Hidrometra ali mukometra je lahko posledica povišane ravni progesterona v diestrusu in lahko vodi do zmanjšane plodnosti in verjetno povečanega tveganja za razvoj hujše bolezni maternice (Slika 8).

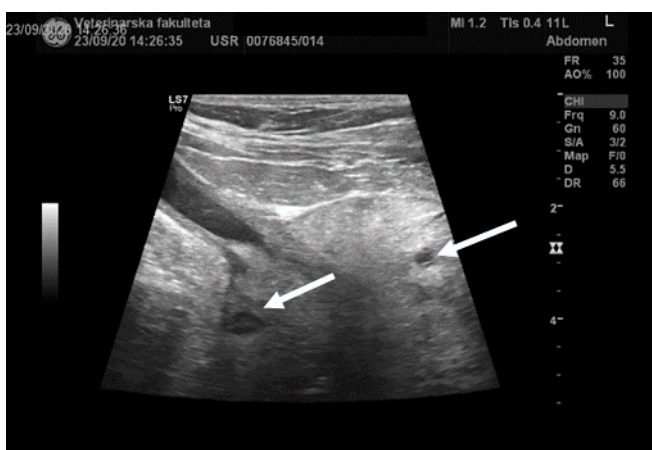


Slika 8: Ultrazvočna slika tekočine v maternici (puščici) pri psici v fazi diestrusa
Figure 8: Ultrasonographic image of uterine fluid (arrows) in a bitch in the diestrus phase

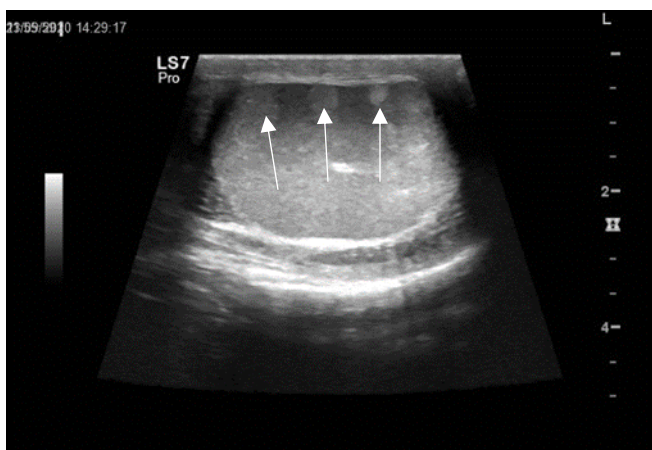
V skupini psov s plodnostnimi motnjami smo pregledali 4 samce, v času pregleda so bili stari 4–6 let (povprečna starost $5 \pm 0,8$). Pri 1 smo ugotovili ciste v prostati brez zaznavnih kliničnih odstopanj.

S kliničnim pregledom pri pacientih iz kontrolne skupine nismo ugotovili kliničnih odstopanj. Pregledali smo 14 samic (4 intaktne in 10 steriliziranih). Z ultrazvočnim pregledom smo pri 1 od 4 intaktnih samic ugotovili minimalno količino tekočine v maternici. Samica je bila v fazi diestrusa, v kateri tekočino v maternici lahko ugotovimo zaradi povišane koncentracije progesterona. Pred tem ni bila parjena. Pri preostalih 3 od 4 intaktnih samic nismo ugotovili odstopanj. Na podlagi citološkega pregleda brisa sta bili 2 samici v fazi estrusa, 2 v fazi diestrusa. Pri 10 steriliziranih samicah nismo zaznali ultrazvočnih odstopanj.

V kontrolni skupini smo pregledali 12 intaktnih in 5 kastriranih samcev. Pri 2 intaktnih samcih smo ugotovili benigno hiperplazijo prostate (Slika 9) in sočasno tumor mod (Slika 10).



Slika 9: Ultrazvočna slika benigne hiperplazije prostate s cistami (puščici) pri intaktnem samcu
Figure 9: Ultrasonographic image of a benign prostatic hyperplasia with cysts (arrows) in intact male



Slika 10: Ultrazvočna slika tumorja na modih (puščice)
Figure 10: Ultrasonographic image of the testicular tumors (arrows)

Pri 4 intaktnih samcih smo ugotovili ciste v prostati, pri 1 pa benigno hiperplazijo prostate. Pri 5 kastriranih samcih ultrazvočno nismo ugotovili odstopanj.

Klinični pregled smo opravili tudi pri 3 pacientih po zdravljenju (samec iz skupine z obolenji sečil in spolovil ter samica in samec iz skupine s plodnostnimi motnjami). Kliničnih odstopanj nismo zaznali.

4.2 Rezultati hematološke analize

Hematološki parametri pacientov, razdeljenih po skupinah, so zbrani v prilogi 2. Statistična analiza je bila opravljena znotraj posamezne preiskovane skupine kot tudi ločeno za samce in samice iz posameznih skupin. Opisani so samo rezultati, kjer je bilo značilno odstopanje.

4.2.1 Psi z obolenji sečil in spolovil

Edino značilno odstopanje smo ugotovili ob ugotavljanju vrednosti hemoglobina pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi s kontrolno skupino ($P = 0,022$). Povprečna vrednost hemoglobina pri psih s potrjeno okužbo z *M. canis* v skupini z obolenji sečil in spolovil je bila najnižja, vendar še vedno znotraj referenčnih vrednosti (referenčne vrednosti 129–184 g/L). Rezultati so prikazani v tabeli 6.

Tabela 6: Vrednost koncentracije hemoglobina pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi s kontrolno skupino – enosmerna analiza variance (ANOVA)

Table 6: Hemoglobin concentration value in dogs in the urogenital group with confirmed *M. canis* infection compared to the control group – one-way analysis of variance (ANOVA)

hemoglobin (g/L)		n	\bar{x}	σ	F(3, 22)	p
obolenja sečil in spolovil	<i>M. canis</i>	3	138,000	23,065	3,908	0,022
	negativno	3	179,000	13,000		
kontrolna skupina	<i>M. canis</i>	6	177,167	15,562		
	negativno	14	167,786	17,716		

\bar{x} = povprečna vrednost; σ = standardni odklon

Med psicami z obolenji sečil in spolovil in kontrolno skupino nismo zaznali značilnih razlik.

V skupini sta bila zastopana samo 2 samca, zato morebitnih značilnih razlik ni bilo mogoče ugotavljati.

Pri drugih hematoloških parametrih nismo zaznali značilnih odstopanj.

4.2.2 Psi s plodnostnimi motnjami

Pri nobenem hematološkem parametru nismo ugotovili značilnih odstopanj pri psih v skupini s plodnostnimi motnjami v primerjavi s kontrolno skupino. Prav tako nismo ugotovili značilnih razlik pri samicah v tej skupini. Ker so bili v skupini samo 4 samci in od tega 1 z dokazano okužbo z *M. canis* in 1 negativen, morebitnih značilnih razlik ni bilo mogoče ugotavljati.

4.3 Rezultati analize izbranih biokemijskih parametrov

Analize biokemijskih parametrov pacientov, razdeljenih po skupinah, so zbrane v prilogi 3. Statistična analiza je bila opravljena znotraj posamezne preiskovane skupine kot tudi ločeno za samce in samice iz posameznih skupin. Opisani so samo rezultati, kjer je bilo statistično značilno odstopanje.

4.3.1 Psi z obolenji sečil in spolovil

Značilne razlike smo ugotovili samo ob ugotavljanju vrednosti kreatinina pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi s tistimi, ki niso imeli potrjene okužbe ($P = 0,014$). Vrednost kreatinina pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* je bila najnižja, vendar je bil parameter znotraj referenčnih vrednosti (44,2–132,6 $\mu\text{mol/L}$). Rezultati so prikazani v tabeli 7.

Tabela 7: Vrednost koncentracije kreatinina pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil in kontrolni skupini – enosmerna analiza variance (ANOVA)

Table 7: Creatinine concentration values in dogs in the urogenital and control groups – one-way analysis of variance (ANOVA)

kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)		n	\bar{x}	σ	F(3, 22)	p
obolenja sečil in spolovil	<i>M. canis</i>	3	47,097	39,764	4,394	0,014
	negativno	3	111,440	20,863		
kontrolna skupina	<i>M. canis</i>	6	85,040	21,192		
	negativno	14	82,987	18,102		

\bar{x} = povprečna vrednost; σ = standardni odklon

Prav tako nismo zaznali značilnih odstopanj pri izbranih biokemijskih parametrih pri samicah v tej skupini.

V skupini sta bila zastopana samo 2 samca, zato morebitnih značilnih razlik zaradi majhnega vzorca ni bilo mogoče ugotavljati.

4.3.2 Psi s plodnostnimi motnjami

Pri nobenem od izbranih biokemijskih parametrov nismo zaznali značilnih razlik v skupini psov s plodnostnimi motnjami. Prav tako nismo ugotovili značilnih odstopanj pri samicah v tej skupini. Ker so bili v skupini samo 4 samci in od tega 1 z dokazano okužbo z *M. canis* in 1 negativen, značilnih razlik zaradi premajhnega vzorca ni bilo mogoče ugotovljati.

4.4 Pregled urina

Analize urinskih parametrov pacientov, razdeljenih po skupinah, so zbrane v prilogi 4. Statistična analiza je bila opravljena znotraj posamezne preiskovane skupine kot tudi ločeno za samce in samice iz posameznih skupin. Opisani so samo rezultati, kjer je bilo značilno odstopanje.

4.4.1 Urinski parametri pri psih z obolenji sečil in spolovil

4.4.1.1 Bilirubin

Značilne razlike smo ugotovili v koncentraciji bilirubina v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil ($P = 0,032$). Pri psih s potrjeno okužbo z *M. canis* smo pogosteje ugotovili bilirubin v urinu kot pri psih brez okužbe in pri tistih v kontrolni skupini (Tabela 8).

Tabela 8: Koncentracija bilirubina v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi s kontrolno skupino – test hi-kvadrat

Table 8: Urinary bilirubin concentrations in dogs in the group with urogenital diseases with confirmed *M. canis* infection compared to the control group – chi-square test

bilirubin		n	POZ	NEG	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	<i>M. canis</i>	3	2	1	8,832	0,032
	negativno	3	1	2		
kontrolna skupina	<i>M. canis</i>	6	2	4		
	negativno	14	0	14		

4.4.1.2 Glukoza

Značilne razlike smo ugotovili tudi v koncentraciji glukoze v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi s kontrolno skupino ($P = 0,047$). Vendar gre za majhno skupino 7 pacientov in odstopanje le pri 1 pacientu (Tabela 9).

Tabela 9: Prisotnost glukoze v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi s kontrolno skupino – test hi-kvadrat

Table 9: Presence of glucose in dogs in the group with urogenital diseases with confirmed *M. canis* infection compared to the control group – chi-square test

glukoza (mmol/L)		n	5,5	NEG	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	<i>M. canis</i>	3	1	2	7,973	0,047
	negativno	3	0	3		
kontrolna skupina	<i>M. canis</i>	6	0	6		
	negativno	14	0	14		

4.4.1.3 Levkociti

Značilne razlike smo ugotovili v prisotnosti levkocitov v sedimentu urina samo pri samicah v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* (100 %) v primerjavi s kontrolno skupino ($P = 0,002$) (Tabela 10).

Tabela 10: Prisotnost levkocitov v sedimentu urina pri samicah v skupini z obolenji sečil in spolovil s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi s kontrolno skupino – test hi-kvadrat

Table 10: Presence of leukocytes in bitches in the group with urogenital diseases with confirmed *M. canis* infection compared to the control group – chi-square test

levkociti		n	POZ	NEG	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	<i>M. canis</i>	2	2	0	15	0,002
	negativno	2	0	2		
kontrolna skupina	<i>M. canis</i>	2	0	2		
	negativno	9	0	9		

V skupini sta bila zastopana samo 2 samca, zato zaradi majhnega vzorca razlik ni bilo mogoče statistično ugotavljati.

4.4.2 Urinski parametri pri psih s plodnostnimi motnjami

Pri nobenem od izbranih urinskih parametrov nismo zaznali značilnih razlik pri psih v skupini s plodnostnimi motnjami.

Značilne razlike smo ugotovili v koncentraciji bilirubina v urinu pri samicah v skupini s plodnostnimi motnjami ($P = 0,026$) v primerjavi samicami iz kontrolne skupine, vendar je razlika neodvisna od potrjene okužbe z *M. canis* (Tabela 11).

Tabela 11: Koncentracija bilirubina v urinu pri samicah v skupini s plodnostnimi motnjami v primerjavi samicami v kontrolni skupini – test hi-kvadrat

Table 11: Urinary bilirubin concentration in urine in bitches in the group with fertility disorders compared to bitches in the control group – hi-square test

bilirubin		n	NEG	POZ	χ^2	p
plodnostne motnje	<i>M. canis</i>	5	2	3	9,231	0,026
	negativno	4	1	3		
kontrolna skupina	<i>M. canis</i>	2	1	1		
	negativno	9	9	0		

Ker so bili v skupini s plodnostnimi motnjami le 4 samci in od tega 1 z dokazano okužbo z *M. canis* in 1 negativen, razlik zaradi majhnega vzorca ni bilo mogoče statistično ugotovljati.

4.4.3 Primerjava vrednosti urinskih parametrov med skupinami

Statistična analiza je bila opravljena znotraj posamezne preiskovane skupine kot tudi ločeno za samce in samice med posameznimi skupinami. Opisani so samo rezultati, kjer je bilo značilno odstopanje.

4.4.3.1 Bakteriurija v skupini z obolenji sečil in spolovil

Po pričakovanjih je bila bakteriurija značilno pogostejša pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil (100 %) v primerjavi s preostalima skupinama ($P = 0,039$) (Tabela 12).

Tabela 12: Prisotnost bakterij v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil v primerjavi s preostalima skupinama – test hi-kvadrat

Table 12: Presence of bacteria in urine in dogs in the group with urogenital diseases compared to other groups – hi-square test

bakteriurija	n	NEG	POZ	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	7	0	7	6,499	0,039
plodnostne motnje	14	8	6		
kontrolna skupina	31	14	17		

4.4.3.2 Hematurija v skupini z obolenji sečil in spolovil

Poleg tega je pričakovano v skupini psov z obolenji sečil in spolovil, v primerjavi s skupino psov s plodnostnimi motnjami in kontrolno skupino, značilno pogostejša tudi hematurija ($P = 0,015$). Rezultati so prikazani v tabeli 13.

Tabela 13: Prisotnost krvi v urinu pri psih v skupini z obolenji sečil in spolovil v primerjavi s preostalima skupinama – test hi-kvadrat

Table 13: Presence of blood in urine in dogs in the group with urogenital diseases compared to other groups – chi-square test

hematurija	n	NEG	POZ	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	7	1	6	8,436	0,015
plodnostne motnje	14	11	3		
kontrolna skupina	31	20	11		

4.4.3.3 Ugotavljanje bilirubina pri samicah

Značilne razlike smo ugotovili pri ugotavljanju koncentracije bilirubina pri samicah med preiskovanimi skupinami ($P = 0,020$) (Tabela 14).

Tabela 14: Koncentracija bilirubina v urinu pri samicah med preiskovanimi skupinami – test hi-kvadrat

Table 14: Urinary bilirubin concentration in bitches between study groups – hi-square test

bilirubin	n	POZ	NEG	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	5	2	3	7,842	0,020
plodnostne motnje	10	6	4		
kontrolna skupina	14	1	13		

S Fisherjevim eksaktnim testom pa smo dokazali, da značilno odstopajo samice iz skupine s plodnostnimi motnjami (delež 60 %) v primerjavi s samicami v kontrolni skupini (delež 7 %) ($P = 0,009$) (Tabela 15). Značilnega odstopanja med samicami v skupini z obolenji sečil in spolovil v primerjavi s kontrolno skupino ni bilo.

Tabela 15: Koncentracija bilirubina v urinu pri samicah iz skupine s plodnostnimi motnjami v primerjavi s samicami v kontrolni skupini – Fisherjev eksaktni test

Table 15: Urinary bilirubin concentration in bitches from the fertility disorder group compared to females in the control group – Fisher-Exact test

bilirubin	n	POZ	NEG	p
plodnostne motnje	10	6	4	0,009
kontrolna skupina	14	1	13	

4.4.3.4 Prisotnost levkocitov pri samicah

Značilne razlike smo ugotovili v prisotnosti levkocitov v sedimentu urina pri samicah med preiskovanimi skupinami ($P = 0,006$). Levkociti so bili prisotni samo pri samicah v skupini z obolenji sečil in spolovil (40 %) (Tabela 16).

Tabela 16: Prisotnost levkocitov v sedimentu urina pri samicah med preiskovanimi skupinami – test hi-kvadrat
 Table 16: Presence of leukocytes in urine in bitches between study groups – hi-square test

levkociti	n	POZ	NEG	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	5	2	3	10,311	0,006
plodnostne motnje	10	0	10		
kontrolna skupina	14	0	14		

Značilne razlike smo ugotovili ob ugotavljanju koncentracije bilirubina v urinu pri samcih med preiskovanimi skupinami ($P = 0,012$). Višji delež bilirubina v urinu smo ugotovili tako pri samcih v skupini z obolenji sečil in spolovil (100 %), čeprav je vzorec majhen ($n = 2$), kot tudi pri samcih v skupini s plodnostnimi motnjami (75 %) v primerjavi s kontrolno skupino (18 %) (Tabela 17).

Tabela 17: Koncentracija bilirubina v urinu pri samcih med preiskovanimi skupinami – test hi-kvadrat
 Table 17: Urinary bilirubin concentration in males between study groups – hi-square test

bilirubin	n	POZ	NEG	χ^2	p
obolenja sečil in spolovil	2	2	0	8,803	0,012
plodnostne motnje	4	3	1		
kontrolna skupina	17	3	14		

4.5 Pregled semena

Po odvzemu semena smo določili barvo, vonj in količino pridobljenega semena ter opravili osnovno mikroskopsko preiskavo, ki vključuje določanje gibljivosti, ugotavljanje morfoloških sprememb in določitev koncentracije semenčic. Na podlagi izračunov smo v ejakulatu oz. vzorcu semena določili skupno število semenčic, število progresivno gibljivih in morfološko normalnih semenčic. Skupno in progresivno gibljivost semenčic v vzorcu smo določali z računalniško analizo.

Trije samci v semenski tekočini niso imeli prisotnih spermijev (azoospermija), 1 samec pa ni dajal semena (aspermija). S pomočjo metode PCR smo pregledali tudi semensko tekočino pri 3 samcih. Rezultati so bili skladni z rezultati prepucialnih brisov (Tabela 18).

Tabela 18: Preglednica samcev s plodnostnimi motnjami
Table 18: Table of males with fertility disorders

št. pacienta	starost v letih	semenska tekočina	prepucialni bris PCR	semenska tekočina PCR
8	6	azoospermija	mikoplazme	mikoplazme
9	4	azoospermija	negativno	negativno
13	5	aspermija	<i>M. canis</i>	ni bilo ejakulata
15	5	azoospermija	mikoplazme	mikoplazme

mikoplazme – druge mikoplazme

Samec, ki je bil z metodo PCR pozitiven na druge mikoplazme, se je paril šestkrat, vendar neuspešno. Seme pred paritvijo ni bilo nikoli pregledano. Drugi samec, ki je bil z metodo PCR prav tako pozitiven na druge mikoplazme, se je paril dvakrat, po besedah lastnice uspešno, število preživelih mladičev ni znano. Samec, ki je bil z metodo PCR negativen, se je uspešno paril samo enkrat, števila preživelih mladičev nam lastnik ni želel zaupati. Edini samec, ki je bil z metodo PCR pozitiven na *M. canis*, spolnega nagona nima izraženega in z digitalno manipulacijo ni dajal semena. Živi z intaktno psico, lastnik samico pripušča dvakrat letno, vendar se do zdaj še ni obrejila.

V kontrolni skupini psov so bili pregledani tudi 4 samci, ki niso imeli plodnostnih motenj (Priloga 5; I).

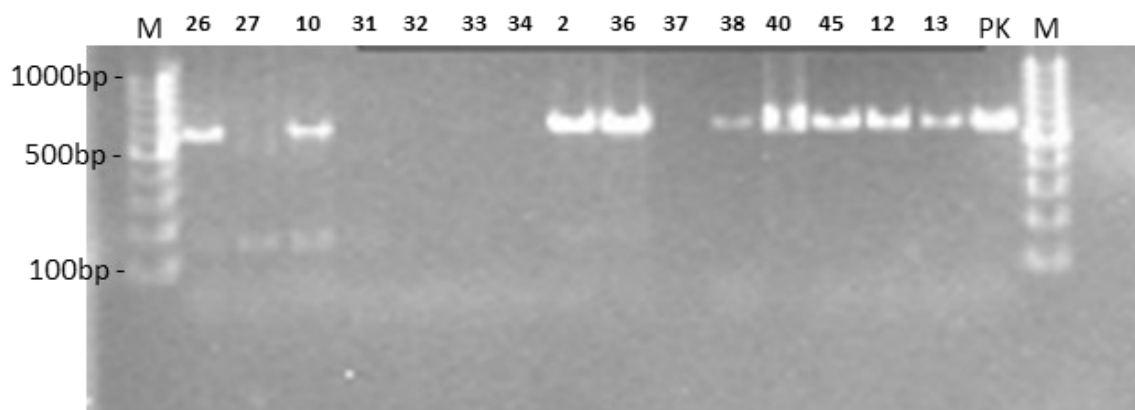
Oba samca, ki sta bila z metodo PCR pozitivna na *M. canis*, imata nižje število semenčic v ejakulatu kot samca, ki sta bila bodisi negativna ali pa pozitivna na druge mikoplazme. Starejši samec, ki je bil pozitiven na *M. canis*, ima volumsko nižjo količino semena kot mlajši samec, ki je bil pozitiven na *M. canis*, ali pa samec, ki je bil negativen, vendar se je uspešno paril že enajstkrat tako v Sloveniji kot v tujini. Gibljivost semenčic v odstotkih je bila pri starejšem samcu, pozitivnem na *M. canis*, najnižja v celotni preiskovani skupini samcev (85 %), ostali 3 pacienti so imeli odstotek enak (90 %). Edini samec, ki je bil pozitiven na druge mikoplazme, je imel volumsko najnižjo količino semena od vseh 4 pregledanih samcev, vendar daruje seme desetkrat na leto tako v Sloveniji kot v tujini. Približno vsako 9. darovanje semena je bilo uporabljeno za umetno oploditev. Samec, ki je bil negativen na mikoplazme, ima najvišje število semenčic v ejakulatu in tudi drugo najvišje volumsko količino semena, ni pa še imel potomcev. Mlajši samec, ki je bil pozitiven na *M. canis*, ima drugo najnižje število semenčic v ejakulatu in volumsko najvišjo količino semena v skupini. Potomcev ta pacient še ni imel.

Mikroskopski pregled semena takoj ob odvzemu je pokazal, da ima samec, ki je bil negativen, najvišji odstotek morfološko normalnih spremijev (84 %), sledita mu oba samca, ki sta bila pozitivna na *M. canis* (76 % in 78 %), najnižji odstotek pa je imel samec, ki je bil pozitiven na druge mikoplazme (51 %). Mikroskopski pregled semena po 3 urah je pokazal, da ima najvišji odstotek (79 %) morfološko normalnih spermijev mlajši samec, ki je bil pozitiven na *M. canis*. Sledi samec, ki je bil negativen (64 %), nato starejši samec, ki je bil pozitiven na *M. canis* (48 %), in samec, ki je bil pozitiven na druge mikoplazme (42 %).

Takoj po odvzemu semena sta bila opravljena osnovni pregled za določanje morfoloških napak in računalniška analiza semena (Priloga 5; II in III). S pomočjo metode PCR smo pregledali tudi semensko tekočino pri vseh samcih. Rezultati so bili skladni z rezultati prepucialnih brisov (Priloga 5; IV).

4.6 Ugotavljanje povzročitelja z metodo PCR iz vaginalnih in prepucialnih brisov

Za ugotavljanje genomske DNA mikoplazem v vaginalnih in prepucialnih brisih smo uporabili dve različni metodi PCR, v nadaljevanju imenovani PCR mikoplazme in PCR za *M. canis*. Z metodo PCR mikoplazme smo dobili produkte ustrezne dolžine pri 29/52 preiskovanih vzorcev brisov (Slika 11). Različne mikoplazme smo potrdili pri 4 od 7 pacientov iz skupine z obolenji sečil in spolovil, pri 10 od 14 pacientov iz skupine s plodnostnimi motnjami in 15 od 31 pacientov iz kontrolne skupine.



Slika 11: Elektroforezni gel

Slika prikazuje 600 bp dolge PCR produkte odseka gena za 23S RNA gena mikoplazem v nekaterih vzorcih vaginalnih in prepucialnih brisov psov. V 1. in 18. stolpcu je označevalec (M) velikosti 100 bp (GeneRuler, 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva) za oceno dolžine produktov. V stolpcih od 2 do 16 so PCR produkti za posamezne vzorce; številke predstavljajo oznake pacientov. V stolpcu 17 je pozitivna kontrola (PK).

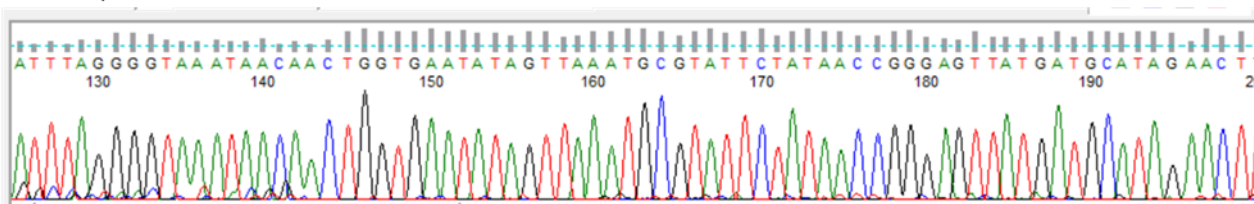
Figure 11: Electrophoresis gel

The figure shows 600 bp long PCR products of the 23S RNA gene section of the mycoplasma gene in some samples of dog vaginal and preputial swabs. Columns 1 and 18 contain a 100 bp marker (M) (GeneRuler, 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Lithuania) to estimate product length. Columns 2 to 16 contain PCR products for individual samples; the numbers represent patient labels. Column 17 is a positive control (PK).

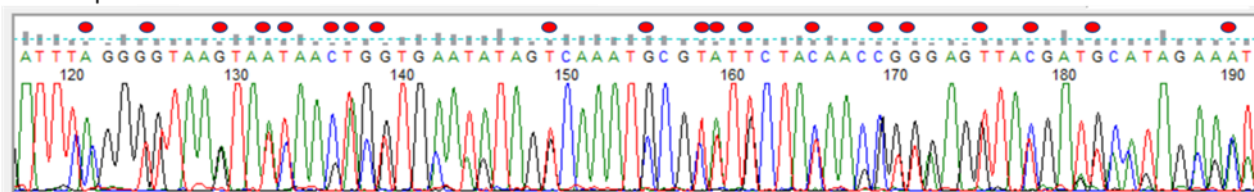
Nukleotidna zaporedja smo s programom Finch TV uredili tako, da smo primerjali zaporedje, dobljeno z obema začetnima oligonukleotidoma, ter izločili neberljive začetne in končne dele zaporedja. S programom BLAST smo urejena zaporedja v dolžini od 520 do 600 nukleotidov primerjali z javno dostopnimi zaporedji v podatkovni banki GenBank. Nukleotidno zaporedje smo uspešno določili pri 26/29 (90 %) pozitivnih vzorcev. V 17 primerih (65 %) je bil signal v dobljenih elektroferogramih jasen, v 9 primerih (35 %) pa smo dobili mešano nukleotidno zaporedje. Primer različno berljivih elektroferogramov je prikazan na spodnji sliki (12). V prilogi 6 so prikazani

rezultati za posamezne vzorce. V primeru mešanih signalov smo v tabeli ločeno označili vrsto, s katero smo v programu BLAST dobili najvišjo nukleotidno podobnost. Nukleotidno zaporedje *M. canis* smo potrdili v 9/29 (31 %) PCR – mikoplazma pozitivnih vzorcih. V 4/9 (44 %) primerov je imelo primerjano zaporedje od 99- do 100-odstotno podobnost z zaporedjem *M. canis* iz podatkovne banke GenBank. V 5/9 (56 %) primerov smo dobili mešani signal, kljub temu so bili rezultati primerjave BLAST najbolj podobni zaporedju *M. canis* z 78- do 99-odstotno podobnostjo.

Oznaka pacienta 2



Oznaka pacienta 17



Slika 12: Elektroferogram

Elektroferogram delnega zaporedja gena za ribosomalno 23S RNA za vzorec z oznako pacienta št. 2 in vzorec z oznako pacienta št. 17. Z rdečimi pikami so označene pozicije nukleotidov, kjer je bilo zaznanih več različnih signalov.

Figure 12: Electropherogram

Partial sequence electropherogram of the ribosomal 23S RNA gene for sample patient no. 2 and sample patient no. 17. The red dots indicate the positions of the nucleotides where several different signals have been detected.

Z metodo PCR za *M. canis* smo skupno analizirali 52 vzorcev vaginalnih in prepucialnih brisov. Genomsko DNA *M. canis* smo potrdili v 15 brisih, vsi ti vzorci so bili pozitivni tudi z metodo PCR – mikoplazme, medtem ko smo z določanjem nukleotidnega zaporedja potrdili *M. canis* v 9/15 (60 %) vzorcev, pozitivnih s specifično metodo PCR za *M. canis*. Rezultati za posamezne vzorce v posameznih testiranih skupinah so prikazani v prilogi 6.

M. canis smo potrdil pri 3/7 (43 %) psov iz skupine z obolenji sečil in spolovil, pri 6/14 (43 %) psov iz skupine s plodnostnimi motnjami in pri 6/31 (19 %) psov iz kontrolne skupine (Tabela 19).

Tabela 19: PCR rezultati po skupinah
 Table 19: PCR results by groups

skupine	<i>M. canis</i>	mikoplazme	negativno	skupaj
obolenja sečil in spolovil	3 (43 %)	1 (14 %)	3 (43 %)	7
plodnostne motnje	6 (43 %)	4 (29 %)	4 (29 %)	14
kontrolna skupina	6 (19 %)	9 (29 %)	16 (52 %)	31
skupaj	15 (29 %)	14 (27 %)	23 (44 %)	52

mikoplazme – druge mikoplazme

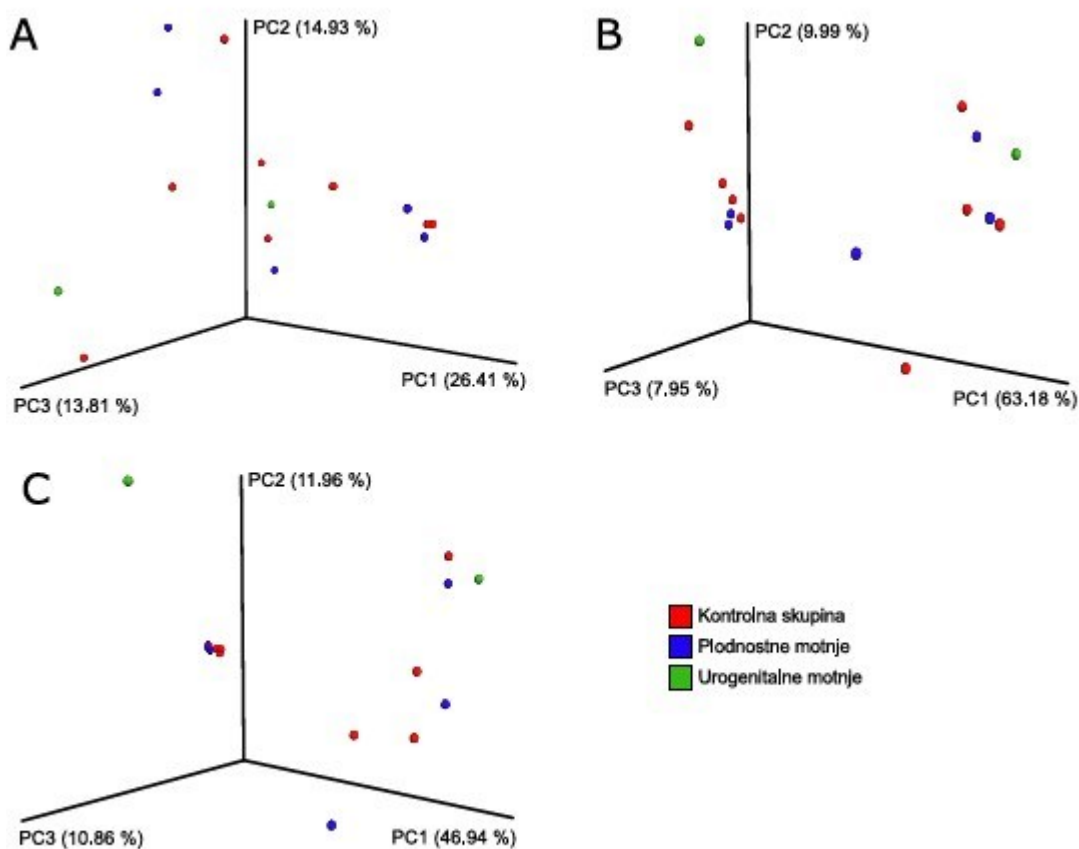
Ker je vzorčenje izrednega pomena pri diagnostiki patogenov, smo, da bi ugotovili kakovost odvzema, vzorce brisov testirali z metodo RT-qPCR za detekcijo evkariontske ribosomalne 18S RNA. Nižje vrednosti Ct predstavljajo večjo količino evkariontskih celic v vzorcu in s tem bolj kakovostno odvzet vzorec. Rezultati za posamezne vzorce so prikazani v prilogi 6. Razlika v povprečni vrednosti Ct med vaginalnimi brisi in brisi prepucija je za 2 Ct nižja za brise prepucija, kar pomeni, da je bilo v brisih prepucija za 5,7-krat več biološkega materiala (razlika za 3,2 Ct predstavlja 10-kratno razliko v količini vzorca). Povprečna vrednost za vaginalne brise je 24 Ct s standardno deviacijo 3,1 in za brise prepucija 22 Ct s standardno deviacijo 3,7 (vzorec z oznako 26 je bil zaradi zelo izstopajoče vrednosti Ct pri izračunu izločen). Ugotovili smo, da je kakovost odvzetih vzorcev primerljiva in da ni povezave med količino 18S RNA v vzorcu in rezultati PCR ali kakovostjo določenega nukleotidnega zaporedja.

4.7 Analiza metagenoma

V 48 testiranih vzorcih smo metagenomsko analizo, ki temelji na pomnoževanju in primerjanju variabilne regije V4 gena 16S rRNA, uspešno opravili pri 15 vzorcih, ki so imeli zadostno količino genetskega materiala. Rezultate nam je uspelo dobiti za 2 vzorca iz skupine z obolenji sečil in spolovil, za 5 vzorcev iz skupine s plodnostnimi motnjami in za 8 vzorcev iz kontrolne skupine. Analiziranih je bilo 10 vzorcev, ki so bili pozitivni z metodo PCR – mikoplazme, s katero določamo različne vrste bakterij iz rodu *Mycoplasma* in rodu *Ureaplasma*, in 5 vzorcev, ki so bili negativni z omenjeno metodo. V 9/10 (90 %) pozitivnih vzorcev na mikoplazme smo tudi z metagenomsko analizo potrdili prisotnost teh bakterij v vzorcih. V 9 vzorcih je bil zaznan različen odstotek mikoplazem (od 0,01 % do 90,85 %), ki vključuje nekatere vrste iz rodu *Mycoplasma*, pa tudi iz

rodu *Ureaplasma*. V enem vzorcu, v katerem smo z obema metodama PCR (nespecifični in specifični za *M. canis*) pomnožili odseke genoma mikoplazem, nam z metagenomsko analizo ni uspelo potrditi mikoplazem. Rezultati metagenomske analize se v 73 % (11/15) ujemajo z rezultati specifične metode PCR za *M. canis* za določanje prisotnosti *M. canis* v vzorcu. V enem vzorcu smo *M. canis* potrdili s konvencionalnimi PCR, medtem ko so bili rezultati metagenomske analize negativni na mikoplazme. Obratne rezultate pa smo dobili v 20 odstotkih (3/15) primerov, ko smo *M. canis* določili z metagenomsko analizo, ni nam pa je uspelo potrditi s PCR za *M. canis* ali z določanjem nukleotidnega zaporedja. Delež *M. canis* v teh treh vzorcih je bil različen, v vzorcu z oznako pacienta št. 24 je bil 0,01-odstoten, v vzorcu pacienta št. 30 0,23-odstoten in v vzorcu pacienta št. 50 0,24-odstoten. Pri vseh teh vzorcih so v analizirani mikrobni združbi prevladovalle druge mikoplazme, v vzorcu pacienta št. 24 je prevladovala bakterija *Ureaplasma canigenitalium* s 75,9-odstotnim deležem, v vzorcu pacienta št. 30 je bilo največ *M. cynos* s 66-odstotnim deležem kot tudi v vzorcu pacienta št. 50 z 90-odstotnim deležem. Rezultati analize, pri katerih so bile v vzorcu določene bakterije iz rodu *Mycoplasma*, so prikazani v prilogi 6. Celotna analiza metagenoma pri analiziranih pacientih je prikazana v prilogi 7.

Raznolikost beta oz. podobnost med celotnimi preiskovanimi mikrobnimi združbami smo grafično predstavili s tridimenzionalno analizo glavnih komponent, pri čemer smo kot mere za podobnost med vzorci uporabili razdalje Bray-Curtis tako med vrstami (filtrirana taksonomska preglednica) kot tudi med moduli in encimi KEGG (relativna zastopanost modulov/encimov KEGG). Analiza je torej temeljila na sestavi bakterijskih združb in njihovi predvideni funkciji. Analiza glavnih komponent je pokazala, da se preiskovani vzorci niso razvrščali v gruče glede na preiskovane skupine (Slika 13). Z drugimi besedami: sestava in funkcija bakterijske združbe v preiskovanih vzorcih nista bili dovolj informativni za razvrščanje vzorcev v gruče glede na preiskovane skupine.



Slika 13: Tridimenzionalna analiza metagenoma

Tridimenzionalna analiza glavnih komponent, ki predstavlja podobnost med bakterijskimi združbami v 15 preiskovanih vzorcih. Analizo smo izvedli na osnovi razdalj Bray-Curtis med vrstami (taksonomija) (A), moduli KEGG (B) in encimi KEGG (C). Vzorci so obarvani glede na preiskovano skupino. PC1, PC2 in PC3 so osi analize glavnih komponent in pojasnijo določen odstotek razpršenosti v analiziranih podatkih.

Figure 13: Three-dimensional metagenomic analysis

Three-dimensional analysis of the main components, representing the similarity between the bacterial communities in the 15 samples examined. The analysis was performed based on Bray-Curtis distances between species (taxonomy) (A), KEGG modules (B) and KEGG enzymes (C). The samples are stained according to the investigation group. PC1, PC2, and PC3 are the axes of principal component analysis and explain a certain percentage of dispersion in the analyzed data.

4.8 Ugotavljanje specifičnih protiteles z metodo DIBA

Prisotnost specifičnih protiteles z metodo DIBA smo ugotavljali v vseh 55 zbranih serumih od vseh 52 pacientov (52 serumov ob vključitvi v raziskavo in 3 serumi po končanem zdravljenju). Uporabili smo 5 različnih sevov mikoplazem: *M. canis Larissa*, *M. canis PG14*, *M. cynos 896*, *M. cynos 2296* in *M. molare*.

Pri 54/55 (98 %) pacientov smo zabeležili pozitivno reakcijo na vsaj enega od izbranih sevov *M. canis*. Pri vseh pacientih, razen pri dveh iz kontrolne skupine, smo zabeležili reakcijo na sev *M. canis Larissa*.

V skupini psov z obolenji sečil in spolovil so bili 3 pacienti, ki so bili z metodo PCR pozitivni na *M. canis*, 3 negativni in 1 pozitiven na druge mikoplazme. Pri 1 od 3 pacientov (33 %), pozitivnih z metodo PCR na *M. canis*, smo zaznali reakcijo na sev *M. canis PG14*, pri ostalih 2 (66 %) pa reakcije na ta izbrani sev nismo zaznali. Pri pacientih, ki so bili bodisi negativni ali pa pozitivni na druge mikoplazme z metodo PCR (4/7, 57 %), smo zabeležili pozitivno reakcijo na sev *M. canis PG14* (Fisherjev eksaktni test, $P = 1$).

V skupini psov s plodnostnimi motnjami je bilo 6 pacientov, ki so bili z metodo PCR pozitivni na *M. canis* in pri nobenem nismo zabeležili pozitivne reakcije na sev *M. canis PG14*. Od ostalih 8 pacientov, ki so bili bodisi negativni ali pa pozitivni na druge mikoplazme z metodo PCR, pa samo pri 1 pacientu (1/8, 12 %) nismo zabeležili pozitivne reakcije na *M. canis PG14* (Fisherjev eksaktni test, $P = 0,229$).

V kontrolni skupini je bilo 6 pacientov, ki so bili z metodo PCR pozitivni na *M. canis*, od katerih je polovica pacientov (3/6, 50 %) imela pozitivno reakcijo na sev *M. canis PG14*, polovica (3/6, 50 %) pa ne. Eden od 9 pacientov, pozitivnih na druge mikoplazme z metodo PCR, ni imel pozitivne reakcije na sev *M. canis PG14*, ostali (8/9, 89 %) pa so pozitivne reakcije na izbrani sev imeli. Pri negativnih pacientih pa jih je 11/14 (78 %) imelo pozitivno reakcijo na sev *M. canis PG14*.

Tabela 20: Pozitivni DIBA rezultati na različno število sevov
 Table 20: Positive DIBA results on different number of strains

izbrani sevi	pozitivni DIBA rezultati na različno število sevov						skupaj
	ni reagiralo	1	2	3	4	5	
<i>M. canis Larissa & PG14</i>	1 (2 %)	18 (33 %)	36 (65 %)				55
<i>M. cynos 896 & 2296</i>	16 (29 %)	18 (33 %)	21 (38 %)				55
<i>M. molare</i>	33 (60 %)	22 (40 %)					55
<i>M. cynos (896 & 2296) & M. molare</i>	14 (25 %)	15 (27 %)	11 (20 %)	15 (27 %)			55
<i>vseh 5 izbranih sevov</i>	1 (2 %)	9 (16 %)	10 (18 %)	11 (20 %)	10 (18 %)	14 (25 %)	55

Rezultati pozitivnih reakcij samo na oba izbrana seva *M. canis Larissa* in *M. canis PG14* so prikazani v tabeli 21.

Tabela 21: Pozitivne DIBA reakcije na oba seva *M. canis*
 Table 21: Positive DIBA reactions to both *M. canis* strains

skupina	rezultati DIBA testiranja				
	št. testiranih vzorcev	št. pozitivnih samo na <i>M. canis Larissa</i>	št. pozitivnih samo na <i>M. canis PG14</i>	št. pozitivnih na oba seva <i>M. canis</i>	skupaj pozitivnih na <i>M. canis</i>
obolenja sečil in spolovil	7	2	0	5	7
plodnostne motnje	14	7	0	7	14
kontrolna skupina	31	6	1	23	30
skupaj	52	15	1	35	51

V prilogi 8 so združeni rezultati PCR preiskave, testiranja z metodo DIBA in metagenomske analize.

Prav tako smo po terapiji 3 pacientom (1 samec iz skupine z obolenji sečil in spolovil ter samec in samica iz skupine s plodnostnimi motnjami) z metodo DIBA ugotavljali prisotnost specifičnih protiteles (Tabela 22).

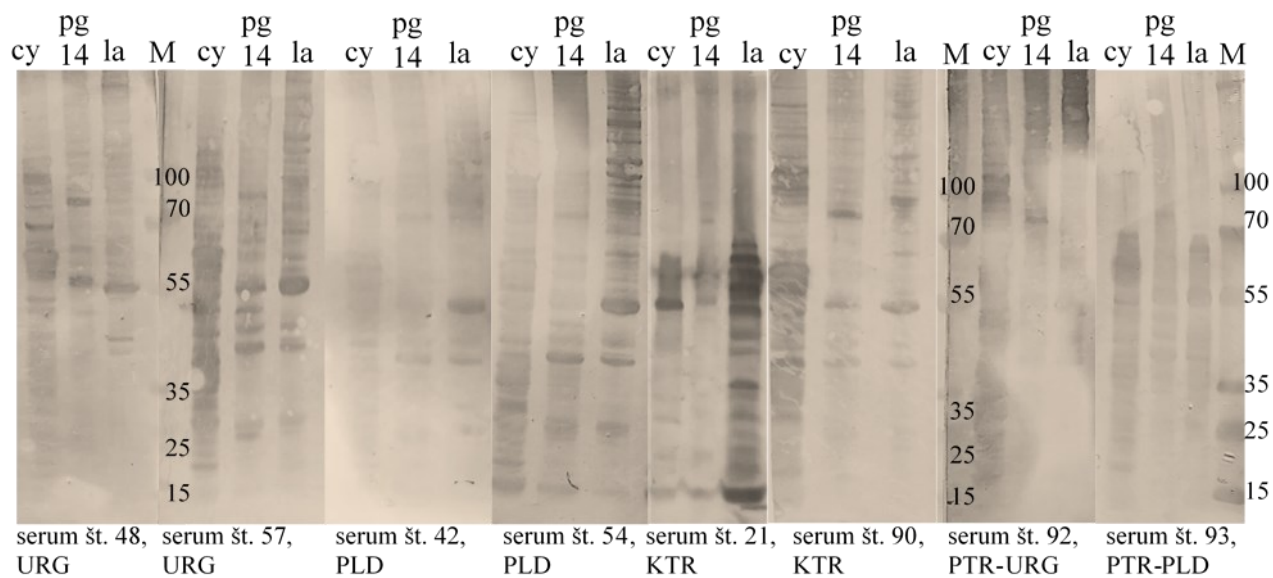
Tabela 22: DIBA rezultati pred in po zdravljenju
Table 22: DIBA results before and after treatment

skupina/pacient	DIBA pred zdravljenjem	DIBA po zdravljenju
obolenja sečil in spolovil, pacient št. 2	<i>M. canis Larissa</i>	<i>M. canis Larissa</i> in <i>M. cynos 896</i>
plodnostne motnje, pacient št. 12	<i>M. canis Larissa</i>	<i>M. canis Larissa</i> in <i>M. cynos 896</i>
plodnostne motnje, pacient št. 13	<i>M. canis Larissa</i> , <i>M. cynos 896</i> in <i>M. cynos 2297</i>	<i>M. canis Larissa</i> , <i>M. canis PG14</i> in <i>M. cynos 896</i>

4.9 Potrditev prisotnosti protiteles v serumih z metodo analize po Westernu

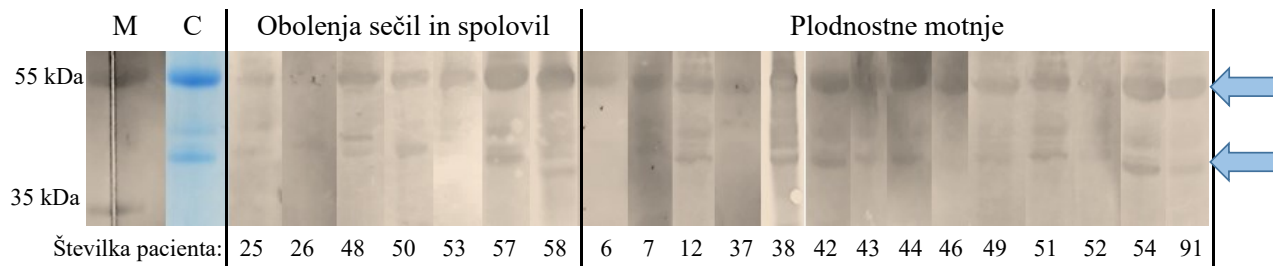
V izbranih serumih smo preverjali prisotnost protiteles, ki specifično reagirajo s proteini pasjih mikoplazem mase od 15–130 kDa. Testirali smo vseh 7 serumov pacientov iz skupine z obolenji sečil in spolovil, vseh 14 serumov pacientov iz skupine s plodnostnimi motnjami, vse 3 serume, pridobljene po terapiji, in 9 serumov iz kontrolne skupine.

Reakcije so bile prisotne tako pri sevu *M. canis Larissa*, ki je visoko virulenten sev, kot tudi pri tipskem sevu *M. canis PG14*. Protitelesa v serumih so se vezala tudi na proteine seva *M. cynos 896*, bodisi zaradi navzkrižne reaktivnosti bodisi zaradi sočasne/predhodne okužbe živali z *M. cynos* (Slika 14). Najbolj je izstopala reakcija s proteinoma mase 55 kDa in približno 40 kDa (označena s puščico na sliki 15), ki je bila prisotna pri vseh testiranih serumih iz skupine psov z obolenji sečil in spolovil in skupine s plodnostnimi motnjami.



cy – *M. cynos* 896, pg14 – *M. canis* PG14, la – *M. canis* Larissa, M – molekularni označevalec, URG – skupina z obolenji sečil in spolovil, PLD – skupina s plodnostnimi motnjami, KTR – kontrolna skupina, PTR – po končani terapiji

Slika 14: Reakcije protiteles v serumih psov s specifičnimi proteini *M. canis* in *M. cynos*
 Figure 14: Antibody reactions in dog sera with specific proteins of *M. canis* and *M. cynos*



M – molekularni označevalec, C – barvanje proteinov na membrani PVDF z barvilom Coomassie Brilliant Blue

Slika 15: Reakcija protiteles s proteinoma mase 55 kDa in približno 40 kDa
 Figure 15: Reaction of antibodies with proteins of mass 55 kDa and approx. 40 kDa

5 RAZPRAVA

5.1 Plodnostne motnje

5.1.1 Samci

V primerjavi s humano medicino, kjer je poleg ocenjevanja semena genetsko testiranje sestavni del zdravljenja moške neplodnosti, je v veterinarski medicini malo znanega o specifičnih opažanjih ali ugotovitvah pri ocenjevanju semena in niti ni znano, ali so te ugotovitve tudi vzrok neplodnosti pri psih. Podatki, ki jih zberemo s pregledom semenske tekočine, in pregled, ki ga opravi veterinar pri samcu s plodnostnimi težavami, ne zadoščajo, da bi parametre med seboj lahko povezali in samca označili kot plodnega ali neplodnega (79), zato še vedno ostaja visok odstotek (70–74 %) primerov neplodnosti pri psih nepojasnen (8). Kljub obstoju objektivnih metod za ocenjevanje sperme, s katerimi lahko potrdimo kvaliteto (dobra/slaba sperma), bo v prihodnosti treba standardizirati fiziološke parametre sperme/semencic, da bi lahko rezultate interpretirali pod enotnimi merili (80). Semenska tekočina s spermiji, ki jo pregledamo ob odvzemu, namreč ne kaže lastnosti, kot jih bo imela pri prehodu skozi spolovila samice pri naravni osemenitvi (79).

V skupini psov s plodnostnimi motnjami smo pri enem samcu od štirih (25 %), ki ni imel spolnega nagona in z digitalno manipulacijo ni dajal semena, s specifično metodo PCR potrdili *M. canis* v prepucialnem brisu. Pri ostalih 3 samcih (75 %) v semenski tekočini nismo našli semenčic. Pri 2 pacientih, ki sta bila negativna na *M. canis*, smo z nespecifično metodo PCR kot tudi z metagenomsko analizo potrdili različne druge mikoplazme tako v prepucialnih brisih kot tudi v semenski tekočini (81). S kliničnim in ultrazvočnim pregledom pri vključenih samcih nismo ugotovili nobenih odstopanj, anatomskih nepravilnosti ali nevroloških disfunkcij, ki bi glede na literaturne podatke lahko prispevali k razlagi neplodnosti (82). Prav tako ni bilo odstopanj v hematoloških in biokemijskih parametrih. Kot možen vzrok za zmanjšano kakovost semena in moteno spermatogenezo literatura navaja tudi okužbo z *Babesia canis*. Na motnje v spermatogenezi naj bi vplivala predvsem povišana telesna temperatura v akutni fazi okužbe (83). Izsledki novejših raziskav, tako pri ljudeh kot pri psih, kažejo na možnost upada kakovosti semena in povečano pogostnost raka na modih v povezavi z izpostavljenostjo različnim kemičnim snovem (ftalat DEHP in poliklorirani bifenili) v okolju, ki direktno škodljivo vplivajo na razvoj plodu (84). Pri samcu, pozitivnem na *M. canis*, pri katerem smo ugotovili izostanek spolnega nagona, je eden

od možnih vzrokov lahko psihološke narave (obisk veterinarja, drugo okolje, neznani ljudje) ali pa samec preprosto ni zainteresiran za določeno samico (85). V raziskavi Doig in sodelavci (9) poročajo, da so *M. canis* izolirali pri 46 odstotkih (12/26) psov s plodnostnimi motnjami. Razlika med plodnimi in neplodnimi je bila značilna le pri samcih (9). V naši raziskavi je odstotek pozitivnih bistveno nižji (1/4, 25 %), vendar so rezultati zaradi majhnega števila preiskovanih živali neprimerljivi.

Pri pacientih iz skupine s plodnostnimi motnjami, ki so bili pozitivni na *M. canis* (6/14, 43 %), z metodo DIBA pri nobenem pacientu nismo ugotovili reakcije na sev *M. canis* PG14. Pri ostalih 8 pacientih, ki so bili bodisi negativni ali pa pozitivni na druge mikoplazme z metodo PCR (8/14, 57 %), pa samo pri enem nismo zabeležili pozitivne reakcije na sev *M. canis* PG14, vendar razlika ni bila značilna ($P = 0,229$). Tako kot v skupini psov z obolenji sečil in splolovih so tudi vsi pacienti iz skupine s plodnostnimi motnjami, ne glede na rezultat PCR testa, imeli reakcijo na sev *M. canis* Larissa.

V naši raziskavi je bilo v kontrolni skupini 55 odstotkov (17/31) samcev, 12 samcev je bilo intaktnih ter 5 kastriranih. Zanimivo je, da smo z metodo PCR *M. canis* potrdili pri 4/17 (23 %), kar je primerljivo tudi z raziskavo, ki jo je opravil Doig s sodelavci (9), kjer sta bila 2/11 (18 %) psov iz kontrolne skupine pozitivna na *M. canis*. Prisotnost *M. canis* še nujno ne pomeni tudi obolenja z izraženimi kliničnimi znaki. Prav prepoznavanje in odkrivanje latentnih okužb predstavlja največji izziv. V prihodnje bo treba raziskave usmeriti v prepoznavanje atipičnih kliničnih in laboratorijskih kazalnikov obolenja na biokemijskem ali genetskem nivoju ter uvesti ustrezne protokole zdravljenja. Redno in pogosto spremljanje prisotnosti povzročitelja v korelaciji s spremljanimi parametri bi, verjamemo, lahko prispevalo k pravočasnemu odkrivanju tudi virulentnejših sevov *M. canis* in njihovih specifičnih lastnosti (81). V bodoče bi bilo smiselno raziskave usmeriti v preučevanje same *M. canis* in mehanizme, ki jih bakterija uporablja za vzpostavitev okužbe v sečilih in spolovilih psov.

V kontrolni skupini smo 4 samcem odvzeli tudi semensko tekočino in jo testirali z obema metodama PCR. Tako v vzorcih semenske tekočine kot tudi v prepucialnih brisih teh štirih samcev smo s specifično metodo PCR potrdili okužbo z *M. canis* pri 2 samcih (2/4, 50 %) in okužbo z drugimi mikoplazmami pri 1 samcu. Pri starejšem samcu s potrjeno okužbo z *M. canis* se ta ni kazala v odstopanjih glede kakovosti semena. Samec se že vrsto let uspešno pari, celo večkrat letno.

Mlajši samec s potrjeno okužbo *M. canis* pa se še ni paril. Prav tako se samec s potrjeno okužbo z mikoplazmami uspešno pari že več let in daje seme večkrat na leto. Seme so prav tako že shranjevali zamrznjeno in tudi z zamrznjenim semenom so bile paritve, po besedah lastnika, zelo uspešne. Lastniki samcev, ki se uspešno parijo, žal v času raziskave niso pokazali zanimanja za zdravljenje. Prav tako niso privolili v pregled zamrznjenega semena, ki bi nam morda dal več potrebnih informacij za potrditev postavljene hipoteze. S stališča veterinarske stroke je potrjeno okužbo priporočljivo zdraviti ter učinke zdravljenja tudi spremljati (81). Glede na majhno število preiskovanih psov v skupini, ne moremo trditi, da so dani rezultati zadosten dokaz, da *M. canis* nima vpliva na kakovost semena.

Povzročitelja smo dokazovali z metodo PCR v vaginalnih in prepucialnih brisih psov. Gre za enostaven in neinvaziven postopek, specifična metoda PCR za dokazovanje posameznega povzročitelja v kliničnih vzorcih pa je primerna, hitra in zanesljiva (81). Na podlagi molekularnega izvida lahko pacienta, pozitivnega na *M. canis*, začnemo zdraviti nemudoma, kar je velika prednost v primerjavi z gojišnimi preiskavami, ki so dolgotrajne. Z metodo PCR smo pregledali tudi semensko tekočino in ugotovili skladnost rezultatov s prepucialnimi brisi. Da bi dokazali, ali gre za okužbo z *M. canis*, bi bilo smiselno v rutinski protokol pregleda že pred odvzemom semena, umetno paritvijo ali pripustom uvesti pregled prepucialnih brisov z molekularno metodo PCR.

5.1.2 Samice

Neuspešno parjenje pri samicah se navadno ne nanaša na nezmožnost obrejitve, temveč je najpogosteje posledica neustreznega vodenja vzreje in nepopolnega spremljanja ciklusa samice. V primeru ustreznega spremljanja ciklusa in neuspešnega parjenja je treba izključiti še hormonsko neravnovesje, latentne ali kronične infekcijske bolezni, ustreznost prehrane in morebiten vpliv sočasne uporabe nekaterih zdravil, ki lahko povzročajo neplodnost. Težave s plodnostjo se lahko pojavijo tudi kot posledica motenj v fazi estrusa, kot npr. tiha gonitev (psica ne kaže znakov gonitve, ki bi jih lastnik zaznal), podaljšana faza estrusa, ali med brejostjo. Možna vzroka sta še dominantno vedenje samice in stres, povezan z menjavo okolja v času paritve. Čas pripuščanja in dolžina faze estrusa se pri zdravih samicah lahko razlikujeta individualno, pa tudi med posameznimi gonitvami (47).

V skupini s plodnostnimi motnjami smo pregledali 10 samic, od katerih jih je bilo 5 od 10 (50 %) PCR pozitivnih na *M. canis*, 2 pa pozitivni na druge mikoplazme. Podobne rezultate v deležih so dobili Doig in sodelavci (9), ko so pri samicah, ki so imele plodnostne motnje, *M. canis* izolirali v 52 odstotkih (14/27) primerov. Pri samicah v skupini s plodnostnimi motnjami, ki so bile pozitivne na *M. canis*, nismo ugotovili kliničnih ali ultrazvočnih odstopanj, kljub temu pa pri štirih od petih oploditev v preteklosti ni bila uspešna. Pri eni od štirih samic, pozitivni na *M. canis*, se je lastnik odločil za eno od antibiotičnih terapij izbora (doksiciklin 5mg/kg tm na 12 ur 7 dni). Kontrolni bris po zdravljenju je bil negativen. Podatka, ali se je samica po terapiji uspešno parila, nimamo.

Metagenomska analiza je bila opravljena pri 2 samicah iz skupine s plodnostnimi motnjami. Pri prvem pacientu mikoplazem v vzorcu nismo dokazali z nobeno metodo. Pri drugem pacientu smo s klasično metodo PCR potrdili prisotnost mikoplazem, medtem ko mikoplazem nismo potrdili z metagenomsko analizo. Potrdili pa smo druge bakterije: *Haemophilus haemoglobinophilus* v 31,84 odstotka, *Bacteroides pyogenes* v 24,34 odstotka, *Porphyromonas canigingivalis* v 11,37 odstotka ter taksone, ki jim taksonomije za določeno taksonomsko raven nismo mogli nedvoumno pripisati in so opisani kot »drugi«, v 18,89 odstotka (81).

V naši raziskavi je bilo v kontrolni skupini 14 samic, *M. canis* smo potrdili pri 14 odstotkih (2/14), kar je primerljivo z rezultati študije Doig in sodelavci (9), kjer so *M. canis* pri samicah izolirali v 13 odstotkih (2/16) v kontrolni skupini.

Tamiozzo (86) v študiji iz leta 2021 opisuje primer neplodnosti, povezan s prisotnostjo bakterij *M. spumans* in *M. maculosum* v psarni bernskih planšarskih psov, dokazanih z metodo PCR in sekvencioniranjem iz vzorcev vaginalnih brisov. Samice so bile neuspešno parjene, pri samcu pa so pri analizi semenske tekočine ugotovili nizko število negibljivih semenčic, 100 odstotkov mrtvih semenčic, pri katerih so v 70 odstotkih ugotovili nepravilnosti na glavi, sredici ali repu. Po 15-dnevem zdravljenju z doksiciklinom in 9-dnevem zdravljenju z azitromicinom so se samice obrejile in rezultati analize semenske tekočine so bili v mejah normale. Glede na uspešnost parjenja po zdravljenju avtor sklepa, da so težave s plodnostjo posledica prav okužbe s tema vrstama mikoplazem (86). *M. maculosum* smo skupaj z *M. canis* potrdili le pri enem klinično zdravem pacientu iz kontrolne skupine. V vzorcu smo s specifično metodo PCR (PCR za *M. canis*) potrdili *M. canis*, prav tako smo z nespecifično metodo PCR, s katero pomnožujemo odseke genoma za ribosomalno 23S RNA različnih bakterij iz rodu *Mycoplasma*, vključno z *M. canis* in rodu

Ureaplasma, pomnožili produkt ustrezne dolžine. S primerjavo BLAST smo določenemu nukleotidnemu zaporedju ugotovili 99-odstotno podobnost z *M. maculosum*. Pri istem pacientu smo z metagenomsko analizo poleg drugih bakterij določili 10,7-odstotni delež *M. canis* in 0,09-odstotni delež *M. cynos*, kar potrjuje pravilnost specifične metode PCR.

5.2 Obolenja sečil in spolovil

Etiološki dejavniki relativno pogostih vnetnih in funkcionalnih obolenj sečil in spolovil psov ostanejo pogosto nedokazani. Eden od mogočih vzrokov, ki se zdi podcenjen, je lahko tudi latentna, subklinična ali klinično zaznavna okužba z *M. canis*.

Okužba sečil je opredeljena kot kolonizacija, pritrditev, razmnoževanje in vztrajanje mikrobnega povzročitelja vnetja v sečilih (43). Pojavi se kot posledica oslabljenih obrambnih mehanizmov gostitelja, ki virulentnim mikrobom omogoči lažjo pričvrstitev na sluznice in razmnoževanje. Obrambni mehanizem gostitelja vključuje nespecifično odpornost, kamor spada fiziološko (normalno) uriniranje, pravilne anatomske strukture, sluznice kot zunanja prepreka, sestava urina in kompetenten imunski sistem.

Najpogostejši povzročitelji okužbe sečil so bakterije, redkeje glive ali virusi (42). Okužba je lahko omejena samo na del sečil (npr. ledvični meh, sečevod, sečni mehur, sečnica, nožnica), pogosteje pa je zajetih več segmentov sečil. Od mesta okužbe so odvisni izbor protimikrobnega sredstva, čas zdravljenja in spremljanje odziva (43). Večina bakterijskih okužb sečil je posledica kontaminacije s črevesnimi bakterijami skozi prosto dostopna vstopna mesta in njihovega prehajanja retrogradno po celotnem sistemu do ledvic (42). Z namenom uspešnega zdravljenja in skrbi za preprečevanje razvoja rezistentnih bakterijskih sevov v veterinarski medicini uporabljamo strokovne smernice Mednarodnega združenja za nalezljive bolezni družnih živali (ISCAID) za diagnosticiranje in zdravljenje bakterijskih okužb sečil pri psih in mačkah (87). Okužbe sečil lahko potekajo asimptomatsko ali pa z bolj ali manj izrazitimi kliničnimi znaki, odvisno od povzročitelja in njegove virulentnosti, lokalizacije, razširjenosti in trajanja procesa, imunskega odgovora ter morebitnih pridruženih bolezni. Najpogosteje se okužbe spodnjih sečil in prostate kažejo s polakiurijo, disurijo, hematurijo in oligurijo. Okužbi zgornjih sečil se lahko pridruži tudi trebušna bolečina in poliurija (43). Pri psih z okužbo sečil najpogosteje izoliramo samo eno vrsto bakterij

(75 %), redkeje dve vrsti (v 20 %), tri in več pa pri približno 5 odstotkih okužb. Najpogosteje izolirana bakterija je *Escherichia coli*, sledijo gram-pozitivni koki, nato pa različni sevi iz rodov *Proteus*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*.

Mikoplazme so iz urina psov s kliničnimi znaki vnetja spodnjih sečil izolirane v manj kot 5 odstotkih vzorcev (42), kar ne zmanjšuje nujno njihovega pomena.

V naši raziskavi je bilo v skupino psov z obolenji sečil in spolovil vključenih 7 psov s predhodnimi okužbami spodnjih sečil, zdravljenimi z antibiotiki izbora po priporočilih Weeseja in sodelavcev (87). Lastniki vseh 7 pacientov so poročali o pogostejšem uriniranju, občasni hematuriji in pri eni intaktni samici tudi o občasno prisotni bolečini ob uriniranju. Pacientom smo urin odvzeli s kateterizacijo, ki je v klinični praksi najpogostejši način vzorčenja. Pričakovano smo v skupini psov z obolenji sečil in spolovil potrdili značilno pogostejšo bakteriurijo ($P = 0,039$) v primerjavi s skupino s plodnostnimi motnjami in kontrolno skupino. Poleg tega je pričakovano pri skupini z obolenji sečil in spolovil, v primerjavi z drugima dvema skupinama, statistično značilno pogostejša tudi hematurija ($P = 0,015$). Pri psih s potrjeno okužbo z *M. canis* smo pogosteje zaznali blago bilirubinurijo, ki ji pri psih ne pripisujemo kliničnega pomena, saj to pogosto ugotovimo pri bolj koncentriranem urinu, še posebej pri samcih, in je posledica nižjega ledvičnega praga za bilirubin (88, 89). Bilirubinurija je sicer lahko posledica hemolize, jetrnih bolezni, ekstrahepatične biliarne obstrukcije, vročinskih stanj ali obdobji daljšega stradanja (90), kar smo pri naših pacientih v času vključitve v raziskavo izključili. Naša preiskovana skupina psov z obolenji sečil in spolovil je bila majhna, zajemala je samo 7 pacientov. Zato bilirubinurija, ki je bila zaznana, morda ni ključni pokazatelj ali indikator, da je pri psu prisotna okužba z *M. canis*. Kljub značilnim odstopanjem v koncentraciji hemoglobina ($P = 0,022$) in kreatinina ($P = 0,014$) pri psih s potrjeno okužbo z *M. canis* v primerjavi z negativnimi primerjava nima diagnostične vrednosti, saj so bile vse vrednosti znotraj referenčnih.

Izsledki kliničnih raziskav pri psih z obolenji sečil o prisotnosti *M. canis* v urinu s pomočjo gojiščne preiskave so zelo različni. V turški raziskavi so v vzorcu 100 vključenih psov le pri 4 uspešno izolirali *M. canis* (3), nasprotno pa L'Abée-Lund in sodelavci poročajo, da jim je čisto kulturo *M. canis* uspelo izolirati pri 7/9 psov (5). Po okužbi se mikoplazme pritrdijo na sluzničnih površinah, pa tudi v spodaj ležečih tkivih, zato vzorec urina morda ni najprimernejši za določanje števila mikroorganizmov in ugotavljanja prisotnosti okužbe z mikoplazmami (5). Okužba sama po

sebi še ne pomeni obolenja s prisotnostjo kliničnih znakov, ker je *M. canis* prisotna tudi v sečilih in spolovilih klinično zdravih živali (3). To smo potrdili tudi v naši raziskavi, saj smo okužbo z *M. canis* potrdili pri 19 odstotkih (6/31) zdravih psov iz kontrolne skupine.

Z metodo PCR smo okužbo z *M. canis* potrdili pri 43 odstotkih (3/7). Pri PCR pozitivnih pacientih nismo zaznali odstopanj v kliničnih parametrih oz. so bila ta odstopanja primerljiva z odstopanji pri PCR negativnih pacientih. Metagenomska analiza je bila opravljena pri dveh vzorcih iz skupine psov z obolenjem sečil in spolovil. S specifično metodo PCR sta bila oba vzorca negativna na *M. canis*, prav tako z metagenomsko analizo nismo potrdili *M. canis* v teh dveh vzorcih. Ugotovili pa smo visok delež bakterij (*Streptococcus canis* in *Proteus mirabilis*), ki sta pogosto izolirani iz urina psov z okužbo sečil (42).

Uporaba konsenzus/vrstno nespecifičnih PCR metod, ki temeljijo na pomnoževanju ohranjenih regij, kot so odseki genoma za 16S rRNA in 23S rRNA, se uporabljajo za številne filogenetske študije in se predvidoma uporabljajo za pomnoževanje DNA iz čistih bakterijskih kultur oz. kolonij (75). Tradicionalno določanje nukleotidnega zaporedja po Sangerju omogoča detekcijo individualne vrste in zaradi tega ni najprimernejše za kompleksne vzorce, kjer je lahko prisotna mešanica različnih mikroorganizmov (91). To smo potrdili tudi v naši študiji, saj smo z metodo določanja nukleotidnega zaporedja *M. canis* uspešno potrdili le v 60 odstotkih vzorcev. Prav z namenom določanja različnih mikrobnih združb v različnih vzorcih so razvili tehniko sekvenciranja nove generacije (NGS), ki omogoča metagenomske analize (91). Pri določanju *M. canis* smo v analiziranih vzorcih z metagenomsko analizo, na osnovi V4 regije ribosomalne 16S RNA, to bakterijo dokazali v 3 vzorcih več kot z izbrano specifično metodo PCR za detekcijo *M. canis*. Slaba stran metagenomske analize je, da moramo za preiskavo imeti v vzorcu dovolj genetskega materiala, v našem primeru smo le pri 15 pacientih od 48 uspeli analizirati vzorce. Prav tako je še vedno težava v dostopnosti in ceni, ko gre za individualne vzorce, vendar se z optimizacijo in razvojem tehnologije ta situacija zelo hitro izboljšuje. Negativne rezultate lahko dobimo tudi v primeru, če se patogeni mikroorganizmi ne razmnožujejo ali pa je razmnoževanje zavrto.

Pri pacientih iz skupine z obolenji sečil in spolovil, ki so bili pozitivni na *M. canis* (3/7), smo z metodo DIBA zaznali reakcijo na sev *M. canis* PG14 samo pri 1 pacientu, pri ostalih 2 pa reakcije na ta izbrani sev nismo zaznali. Pri ostalih 4 pacientih, ki so bili bodisi negativni ali pa pozitivni

na druge mikoplazme z metodo PCR (4/7, 57 %), pa smo sicer zabeležili pozitivno reakcijo na sev *M. canis* PG14, vendar razlika ni bila značilna ($P = 1$). Ugotovili smo, da so vsi pacienti iz skupine z obolenji sečil in spolovil, ne glede na rezultat PCR testa, imeli reakcijo na sev *M. canis* Larissa. V raziskavi, ki smo jo opravili pri nas v letih 2008 in 2009, smo pri 34 delovnih psih brez kliničnih znakov obolenj specifična protitelesa proti vsaj eni mikoplazmi dokazali kar pri 32/34 (94,1 %) psih, 7/34 psov (20,6 %) je bilo pozitivnih samo na *M. canis*, 8/34 psov (23,5 %) je bilo pozitivnih samo na *M. cynos*, nobeden pa ni bil pozitiven samo na *M. molare* (41). V naši raziskavi je v kontrolni skupini samo 1 pacient, pri katerem nismo zaznali reakcije na noben izbrani sev, na vsaj enega od 5 zbranih sevov je reagiralo 96,8 odstotka (30/31) serumov, kar je primerljivo z omenjeno raziskavo. Na vsaj 1 od 2 izbranih sevov *M. canis* je reagiralo 96,8 odstotka (30/31) preiskovanih serumov, na vsaj 1 od 2 izbranih sevov *M. cynos* je reagiralo 84 odstotkov (26/31) serumov in samo na sev *M. molare* je reagiralo 52 odstotkov (16/31) zbranih serumov. Ugotovili smo večji odstotek pozitivnih reakcij kot v omenjeni raziskavi (41). Predvidevamo lahko, da je velik odstotek psov, ki so pozitivno reagirali v testu DIBA, najverjetneje posledica navzkrižne reakcije med različnimi mikoplazmami in da gre najverjetneje za proteine z ohranjenim zaporedjem, kar povzroči navzkrižno vezavo protiteles iz serumov. Obstaja možnost, da so se psi, ki so bili vključeni v našo raziskavo in pri katerih smo zaznali reakcije v testu DIBA ne samo na dva seva *M. canis*, ampak tudi na preostale tri izbrane seve, v preteklosti že okužili z mikoplazmami in razvili protitelesa. Rycroft in sodelavci (40) poročajo o seroloških dokazih okužbe z *M. cynos* pri nalezljivi okužbi dihal pri psih. Odvzeli so parne serume ter dokazali protitelesa proti tipskemu sevu *M. cynos* z metodo po Westernu. Imunodominantni antigen v velikosti 45 kDa je bil jasno izražen na membrani PVDF. Ko so primerjali vrednost povečanja protiteles na eni strani s psi, ki so imeli znake okužbe dihal, in na drugi strani s tistimi, ki niso zboleli, je bila razlika značilna. Ugotovitev kaže, da je pojavnost protiteles proti *M. cynos* verjetnejša pri psih, ki kažejo klinične znake bolezni. Pri treh psih, ki niso zboleli, so prvi dan zaznali protitelesa proti *M. cynos*, kar kaže na možnost pretekle izpostavljenosti temu povzročitelju.

Z namenom potrditve prisotnosti protiteles v serumih, ki specifično reagirajo s proteini pasjih mikoplazem, smo uporabili metodo po Westernu. Testirali smo vseh 7 serumov pacientov iz skupine z obolenji sečil in spolovil, vseh 14 serumov pacientov iz skupine s plodnostnimi motnjami, 3 serume (samec iz skupine z obolenji sečil in spolovil ter samec in samica iz skupine s

plodnostnimi motnjami), dobljene po terapiji, ter 9 serumov iz kontrolne skupine. Najbolj je izstopala reakcija s proteinoma v velikosti 55 kDa in približno 40 kDa, ki je bila prisotna pri vseh testiranih serumih iz skupine psov z obolenji sečil in spolovil in pri psih iz skupine s plodnostnimi motnjami (81). Identifikacija imunogenih proteinov nam lahko posreduje nove podatke o mehanizmih patogenega delovanja bakterije znotraj gostitelja, hkrati pa omogoča uvedbo nove metodologije za potrjevanje aktivne okužbe bodisi v serološki bodisi v molekularni diagnostiki. Berčič in sodelavci (92) opisujejo deset predhodno neidentificiranih glavnih proteinov *M. synoviae*, ki sodelujejo pri presnovi in predelavi beljakovin, ter tri domnevne lipoproteine. Med drugim opisujejo približno 43 kDa velik protein, identificiran kot elongacijski faktor EF-Tu, ki sodeluje pri translaciji proteinov s katalizo vezave aminoacil-tRNA na ribosom, ter dva površinska proteina v velikosti 55 kDa (*tig* sprožilni dejavnik in encim piruvat kinaza), ki sodelujeta pri presnovi sladkorjev in spadata med imunogena proteina *M. synoviae*. Invazivnost mikoplazem je posredovana s površinskimi adhezini in njihovimi pomožnimi proteini, kapsularnimi polisaharidi, invazivnimi encimi in biofilmom (22). Vsi dejavniki skupaj omogočajo njihovo vzpostavitev, razmnoževanje in širjenje *in vivo* (22). Adhezija je začetni in bistveni korak za kasnejšo kolonizacijo in okužbo, izguba adhezijske aktivnosti pa zmanjša patogenost večini mikoplazem (18). Tudi Robinson in sodelavci (93) opisujejo približno 40 kDa velik površinski protein iz prašičjega respiratornega patogena *M. hyopneumoniae*. Ta površinsko dostopna aminopeptidaza deluje skupaj z endoproteazami ter tvori aminokislino in peptide in s tem celici omogoči dostop do potrebnih hranil in omogoči celično proliferacijo. Bao in sodelavci (94) opisujejo približno 53 kDa velik površinski protein enolaza *M. synoviae*, ki je aviarne patogen in lahko povzroči okužbe dihalnih poti in artritis. Ugotovili so, da ima enolaza *M. synoviae* pomembno vlogo pri presnovi in bi lahko vplivala na okužbo in imunost.

Za vzpostavitev okužbe in podaljšano kolonizacijo so pomembni še drugi imunogeni proteini. Sialidaza/nevraminidaza je encim, ki s katalizo hidrolize sialičnih kislin sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa in s tem mikroorganizmu omogoča širjenje in vstop v celice. Na primer, več pasjih mikoplazem, kot so *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare*, izloča sialidazo, strogo celično povezano aktivnost sialidaze pa izločajo *M. alligatoris*, *M. synoviae* in *M. gallisepticum* (29, 33, 95, 96). Številne mikoplazme, med njimi tudi *M. canis*, lahko presnavljajo glicerol kot vir za sintezo ATP in končno proizvodnjo vodikovega peroksida kot virulenčnega dejavnika (97, 98). Z

izražanjem proteinov M, ki vežejo imunoglobuline (angl. *mycoplasma immunoglobulin binding – MIB*), so mikoplazme razvile tudi mehanizme, usmerjene v neposredno ciljanje in inaktivacijo ali uničenje gostiteljevih protiteles (99). Okužba z mikoplazmami lahko povzroči širok razpon kliničnih izidov, odvisno od vrste, okuženega posameznika in pojava drugih sočasnih okužb (10, 100). Večina mikoplazem ne izloča toksinov in zdi se, da je patogenost v veliki meri posledica vnetne reakcije gostitelja in celičnih poškodb, povezanih s proizvodnjo reaktivnih kisikovih zvrsti. Ko okužbo z mikoplazmo potrdimo, je ta najverjetneje že postala kronična kljub na videz normalnemu imunskemu odzivu, v katerega so vključeni tako celično posredovani kot humoralni mehanizmi. Odziv protiteles na okužbe z mikoplazmo sledi tipičnemu poteku: specifične IgM odkrijemo v prvem tednu okužbe, čemur sledi proizvodnja visokih titrov specifičnih IgG in IgA. Čeprav je v mnogih primerih imunski sistem sposoben nadzorovati okužbo, se lahko mikoplazme v koloniziranih tkivih ohranijo. To opažanje nakazuje, da je lokalni imunski odziv pomembnejši za razvoj imunosti in premagovanje okužbe kot sistemski odziv, zlasti z lokalno proizvodnjo visokih titrov protiteles v sluznicah (99, 101). Pomembna je sposobnost mikoplazem, da uspešno preprečijo humoralni imunski odziv svojega gostitelja, saj lahko te bakterije okužijo nedavno cepljene posameznike in vztrajajo tudi v prisotnosti visokih titrov specifičnih protiteles (99). Številne mikoplazme imajo izraženih več različnih mest/pozicij na genu, ki kodira različice glavnih in imunodominantnih lipoproteinov in so sposobne preklapljati izražanje med temi pozicijami. Tak potek je bil opisan *in vitro*, pa tudi *in vivo* med naravno okužbo. Katero mesto bo mikoplazma v določenem trenutku izbrala, se zdi naključno in protitelesa, ki ciljajo na spremenljive površinske beljakovine, nimajo vpliva na zaviranje rasti mikoplazem (102, 103). Poleg razgradnje protiteles s proteolizo mikoplazme lahko tudi preprečijo prepoznavanje protiteles s strani drugih beljakovin in tako blokirajo s protitelesi posredovane efektorske funkcije. Pri mikoplazmah so odrili celične procese, ki temeljijo na proteinih, ki vežejo imunoglobuline (angl. *immunoglobulin binding proteins – IBP*). IBP najdemo pri več bakterijskih patogenih (99, 104). Zdi se, da so prefinjene strategije, ki jih uporabljajo mikoplazme za neposredno ciljanje na protitelesa, ključne sestavine njihovih interakcij z gostiteljem. Tako protein M kot MIB ponujata mikoplazmam možnost preprečevanja vezave antigena, kritičnega procesa imunskega sistema (99). Dejansko je prva plast obrambe gostitelja imunska izključitev v sluznici, proces, ki temelji na raznolikem naboru naravnih protiteles polireaktivnega sekretornega imunoglobulina A (sIgA). Te imunoglobuline z nizko do

srednjo afiniteto najdemo pri večini vretenčarjev in se nenehno proizvajajo tudi brez imunizacije. Lahko se vežejo na množico tujih antigenov in jih ujamejo v sluznici. Ta mehanizem morajo mikoplazme obiti, da dosežejo površino epitelijskih celic, jo kolonizirajo in na njej ostanejo (99, 105). Razgradnja protiteles bi lahko bila pomemben dejavnik pri vzpostavitvi multikompleksne patogeneze bolezni, ki je pogosto povezana z mikoplazmami. Trenutno ni znano, ali so okužbe z mikoplazmo posledica kolonizacije drugih patogenov ali so sočasne. Leta 2016 so Hirayasu in sodelavci poročali, da je *M. hyorhina* uspelo odcepiti VH domeno nespecifičnih IgM, IgA in IgG, verjetno prek MIB-MIP, pri čemer se je do 50 odstotkov protiteles, prisotnih v gojišču, razgradilo (106). Na podlagi teh podatkov bi lahko domnevali, da kolonizacija mikoplazme učinkovito izčrpa nabor protiteles v sluznici in ustvari *de facto* lokalno imunsko pomanjkljivost, kar olajša okužbo z drugimi patogeni (99).

Za zdravljenje potrjene okužbe z *M. canis* se je odločil le lastnik kastriranega samca. Glede na priporočila je bil terapevtik (13) izbora antibiotik iz skupine fluoriranih kinolonov (enrofloksacin v odmerku 10 mg/kg tm na dan, 7 dni). Po zaključenem zdravljenju je bil prepucalni bris negativen na *M. canis* z metodo PCR, urinski sediment pa je bil negativen na prisotnost bakterij. Žal se za zdravljenje nista odločila lastnika preostalih dveh pozitivnih psov, zato učinkovitosti zdravljenja nismo mogli preveriti.

V dostopni literaturi nismo zasledili, da bi psom z obolenji sečil in spolovil ali ponavljajočimi se vnetji sečil poleg preiskave urina okužbo z *M. canis* dokazovali tudi v brisih sluznic ob hkratnem spremljanju hematoloških in biokemijskih parametrov v krvi ter metagenomsko analizo. Žal pa nam v klinično raziskavo ni uspelo vključiti večjega števila pacientov, kar predstavlja eno od večjih pomanjkljivosti raziskave.

6 ZAKLJUČKI

- Psi z obolenji sečil in spolovil ter sočasno okužbo z *M. canis* nimajo izrazitejših kliničnih znakov primarne bolezni in niso slabše odzivni na zdravljenje s priporočenimi terapijami.
- Okužba z *M. canis* je pogostejša pri psih s plodnostnimi motnjami (6/14, 43 %) v primerjavi s kontrolno skupino (6/31, 19 %).
- Ni nujno, da okužba z *M. canis* povzroči tudi spremembe v spermogramu in da ima negativen vpliv na kakovost semena in posledično neuspešno parjenje in obrežitev samice.
- *M. canis* izzove humoralni imunski odziv, saj smo z metodo DIBA dokazali prisotnost specifičnih protiteles pri 56 odstotkih (31/55) na oba izbrana seva *M. canis*.
- Z metodo detekcije po Westernu smo dokazali, da so protitelesa, prisotna v testiranih serumih, najbolj reagirala s proteini v velikosti 55 kDa in približno 40 kDa tako v skupini psov z obolenji sečil in spolovil kot v skupini psov s plodnostnimi motnjami.
- Za dokončno oceno občutljivosti in specifičnosti testa DIBA ter njegovo uporabo v rutinskih presejalnih testih bi bilo treba metodo dodatno validirati.
- Imunskega odziva gostitelja na kroničnost okužbe z *M. canis* nam ni uspelo preveriti, saj smo serološke reaktorje ugotovili v vseh skupinah, vključno s kontrolno skupino.
- Vsi trije zdravljeni psi so se na terapijo uspešno odzvali.

7 POVZETEK

Namen doktorske naloge je bil razjasniti pomembnost okužbe z *M. canis* pri psih z obolenji sečil in spolovil in pri psih s plodnostnimi motnjami ter oblikovati protokol rutinske diagnostike mikoplazem. V klinično študijo smo vključili 52 psov, od tega 7 psov z znaki obolenj sečil in spolovil, 14 psov s plodnostnimi motnjami in 31 zdravih psov. Pri vseh vključenih pacientih smo poleg rutinskega kliničnega pregleda opravili tudi ultrazvočni pregled sečil in spolovil, odvzeli kri za hematološke in izbrane biokemijske parametre ter opravili analizo urina. Odstopanj pri kliničnem pregledu, hematoloških in biokemijskih parametroh ter analizi urina, ki bi nakazovala, da je pacient okužen z *M. canis*, nismo ugotovili. Prav tako pri ultrazvočnem pregledu nismo ugotovili razlik med pacienti, ki so bili z metodo PCR pozitivni na *M. canis*., ali tistimi, ki so bili negativni. Pozitivnih pacientov na *M. canis* je bilo v kontrolni skupini 6 od 31 (19 %), kar je manj, kot navajajo dosedanje raziskave. V skupini psov s plodnostnimi motnjami je bilo na *M. canis* pozitivnih 6 od 14 (43 %) pacientov, kar pa je primerljivo z rezultati predhodnih raziskav. V skupini psov z obolenji sečil in spolovil so bili na *M. canis* pozitivni 3 od 7 psov (43 %). Zaradi majhnega števila vključenih živali v posameznih skupinah deleži pozitivnih pacientov ne predstavljajo reprezentativnega vzorca za populacijo psov z omenjenimi obolenji. Kljub temu pa rezultati nakazujejo, da je pri pacientih s ponavljajočimi okužbami sečil smiselno izključiti tudi okužbe z mikoplazmami, še posebej z *M. canis*.

Povzročitelja smo dokazovali z metodo PCR v vaginalnih in prepucialnih brisih psov. Postopek je enostaven in neinvaziven, specifična metoda PCR za dokazovanje posameznega povzročitelja v kliničnih vzorcih pa je primerna, hitra in zanesljiva. Pacienta, ki je na podlagi molekularnega izvida pozitiven na *M. canis*, začnemo zdraviti nemudoma, kar je velika prednost v primerjavi z gojiščnimi preiskavami, ki so dolgotrajne. Z metodo PCR smo pregledali tudi semensko tekočino in ugotovili skladnost rezultatov s prepucialnimi brisi. V rutinski protokol pregleda pred odvzemom semena, umetno paritvijo ali pripustom z namenom dokazati, ali gre za okužbo z *M. canis*, bi bilo smiselno uvesti pregled prepucialnih brisov z molekularno metodo PCR.

Z namenom ugotavljanja pojavnosti *M. canis* v kliničnih vzorcih smo poleg metode PCR opravili tudi analizo metagenoma vaginalnih in prepucialnih brisov. Z določitvijo deleža posameznih vrst mikoplazem v preiskovanih vzorcih smo želeli podrobneje spoznati potencialno vlogo mikoplazem na izražanje kliničnih znakov. Omenjenih analiz v dosedanjih raziskavah v povezavi s klinično

diagnostiko nismo zasledili. Uporaba metagenomskih/metataksomskih analiz omogoča enostavnejše določanje mikrobne združbe kot tudi določanje genov za rezistenco oz. virulentnost v primerjavi s standardnimi metodami, kot je izolacija mikroorganizmov ali uporaba specifičnih molekularnih metod. Žal pa so te preiskave še vedno veliko dražje od klasičnih metod in velikokrat neizvedljive zaradi neustrezne kvalitete vzorcev.

Prisotnost specifičnih protiteles smo ugotavljali z metodo DIBA in rezultate potrdili z metodo po Westernu. Metoda DIBA je primerna metoda, predvsem za hitro presejalno testiranje potencilanih nosilcev okužbe z različnimi vrstami mikoplazem. Z metodo po Westernu smo zaznali več reakcij protiteles iz izbranih serumov s specifičnimi proteini v velikosti 15–130 kDa. Izstopala je reakcija s proteinoma v velikosti 55 kDa in približno 40 kDa, ki je bila prisotna pri vseh testiranih serumih iz skupine psov z obolenji sečil in spolovil in pri psih iz skupine s plodnostnimi motnjami. Z namenom optimizacije metode po Westernu bi bilo smiselno določiti identiteto pogostih imunogenih proteinov (npr. omenjeni protein 55 kDa) z N-terminalnim sekvenciranjem in jih nadalje uporabljati za dokazovanje prisotnosti specifičnih protiteles, ki so nastala med okužbo z *M. canis*. Žal nam v raziskavo ni uspelo vključiti dovolj pacientov, ki bi jih lahko spremljali tudi po zdravljenju. Potrebne so še nadaljnje raziskave serokonverzije in gibanja titra specifičnih protiteles od začetka okužbe, ki bi nam dale natančno sliko o poteku okužbe na ravni imunskega odgovora.

Okužbe z mikoplazmami so nedvomno podcenjena in pogosto spregledana težava v klinični diagnostiki obolenj sečil in spolovil pri psih. Trenutni postopki ugotavljanja okužbe z *M. canis* niso zadovoljivi in enoznačni, zato bodo potrebne dodatne raziskave, da bi utemeljili uvedbo specifičnih diagnostičnih postopkov za potrjevanje te pogosto latentne okužbe s subkliničnimi znaki. V veterinarski stroki in pri lastnikih psov pa je potrebno nadaljnje ozaveščanje o tej problematiki, predvsem pri lastnikih tistih psov, ki so v paritvenih postopkih, vztrajati pri zdravljenju z namenom preprečevanja širjenja okužbe na paritvene partnerje in potomce, saj so pogosto psi brez kliničnih znakov obolenj.

8 SUMMARY

The purpose of this dissertation was to investigate the role that *M. canis* infection plays in dogs with urogenital diseases and in dogs with fertility disorders, and to design a protocol for routine diagnosis of mycoplasmas. The clinical study included 52 dogs, including 7 dogs with urogenital disease symptoms, 14 dogs with fertility disorders, and 31 healthy dogs. All dogs in the study underwent routine clinical examination, ultrasonography of the urogenital tract, blood examination for haematological and biochemical analysis and urinalysis. Based on the clinical examination, hematologic and biochemical results and urinalysis, we found no significant markers distinguishing between dogs with *M. canis* infection and dogs without this infection. Ultrasonography showed no differences between patients that tested positive for *M. canis* and those that were negative. Of 31 healthy dogs, 6 tested positive for *M. canis* (19 %), which is less than other studies have shown. Of the dogs with fertility problems, 6 out of 14 (43 %) tested positive for *M. canis*, which is comparable to other research findings. Among the dogs with urogenital disorders, 3 out of 7 (43 %) tested positive for *M. canis*. Because of the small sample size of the different groups, the percentages of dogs that tested positive for *M. canis* do not necessarily correspond to the percentages for the entire population. However, the results indicate that it is reasonable to rule out mycoplasma infections, particularly *M. canis*, in dogs with recurrent urinary tract infections.

In our study, *M. canis* infections were detected by the PCR method on vaginal and preputial swabs. It is a simple and non-invasive procedure, while the specific PCR method is a suitable, rapid and reliable method to confirm the pathogen in clinical samples. Based on a positive molecular test result for *M. canis*, canine patients can be treated immediately, which is advantageous compared to the time-consuming bacterial culture test. Semen was also tested using the PCR method to confirm consistency with preputial swab results. It would be useful to include PCR testing of preputial swabs in routine examination protocols prior to semen collection, artificial insemination, or mating to confirm *M. canis* infection.

With the aim of further investigating the presence of *M. canis* in clinical samples, metagenomic analysis of vaginal and preputial swabs was performed in addition to the PCR method. In this way, we were able to specify the proportion of different mycoplasma species in the samples examined to gain better insight into how the different mycoplasma species influence the clinical picture. To our knowledge, none of these methods have been used in clinical diagnostic research. The use of

metagenomic/metataxomic analyses facilitates the determination of the microbial community as well as the determination of genes for resistance or virulence compared to classical methods such as isolation of microorganisms or the use of specific molecular methods. Unfortunately, these analyses are still much more expensive than the classical methods and often not feasible due to the insufficient quality of the samples.

The presence of antibodies was tested by the DIBA method, while the results were confirmed by the Western Blot method. The DIBA method is a suitable method, especially for rapid screening testing of potential carriers of infection with different types of mycoplasmas. Several reactions between antibodies from selected sera and specific proteins in the size range of 15-130 kDa were detected by the Western Blot method. The reactions with proteins of sizes 55 kDa and approximately 40 kDa stood out, which were detected in all sera tested from dogs with urogenital diseases and fertility disorders. To optimize the Western Blot method, we propose to determine the identity of common immunogenic proteins (e.g., the 55 kDa protein) by N-terminal sequencing and further use them to detect the presence of specific antibodies produced during *M. canis* infection. Unfortunately, we were unable to enroll more patients in our study who could be followed up after treatment. Further studies of seroconversion and specific antibody titers from the onset of infection are needed to give us an accurate picture of the course of infection at the immune response level. Mycoplasma infections are undoubtedly an underappreciated and often overlooked problem in the clinical diagnosis of urogenital diseases in dogs. Current procedures for detecting *M. canis* infections are unsatisfactory and may yield equivocal results. Further research is needed as a basis for establishing specific diagnostic procedures to confirm this often latent infection with subclinical signs. We need to raise awareness of this problem in the veterinary community and among dog owners, especially owners of dogs in mating procedures, to insist on treatment to prevent transmission to mating partners and offspring, as the dogs often do not show clinical signs.

9 ZAHVALE

Spoštovana moja mentorica, prof. dr. Nataša Tozon. Hvala ti, ker nisi nikoli obupala and menoj. Hvala ti, ker znaš prisluhniti in voditi. Hvala ti, ker si to, kar si. Ostani takšna, naša in edinstvena.

Spoštovana doc. dr. Darja Pavlin, predsednica komisije. Draga moja Darja – neizmerna hvala za ves tvoj čas, za tvoje komentarje, za tvoje pripombe in za vse, kar si v letih, ko se poznavava in skupaj delava, naredila zame. Tudi brez tebe ne bi prišla tako daleč in dosegla vsega, kar sem.

Spoštovana prof. dr. Mojca Narat, članica komisije. Vaša veličina se kaže v vašem odnosu do človeka, v vaši veliki volji pomagati in usmerjati. Hvala vam za vse.

Spoštovani prof. dr. Robert Frangež, član komisije. S kakšno mirnostjo, lepimi besedami in lepo oblikovanimi stavki znate nagovoriti človeka. V trenutku izgine strah, zamenja ga globoko spoštovanje in hvaležnost za vso pomoč.

Asist. dr. Brigita Slavec. Hvala, da si mi pokazala, da je delo v laboratoriju zanimivo in predstavlja velik izziv. Da si z menoj delila dobre in slabe trenutke in na koncu z mano zmagala.

Asist. razisk. dr. Saša Koprivec. Tako potrpežljivega človeka, kot si ti, ne najdeš zlepa. Vedno si si vzela čas, vedno si me znala voditi in usmerjati.

Izr. prof. dr. Primož Klinc. Tvoja volja do dela in življenja je tisto, kar vedno potrebujem. In občudujem pri tebi. Naj ti te volje nikoli ne zmanjka.

Dr. Bojan Papić. Prišel si, razložil, pomagal, rešil. Hvala.

Mojim sodelavcem na Kliniki za male živali. Ko bi vi vedeli, kako sem vam hvaležna za vse, kar ste naredili zame. Me spodbujali, mi pomagali, se smejali ali jokali z menoj. In mi vedno priskočili na pomoč. Vaša imena se začnejo s prvo črko abecede in končajo z zadnjo črko in prav vsi, ampak res vsi, ste »krivi« za to, da sem svoj življenjski projekt speljala do konca.

Alenka in Aleksander. Laboratorij ni samo prostor, kjer se opravljajo preiskave. To je prostor, kjer sta mi pomagala pri urejanju, hranjenju, pošiljanju vzorcev in kjer sta me bodrila vsak dan sprti. Hvala vama.

Osebjem diagnostičnih laboratorijev. Hvala vsem za vso tehnično in moralno podporo.

Gospo Sabini Ličen hvala za vse nasvete in pobude pri obdelavi statističnih podatkov.

Martinu Vrtačniku hvala za pomoč in pripravljenost pomagati v trenutku, ko sem to potrebovala.

Lektorici Poloni Šergon hvala za lektroiranje in nasvete.

Martina, Estera, Barbara. Hvala za vse ultrazvočne preglede, slike in hvala za pomoč vedno in povsod.

Mag. Giti Grecs-Smole hvala za vso pomoč pri urejanju naloge in pregledu literature, Slavici Sekulič in Stanki Ujc pa za iskanje člankov, reševanje problemov in pomoč.

Biljani Grubišič hvala za pomoč in večni optimizem pri reševanju majhnih in velikih težav.

Nina in Urša. Skupaj se smejemo, skupaj se zjokamo. Skupaj si pomagamo, da na koncu zmagamo.

Petra, Renata, Barbi. Hvala, ker sem lahko vaša, in hvala, ker mi vedno stojite ob strani.

Mateja in Matejka. Pogovori in druženja z vama so mi v neizmerno veselje in tolažbo. Naj tako ostane.

Irena in Tina. Pravijo, da prijatelji pridejo ob pravem času. Res je, vedve sta prišli. Prebijamo se skozi vzpone in padce, skozi srečo in žalost. A ostajamo skupaj.

Blaž Repe. Ti nisi samo moj sorodnik, ti si moj zvesti spremljevalec v življenju. Ti in tvoja družina so nekaj, kar si vsak lahko želi, da bi enkrat v življenju srečal. Hvala tebi in tvojim za vse.

Blaž Harej. Ko mi je hudo, si tam. Vedno. Moj. Unikaten. Hvala.

Moja mati Mia. Brez tebe ne bi bila veterinarica. Brez tebe ne bi imela družine. Brez tebe ne bi bila jaz jaz. Vem, da me vedno čuvaš, kjerkoli že si.

Moj oči. Moj Fotr. Sem presrečna, da sem tvoja hči in sem ponosna, da si moj Fotr. Hvala ti za vse, kar mi daješ in kar si me naučil. Hvala ti za potrpežljivost in hvala, ker mi vedno stojiš ob strani.

Maaike in Ria. Vedve sta moji punici, neskončno vaju imam rada. Dajeta mi moč in zagon, da premagam vse ovire. Super hčerki sta.

Lieve Branko. Er zijn eigenlijk maar drie woorden nodig: geluk, blijdschap, liefde. Ik ben blij dat ik je gevonden heb. Blijdschap is wat jij elke dag in mijn leven brengt. En liefde, waarvan ik niet geloofde dat die bestond. Die bestaat wel. En jij bent mijn schat.

10 LITERATURA

1. Frey J. Mycoplasmas of animals. In: Razin S, Herrmann R, eds. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002: 73–90.
2. Chalker VJ. Canine mycoplasmas. Res Vet Sci 2005; 79(1): 1–8.
3. Ülgen M, Çetin C, Şentürk S, Özel EA ÖÜ. Urinary tract infections due to *Mycoplasma canis* in dogs. J Vet Med A. 2006; 53: 379–82.
4. Binder A, Plagemann O, Vogel R, Kirchhoff H. Nachweis einer bei Hunden bislang unbekanntem Mykoplasmaspezies bei Hündinnen mit Fertilitätsstörungen. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1986; 99(2): 44–6.
5. L’Abee-Lund TM, Heiene R, Friis NF, Ahrens P, Sørum H. *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway. Vet Rec 2003; 153(8): 231–5.
6. Kustritz MVR, Johnston SD, Olson PN, Lindeman CJ. Relationship between inflammatory cytology of canine seminal fluid and significant aerobic bacterial, anaerobic bacterial or mycoplasma cultures of canine seminal fluid: 95 cases (1987-2000). Theriogenology 2005; 64(6): 1333–9.
7. Laber G, Holzmann A. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the male dog. II. Andrological and microbiological investigations after exposure to mycoplasmas. Theriogenology 1977; 7(4): 177–88.
8. Fontbonne A. Infertility in male dogs: recent advances. Rev Bras Reprod Anim 2011; 35(2): 266–73.
9. Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WTK. The genital mycoplasma and ureaplasma flora of healthy and diseased dogs. Can J Comp Med 1981; 45(3): 233–8.
10. Razin S, Yogevev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(4): 1094–156.
11. Razin S. The genus *Mycoplasma* and related genera (class Mollicutes). In: The Prokaryotes. New York : Springer, 2006: 836–904.

12. Volokhov DV, George J, Liu SX, Ikonomi P, Anderson C, Chizhikov V. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 71(5): 680–98.
13. Green CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd edition. St. Louis: Elsevier, 2006: 260–5.
14. Citti C, Nouvel LX, Baranowski E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol* 2010; 5(7): 1073–85.
15. Nagatomo H, Takegahara Y, Sonoda T, et al. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. *Vet Microbiol* 2001; 82(3): 223–32.
16. Jambhekar A, Robin E, Le Boedec K. A systematic review and meta-analyses of the association between 4 mycoplasma species and lower respiratory tract disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33(5): 1880–91.
17. Shoetensack H.M. Pure cultivation of filterable virus isolated from canine distemper. *Kitasato Arch Exp Med* 1934; 11: 227–90.
18. Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 2003; 83(2): 417–32.
19. Taylor P. Recovery of human mycoplasmas. In: Hounsell EF, ed. *Methods in molecular biology*. Vol. 76. Totowa : Humana Press, 1998: 25–35.
20. Michaels DL, Leibowitz JA, Azaiza MT, et al. Cellular microbiology of *Mycoplasma canis*. *Infect Immun* 2016; 84(6): 1785–95.
21. Schäfer-Somi S, Spargser J, Aurich C. Bacteria and mycoplasmas in canine ejaculates a retrospective survey. *Wien Tierarztl Monatsschr* 2009; 96(9/10): 240–5.
22. Yiwen C, Yueyue W, Lianmei Q, Cuiming Z, Xiaoxing Y. Infection strategies of mycoplasmas: unraveling the panoply of virulence factors. *Virulence* 2021; 12(1): 788–817.
23. Chalker VJ, Brownlie J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54(2): 537–42.

24. Balish MF Krause DC. Cytadherence and the cytoskeleton. In: Razin S, Herrmann R, eds. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. New York: Kluwer Academic, 2002: 491–518.
25. Rosendal S. Canine mycoplasmas: serological studies of type and reference strains, with a proposal for the new species, *Mycoplasma opalescens*. Acta Pathol Microbiol Scand 1975; 83: 463–70.
26. Pollack JD, Williams MV, McElhaney MR. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function. Crit Rev Microbiol 1997; 23: 269–354.
27. Almagor M, Kahane I, Gilon C YS. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun 1986; 52: 240–4.
28. Salman M RS. The cell membrane of *Mycoplasma penetrans*: lipid composition and phospholipase A activity. Biochim Biophys Acta 1995; 1235: 369–77.
29. Berčič RL, Cizelj I, Benčina M, et al. Demonstration of neuraminidase activity in *Mycoplasma neurolyticum* and of neuraminidase proteins in three canine *Mycoplasma* species. Vet Microbiol 2012; 155(2–4): 425–9.
30. Wren BW. Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. Nat Rev Genet 2000; 1(1): 30–9.
31. Markham PF, Glew MD, Sykes JE, et al. The organisation of the multigene family which encodes the major cell surface protein, pMGA, of *Mycoplasma gallisepticum*. FEBS Lett 1994; 352(3): 347–52.
32. Chambaud I, Wróblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. Trends Microbiol 1999; 7(12): 493–9.
33. May M, Brown DR. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. Vet Microbiol 2009; 137(3–4): 380–3.
34. Brown DR, May M, Michaels DL, Barbet AF. Genome annotation of five *Mycoplasma canis* strains. J Bacteriol 2012; 194(15): 4138–9.
35. Qin L, Chen Y, You X. Subversion of the response by human pathogenic mycoplasmas. Front Microbiol 2019; 10: 1934 (12 str.) doi: 10.3389/fmicb.2019.01934

36. Sher T, Yamin A, Rottem S, Gallily R. In vitro induction of tumor necrosis factor alpha, tumor cytolysis, and blast transformation by *Spiroplasma* membranes. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(13): 1142–5.
37. Stuart PM, Cassell GH, Woodward JG. Differential induction of bone marrow macrophage proliferation by mycoplasmas involves granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun* 1990; 58(11): 3558–63.
38. Sher T, Rottem S, Gallily R. *Mycoplasma capricolum* membranes induce tumor necrosis factor alpha by a mechanism different from that of lipopolysaccharide. *Cancer Immunol Immunother* 1990; 31(2): 86–92.
39. Saraya T. *Mycoplasma pneumoniae* infection: basics. *J Gen Fam Med* 2017; 18(3): 118–25.
40. Rycroft AN, Tsounakou E, Chalker V. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol* 2007; 120(3/4): 358–62.
41. Scolten SS, Tozon N, Koprivec S, et al. Molecular detection and seroprevalence of Mycoplasmas in clinically healthy working dogs. *Slov Vet Res* 2017; 54(4): 155–61.
42. Olin SJ, Bartges JW. Urinary tract infections: treatment/comparative therapeutics. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* 2015; 45(4): 721–46.
43. Pressler B, Bartges JW. Urinary tract infections. In: Ettinger SJ; Feldman EC, ed. *Textbook of veterinary internal medicine*. St. Louis : Saunders Elsevier, 2010: 2036–47.
44. Jang SS, Ling G V., Yamamoto R, Wolf AM. Mycoplasma as a cause of canine urinary tract infection. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 185(1): 45–7.
45. Maksimović Z, Maksimović A, Halilbašić A, Rifatbegović M. Genital mycoplasmas of healthy bitches. *J Vet Diagn Invest*. 2018; 30(4): 651–3.
46. Janowski T, Zduńczyk S, Jurczak A, Socha P. Incidence of *Mycoplasma canis* in the vagina in three groups of bitches. *Bull Vet Inst Pulawy* 2008; 52(4): 533–5.
47. Grundy SA, Feldman E, Davidson A. Evaluation of infertility in the bitch. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002; 17(3): 108–15.
48. Kustritz MVR. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology* 2006; 66(3): 567–74.

49. Gunay U, Onat K, Gunay A, Ulgen M. Vaginal, cervical and uterine bacterial flora at the different stages of the reproductive cycle in ovariohysterectomized bitches. *J Anim Vet Adv* 2010; 9(3): 478–81.
50. Chandler JC, Lappin MR. Mycoplasmal respiratory infections in small animals: 17 cases (1988–1999). *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38(2): 111–9.
51. Mitchell JA, Cardwell JM, Leach H, et al. European surveillance of emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol* 2017; 212: 31–8.
52. Zeugswetter F, Weissenböck H, Shibly S, Hassan J, Spersger J. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies. *Vet Rec* 2007; 161(18): 626–8.
53. Canonne AM, Peters I, Roels E, Desquilbet L, Clercx C. Detection of specific bacterial agents by quantitative PCR assays in the bronchoalveolar lavage fluid of dogs with eosinophilic bronchopneumopathy vs. dogs with chronic bronchitis and healthy dogs. *Vet J* 2018; 232: 52–6.
54. Chalker VJ, Owen WMA, Paterson C, et al. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology* 2004; 150(10): 3491–7.
55. Henricks PM. Isolation of two *Mycoplasma* species from the peritoneal cavity of a dog. *Can Vet J* 1987; 28(7): 437–8.
56. Barton MD, Ireland L, Kirschner JL, Forbes C. Isolation of *Mycoplasma spumans* from polyarthritis in a greyhound. *Aust Vet J* 1985; 62(6): 206–7.
57. Bowe PS, Van Kruiningen HJ, Rosendal S. Attempts to produce granulomatous colitis in boxer dogs with a mycoplasma. *Can J Comp Med* 1982; 46(4): 430–3.
58. Klein S, Klotz M, Eigenbrod T. First isolation of *Mycoplasma canis* from human tissue samples after a dog bite. *New Microbes New Infect* 2018; 25: 14–5.
59. Sidrak D, Green J, Nawathe P, Morgan M, Soni PR. Canine-to-human transmission of *Mycoplasma canis* in the central nervous system. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2021; piab049: e1–3. doi: 10.1093/jpids/piab049
60. Tamiya S, Yoshikawa E, Ogura M, Kuroda E, Suzuki K, Yoshioka Y. Vaccination using inactivated *Mycoplasma pneumoniae* induces detrimental infiltration of neutrophils after subsequent infection in mice. *Vaccine* 2020; 38(32): 4979–87.

61. McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RAJ. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J Med Microbiol* 2005; 54(8): 731–9.
62. Windsor D; Windsor H. Quality control testing of *Mycoplasma* Medium. In: Miles R; Nicholas R, ed. *Mycoplasma Protocols* Humana Press Totowa, New Jersey, 1998; 61–8.
63. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487–91.
64. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol* 2017; 8(FEB).
65. Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief Bioinform* 2018; 20(4): 1125–39.
66. Franzosa EA, Hsu T, Sirota-Madi A, et al. Sequencing and beyond: integrating molecular “omics” for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13(6): 360–72.
67. Poumarat F. Identification of mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). In: Miles R; Nicholas R, ed. *Mycoplasma Protocols* Humana Press Totowa, New Jersey, 1998; 113–8.
68. Ball HJ, Finlay D. Diagnostic application of monoclonal antibody (MAb)-based sandwich ELISAs. In: Miles R, Nicholas R, eds. *Mycoplasma protocols*. Totowa: Humana Press, 1998: 128–32.
69. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* 2013; 133(9): 1–3.
70. Razin S, Rottem S. Identification of *Mycoplasma* and other microorganisms by polyacrylamide-gel electrophoresis of cell proteins. *J Bacteriol* 1967; 94(6): 1807–10.
71. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680–5.
72. Duffy MF, Noormohammadi AH, Baseggio N, Browning GF, Markham PF. Polyacrylamide Gel-Electrophoresis Separation of Whole-Cell Proteins. In: Miles R, Nicholas R, eds. *Mycoplasma Protocols*. New Jersey : Humana Press Totowa, 1998: 267–77.

73. Imada Y, Harasawa R, Kotani H, Koshimizu K. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting analyses of ureaplasmas isolated from dogs. *J Vet Med Sci* 1992; 54(2): 325–8.
74. Vozelj M. Temelji imunologije. Ljubljana: DZS, 2000: 91–120.
75. Johansson KE, Heldtander MU, Pettersson B. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods Mol Biol* 1998; 104: 145–65.
76. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(1): 17–20.
77. Zhang J, Madden TL. PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* 1997; 7(6): 649–56.
78. Geisse AL, Lowry JE, Schaeffer DJ, Smith CW. Sonographic evaluation of urinary bladder wall thickness in normal dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1997; 38(2): 132–7.
79. Kustritz MVR. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology* 2007; 68(3): 329–37.
80. Peña Martínez AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 2004; 82/83: 209–24.
81. Suhadolc Scholten S, Slavec B, Klinc P, Tozon N, Papić B, Koprivec S. Association of *Mycoplasma canis* with fertility disorders in dogs: a case study supported by clinical examination. *Pathogens* 2024; 13(5): 391. doi: 10.3390/pathogens13050391
82. Christensen BW. Canine Prostate Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2018; 48(4): 701–19.
83. Domosławska A, Zdunczyk S. Canine babesiosis-a disease rarely considered in the context of male infertility. *Ir Vet J* 2020; 73(1). doi: 10.1186/s13620-020-00174-y
84. Sumner RN, Byers A, Zhang Z, et al. Environmental chemicals in dog testes reflect their geographical source and may be associated with altered pathology. *Sci Reports* 2021; 11(1): 7361. doi: 10.1038/s41598-021-86805-y
85. Threlfall W. Breeding Soundness examination of the stud dog. In: Ettinger SJ; Feldman EC, ed. *Textbook of veterinary internal medicine*. St. Louis : Saunders Elsevier, 2010: 1934–9.

86. Tamiozzo PJ. *Mycoplasma maculosum* and *Mycoplasma spumans* associated with fertility disorders in dogs from a Bernese Mountain dog kennel. *Rev Argent Microbiol* 2021; doi: 10.1016/j.ram.2021.04.001
87. Weese JS, Blondeau J, Boothe D, et al. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. *Vet J* 2019; 247: 8–25.
88. Reine NJ, Langston CE. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005; 20(1): 2–10.
89. Bilirubin [online]. In: eClinpath. Ithaca : Cornell University, 2020. <https://eclinpath.com/chemistry/liver/cholestasis/bilirubin/> (31. 1. 2022)
90. DiBartola SP. Urinary system. In: Ettinger SJ; Feldman EC, ed. *Textbook of veterinary internal medicine*. St. Louis : Saunders Elsevier, 2010; 1955–69.
91. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 2012; 21(8): 1794–805.
92. Berčič RL, Slavec B, Lavrič M, et al. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Vet Microbiol* 2008; 127(1–2): 147–54.
93. Robinson MW, Buchtman KA, Jenkins C, et al. MHJ_0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol* 2013; 3(4). doi: 10.1098/RSOB.130017
94. Bao S, Guo X, Yu S, et al. *Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/ fibronectin binding protein. *BMC Vet Res* 2014; 10(1). doi: 10.1186/s12917-014-0223-6
95. Brown DR, Zacher LA, Farmerie WG. Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. *J Bacteriol* 2004; 186(12): 3922–7.
96. Hunt ME, Brown DR. Role of sialidase in *Mycoplasma alligatoris*-induced pulmonary fibroblast apoptosis. *Vet Microbiol* 2007; 121(1–2): 73–82.
97. Megid R, Nicholas RAJ, Miles RJ. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. *Vet Res Commun* 2001; 25(1): 1–12.

98. Szczepanek SM, Boccaccio M, Pflaum K, Liao X, Geary SJ. Hydrogen peroxide production from glycerol metabolism is dispensable for virulence of *Mycoplasma gallisepticum* in the tracheas of chickens. *Infect Immun* 2014; 82(12): 4915–20.
99. Arfi Y, Lartigue C, Sirand-Pugnet P, Blanchard A. Beware of mycoplasma anti-immunoglobulin strategies. *MBio* 2021; 12(6). doi: 10.1128/mBio.01974-21
100. Citti C, Blanchard A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol* 2013; 21(4): 196–203.
101. Simecka JW, Ross SE, Cassell GH, Davis JK. Interactions of mycoplasmas with B cells: antibody production and nonspecific effects. *Clin Infect Dis* 1993; 17: S176–82.
102. Citti C, Kim MF, Wise KS. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect Immun* 1997; 65(5): 1773–85.
103. Ma L, Jensen JS, Mancuso M, Myers L, Martin DH. Kinetics of genetic variation of the *Mycoplasma genitalium* MG192 gene in experimentally infected chimpanzees. *Infect Immun* 2016; 84(3): 747–53.
104. Sidorin EV, Solov'eva TF. IgG-binding proteins of bacteria. *Biochem* 2011; 76(3): 295–308.
105. Quan CP, Berneman A, Pires R, Avrameas S, Bouvet JP. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infect Immun* 1997; 65(10): 3997–4004.
106. Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, et al. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol* 2016; 1(6). doi: 10.1038/NMICROBIOL.2016.54

11 PRILOGE

Priloga 1 Pasma psov, vključenih v raziskavo

pasme psov	obolenja sečil in spolovil	plodnostne motnje	kontrolna	skupaj
Airedalski terier		2		2
Ameriški koker španjel			1	1
Ameriški staffordshirski terier		1		1
Angleški koker španjel			1	1
Angleški špringer španjel			2	2
Argentinska doga		1		1
Bemski planšarski pes		3		3
Doberman			1	1
Francoski buldog	1			1
Japonski čin			1	1
Kratkodlaki weimaraneec		1	1	2
Madžarski kratkodlaki ptičar			1	1
Mali angleški hrt			1	1
Maltežan			1	1
Mešanec	4		10	14
Nemški ovčar		3		3
Nemški prepeličar			1	1
Pritlikavi šnavcer			1	1
Romanski vodni pes			1	1
Rotvajler			2	2
Ruski hrt			2	2
Sibirski husky	1			1
Škotski terier			2	2
Španjel kavalir king charles	1			1
Terier parson jack russell		1		1
Zlati prinašalec		2	2	4
skupaj	7	14	31	52

Priloga 2 Zbirne tabele hematoloških parametrov

I. Skupina z obolenji sečil in spolovil

št	WBC [x10.e9/L]	RBC [x10.e12/L]	HGB [g/L]	HCT [L/L]	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/L]	CHCM [g/L]	CH [pg]	RDW [%]	HDW [g/L]	PLT [x10.e9/L]	MPV [fL]	PCT [%]	%NEUT [%]	%LYMP [%]	%MONO [%]	%EOS [%]	%BASO [%]	%LUC [%]	#NEUT [x10.e9/L]	#LYMPH [x10.e9/L]	#MONO [x10.e9/L]	#EOS [x10.e9/L]	#BASO [x10.e9/L]	#LUC [x10.e9/L]
1	7,74	6,72	164	0,47	70,1	24,4	348	362	25,3	12,5	18,7	154	15,4	0,24	58,4	27,1	4,1	9,6	0,5	0,3	4,53	2,09	0,32	0,74	0,04	0,02
2	7,25	6,39	146	0,42	66	22,8	345	357	23,6	11,6	17,1	327	12,9	0,42	62,6	24,5	7	5,5	0,2	0,2	4,54	1,77	0,51	0,4	0,02	0,01
2a	6,68	7,49	182	0,5	67	24,4	364	354	23,7	12,3	17,3	327	9,5	0,31	18,6	38,9	5,6	6,2	0,2	0,4	3,25	2,6	0,37	0,42	0,02	0,03
3	12,07	8,21	156	0,45	55,1	19	346	344	19	12,7	24,9	108	12,7	0,14	68,4	14,2	7,3	9,7	0,2	0,3	8,26	1,72	0,88	1,17	0,02	0,04
4	11,43	7,66	186	0,53	68,8	24,3	352	360	24,8	14,2	18,4	313	11,8	0,37	75,4	17,8	3,4	2,9	0,3	0,2	8,61	2,03	0,39	0,33	0,04	0,02
5	8,94	5,25	119	0,35	67	22,7	339	347	23,2	13,7	15,9	359	8,5	0,31	45,9	39,5	2,5	11,5	0,2	0,3	4,11	3,53	0,22	1,03	0,02	0,03
6	8,02	7,76	187	0,53	68	24	354	356	24,2	13,6	17,9	220	9,8	0,22	64,1	23,9	3,4	8,4	0,1	0,1	5,15	1,91	0,27	0,67	0,01	0,01
7	12,07	4,34	112	0,34	78,8	25,8	327	342	26,9	12,7	19,6	319	16,5	0,53	61,2	29,5	2,7	6,2	0,2	0,2	7,39	3,57	0,33	0,75	0,02	0,02

Legenda:

WBC – levkociti, RBC – eritrociti, HGB – hemoglobin, HCT – hematokrit, MCV – povprečni volumen eritocita, MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritocitu, RDW – razdelitev eritrocitov po volumnu, PCT – trombokrit, NEU – nevtrofilci, LYMP – limfociti, MONO – monociti, EOS – eozinofilci, BASO – bazofilci, LUC – nedefinirane celice

2a- rezultati po zdravljenju

II. Skupina s plodnostnimi motnjami

št pacienta	hematoloske preiskave																									
	WBC [x10.e9/L]	RBC [x10.e12/L]	HGB [g/L]	HCT [L/L]	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/L]	CHCM [g/L]	CH [pg]	RDW [%]	HDW [g/L]	PLT [x10.e9/L]	MPV [fL]	PCT [%]	%NEUT [%]	%LYMPH [%]	%MONO [%]	%EOS [%]	%BASO [%]	%LUC [%]	#NEUT [x10.e9/L]	#LYMPH [x10.e9/L]	#MONO [x10.e9/L]	#EOS [x10.e9/L]	#BASO [x10.e9/L]	#LUC [x10.e9/L]
8	13,77	7,97	185	0,53	66,6	23,2	348	343	22,8	12,6	17,6	262	8,6	0,23	68,4	20,7	4,5	6,2	0,2	0,1	9,41	2,84	0,62	0,85	0,03	0,01
9	12,8	7,63	185	0,54	70,6	24,3	344	326	23	11,5	15,6	163	14,2	0,23	65,1	23,2	4,5	6,9	0,2	0,1	7,93	2,82	0,55	0,84	0,02	0,02
10	6,8	8,55	195	0,57	66,9	22,8	340	348	23,2	12,5	18,3	159	13,7	0,22	54,3	32,1	6,4	6,6	0,3	0,3	3,69	2,18	0,44	0,45	0,02	0,02
11	7,28	7,98	184	0,55	69	23	333	354	24,4	11,8	15,7	264	10,4	0,27	50,4	24,6	4,8	19,7	0,2	0,2	3,67	1,79	0,35	1,44	0,02	0,01
12	10,75	7,2	170	0,47	65,9	23,5	357	369	24,3	13,7	18,8	286	9	0,26	64	27,5	3,3	4,9	0,1	0,1	6,88	2,96	0,36	0,53	0,01	0,01
12a	11,65	7,36	175	0,49	66,3	23,9	360	367	24,3	13	18,5	283	8,8	0,25	64,4	28	3,3	3,8	0,2	0,2	7,51	3,26	0,39	0,45	0,02	0,03
13	14,09	6,45	154	0,44	68,8	23,8	346	366	25,2	12,9	16,9	219	10,3	0,23	64,3	27,1	3,7	4,6	0,1	0,2	9,05	3,82	0,52	0,65	0,01	0,03
13a	14,55	7	172	0,48	68,4	24,6	360	362	24,7	12,8	17,5	241	10,1	0,24	63,2	29	3,5	4,2	0,2	0,1	9,19	4,21	0,5	0,6	0,03	0,01
14	6,12	8,44	193	0,55	65	22,9	352	365	23,7	12,7	20,1	198	8,8	0,17	63,9	25,9	3,9	6	0,3	0,1	3,91	1,59	0,24	0,36	0,02	0,01
15	9,4	7,6	178	0,49	64	23,4	365	371	23,8	14,5	21,4	292	9,4	0,28	60,1	29	3,6	6,9	0,2	0,1	5,65	2,72	0,34	0,65	0,02	0,01
16	12,17	6,57	148	0,42	63,2	22,5	356	371	23,4	13	18,2	101	14,7	0,15	62,6	24,7	6	6,2	0,1	0,3	7,62	3,01	0,74	0,75	0,02	0,03
17	10,11	7,13	165	0,47	65,3	23,1	354	356	23,2	13,5	20,5	412	11,9	0,49	73,3	15,6	6,1	3,8	0,5	0,7	7,41	1,58	0,62	0,39	0,05	0,02
18	10,49	2,4	57	0,17	71,3	23,9	335	356	25,3	14	20,2	180	13,9	0,25	71,9	18,4	6,6	2,7	0,2	0,3	7,54	1,93	0,69	0,28	0,02	0,03
19	10,85	8,03	185	0,53	65,8	23,1	351	361	23,7	13,1	18,6	297	11,6	0,35	74,1	19,1	5,3	1,1	0,1	0,1	8,04	2,07	0,58	0,12	0,01	0,01
20	15,71	7,29	168	0,46	63,8	23,1	362	355	22,6	13,7	20,5	400	13,8	0,55	77,4	14,1	4,8	3,3	0,1	0,1	12,7	2,22	0,76	0,52	0,02	0,02
21	8,24	6,52	160	0,46	70,8	24,5	347	347	24,5	12,3	17,2	326	10,2	0,33	77,6	14,5	4,8	2,9	0,2	0,1	6,39	1,2	0,39	0,23	0,02	0,01

Legenda:

WBC – levkociti, RBC – eritrociti, HGB – hemoglobin, HCT – hematokrit, MCV – povprečni volumen eritocita, MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritocitu, RDW – razdelitev eritrocitov po volumnu, PCT – trombokrit, NEU – nevtrofilci, LYMP – limfociti, MONO – monociti, EOS – eozinofilci, BASO – bazofilci, LUC – nedefinirane celice

12a in 13 a-rezultati po zdravljenju

III. Kontrolna skupina

št	WBC [x10.e9/L]	RBC [x10.e12/ g/L]	HGB [g/L]	HCT [L/L]	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/L]	CHCM [g/L]	CH [pg]	RDW [%]	HDW [g/L]	PLT [x10.e9/L]	MPV [fL]	PCT [%]	%NEUT [%]	%LYMP H [%]	%MONO [%]	%EOS [%]	%BASO [%]	%LUC [%]	#NEUT [x10.e9/L]	#LYMPH [x10.e9/L]	#MONO [x10.e9/L]	#EOS [x10.e9/L]	#BASO [x10.e9/L]	#LUC [x10.e9/L]
22	7,82	6,84	163	0,5	72,2	23,8	328	322	23,4	14,4	16,7	147	16,5	0,24	70,3	17,1	5,7	6,4	0,2	0,3	5,5	1,34	0,45	0,5	0,02	0,03
23	9,61	7,25	175	0,52	72,1	24,1	334	328	23,6	11,6	14,7	290	9,2	0,27	50,2	31,9	3,6	13,8	0,3	0,1	4,83	3,06	0,35	1,32	0,03	0,01
24	8,11	6,32	148	0,45	70,4	23,4	332	321	22,6	11,8	15,3	289	9,2	0,27	67,4	24,1	4,3	3,9	0,2	0,2	5,47	1,95	0,35	0,31	0,01	0,01
25	9,65	7,11	161	0,46	64,3	22,7	352	340	21,8	11,4	17,2	275	13,1	0,36	56	31,4	6	6,3	0,1	0,3	5,4	3,03	0,57	0,61	0,01	0,03
26	7,21	7,71	163	0,48	62,7	21,2	338	326	20,4	13,6	17,8	293	11	0,32	54,3	32,1	7,4	5,1	0,7	0,4	3,92	2,32	0,53	0,37	0,05	0,03
27	14,4	8,21	181	0,54	65,8	22,1	336	325	21,3	12,9	17,3	234	9,6	0,22	69,7	21,6	3,9	4,1	0,5	0,3	10,04	3,11	0,56	0,58	0,07	0,04
28	14,35	6,48	142	0,42	65	21,9	337	323	21	12,2	17,9	481	9,3	0,45	45,2	24,6	3,3	25,9	0,2	0,9	6,49	3,53	0,47	3,71	0,02	0,13
29	15,6	7,7	174	0,5	65,4	22,7	346	335	21,8	11,8	16,7	311	9,8	0,31	46,7	30	4	18,8	0,3	0,3	7,28	4,69	0,62	2,93	0,04	0,04
30	18,5	5,82	132	0,38	64,7	22,7	352	358	23,1	12,1	20,5	253	11,4	0,29	78,4	9,3	7,8	4,4	0	0,1	14,5	1,73	1,45	0,81	0	0,01
31	6,49	6,64	151	0,43	65,1	22,7	350	353	22,9	13,6	23,5	202	11,6	0,23	62,2	30,5	2,9	3,6	0,6	0,2	4,04	1,98	0,19	0,23	0,04	0,01
32	9,41	7,5	180	0,55	72,9	23,9	328	357	26	12,8	18,3	396	12,7	0,5	66,4	24,4	4,2	3,7	0,8	0,5	6,25	2,3	0,39	0,35	0,07	0,04
33	9,09	7,52	163	0,5	66,1	21,7	328	344	22,7	13,2	17	303	7,9	0,24	52,7	39,5	3,1	4,5	0,2	0,1	4,79	3,59	0,28	0,41	0,02	0,01
34	7,3	8,45	198	0,58	68,4	23,4	343	362	24,7	12,5	18	168	12	0,2	71,1	22	3,5	2,7	0,6	0,2	5,19	1,61	0,26	0,2	0,04	0,01
35	6,87	7,4	171	0,5	67,3	23,1	344	357	24	11,9	16,6	301	8,7	0,26	67,1	28,1	1,7	2,8	0,3	0,2	4,61	1,93	0,12	0,19	0,02	0,01
36	11,04	7,82	190	0,55	70,9	24,3	343	356	25,2	12,3	17,2	194	11	0,21	58,5	29,8	2,8	8,4	0,2	0,2	6,46	3,3	0,31	0,93	0,02	0,02
37	11,32	7,3	171	0,5	68,3	23,5	344	362	24,7	12	17,3	186	10,2	0,19	55,9	30,9	6	6,7	0,3	0,3	6,32	3,49	0,68	0,76	0,03	0,03
38	20,95	6,5	161	0,41	63,2	24,8	393	350	22,1	13,9	18,3	400	10,3	0,41	62,9	24,5	7,1	4,8	0,3	0,3	13,18	5,13	1,49	1,01	0,07	0,07
39	9,15	5,6	128	0,38	68,2	22,9	336	350	23,8	13,5	23,6	402	12,8	0,52	69,7	18,1	4,8	7,1	0,1	0,1	6,37	1,66	0,44	0,65	0,01	0,01
40	7,4	6,2	150	0,44	70,2	24,1	344	356	24,9	13,1	16,8	216	10,3	0,22	55,4	32,2	5,2	6,5	0,4	0,3	4,1	2,39	0,38	0,48	0,03	0,02
41	8,21	6,74	155	0,44	65,4	22,9	351	368	24,1	12,5	18,3	176	11	0,19	71,2	18,6	8,7	0,2	0,2	1	5,84	1,53	0,72	0,02	0,02	0,09
42	10,95	7,97	179	0,51	64,6	22,5	348	362	23,4	12,9	19,3	446	8,8	0,39	73,3	16,9	5,1	4	0,4	0,2	8,02	1,85	0,56	0,44	0,05	0,03
43	4,86	6,65	157	0,44	66,8	23,7	354	365	24,4	12,5	19,9	188	9,8	0,18	55,6	34	2,1	7,8	0,3	0,1	2,7	1,65	0,1	0,38	0,02	0,01
44	6,49	8,49	200	0,57	66,9	23,5	352	367	24,5	12,7	17,8	295	12	0,35	45,7	42,7	4,7	6,5	0,2	0,1	2,97	2,77	0,31	0,42	0,01	0,01
45	6,94	6,77	167	0,48	70,9	24,7	348	354	25,1	12,5	16,9	195	9,9	0,19	60,2	31	3,5	4,7	0,2	0,4	4,18	2,15	0,24	0,32	0,02	0,03
46	7,71	6,84	164	0,46	67,5	24	355	360	24,3	12,4	17,4	260	10,2	0,3	65,1	25,8	4,6	4,2	0,2	0,1	5,02	1,99	0,36	0,33	0,02	0
47	13,93	6,78	162	0,47	68,8	24	348	355	24,4	12,8	19,9	236	9,2	0,22	59,5	33,7	4,5	1,6	0,4	0,3	8,29	4,69	0,63	0,22	0,06	0,04
48	9	7,41	178	0,51	68,6	24	349	360	24,7	12,4	16	460	7,5	0,35	65,5	22,9	5,1	6	0,2	0,2	5,9	2,06	0,46	0,54	0,02	0,01
49	12,84	8,59	202	0,58	67,7	23,6	348	370	25	12,9	18,2	499	10,1	0,5	62,6	20,4	3,7	12,6	0,5	0,1	8,04	2,62	0,48	1,62	0,07	0,02
50	12,71	5,62	138	0,38	67	24,6	367	361	24,2	12,4	20,4	538	9,3	0,5	67,2	22	4,9	5,4	0,1	0,3	8,54	2,8	0,62	0,69	0,01	0,04
51	10,87	7,77	183	0,51	65,9	23,5	357	365	24	12,9	18,1	446	10,7	0,48	64,2	14,9	4	16,7	0,2	0,2	6,98	1,62	0,44	1,81	0,02	0,02
52	5,8	7,31	188	0,55	74,8	25,7	343	361	26,9	12,6	18	182	10,4	0,19	71	18,2	4,5	6,1	0,3	0	4,11	1,05	0,26	0,35	0,02	0

Legenda:

WBC – levkociti, RBC – eritrociti, HGB – hemoglobin, HCT – hematokrit, MCV – povprečni volumen eritocita, MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu, RDW – razdelitev eritrocitov po volumnu, PCT – trombokrit, NEU – nevtrofilci, LYMP – limfociti, MONO – monociti, EOS – eozinofilci, BASO – bazofilci, LUC – nedefinirane celice

Priloga 3 Zbirne tabele biokemijskih parametrov

I. Skupina z obolenji sečil in spolovil

št pacienta	sečnina (mmol/L)	kreatinin (μ mol/L)	skupni proteini (g/L)	globulini (g/L)
1	8,85	123,57	53,17	35,44
2	6,26	11,34	56,45	42,31
2a	7,73	99,81	56,557	38,005
3	2,21	40,03	57,72	42,34
4	8,04	87,35	53,08	41,32
5	3,98	71,29	39,455	35,53
6	9,1	123,4	53,84	41,15
7	8,53	89,92	51,64	34,38

Legenda: 2a – rezultati po zdravljenju

II. Skupina s plodnostnimi motnjami

št pacienta	sečnina (mmol/L)	kreatinin (μ mol/L)	skupni proteini (g/L)	globulini (g/L)
8	6,6	67,5	54,95	37,46
9	9,2	101,85	57,57	41,59
10	5,65	78,74		
11	5,33	63,43	55,12	41,36
12	5,74	102,31	57,65	36,95
12a	5,7	106,1	52,372	40,565
13	7,21	137	58,04	37,5
13a	7,43	117,7	50,068	42,364
14	12,23	89	54,33	40,56
15	14,73	85	56,99	41,16
16	5,88	98	56,66	32,62
17	4,81	92,2	56,33	42,25
18	3,06	61,42	31,53	24,02
19	6,49	109,06	57,69	41,56
20	5,96	150,1	56,48	42,47
21	4,32	80,03	48,33	38,26

Legenda: 12a in 13 a – rezultati po zdravljenju

III. Kontrolna skupina

št pacienta	sečnina (mmol/L)	kreatinin (μ mol/L)	skupni proteini (g/L)	globulini (g/L)
22	6,36	96,47	55,02	39,14
23	10,63	101,12	53,87	41,49
24	6,64	129,75	55,9	36,67
25	5,91	86,61	52,23	38,97
26	3,08	65,35	55,49	40,98
27	5,03	79,22	58,74	42,72
28	4,52	87,2	55,89	41,28
29	7,16	113,76	56,81	41,98
30	22,7	312,8	56,73	41,57
31	7,27	116,1	54,4	39,3
32	6,04	87,06	56,13	40,8
33	8,67	87,44	58,03	42,9
34	7,86	81,46	58,29	42,07
35	6,9	59,64	53,8	39,87
36	5,87	11,3	53,49	42,16
37	8,36	66,14	53,08	42,12
38	6,02	63,83	54,08	40,8
39	5,33	57,57	57,5	41,58
40	6,56	89,94	50,58	36,87
41	3,32	62,87	54,73	41,1
42	3,36	66,86	48,85	33,15
43	6,06	99,91	53,79	39,1
44	5,26	109,38	51,65	40,27
45	5,05	81,39	50,24	41,77
46	4,71	57,61	46,88	43,48
47	10,3	87	54,09	41,51
48	11,56	77	56,79	37,72
49	4,13	70,5	54,85	40,49
50	9,47	84,8	50,65	38,48
51	8,95	76,13	57,12	42,2
52	6,68	95,68		

Priloga 4 Zbirne tabele rezultatov urinskega pregleda

I. Skupina z obolenji sečil in spolovil

št pacienta	semikvantitativni pregled										urinski sediment						
	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO [g/L]	UBG [mmol/L]	NIT	LEV	ERI	LEV	CIL	EP C	KRIS	MS KAP	BAKT
1	NEG	NEG	NEG	1,03	TRACE	7	>3,0	3,2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	STRUV	MALO	BAKT K	
2	NEG	SMALL	NEG	1,02	TRACE	7,5	1	3,2	NEG	NEG	5-8	POSAM	NEG	POSAM	NEG	BAKT	
2a	NEG	SMALL	NEG	1,026	TRACE	6,5	NEG	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	POSAM	NEG	NEG	
3	NEG	NEG	NEG	1,014	TRACE	8,5	1	3,2	POS	15	MASA	MASA	NEG	POSAM	POSAM	BAKT K/P	
4	NEG	SMALL	NEG	1,03	TRACE	6,5	1	3,2	NEG	NEG	DO 15	DO 10	POSAM	POSAM	NEG	BAKT K	
5	NEG	SMALL	NEG	1,032	NEG	9	3	3,2	NEG	NEG	POSAM	15-25	NEG	POSAM	STRUVIT	BAKT	
6	NEG	NEG	NEG	1,05	TRACE	9	3	3,2	NEG	NEG	MASA	MASA	NEG	ŠTEVILNE	STRUVIT	BAKT P	
7	5,5	LARGE	NEG	1,054	TRACE	7	0,3	3,2	NEG	TRACE	MASA	POS	NEG	POSAM	POSAM	BAKT K	

Legenda:

GLU – glukoza, BIL – bilirubin, KET – ketoni, SG – specifična teža, BLD – kri, PRO – proteini, UBG – urobilinogen, NIT – nitriti, LEV – levkociti, ERI – eritrociti, CIL – cilindri, EP C – epitelne celice, KRIS – kristali, MS KAP – maščobne kapljice, BAKT – bakterije, BAKT K – kokoidne bakterije, BAKT P – paličaste bakterije, BAKT K/P – kokoidne in paličaste bakterije

2a – rezultati po zdravljenju

II. Skupina s plodnostnimi motnjami

št pacienta	semikvantitativni pregled										urinski sediment						
	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO [g/L]	UBG [mmol/L]	NIT	LEV	ERI	LEV	CIL	EP C	KRIS	MS KAP	BAKT
8	NEG	SMALL	NEG	1,03	NEG	6	1	3,2	NEG	NEG	NEG	DO 4	DO 3	DO 3	CA OKS	POSAM	BAKT
9	NEG	SMALL	NEG	1,036	TRACE	7,5	3	3,2	NEG	NEG	MASA	MASA	NEG	POSAM	POSAM	POSAM	BAKT P
10	NEG	SMALL	NEG	1,03	NEG	6	0,3	3,2	NEG	NEG	NEG	DO 15	DO 1	DO 4	NEG	NEG	NEG
11	NEG	NEG	NEG	1,034	NEG	5,5	NEG	3,2	NEG	NEG	DO 7	DO 1	NEG	DO 2	POSAM	POSAM	NEG
12	NEG	SMALL	NEG	1,05	NEG	9	1	3,2	NEG	NEG	POSAM	NEG	NEG	POSAM	POSAM	POSAM	NEG
12a	NEG	SMALL	NEG	1,04	NEG	8	NEG	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	POSAM	POSAM	NEG	NEG
13	NEG	SMALL	NEG	1,046	NEG	7,5	0,3	3,2	NEG	NEG	POSAM	DO 2	POSAM	POSAM	NEG	NEG	BAKT
13a	NEG	SMALL	NEG	1,052	NEG	7,5	NEG	3,2	NEG	NEG	POSAM	NEG	NEG	POSAM	NEG	NEG	BAKT
14	NEG	NEG	NEG	1,062	NEG	7	0,3	3,2	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POSAM	NEG	POSAM	NEG
15	NEG	NEG	NEG	1,07	NEG	7	0,3	3,2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	NEG
16	NEG	SMALL	NEG	1,054	TRACE	6	1	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	POSAM	NEG	POSAM	NEG
17	NEG	SMALL	NEG	1,044	TRACE	7	1	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	ŠTEVILNE	NEG	NEG	BAKT
18	NEG	NEG	NEG	1,016	NEG	7	NEG	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	POSAM	POSAM	VELIKO	BAKT P
19	NEG	SMALL	NEG	1,046	NEG	9	3	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG
20	NEG	NEG	NEG	1,032	NEG	9	3	3,2	NEG	NEG	NEG	POSAM	NEG	POSAM	POSAM	POSAM	BAKT
21	NEG	SMALL	NEG	1,08	NEG	9	1	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	POSAM	STRUVIT	POSAM	NEG

Legenda:

GLU – glukoza, BIL – bilirubin, KET – ketoni, SG – specifična teža, BLD – kri, PRO – proteini, UBG – urobilinogen, NIT – nitriti, LEV – levkociti, ERI – eritrociti, CIL – cilindri, EP C – epitelne celice, KRIS – kristali, MS KAP – maščobne kapljice, BAKT – bakterije, BAKT K – kokoidne bakterije, BAKT P – paličaste bakterije, BAKT K/P – kokoidne in paličaste bakterije

12a in 13a – rezultati po zdravljenju

III. Kontrolna skupina

št pacienta	semikvantitativni pregled										urinski sediment						
	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO [g/L]	UBG [mmol/L]	NIT	LEV	ERI	LEV	CIL	EP C	KRIS	MS KAP	BAKT
22	NEG	NEG	TRACI	1,025	TRACE	6	>3.0	3,2	NEG	NEG	1	NEG	NEG	2	NEG	NEG	NEG
23	NEG	SMALL	NEG	1,025	NEG	6	0,3	16	NEG	NEG	NEG	NEG	DO 1	DO1	NEG	POSAM	NEG
24	NEG	NEG	NEG	1,015	NEG	7,5	TRACE	3,2	NEG	NEG	DO1	DO1	DO1	DO1	AM SOLI	POSAM	BAKT
25	NEG	NEG	NEG	1,01	NEG	8	TRACE	3,2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	STRUV	POSAM	NEG
26	NEG	NEG	TRACI	1,025	TRACE	7	1	3,2	NEG	NEG	DO 7	DO 15	DO 1	DO 3	STRUV	POSAM	BAKT K
27	NEG	NEG	NEG	1,02	TRACE	7	1	3,2	NEG	NEG	DO10	DO7	DO1	DO 3	AM SOLI	POSAM	BAKT K
28	NEG	NEG	NEG	1,02	NEG	6,5	1	3,2	NEG	NEG	DO 5	DO 8	DO 3	DO 4	NEG	POSAM	BAKT K
29	NEG	NEG	NEG	1,015	NEG	7	0,3	3,2	NEG	NEG	DO 2	DO 4	DO 2	DO 3	STRUV	NEG	BAKT K
30	NEG	NEG	NEG	1,008	TRACE	7	0,3	3,2	NEG	NEG	MASA	DO 5	NEG	POSAM	NEG	NEG	NEG
31	NEG	NEG	NEG	1,05	TRACE	5,5	TRACE	3,2	NEG	NEG	15-20	POSAM	POSAM	POSAM	NEG	POSAM	BAKT
32	NEG	NEG	NEG	1,01	TRACE	7	NEG	3,2	NEG	NEG	DO 2	DO 2	DO1	DO 1	NEG	POSAM	NEG
33	NEG	NEG	NEG	1,036	NEG	8,5	NEG	3,2	NEG	NEG	POSAM	1-5	NEG	POSAM	POSAM	POSAM	NEG
34	NEG	NEG	NEG	1,06	NEG	9	1	3,2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	STRUV	POSAM	BAKT
35	NEG	NEG	NEG	1,05	NEG	7,5	0,3	3,2	NEG	NEG	NEG	POSAM	NEG	POSAM	STRUV	POSAM	NEG
36	NEG	LARGE	NEG	1,06	NEG	7	1	3,2	NEG	NEG	POSAM	10-20	POSAM	POSAM	NEG	NEG	BAKT
37	NEG	NEG	NEG	1,054	NEG	9	1	3,2	NEG	NEG	POSAM	5-10	NEG	ŠTEVILNI	STRUV	POSAM	BAKT
38	NEG	NEG	NEG	1,036	NEG	8,5	0,3	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	POSAM	POSAM	POSAM	POSAM	BAKT K
39	NEG	NEG	NEG	1,038	TRACE	7	3	3,2	NEG	15	5-8	20-30	NEG	5-10	NEG	NEG	BAKT
40	5,5	NEG	NEG	1,07	NEG	7	1	3,2	NEG	NEG	POSAM	20-30	POSAM	POSAM	POSAM	NEG	BAKT
41	NEG	NEG	NEG	1,01	NEG	8	NEG	3,2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POSAM	NEG
42	NEG	NEG	NEG	1,022	NEG	8,5	>3.0	3,2	NEG	NEG	NEG	NEG	POSAM	POSAM	STRUV	POSAM	BAKT
43	NEG	NEG	NEG	1,015	NEG	7,5	NEG	3,2	NEG	NEG	DO2	DO 1	NEG	DO 1	NEG	POSAM	BAKT K
44	NEG	NEG	NEG	1,008	NEG	7	NEG	3,2	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	POSAM	POSAM	NEG	NEG
45	NEG	NEG	NEG	1,054	NEG	5,5	NEG	3,2	NEG	NEG	NEG	NEG	POSAM	POSAM	NEG	NEG	NEG
46	NEG	LARGE	NEG	1,02	NEG	5,5	NEG	3,2	NEG	NEG	NEG	POSAM	NEG	POSAM	STRUV	POSAM	BAKT
47	NEG	NEG	TRACI	1,026	TRACE	6,5	1	3,2	NEG	NEG	MASA	POSAM	NEG	POSAM	POSAM	NEG	BAKT
48	NEG	NEG	NEG	1,025	TRACE	7	0,3	3,2	NEG	NEG	MASA	NEG	NEG	POSAM	POSAM	POSAM	NEG
49	NEG	NEG	NEG	1,046	NEG	6	1	3,2	NEG	NEG	NEG	POSAM	POSAM	MASA	NEG	NEG	NEG
50	NEG	NEG	NEG	1,065	NEG	5,5	0,3	3,2	NEG	NEG	NEG	POSAM	NEG	POSAM	NEG	NEG	NEG
51	NEG	NEG	NEG	1,068	TRACE	7	3	3,2	NEG	NEG	MASA	POSAM	POSAM	ŠTEVILNI	POSAM	NEG	NEG
52	NEG	SMALL	NEG	1,03	TRACE	6	NEG	3,2	NEG	NEG	MASA	POSAM	NEG	POSAM	NEG	NEG	BAKT

Legenda:

GLU – glukoza, BIL – bilirubin, KET – ketoni, SG – specifična teža, BLD – kri, PRO – proteini, UBG – urobilinogen, NIT – nitriti, LEV – levkociti, ERI – eritrociti, CIL – cilindri, EP C – epitelne celice, KRIS – kristali, MS KAP – maščobne kapljice, BAKT – bakterije, BAKT K – kokoidne bakterije, BAKT P – paličaste bakterije, BAKT K/P – kokoidne in paličaste bakterije

Priloga 5 Rezultati pregleda semena pri samcih iz kontrolne skupine

I. Pregled semena po odvzemu

Št. pacienta	starost (v letih)	prepucialni bris PCR	pregled semena takoj po odvzemu					mikroskopski pregled semena			
			barva	vonj	semenčic/ml	količina semena (v ml)	giblјivost semenčic (v %)	MNS (v %)	MAS (v %)	MNS (v %) po 3 urah	MAS (v %) po 3 urah
26	7	<i>M. canis</i>	sivobela	brez vonja	35,4 x 10 ⁶	3,4	85	78	22	48	52
27	1	negativno	sivobela	brez vonja	67,3 x 10 ⁶	5,2	90	84	16	64	36
28	10	mikoplazme	sivobela	brez vonja	41,5 x 10 ⁶	2,5	90	51	49	42	58
29	2	<i>M. canis</i>	sivobela	brez vonja	37,4 x 10 ⁶	6	90	76	24	79	21

MNS – morfološko normalni spermiji, MAS – morfološko abnormalni spermiji, mikoplazme – druge mikoplazme

II. Integriteta celične membrane

Št. pacienta	starost (v letih)	prepucialni bris PCR	HOS test (v %)		eozin/nigrozin test (v %)	
			ob odvzemu	po 3 urah	ob odvzemu	po 3 urah
26	7	<i>M. canis</i>	A52/E 48	A44/E 56	56	88
27	1	negativno	A61/E 39	A 59/E 41	64	73
28	10	mikoplazme	A 48/E 52	A 35/E 65	58	66
29	2	<i>M. canis</i>	A73/E 27	A 67/E 33	51	82

mikoplazme – druge mikoplazme, A – odstotek mrtvih spremijev, E – odstotek živih spremijev

III. Računalniška analiza CASA

Št. pacienta	starost (v letih)	prepucialni bris PCR	CASA											
			% G 0h-1. meritev	% G 0h-2. meritev	% G 0h-povp.	% PG 0h-1. meritev	% PG 0h-2. meritev	% PG 0h-povp.	% G 3h-1. meritev	% G 3h-2. meritev	% G 3h-povp.	% PG 3h-1. meritev	% PG 3h-2. meritev	% PG 3h-povp.
26	7	<i>M. canis</i>	19	43/39	41	8	20/14	17	24	29	27	7	10	9
27	1	negativno	87	81	84	60	55	58	89	89	89	45	44/49	46
28	10	mikoplazme	16	19	18	0	1	1	19	18	19	2	0	1
29	2	<i>M. canis</i>	93	92/92	92	72	64/62	63	92	89	91	70	66	68

G – gibljivost, PG – progresivna gibljivost, mikoplazme – druge mikoplazme

IV. Primerjava rezultatov prepucialnih brisov in semenske tekočine z metodo PCR

št. pacienta	starost v letih	prepucialni bris PCR	semenska tekočina PCR
26	7	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>
27	1	negativno	negativno
28	10	mikoplazme	mikoplazme
29	2	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>

mikoplazme – druge mikoplazme

Priloga 6 Združeni rezultati molekularnih preiskav

I. Skupina z obolenji sečil in spolovil

osnovni podatki										PCR			metagenomika						
št. pacienta	pasma	starost (leta)	spol	reproduktivno stanje	faza ciklusa	tel. masa (kg)	18S RNA Ct	PCR mikoplazme	PCR <i>M. canis</i>	Primerjava nukleotidnega zaporedja (% podobnosti)	<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>Mycoplasma canis</i>	<i>Mycoplasma opalescens</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma spumans</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma canadense</i>		
1	Mešanec	9	Ž	sterilizirana	anestrus	14	24,87757683	neg	neg										
2	Mešanec	9	M	kastriran	kastrat	13,8	19,30335808	poz	poz	<i>M. canis</i> (100 %)									
2a	Mešanec	9	M	kastriran	kastrat	13,8		neg	neg										
3	Mešanec	2	Ž	sterilizirana	anestrus	12,8	25,20830727	poz	poz	mešana sekvenca (80 % <i>M. canis</i>)									
4	Francoski buldog	6	M	intakten	intakten	15,8	19,39615059	neg	neg		0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %		
5	Sibirski husky	1	Ž	intaktna	anestrus	13,8	20,74898148	poz	poz	<i>M. cynos</i> (100 %)									
6	Mešanec	5	Ž	sterilizirana	anestrus	44	20,85733604	neg	neg		0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %		
7	Španjel kavalir king charles	1	Ž	intaktna	anestrus	9,8	22,42572403	poz	poz	mešana sekvenca (<i>U. gallorale</i> 94 %)									

zeleno – rezultati po zdravljenju; rdeče – *M. canis* pozitivni

II. Skupina s plodnostnimi motnjami

osnovni podatki										PCR			metagenomika						
št. pacienta	pasma	starost (leta)	spol	reproduktivno stanje	faza ciklusa	tel. masa (kg)	18S RNA Ct	PCR mikoplazme	PCR <i>M. canis</i>	Primerjava nukleotidnega zaporedja (% podobnosti)	<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>Mycoplasma canis</i>	<i>Mycoplasma opalescens</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma spumans</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma canadense</i>		
8	Terier parson jack russell	6	M	intakten	intakten	4,7	18,17720222	poz	neg	mešana sekvenca, <i>M. miroungigenitalium</i> (94 %)	11,76 %	0,00 %	2,10 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %		
9	Bernski planšarski pes	4	M	intakten	intakten	36,2	18,54579353	neg	neg										
10	Nemški ovčar	6	Ž	intaktna	estrus	29,3	17,73189354	poz	poz	<i>U. gallorale</i> (94 %)									
11	Nemški ovčar	5	Ž	intaktna	diestrus	26,1	22,17442131	poz	poz	ni določena									
12	Zlati prinašalec	4	Ž	intaktna	estrus	34,2	23,16855049	poz	poz	mešana sekvenca (<i>M. canis</i> 91 %)									
12a	Zlati prinašalec	4	F	intaktna	estrus	34,2		neg	neg										
13	Zlati prinašalec	5	M	intakten	intakten	36	23,43418884	poz	poz	<i>M. canis</i> (99 %)	0,00 %	2,48 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %		
13a	Zlati prinašalec	5	M	intakten	intakten	36		neg	neg										
14	Airedalski terier	8	Ž	intaktna	diestrus	28,3	27,09704781	neg	neg										
15	Airedalski terier	5	M	intakten	intakten	30,1	19,37378502	poz	neg	<i>M. cynos</i> (100 %)	17,49 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %		
16	Nemški ovčar	4	Ž	intaktna	estrus	28,3	22,05	neg	neg		0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %		
17	Ameriški staffordshirski terier	3	Ž	intaktna	diestrus	20,1	20,81504059	poz	poz	mešana sekvenca (<i>M. edwardii</i> 94 %, <i>M. canis</i> 92 %)									
18	Argentinska doga	6	Ž	intaktna	estrus	30,2	31,15471458	poz	neg	mešana sekvenca (93 % <i>U. gallorale</i>)	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %		
19	Bernski planšarski pes	2	Ž	intaktna	diestrus	38,3	21,25323105	neg	neg										
20	Bernski planšarski pes	3	Ž	intaktna	diestrus	40,2	23,67811394	poz	poz	mešana sekvenca (99 % <i>M. canis</i>)									
21	Kratkodlaki weimaranec	3	Ž	intaktna	anestrus	24,9	25,0115757	poz	neg	<i>U. gallorale</i> (95 %)									

zeleno – rezultati po zdravljenju; rdeče – *M. canis* pozitivni

III. Kontrolna skupina

Št. pacienta	osnovni podatki							18S RNACt	PCR mikoplazme	PCR <i>M. canis</i>	Primerjava nukleotidnega zaporedja (% podobnosti)	metagenomika						
	pasma	starost (leta)	spol	reproduktivno stanje	faza ciklusa	tel. masa (kg)	<i>Mycoplasma cynos</i>					<i>Mycoplasma canis</i>	<i>Mycoplasma opalescens</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma spumans</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma canadense</i>	
22	Angleški špringer španjel	9	Ž	intaktna	estrus	17,4	20,95232964	neg	neg									
23	Mešanec	1	Ž	intaktna	diestrus	21	26,20441818	poz	poz	<i>M. maculosum</i> (99 %)	0,09 %	10,77 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
24	Japonski čin	3	M	intakten	intakten	3,1	19,26061821	poz	neg	<i>M. cynos</i> (100 %)	18,50 %	0,01 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
25	Mešanec	2	Ž	sterilizirana	anestrus	23,2	22,08649826	neg	neg									
26	Škotski terier	7	M	intakten	intakten	8,6	36,62234879	poz	poz	ni določena								
27	Škotski terier	1	M	intakten	intakten	10,4	19,96762657	neg	neg									
28	Rotvajler	10	M	intakten	intakten	42,3	19,81171608	poz	neg	<i>M. arginini</i> (97 %)								
29	Rotvajler	2	M	intakten	intakten	45	20,30551147	poz	poz	mešana sekvenca (<i>M. canis</i> 78 %)								
30	Doberman	4	M	intakten	intakten	39,5	21,52057457	poz	neg	<i>M. arginini</i> (97 %)	66,46 %	0,23 %	0,28 %	0,00 %	0,38 %	0,04 %	0,02 %	
31	Mešanec	11	Ž	sterilizirana	anestrus	23,2	21,75629997	neg	neg									
32	Pritlikavi šnavcer	9	Ž	sterilizirana	anestrus	4,8	27,58471489	neg	neg		0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
33	Romanski vodni pes	4	Ž	sterilizirana	anestrus	11,5	24,69	neg	neg									
34	Mešanec	4	Ž	sterilizirana	anestrus	11	27,94542313	neg	neg		0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
35	Angleški koker španjel	11	Ž	sterilizirana	anestrus	15	24,97828484	neg	neg									
36	Ruski hrt	3	M	intakten	intakten	39,6	17,84298897	poz	neg	<i>M. bovis genitalium</i> (95 %)								
37	Mešanec	4	Ž	sterilizirana	anestrus	6,9	22,04177475	neg	neg									
38	Ameriški koker španjel	13	M	kastriran	kastrat	16,5	28,67339325	poz	poz	<i>M. canis</i> (100 %)								
39	Mešanec	10	M	intakten	intakten	28,7	25,76142883	neg	neg									
40	Ruski hrt	1	M	intakten	intakten	42,4	16,86975861	poz	neg	<i>M. miroung genitalium</i> (94 %)								
41	Angleški špringer španjel	11	Ž	sterilizirana	anestrus	18,3	26,53050613	neg	neg									
42	Mešanec	11	M	kastriran	kastrat	14	27,44603348	neg	neg									
43	Nemška prepeličarka	7	Ž	sterilizirana	anestrus	20,2	24,98954773	neg	neg									
44	Mešanec	9	Ž	sterilizirana	anestrus	10	24,7880764	neg	neg									
45	Mešanec	8	M	kastriran	kastrat	14	27,41512108	poz	neg	mešana sekvenca (<i>M. cynos</i> 96 %)								
46	Madžarski kratkodlaki pičar	7	M	kastriran	kastrat	22	20,90690804	poz	neg	<i>M. cynos</i> (100 %)	24,38 %	0,00 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
47	Zlati prinašalec	6	M	intakten	intakten	33	25,99987221	neg	neg									
48	Zlati prinašalec	4	Ž	intaktna	estrus	28,7	31,62733841	neg	neg									
49	Mešanec	13	Ž	intaktna	diestrus	14,7	22,25840378	poz	poz	ni določena	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
50	Maizežan	7	M	intakten	intakten	4,8	22,52536583	poz	neg	<i>M. cynos</i> (100 %)	90,85 %	0,24 %	0,30 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
51	Kratkodlaki weimaranec	8	M	intakten	intakten	33	22,29886436	poz	neg	<i>M. microti</i> (91 %)								
52	Malí angleški hrt	6	M	kastriran	kastrat	13	28,28699112	poz	poz	<i>M. canis</i> (99 %)								

rdeče – *M. canis* pozitivni

Priloga 8 Združeni rezultati PCR, DIBA in metagenomike

I. Skupina z obolenji sečil in spolovil

št. pacienta	osnovni podatki						PCR	DIBA					metagenomika							
	pasma	starost (leta)	spol	reproduktivno stanje	faza ciklusa	tel. masa (kg)		PCR bris	<i>M. canis Larisa</i>	<i>M. canis PG14</i>	<i>M. cynos 896</i>	<i>M. cynos 2297</i>	<i>M. molare</i>	<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>Mycoplasma canis</i>	<i>Mycoplasma opalescens</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma spumans</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma canadense</i>
1	Mešanec	9	Ž	sterilizirana	anestrus	14	negativno	+	+	-	-	-								
2	Mešanec	9	M	kastriran	kastrat	13,8	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-								
2a	Mešanec	9	M	kastriran	kastrat	13,8	negativno	+	-	+	-	-								
3	Mešanec	2	Ž	sterilizirana	anestrus	12,8	<i>M. canis</i>	+	+	-	-	-								
4	Francoski buldog	6	M	intakten	intakten	15,8	negativno	+	+	+	+	+	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
5	Sibirski husky	1	Ž	intaktna	anestrus	13,8	mikoplazme	+	+	-	+	-								
6	Mešanec	5	Ž	sterilizirana	anestrus	44	negativno	+	+	+	-	-	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
7	Španjel kavalir king charles	1	Ž	intaktna	anestrus	9,8	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-								

zeleno – rezultati po zdravljenju; mikoplazme – druge mikoplazme

II. Skupina s plodnostnimi motnjami

št. pacienta	osnovni podatki						PCR	DIBA					metagenomika							
	pasma	starost (leta)	spol	reproduktivno stanje	faza ciklusa	tel. masa (kg)		PCR bris	<i>M. canis Larisa</i>	<i>M. canis PG14</i>	<i>M. cynos 896</i>	<i>M. cynos 2297</i>	<i>M. molare</i>	<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>Mycoplasma canis</i>	<i>Mycoplasma opalescens</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma spumans</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma canadense</i>
8	Terier parson jack russell	6	M	intakten	intakten	4,7	mikoplazme	+	-	+	+	-	11,76 %	0,00 %	2,10 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
9	Bernski planšarski pes	4	M	intakten	intakten	36,2	negativno	+	+	+	+	+								
10	Nemški ovčar	6	Ž	intaktna	estrus	29,3	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-								
11	Nemški ovčar	5	Ž	intaktna	diestrus	26,1	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-								
12	Zlati prinašalec	4	Ž	intaktna	estrus	34,2	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-								
12a	Zlati prinašalec	4	F	intaktna	estrus	34,2	negativno	+	-	+	-	-								
13	Zlati prinašalec	5	M	intakten	intakten	36	<i>M. canis</i>	+	-	+	+	-	0,00 %	2,48 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
13a	Zlati prinašalec	5	M	intakten	intakten	36	negativno	+	+	+	-	-								
14	Airedalski terier	8	Ž	intaktna	diestrus	28,3	negativno	+	+	-	-	-								
15	Airedalski terier	5	M	intakten	intakten	30,1	mikoplazme	+	+	+	+	+	17,49 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
16	Nemški ovčar	4	Ž	intaktna	estrus	28,3	negativno	+	+	-	+	+	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
17	Ameriški staffordshirski terier	3	Ž	intaktna	diestrus	20,1	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-								
18	Argentinska doga	6	Ž	intaktna	estrus	30,2	mikoplazme	+	+	+	-	-	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
19	Bernski planšarski pes	2	Ž	intaktna	diestrus	38,3	negativno	+	+	+	-	+								
20	Bernski planšarski pes	3	Ž	intaktna	diestrus	40,2	<i>M. canis</i>	+	-	+	-	-								
21	Kratkodlaki weimaranec	3	Ž	intaktna	anestrus	24,9	mikoplazme	+	+	+	-	+								

zeleno – rezultati po zdravljenju; mikoplazme – druge mikoplazme

III. Kontrolna skupina

šr. pacienta	osnovni podatki						PCR PCR bris	DIBA					metagenomika						
	pasma	starost (leta)	spol	reproduktivno stanje	faza ciklusa	tel. masa (kg)		<i>M. canis Larisa</i>	<i>M. canis PGI4</i>	<i>M. cynos 896</i>	<i>M. cynos 2297</i>	<i>M. molare</i>	<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>Mycoplasma canis</i>	<i>Mycoplasma opalescens</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>Mycoplasma spumans</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Mycoplasma canadense</i>
22	Angleški špringer španjel	9	Ž	intaktna	estrus	17,4	negativno	-	-	-	-	-							
23	Mešanec	1	Ž	intaktna	diestrus	21	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-	0,09 %	10,77 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
24	Japonski čin	3	M	intakten	intakten	3,1	mikoplazme	+	+	+	+	+	18,50 %	0,01 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
25	Mešanec	2	Ž	sterilizirana	anestrus	23,2	negativno	+	+	-	-	+							
26	Škotski terier	7	M	intakten	intakten	8,6	<i>M. canis</i>	+	-	+	-	-							
27	Škotski terier	1	M	intakten	intakten	10,4	negativno	+	+	+	+	+							
28	Rotvajler	10	M	intakten	intakten	42,3	mikoplazme	+	+	+	-	-							
29	Rotvajler	2	M	intakten	intakten	45	<i>M. canis</i>	+	+	+	+	+							
30	Doberman	4	M	intakten	intakten	39,5	mikoplazme	+	-	+	-	-	66,46 %	0,23 %	0,28 %	0,00 %	0,38 %	0,04 %	0,02 %
31	Mešanec	11	Ž	sterilizirana	anestrus	23,2	negativno	+	+	+	-	-							
32	Pritlikavi šnavcer	9	Ž	sterilizirana	anestrus	4,8	negativno	+	-	+	+	+	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
33	Romanski vodni pes	4	Ž	sterilizirana	anestrus	11,5	negativno	+	+	+	+	+							
34	Mešanec	4	Ž	sterilizirana	anestrus	11	negativno	+	+	+	+	-	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
35	Angleški koker španjel	11	Ž	sterilizirana	anestrus	15	negativno	-	+	-	+	-							
36	Ruski hrt	3	M	intakten	intakten	39,6	mikoplazme	+	+	+	+	-							
37	Mešanec	4	Ž	sterilizirana	anestrus	6,9	negativno	+	+	+	-	+							
38	Ameriški koker španjel	13	M	kastriran	kastrat	16,5	<i>M. canis</i>	+	+	+	+	-							
39	Mešanec	10	M	intakten	intakten	28,7	negativno	+	+	+	+	+							
40	Ruski hrt	1	M	intakten	intakten	42,4	mikoplazme	+	+	+	+	+							
41	Angleški špringer španjel	11	Ž	sterilizirana	anestrus	18,3	negativno	+	+	-	-	+							
42	Mešanec	11	M	kastriran	kastrat	14	negativno	+	+	+	-	+							
43	Nemška prepeličarka	7	Ž	sterilizirana	anestrus	20,2	negativno	+	+	+	+	+							
44	Mešanec	9	Ž	sterilizirana	anestrus	10	negativno	+	-	-	-	-							
45	Mešanec	8	M	kastriran	kastrat	14	mikoplazme	+	+	+	+	+							
46	Madžarski kratkodlaki ptičar	7	M	kastriran	kastrat	22	mikoplazme	+	+	+	+	+	24,38 %	0,00 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
47	Zlati prinašalec	6	M	intakten	intakten	33	negativno	+	+	+	-	-							
48	Zlati prinašalec	4	Ž	intaktna	estrus	28,7	negativno	+	+	-	-	-							
49	Mešanec	13	Ž	intaktna	diestrus	14,7	<i>M. canis</i>	+	+	+	+	+	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
50	Maltežan	7	M	intakten	intakten	4,8	mikoplazme	+	+	+	-	+	90,85 %	0,24 %	0,30 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
51	Kratkodlaki weimaraneec	8	M	intakten	intakten	33	mikoplazme	+	+	+	-	+							
52	Mali angleški hrt	6	M	kastriran	kastrat	13	<i>M. canis</i>	+	-	-	-	-							

mikoplazme – druge mikoplazme

Priloga 9 Mnenje Komisije za dobrobit živali VF

Univerza
v Ljubljani Veterinarska
fakulteta

Gerbičeva 60
1000 Ljubljana, Slovenija
telefon: 01 47 70 100
faks: 01 39 32 243
dekanus@vf.uni-lj.si



Jelka Zabavnik Piano,
strokovnjakinja za dobrobit živali na VF

Sara Suhadolc Scholten
Klinika za male živali
Veterinarska fakulteta
Gerbičeva 60, Ljubljana

Ljubljana, 20.12.2016

Zadeva: Obvestilo v zvezi s prejetim dopisom

Zveza: Vaša prošnja za mnenje Komisije za dobrobit živali VF o dopolnitvi vloge na temo doktorske disertacije

Dne 28.11.2016 smo prejeli vašo prošnjo, da Komisija za dobrobit živali VF poda mnenje ali je k doktorski disertaciji z naslovom **Vloga in pomen *Mycoplasma canis* v patogenezi plodnostnih in urogenitalnih obolenj psov** potrebno pridobiti dovoljenje Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) za izvajanje poskusov na živalih.

Iz opisa raziskave je razvidno, da bo načrtovana raziskava potekala na psih s kliničnimi znaki obolenj urogenitalnega sistema in na klinično zdravih živalih s plodnostnimi motnjami. V kontrolni skupini živali bodo klinično zdravi psi brez plodnostnih motenj, ki bodo na kliniko pripeljani zaradi posegov kot so ovariektomija, kastracija ... Vzorci krvi, urina in brisi bodo odvzeti za potrebe ugotavljanja kliničnega stanja pred uvedbo v splošno anestezijo ali v splošni anesteziji. Kandidatka bo pridobila pisno soglasje lastnikov živali, da dovoljujejo uporabo materiala za raziskovalne namene. V vseh primerih gre za delo s kliničnimi pacienti v okviru neeksperimentalne klinične prakse.

Zakon o zaščiti živali (Uradni list RS, 38/2013) v 21.a členu določa, da za poskus na živalih ne štejejo neeksperimentalne klinične veterinarske prakse. Člani Komisije za dobrobit živali smo se v korespondenčni seji (od 6.12.2016 do 12.9.2016) strinjali, da v opisanem primeru ne gre za poskus na živalih in zato za izvedbo opisane teme doktorske disertacije ni potrebno dovoljenje UVHVVR za izvajanje poskusov na živalih.


Prof. dr. Jelka Zabavnik Piano
Strokovnjakinja za dobrobit živali VF




Prof. dr. Andrej Kirbiš
dekan VF

Priloga 10 Soglasje lastnika živali za sodelovanje v klinični študiji

Priloga 1

SOGLASJE LASTNIKA ŽIVALI

1. Ime in priimek lastnika živali:

Podatki o živali:

2. Izjava lastnika živali:

Podpisani sem kot lastnik zgoraj omenjene živali razumel postopke, ki bodo izvedeni v raziskavi z naslovom: " Vloga in pomen *Mycoplasma canis* v patogenezi plodnostnih motenj in urogenitalnih obolenj psov " in dovoljujem sodelovanje moje živali v tej raziskavi.

Moje sodelovanje v raziskavi je popolnoma prostovoljno in ga lahko odklonim oziroma sodelovanje v toku raziskave kadarkoli prekinem.

Dobrobiti, tveganja in nevšečnosti, ki bi jim utegnila biti podvržena moja žival, mi je razumljivo razložil(a), ki je odgovoren(a) za varnost v poteku raziskave. Povedal(a) mi je tudi na koga naj se obrnem v primeru določenih nevšečnosti v njegovi odsotnosti. Zato prostovoljno in obveščeno pristajam na sodelovanje moje živali v tej raziskavi in se tudi strinjam, da v raziskovalne namene uporabijo vse vzorce, ki bodo v toku raziskave odvzeti.

Podpis lastnika živali Datum

Izjava raziskovalca

Podpisani(a), sem razumljivo razložil(a) lastniku živali dobrobiti, tveganja in nevšečnosti sodelovanja v raziskavi.

Podpis raziskovalca Datum

Priča:

Priloga 11 Časovnica pregledov

Priloga 4

Časovnica pregledov

Zap. št. : _____

Posebnosti : _____

Veterinar : _____

Datum : _____

SKUPINE PSOV VKLJUČENIH V RAZISKAVO (izberi eno):

1. klinični znaki obolenj urogenitalnega trakta
 2. klinično zdrave živali s plodnostnimi motnjami
 3. kontrolna skupina

DATUM:	DAN 0	DAN 14	DAN	DAN	SAMICE ob nast. ciklusu DAN	SAMICE čez 6. mesecev DAN
	kri					
polna kri						
hematološka preiskava						
krvni serum						
biokemija						
elektroforeza ser.p.						
DIBA						
Western blot						
T4 & TSH						
progesteron						
urin						
semikvantitativen pregled						
pregled sedimenta						
UPC						
mikrobiološka						
PCR						
bris in izpirki						
PCR						
mikrobiološka						
citološka preiskava vag. brisa						
semenska tekočina						
citološki pregled						
rač. analiza semena						
mikrobiološka						

Opombe:

- a) dan 0 je dan vključitve v raziskavo
 b) kontrolna skupina živali ne bo pregledana po 2 tednih!

Priloga 12 Klinični pregled – samice

Priloga 2

Ženski genitalni trakt

Zaporedna št.: _____

Posebnosti: _____

Veterinar: _____

Datum: _____

History

Zakaj prihaja? (prejšnje težave, pogostnost, trajanje, zdravljenje, rezultati): _____

		Od kdaj	20	Koliko časa
Izcedek	občasne kaplice	nekaj ml	obiljen	zelo obilen
	voden, bister	bister, bolj gost	bel, gost	rumen
	čokol. Obarvan	rjavkast	zelen	rdeč
Estrus	zadnjič 20	neobičajen potek	se še ni pojavil	
Brejost:	zadnja 20	neobičajen potek	živorojeni	mrtvororojeni
		neobičajna brejost	neobičajna kotitev	še ni prišlo do
Veikost abdomna	povečan			
Življenjski pogoji	pesjak	edina žival	v hiši z drugimi psi/živalmi	
Zgodovina				
Estrus cikel	starost pri 1. estrusu	mesecev		
	intervali:	-	mesecev	nepravilni intervali
Preprečitev estrusa	1. uporabljeno:	let	≥ 2x letno	occasional estrus allowed
Prejšnja legja	število	datum	število mladičev	-
	velika perinat. smrtnost	sn. Potomci	neobičajne brejosti	neobičajna kotitev
OVH	datum	kastracija	drugi razlogi	zapleti

Druga opazanja in opisi: _____

Klinični pregled

Vulva				
Okočica	zadebeljen perineum		zamazana okočica	
Izcedek	serozen	mukozen	purulenten	hemopurulenten
	hemoragičen	s kosčki tkiva	smrdeč	
Vulva	majhna	otečena		
	prekrita z dorz. gubo		dorz. guba odsotna	
	vidna dorzalna komisura			
Mukoza	roza/brez leska	bledo roza/lesketajoča	rdeča	
Abdomen				
Veikost/oblika	umaknjen	okrogel/napet	povešen	vbočen
Superf. Palpacija	uterus	uterus zelo velik	fetusi	
Globinska palp.	uterus	jajčniki	fetusi	plodove komore
Vaginoskopija				
Mucoza	roza/brez leska	bledo roza/lesketajoča	(lisasta) roza/bela	
	plitke gube	globoke gube po celotni površini		
	gube z gubami			
Sekret/izcedek	tumor	razjede		
	serozen	mukozen	gnojni	krvsv. gnojni
	hemoragičen	malo tekoč		
Cervix	viden	odprt	viden fetus	
Vaginalna palpacija				
Vagina	zožena	tumor	razjede	tujki
Pelvični kanal	deformiran	nenormalna uretra	deli plodov	
Rektalna palpacija: _____				
druga opazanja in opisi: _____				

Problem(s): _____

Priloga 13 Klinični pregled – samci

Priloga 2

Moški genitalni trakt

Zap. št. : _____

Posebnosti : _____

Veterinar : _____

Datum : _____

Zgodovina

Zakaj prihaja _____

	Od kdaj?	20	Koliko časa
Libido	<input type="checkbox"/> odsoten <input type="checkbox"/> znaki bolečine	<input type="checkbox"/> zmanjšan <input type="checkbox"/> nenorm. Vedenje	<input type="checkbox"/> primeren <input type="checkbox"/> procent koncepcij
Fertilitnost	<input type="checkbox"/> prejšnje parjenje	<input type="checkbox"/> kolikox	<input type="checkbox"/> živahen <input type="checkbox"/> %
Živj. Pogoji	<input type="checkbox"/> živi sam	<input type="checkbox"/> z drugimi	<input type="checkbox"/> nedavno pripeijan
Zgodovina	<input type="checkbox"/> bolezen	<input type="checkbox"/> zdravljen z	

Druge opažanja in pripombe _____

Klinični pregled

Libido	<input type="checkbox"/> prisotna v estrusu <input type="checkbox"/> brez parjenja	<input type="checkbox"/> igriv <input type="checkbox"/> primeren	<input type="checkbox"/> zelo igriv <input type="checkbox"/> močan
Skrotum	<input type="checkbox"/> zadebeljen (lokalno)	<input type="checkbox"/> poškodbe	<input type="checkbox"/> asimetričen
Testisa -levo	<input type="checkbox"/> ni v skrotumu	volumen: _____ ml	<input type="checkbox"/> mehak <input type="checkbox"/> trd <input type="checkbox"/> boleč
-desno	<input type="checkbox"/> ni v skrotumu	volumen: _____ ml	<input type="checkbox"/> mehak <input type="checkbox"/> trd <input type="checkbox"/> boleč
Nadmodek -levo	<input type="checkbox"/> topel	<input type="checkbox"/> velik <input type="checkbox"/> majhen	<input type="checkbox"/> mehak <input type="checkbox"/> trd <input type="checkbox"/> boleč
-desno	<input type="checkbox"/> topel	<input type="checkbox"/> velik <input type="checkbox"/> majhen	<input type="checkbox"/> mehak <input type="checkbox"/> trd <input type="checkbox"/> boleč
Prepucij	<input type="checkbox"/> izcedek	<input type="checkbox"/> ozka odprtina	<input type="checkbox"/> mukozna preveč rdeča
Penis	<input type="checkbox"/> cannot be exposed	<input type="checkbox"/> anomalije	<input type="checkbox"/> os penis nenormalna (palpacija)
Prostata	<input type="checkbox"/> asimetrična	<input type="checkbox"/> (delno) abdominalno	<input type="checkbox"/> trda <input type="checkbox"/> boleča
	<input type="checkbox"/> površina ni gladka	approx. diameter: _____ cm	

Druge opažanja in pripombe _____

Problem(s):

Ocena

Plan

Priloga 14 Pregled oploditvene sposobnosti

Priloga 3

Pregled oploditvene sposobnosti psov
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
KLINIKA ZA REPRODUKCIJO IN KONJE
Cesta v Mestni Log 47, Ljubljana

Pacient:
Številka pacienta:

Datum pregleda:

Teža:

Mikročip:

DNK:
Članstvo:

ANAMNEZA

Razlog za pregled:

Zdravstveni problemi:

Zdravila:

Datum zadnjega pripusta:

Problemi s plodnostjo v preteklosti:

Plodnostne motnje:

Vakcinacija:

Testiranje bruceloza:

Uporabljen test in rezultat:

Zadnje leglo:

Število mladičev:

datum:

posebnosti:

Datum zadnjega odvzema semena/morebitna odstopanja pri pregledu semena:

Pregled :

Penis:

Prepucij:

Prostata:

Semenovod:

Skrotum:

Epididimis (D):

(L):

Testis (D):

(L):

Konzistenca (T/N/M):

Tvorbe/tekočina/bolečina?:

Odvzem semena:

Libido (slab, dober, odličen):

Prisotnost goneče psice/faza ciklusa/uporaba feromonov?:

Uporabljena oprema:

Analiza semena:

Skupen volumen ejakulata:

0

mL

Progresivna gibljivost (%):

0

%

Št. normalnih semenčic/ejakulat:

0

(10⁶)

(Normalne vrednosti)

(variable)

(normalno > 70%)

(normalno 200 - 2000 x 10⁶)

Priloga 15 Nastavitve spermoanalizatorja za pasje seme

PARAMETER	NASTAVITEV
Število okvirjev na sekundo	60 Hz
Število okvirjev	30
Min. kontrast	80
Minimalna velikost celic	5 piksel
Velikost celic	5 piksel
Intenziteta celic	70
Progresivne semenčice - VAP	40 $\mu\text{m/s}$
Progresivne semenčice - STR	75 %
Počasne celice – meja VAP	9,9 $\mu\text{m/s}$
Počasne celice – meja VSL	20,0 $\mu\text{m/s}$
Intenziteta	2176
Vrsta kamrice	Makler
Globina kamrice	10 $\mu\text{m/s}$
Število preiskovanih polj	3
Izbira polja	avtomatska

Priloga 16 Članek: Association of *Mycoplasma canis* with fertility disorders in dogs: a case study supported by clinical examination.



pathogens



Article

Association of *Mycoplasma canis* with Fertility Disorders in Dogs: A Case Study Supported by Clinical Examination, PCR, 16S Microbiota Profiling, and Serology

Sara Suhadolc Scholten ¹, Brigita Slavec ², Primož Klinc ^{3,†}, Nataša Tozon ¹, Bojan Papić ⁴ and Saša Koprivec ^{5,*}

¹ Small Animal Clinic, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia; sara.suhadolcscholten@vf.uni-lj.si (S.S.S.); natasa.tozon@vf.uni-lj.si (N.T.)

² Institute of Poultry, Birds, Small Mammals, and Reptiles, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia; brigita.slavec@vf.uni-lj.si

³ Clinic for Reproduction and Large Animals, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

⁴ Institute of Microbiology and Parasitology, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

⁵ Institute of Preclinical Sciences, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

* Correspondence: sasa.koprivec@vf.uni-lj.si

† Deceased.



Citation: Suhadolc Scholten, S.; Slavec, B.; Klinc, P.; Tozon, N.; Papić, B.; Koprivec, S. Association of *Mycoplasma canis* with Fertility Disorders in Dogs: A Case Study Supported by Clinical Examination, PCR, 16S Microbiota Profiling, and Serology. *Pathogens* **2024**, *13*, 391. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050391>

Academic Editor: Danielle Gunn-Moore

Received: 14 March 2024

Revised: 26 April 2024

Accepted: 6 May 2024

Published: 8 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The role of *Mycoplasma canis* in canine fertility disorders is still poorly understood. As infection is often asymptomatic, there is an increasing need for appropriate diagnostic methods and treatment plans that would allow the reliable detection of *M. canis* infection and rapid alleviation of infection symptoms in affected dogs. In this study, we included 14 dogs with fertility problems and 16 dogs without fertility disorder signs. We compared clinical examination data and selected laboratory parameters (hematology and biochemistry) between the groups. We performed PCR-based detection of *M. canis* and 16S rRNA gene-based microbiota profiling of DNA isolated from vaginal and preputial swabs. Dog sera were tested for the presence of *M. canis*-specific antibodies. Hematological and selected biochemical parameters showed no differences between groups. PCR-based detection of *M. canis* in the samples was consistent with the results of 16S microbiota profiling. Several other bacterial taxa were also identified that could potentially be involved in different fertility disorders. Serological methods were not accurate enough since high cross-reactivity rates were observed. In the future, more accurate and efficient methods will be needed to determine the role of *M. canis* and its true role in the pathogenesis of specific fertility disorders in dogs.

Keywords: *Mycoplasma canis*; canine fertility disorders; vaginal swab; preputial swab; PCR; 16S microbiota profiling; specific antibodies

1. Introduction

Mycoplasma canis (*M. canis*), like other bacteria of the Mollicutes class, is characterized by its small size, simplicity, and the absence of a cell wall. Due to their small genome size and the resulting limited ability to synthesize proteins, mycoplasmas live parasitically and are found in humans, mammals, reptiles, fish, arthropods, and even plants [1]. *M. canis* has already been isolated from dogs with clinical signs of urogenital disease and reproductive disorders [2–7]. Additional reports have demonstrated the presence of *M. canis* in atypical samples, such as nasal swabs and lung tissue samples of dogs suffering from canine infectious respiratory disease [8–10] and even in different human tissues following dog bites [11,12]. L'Abée-Lund et al. [2] have successfully isolated *M. canis* from the prostate, epididymis, and bladder wall. Maksimović et al. isolated *M. canis* and other mycoplasmas from the vagina of female dogs in different stages of the reproductive cycle [3]. Rosendal

showed that experimental infection with *M. canis* led to various complications in the organs of the reproductive and urogenital tract of dogs [13].

Several reports state that mycoplasma species belonging to the genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and *Acholeplasma* are part of the normal mucosal microbiota [4–6,14,15]. *M. canis* has been isolated from mucosal surfaces of asymptomatic dogs as well as from dogs with non-specific clinical signs. The successful in vitro growth of *M. canis* isolated from clinical samples is hampered by the demanding growth requirements and the need for a nutrient-rich environment [16]. This also contributes to the lack of understanding of the role of specific virulence factors and the type of infection that *M. canis* causes in diseased animals [17]. We have previously identified hemagglutinins and neuraminidases as important virulence factors of canine mycoplasmas [18]. Differences in these factors influence the virulence in different strains. New knowledge of pathogen species-specific characteristics is important for setting up new investigation protocols; for example, molecular-based approaches. Reports on the presence of *M. canis* in samples from the canine urogenital and reproductive tract differ between serologic and molecular studies and a novel approach to diagnostics is needed.

In general, infertility in females is the inability to successfully conceive and give birth to offspring, even when mated repeatedly with a known fertile male at the time of ovulation. It is also defined as the inability to impregnate a fertile female at the time of ovulation. In some cases, presumed infertility is due to inadequate breeding management rather than the inability to conceive [19]. Knowledge of male infertility is inadequate. Poor semen quality can occur at any age, often due to unknown causes. Factors such as hormonal imbalances, heat, stress, toxins, or autoimmune diseases can contribute to infertility [20]. As many cases of infertility remain unexplained, we need to look at other possible causes of fertility issues, such as the composition of the microbiota of the female and male reproductive tract. So far, clinical signs of urogenital diseases and fertility problems cannot be directly linked to mycoplasma infection [21]. As reported by Ülgen et al., *M. canis* as well as other micro-organisms were isolated from urine samples, making it difficult to determine the causative agent and results have to be interpreted with caution [22]. Sometimes, infection can be subclinical and even when clinical signs are present, urogenital tract infections are primarily treated with broad-spectrum antibiotics, which have poor-to-no effect on mycoplasmas. The lack of a cell wall makes them resistant to several antibiotic species, such as penicillin, cephalosporin, vancomycin, and bacitracin [17]. The number of recent clinical studies is low, and the data of published studies are frequently contradictory [6,22–24]. Culture methods and serology are slowly being replaced by molecular methods, which are fast, have a lower detection limit, and offer high specificity [25–28]. The aim of this case study was to investigate whether fertility disorders in dogs can be linked to *M. canis* infection by comparing the results of several diagnostic techniques. Clinical examination findings were compared to the results of molecular and serological methods.

2. Materials and Methods

2.1. Dogs and Inclusion Criteria

A total of 30 dogs of variable breeds were included in this study. The dogs were divided into two groups. The first group included 14 dogs (10 females and 4 males) with various fertility disorders (fertility disorder group, FD) and the second group consisted of 16 clinically healthy dogs with a proven history of fertility and producing offspring (4 females and 12 males) (control group, CTRL). The dogs ranged from 1 to 13 years of age. All animals underwent routine clinical examination and hematological analysis. In addition, selected biochemical parameters and ultrasound examination were performed in all dogs.

The criteria for the inclusion of females in the FD group were as follows: inability to produce offspring ($n = 8$), abnormal cycle progression ($n = 2$), and spontaneous termination of pregnancy ($n = 0$). The criteria for the inclusion of males in the FD group were as follows: inability to copulate or ejaculate ($n = 1$), poor semen quality ($n = 3$), and disease of the

prostate gland ($n = 0$). The CTRL group included dogs without chronic diseases that were treated during the survey and without fertility disorders as described above that have previously produced offspring.

2.2. Clinical Examination

All animals underwent a thorough clinical assessment (body condition score, evaluation of vital signs, genital discharge assessment, examination of the peripheral lymph nodes, detection of pain at abdomen palpation), breeding soundness examination (for females: medical history, examination of the external genitalia, vaginoscopy, presence of discharge, assessment of mucous membranes; for males: medical history, assessment of libido, visual assessment of scrotum, palpation of the testes, examination of penis and prepuce), blood work, and ultrasound examination. Some male patients underwent semen evaluation. Vaginal or preputial swabs were collected from all patients.

2.2.1. Hematological and Biochemical Analysis

Blood samples were collected by puncture of the peripheral vein (*v. cephalica*, *v. saphaena* or *v. jugularis*) into EDTA-containing tubes (Microtainer, Beckton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) for the determination of complete blood count (CBC) and white blood cell differential count (WCDC). Routine hematological analysis was performed using an automated flow cytometry-based laser hematology analyzer (ADVIA 120, Siemens, Munich, Germany). For the determination of selected biochemical parameters (urea and creatinine concentration), blood serum was collected in 4 mL tubes with gel and added blood coagulation activator (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Blood samples were kept at room temperature for 30 min and then centrifuged at $1300 \times g$ for 10 min at room temperature. Biochemical parameters were measured spectrophotometrically using an automated biochemical analyzer (RX Daytona, Randox, Crumlin, UK) with factory-made reagent kits (also Randox, Crumlin, UK). Sera protein and globulin levels were measured with the NanoDrop Lite instrument (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) using UV spectrophotometry designed to measure micro-volume amounts of proteins and globulins in the sera samples.

2.2.2. Vaginal/Preputial Swab Collection and Cytology

Vaginal or preputial swabs were collected from all patients in triplicate using a sterile flocked swab with a tip coated with short Nylon fibers (Copan FLOQ Swabs, Brescia, Italy). Vaginal swabs were obtained from the cranial part of the vagina by first gently separating the vulvar lips with the fingers and then inserting the swab into the dorsal part of the vulva. The first and second replicate were stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for molecular analysis. One swab was used for DNA extraction and PCR-based detection of *M. canis* and the second swab was used for 16S microbiota profiling. The third replicate was immediately used for cytology. Dried smears were May–Grunwald Giemsa-stained and evaluated under a light microscope to determine the phase of the reproductive cycle and to check for the possible presence of inflammatory cells and bacteria.

2.2.3. Semen Evaluation

Semen was collected from three out of four patients in the FD group (one dog had a complete lack of libido) and four patients in the CTRL group. Semen collection was performed by digital manipulation. Immediately after collection, the color, odor, consistency, and quantity of the collected semen were determined. The samples were also examined microscopically. Total and progressive motility of the spermatozoa in the sample were determined using computer-assisted CASA analysis (HTM-IVOS, version 12, Beverly, MA, USA). Prior to analysis, the samples were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The examination was conducted using a Makler chamber in which $5\text{ }\mu\text{L}$ of sample was dispensed. For each sample, two measurements were taken in three randomly selected fields, and their average values were used for calculations. Sperm concentration was determined with the CASA

system and a Neubauer counting chamber. Cell membrane integrity was assessed using supravital eosin/nigrosine staining under a phase-contrast microscope at 1000× magnification. Fresh semen samples underwent morphological analysis and May–Grunwald Giemsa-stained smears were used to detect morphological changes. A total of 200 spermatozoa per subject were examined to determine the percentage of morphologically normal spermatozoa and the percentage of spermatozoa with individual morphological defects.

2.2.4. Ultrasound Examination

Ultrasound examination of the urogenital system was performed using an 8C microconvex probe and an 11 L-D linear probe (both GE Healthcare, Chicago, IL, USA). In females, the ovaries, uterus, urinary bladder, and proximal urethra were examined. In males, the testes, prostate gland, urinary bladder, prostatic and penile urethra were examined.

2.3. Molecular Examination

2.3.1. Nucleic Acid Extraction

Total nucleic acids were extracted from preputial and vaginal swabs. Prior to extraction, swabs were soaked in 2 mL of PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) and shaken for 1 min on a Bio Vortex V1 shaker (Biosan, Riga, Latvia). Nucleic acids were extracted from 140 µL of PBS solution using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Nucleic acids were eluted in 60 µL elution buffer and stored at −70 °C until use.

2.3.2. PCR-Based Detection of *M. canis*

Molecular detection of *M. canis* was performed using a conventional PCR based on the amplification of a 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region (IGS), a 247 bp long species-specific nucleotide sequence. For this purpose, primer pair Myc1 and *M. canis*-R was used [29]. The 20 µL PCR reactions included 10 µL 2× DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µL (20 pmol) of each primer Myc1/*M. canis*-R, 2 µL of DNA, and deionized water. PCR amplification was performed using the GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The cycle parameters included initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 60 s, and a final elongation step at 72 °C for 5 min. Appropriate positive and negative controls were applied for each test.

All DNA samples were further tested to confirm the presence of *M. canis* and to obtain a partial neuraminidase gene sequence. Species-specific primer pair Ca-NEU-4F (5' GGA ACA GCA ATT GAA AAT GAT CAC 3') and Ca-NEU-4R (5' TGT ATT CCG TTT CCT ACC CC 3') targeting the 956 bp segment of the neuraminidase gene was used. This primer pair was constructed based on the sequence of the neuraminidase gene of the type strain *M. canis* PG14^T (MCANPG14_00438) [18]. Similarly, the 20 µL PCR reactions were performed using 10 µL 2× DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Europe), 0.5 µL (10 pmol) of each primer Ca-NEU-4F/Ca-NEU-4R, 2 µL of DNA, and deionized water. PCR amplification was performed using the GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) by applying the following parameters: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 75 s, and a final elongation step at 72 °C for 7 min.

2.3.3. Purification of PCR Products and Sanger Sequencing

PCR products from both PCR reactions were separated on a 1.8% agarose gel (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) at 130 V for 30 min. The gel was stained with ethidium bromide (BioRad, Hercules, CA, USA) and the results were visualized using BioRad Gel Doc 2000 Imaging System on Quantity One 4.4.0 Analysis Software. PCR amplicons from the second PCR (primer pair Ca-NEU-4F/Ca-NEU-4R) of appropriate length were

excised from the agarose gel and purified using the FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics Europe, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. The purified PCR amplicons were Sanger sequenced at Macrogen Europe (Amsterdam, The Netherlands). Sequences were analyzed using Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, WA, USA) and queried against the GenBank database [30] using BLASTn [31]. Obtained partial neuraminidase gene sequences were deposited into the GenBank database. A Clustal Omega alignment [32] of partial neuraminidase gene sequences was carried out, comparing the nucleotide sequences to other known mycoplasma neuraminidase genes, accessible in the GenBank database.

2.3.4. 16S Microbiota Profiling

For 16S microbiota profiling, 16S rRNA gene amplicons were sequenced at Diversigen Inc. (New Brighton, MN, USA). For the analysis of the bacterial community composition in vaginal and preputial swabs, total DNA was extracted using the DNeasy PowerSoil Pro Kit automated for high throughput on QiaCube HT with bead beating in Qiagen Powerbed Pro plates (all Qiagen, Germantown, MD, USA). DNA was quantified using qPCR with primers targeting the hypervariable region V4 (515F/806R) of the 16S rRNA gene. Libraries were prepared with a protocol derived from Gohl et al. [33] using KAPA HiFi Polymerase (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) to amplify the hypervariable region V4 (515F/806R) of the 16S rRNA gene. 16S rRNA gene amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq system using the paired-end (2 × 150 bp) mode and the MiSeq Reagent Kit v3 (both Illumina, San Diego, CA, USA).

DNA sequences were filtered for low quality (Q < 30) and length (<50 bases), and adapter sequences were trimmed using Cutadapt (Illumina, San Diego, CA, USA). FastQ files were converted to a single Fasta of stitched reads using shi7. Operational taxonomic units (OTUs) were picked using a closed reference approach at 97% identity against the Greengenes database using fully gapped alignment with Burst. Ties were broken by minimizing the overall number of unique OTUs. For taxonomy assignment, each input sequence was assigned the lowest common ancestor that was consistent across at least 80% of all reference sequences tied for best hit. Samples with fewer than 1000 sequences were discarded. Taxa that could not be unambiguously identified at a given taxonomic level were labeled as "Other". Alpha diversity metrics were calculated from the filtered OTU table, which was rarefied to the minimum number of reads observed in all samples ($n = 10,754$) using QIIME 1.9.1 [34].

2.4. Serology

2.4.1. Dot Immunobinding Assay

Dot immunobinding assay (DIBA) was used to detect the presence of antibodies against different mycoplasma proteins in dog sera. PVDF membrane with 0.45 µm pore size (Immobilon-P PVDF Membrane, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) was activated in 100% methanol (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) and thoroughly washed in distilled water. Cell lysates of five different canine mycoplasma strains were used as antigen. Based on previous studies [18,35], the strains used were as follows: *M. canis* PG14^T, *M. canis* Larissa, *M. cynos* 896, *M. cynos* 2296, and *M. molare* H542^T. An amount of 2 µL of each antigen was dotted several times onto PVDF membrane and incubated in blocking buffer (0.5% Tween-PBS; Tween 20, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) for 2 h at room temperature to block free antigen-binding sites. The membrane was cut up and individual membrane strips containing all five antigens were incubated in different dog sera, diluted to 1:100, for 1.5 h at room temperature. Strips were thoroughly washed three times for 10 min with 0.05% Tween-PBS and then further incubated in 1:2000 diluted HRP-conjugated rabbit anti-dog IgG antibodies (A6792, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) for 1 h at room temperature. Following another series of washing in 0.05% Tween-PBS for 10 min (2×) and PBS for 10 min (1×), the reactions were visualized using the TrueBlue chromogenic substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA).

2.4.2. Western Blot Analysis

Proteins of whole-cell lysates of *M. canis* strains PG14^T (type strain) and Larissa (a highly virulent Slovenian isolate) were separated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) using a modified Laemmli method [36]. Precast NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels with 10 or 15 pockets (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used. Samples were diluted 1:1 with loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 100% glycerol, 10% SDS, 0.25% bromophenol blue, and distilled water) and boiled at 95 °C for 10 min. Proteins were separated using an XCell SureLock Mini-Cell electrophoresis system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 180 V for 60–70 min. PageRuler Plus Prestained Protein Ladder size standard (10–250 kDa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to track the electrophoresis flow and to compare the size of separated proteins on the PVDF membrane. After electrophoresis, the proteins were blotted onto a PVDF membrane using the Mini Trans-Blot Cell System (BioRad, Hercules, CA, USA) at 100 V for 90 min. the membrane was cut into strips, blocked for 2 h at room temperature, and incubated in dog sera (diluted 1:100) for 1.5 h at room temperature. Following washing (as described above), strips were incubated in 1:2000 diluted HRP-conjugated rabbit anti-dog IgG antibodies for 1 h at room temperature. Positive bands were visualized using the chromogenic substrate TrueBlue.

3. Results

3.1. Dogs and Inclusion Criteria

Demographic variables and dog breed had no marked impact on the presence of mycoplasma infection. Based on the inclusion criteria, dogs in the CTRL group showed no clinical signs pointing to mycoplasma infection or any kind of fertility disorder, even though some tested positive for the presence of mycoplasma by species-specific PCR.

3.2. Clinical Examination

All basic patient data, reproductive cycle assessment (females), clinical findings, ultrasound results, PCR, and 16S microbiota profiling results are presented in Table 1. No marked abnormalities were found during the clinical examination. One male and one female patient in the FD group with confirmed *M. canis* infection (by PCR) were treated with a recommended antibiotic (doxycycline, 5 mg/kg every 12 h for 7 days). After treatment, preputial and vaginal swab was tested again with species-specific PCR, which gave negative results.

3.2.1. Hematological and Biochemical Analysis

All measured hematological and biochemical parameters and their values are shown in Table S1. For statistical evaluation of the data, one-way analysis of variance (ANOVA) was used. The level of statistical significance used was $p < 0.05$. No statistically significant discrepancies were found within the two study groups as well as separately for males and females. All measured parameters were within normal range, not showing any signs of bacterial infection or other abnormal health conditions.

3.2.2. Cytology of Vaginal and Preputial Swabs

Cytology of vaginal swabs was used to differentiate the reproductive cycle phase in females (presented in Table 1). In the FD group, four females were in estrus, five in diestrus, and one in anestrus phase. In the CTRL group, two females were in estrus and two in diestrus phase. The cytological examination of swabs did not reveal the presence of abnormal cell structures, inflammatory cells, and no visible bacteria in tissue cells were detected. In the FD and CTRL group, the reproductive cycle phase in females showed no marked connection to mycoplasma infection. In males, no non-specific cells were found on cytological examination of the preputial swabs.

3.2.3. Semen Evaluation

In the FD group, semen was successfully collected from three out of four patients. One male with a lack of libido had no ejaculate. In the three other patients, analysis revealed they had no sperm present in the seminal fluid (azoospermia); therefore, other semen parameters could not be assessed. In the CTRL group, CASA analysis and fresh semen smear analysis of four male patients showed no abnormalities. Results of the CASA analysis are presented in Table S2.

Table 1. List of patients included in this study, denoting key demographic values, reproductive cycle assessment, main clinical findings, PCR and 16S microbiota profiling results.

Study Group	Patient Number	Breed	Sex	Age (years)	Body Weight (kg)	Phase of Estrous Cycle	Clinical Findings	Ultrasound Exam	PCR Results		16S Microbiota Profiling
									<i>Myc1/ M. canis-R</i>	<i>Ca-NEU-4F/ Ca-NEU-4R</i>	
FD group	1	Parson Russel terrier	M	6	4.7	NA	Poorly expressed libido, never had offspring	Unremarkable	–	–	Done
	2	Bernese mountain dog	M	4	36.2	NA	Successfully mated only once	Cysts in the prostate	–	–	NS
	3	German shepherd	F	6	29.3	Estrus	Regularly in heat, mating never successful	Unremarkable	+	+/s	NS
	4	German shepherd	F	5	26.1	Diestrus	Last mating unsuccessful, only once with offspring	Unremarkable	+	+	NS
	5	Golden retriever	F	4	34.2	Estrus	Regularly in heat, mating never successful	Unremarkable	+	+/s	NS
	6	Golden retriever	M	5	36.0	NA	No libido	Unremarkable	+	+/s	Done
	7	Airedale terrier	F	8	28.3	Diestrus	Last two matings not successful	Fluid in the uterus	–	–	NS
	8	Airedale terrier	M	5	30.1	NA	Poorly expressed libido, only once with offspring	Unremarkable	–	–	Done
	9	German shepherd	F	4	28.3	Estrus	Regularly in heat, mating never successful	Unremarkable	–	–	Done
	10	American Staffordshire terrier	F	3	20.1	Diestrus	Regularly in heat, mating never successful	Unremarkable	+	+/s	NS
	11	Dogo Argentino	F	6	30.2	Estrus	Last two matings not successful	Ovarian cysts	–	–	Done
	12	Bernese mountain dog	F	2	38.3	Diestrus	Last two matings not successful	Unremarkable	–	–	NS
	13	Bernese mountain dog	F	3	40.2	Diestrus	Last two matings not successful	Unremarkable	+	+/s	NS
	14	Weimaraner	F	3	24.9	Anestrus	Regularly in heat, mating never successful	Fluid in the uterus	–	–	NS

Table 1. Cont.

Study Group	Patient Number	Breed	Sex	Age (years)	Body Weight (kg)	Phase of Estrous Cycle	Clinical Findings	Ultrasound Exam	PCR Results		16S Microbiota Profiling
									<i>Myc1/M. canis-R</i>	<i>Ca-NEU-4F/Ca-NEU-4R</i>	
CTRL group	15	English springer spaniel	F	9	17.4	Estrus	Unremarkable	Unremarkable	–	–	NS
	16	Cross breed	F	1	21.0	Diestrus	Unremarkable	Unremarkable	+	+/s	Done
	17	Japanese chin	M	3	3.1	NA	Unremarkable	Unremarkable	–	–	Done
	19	Scottish terrier	M	7	8.6	NA	Unremarkable	Cysts in the prostate	+	+/s	NS
	20	Scottish terrier	M	1	10.4	NA	Unremarkable	Unremarkable	–	–	NS
	21	Rottweiler	M	10	42.3	NA	Unremarkable	BPH and testes tumor	–	–	NS
	22	Rottweiler	M	2	45.0	NA	Unremarkable	Cysts in the prostate	+	+/s	NS
	23	Dobermann	M	4	39.5	NA	Unremarkable	BPH and testes tumor	+	+/s	Done
	29	Borzoi	M	3	39.6	NA	Unremarkable	Cysts in the prostate	–	–	NS
	32	Cross breed	M	10	28.7	NA	Unremarkable	BPH	–	–	NS
	33	Borzoi	M	1	42.4	NA	Unremarkable	Unremarkable	–	–	NS
	40	Golden retriever	M	6	33.0	NA	Unremarkable	Unremarkable	–	–	NS
	41	Golden retriever	F	4	28.7	Estrus	Unremarkable	Unremarkable	–	–	NS
	42	Cross breed	F	13	14.7	Diestrus	Unremarkable	Fluid in the uterus	–	–	Done
	43	Maltese dog	M	7	4.8	NA	Unremarkable	Cysts in the prostate	–	–	Done
44	Weimaraner	M	8	33.0	NA	Unremarkable	Unremarkable	–	–	NS	

M, male; F, female; NA, not applicable; BPH, benign prostatic hyperplasia; s, partial neuraminidase gene sequence; NS, not successful; +, positive result; –, negative result.

3.2.4. Ultrasound Examination

Ultrasound examination was successfully performed in all 30 dogs included in the study (presented in Table 1). In females from the FD group, the collection of fluid in the uterus was observed in two patients and ovarian cysts were present in one patient. In one male patient from the FD group, cysts in the prostate were observed; this male had only one successful mating after several unsuccessful trials. In the CTRL group, one female had fluid in the uterus, four males had cysts in the prostate, one male suffered from benign prostatic hyperplasia (BPH), and two males suffered from BPH and simultaneously had a testes tumor present. However, all sexually mature animals in the CTRL group have previously mated successfully and produced healthy offspring and all changes were found incidentally in the scope of this study.

3.3. Molecular Examination

3.3.1. PCR-Based Detection of *M. canis*

DNA from preputial and vaginal swabs of all thirty animals was successfully isolated and used to determine the presence of *M. canis* infection by PCR. Using the primer pair *Myc1/M. canis-R*, infection with *M. canis* was confirmed in 6/14 (42.9%) dogs in the FD group and 4/16 (25.0%) dogs in the CTRL group (Table 1). Patients 5 and 6 were tested

again after a round of antibiotic treatment with doxycycline and their *M. canis*-specific PCR results were negative, pointing to a successful treatment strategy.

All DNA samples were used for a second PCR, in which a partial *M. canis* neuraminidase gene was amplified using the primer pair Ca-NEU-4F/Ca-NEU-4R. Neuraminidases of mycoplasma species are highly variable and offer a suitable positive control for a more precise determination. Even within the same species, some strains show high neuraminidase activity (e.g., *M. canis* Larissa), whereas some completely lack activity and the corresponding gene (*M. canis* LV) [18,37]. The amplification of the *M. canis* neuraminidase gene was successful in 6/14 (42.9%) dogs in the FD group and 4/16 (25.0%) dogs in the CTRL group (Table 1). In the FD group, all six patients were positive by both methods. Similarly, in the CTRL group, all four patients were positive by both methods.

3.3.2. Partial Neuraminidase Gene Sequences

PCR amplicons obtained using the Ca-NEU-4F/Ca-NEU-4R primer pair were sent for Sanger sequencing. Partial *M. canis* neuraminidase gene sequences were successfully obtained in patients 3, 5, 6, 10, 13, 16, 19, 22, and 23. Partial gene sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers: PP4300513, PP4300514, PP4300515, PP4300516, PP4300517, PP4300518, PP4300519, PP4300520, and PP4300521, respectively. The sequence of sample from patient 4 was not of sufficient quality. Nucleotide sequences revealed a 98–100% BLAST identity to other known sialidase sequences of several *M. canis* strains. Clustal Omega was used to produce a nucleotide alignment, which comprised the analyzed partial neuraminidase sequences and known sequences of *M. canis* strains Larissa, PG14^T, UF31, UF33, UFG1, and UFG4 (accession numbers OP354259, JQ177148, AJFR01000002.1, AJFS01000002.1, AJFT01000002.1, and AJFU01000003.1, respectively) (Figure S1). The partial sequences contained several single nucleotide replacements. However, no nucleotide differences were present in important functional regions of the gene, for example, the RIP motif (TATCGTATCCCA, Figure S1, in yellow), which is present at the N-terminal of the corresponding protein and represents a part of the enzyme's active site. Another prominent region in the neuraminidase gene is the Asp box motif (AGTTATGATGAAGGTAGAACATGA, Figure S1, in blue), a highly conserved domain that plays an important part in the catalytic function of the enzyme. No single nucleotide differences were present in this region.

3.3.3. 16S Microbiota Profiling

The samples for which the quality and quantity of DNA were insufficient for 16S microbiota profiling were excluded from the analysis. Samples with fewer than 1000 sequences were also excluded from the analysis. The final 16S microbiota profiling included 10/30 (33.3%) animals, namely 5/14 (35.7%) dogs from the FD group and 5/16 (31.3%) dogs from the CTRL group. Community composition for each sample at different taxonomic levels is presented in Figure 1 and individual species composition for each patient is presented in Table S3. Different species from the genus *Mycoplasma* were detected in 3/5 (60.0%) samples from the FD group and 4/5 (80.0%) samples from the CTRL group. Other most-represented genera included *Ureaplasma*, *Psychrobacter*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, and *Bacteroides* (Figure 1). *M. canis* was detected in patients 6, 16, 17, 23, and 43 (2.48%, 10.77%, 0.01%, 0.23%, and 0.24%, respectively). Patient 6 from the FD group and patients 16 and 23 from the CTRL group were *M. canis*-positive by both the species-specific PCR and 16S microbiota profiling.

The relative abundance of the family *Mycoplasmataceae* did not differ significantly between the study groups ($p = 0.2343$, Mann–Whitney *U* test). The relative abundance of the genus *Mycoplasma* also did not differ significantly between the study groups ($p = 0.1425$, Mann–Whitney *U* test). However, when dogs from both study groups were stratified by sex, the relative abundance of the genus *Mycoplasma* was significantly higher in males than in females ($p = 0.0247$, Mann–Whitney *U* test). In addition, the two samples with

the highest relative abundance of *Mycoplasma* originated from males in the CTRL group (Figure 1).

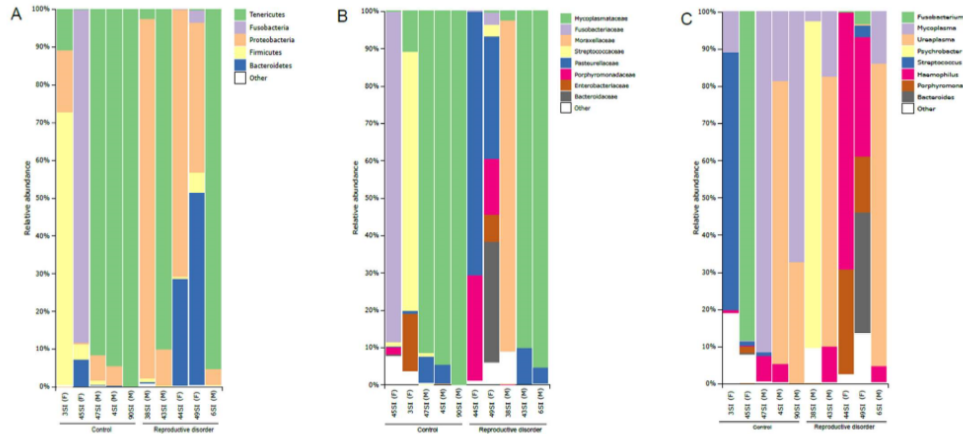


Figure 1. Microbiota composition of each sample. Samples are stratified according to the analyzed group: (A) top five bacterial phyla; (B) top eight bacterial families; (C) top eight bacterial genera. The sex of animals is indicated in brackets next to the sample name: F, female; M, male.

Alpha diversity indices (Chao1, Shannon, and Simpson indices, as well as the number of observed OTUs) for the ten analyzed samples are reported in Table S4. The number of observed OTUs ranged from 12 to 138. The rarefaction curves reached the near plateau phase, suggesting that the sequencing depth employed in this study reflects well the total bacterial diversity present in the studied samples, as shown in Figure 2. The number of observed OTUs did not differ significantly between the study groups ($p = 1.000$), but was significantly higher in females than in males ($p = 0.0422$), as indicated by the Mann–Whitney U test.

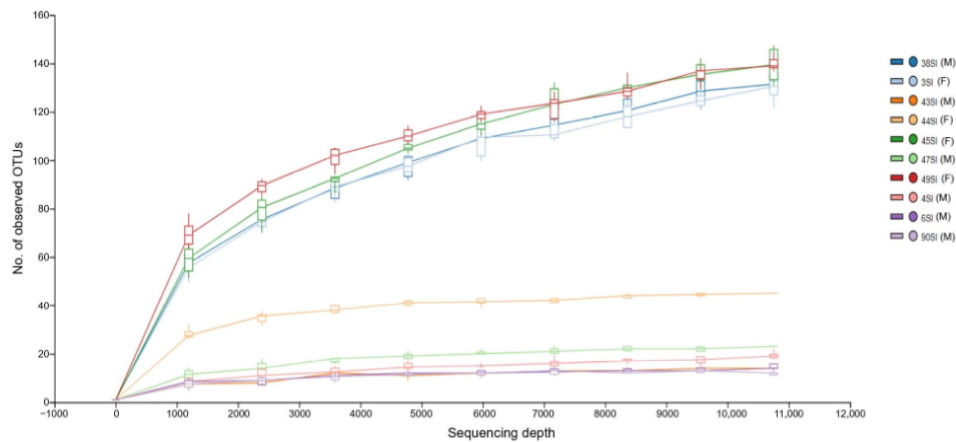


Figure 2. Rarefaction curves showing the number of OTUs per sequencing depth. The sex of the animal is indicated in brackets next to the sample name: F, female; M, male.

3.4. Serology

Blood serum was successfully collected from all 30 animals included in this study. Additionally, for patients 5 and 6, who received antibiotic treatment, serum after treatment was also collected and tested with serological methods. DIBA was used as a preliminary method for Western blot, to investigate the presence of mycoplasma-specific antibodies in all 32 sera. Five canine mycoplasma strains showing variable virulence in a previous study [18] were used as the antigen (*M. canis* PG14^T, *M. canis* Larissa, *M. cynos* 896, *M. cynos* 2296, and *M. molare* H542^T). In the FD group, all sera reacted with *M. canis* Larissa proteins and 7/14 sera (50.0%) reacted with *M. canis* PG14^T proteins. A large proportion of sera also showed a reaction to the *M. cynos* and *M. molare* antigens, respectively. In total, 9/14 (64.3%) sera reacted to *M. cynos* 896, 5/14 (35.7%) sera to *M. cynos* 2297, and 5/14 (35.7%) to *M. molare* H542^T. When compared to PCR results, we can see that even animals, that were PCR negative, showed one or more positive reaction to mycoplasma antigens. Similarly, in the CTRL group, a large number of sera reacted to more than one mycoplasma antigen. Only one patient sera from the CTRL group was completely negative in DIBA (patient 15). In total, 15/16 (93.8%) sera reacted with the *M. canis* Larissa antigen, 12/16 (75.0%) sera reacted with *M. canis* PG14^T, 13/16 (81.3%) sera reacted to *M. cynos* 896, 8/16 (50.0%) sera to *M. cynos* 2297, and 7/16 (43.8%) to *M. molare* H542^T. DIBA may be a good indicative method when researching the prevalence of infection during the whole lifespan of the animal. However, it does not differentiate between acute and chronic infections, or active or past infections, and we must always consider the possibility of antibody cross-reactivity, especially in closely related strains or evolutionary highly conserved proteins. The two sera collected after treatment also reacted to several mycoplasma antigens in DIBA, whereas the post-treatment PCR results were negative.

In Western blot, *M. canis* PG14^T and Larissa proteins, derived from whole cell lysates, were blotted onto a PVDF membrane and incubated in dog sera. All fourteen sera from the FD group, nine sera from the CTRL group, and two sera after treatment were used. The antibodies present in all the tested sera bound to several different mycoplasma proteins, ranging from 15 to 130 kDa (Figure 3). The range of reacting proteins varies between *M. canis* PG14^T and *M. canis* Larissa cell lysates, as shown in Figure 3. This corresponds to several differences between the two strains as observed in our previous study [18]. In all sera from the FD group, there were two prominent reactions to proteins of approximately 55 and 40 kDa. Even the animals without clinical signs of infection or with negative PCR results produced many antigen–antibody immune reactions.

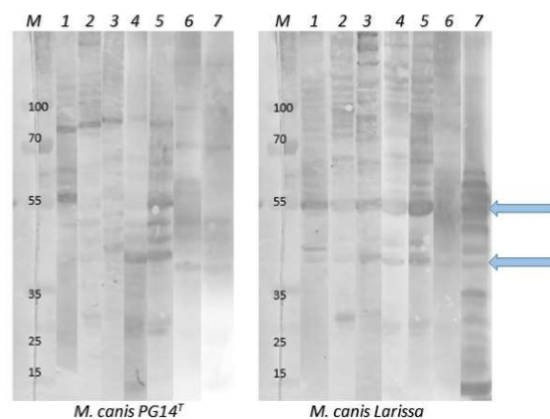


Figure 3. The presence of *M. canis*-specific antibodies in selected sera of the analyzed animals. Whole cell lysates of *M. canis* PG14^T (left panel) and *M. canis* Larissa (right panel) were incubated in sera of

animals from the FD and CTRL group. Reactions of serum antibodies with mycoplasma proteins, ranging from 15 to 130 kDa, are clearly visible in all samples, regardless of the results of molecular examination. In particular, in the right panel (*M. canis* Larissa), antibodies reacted to two proteins, approximately 55 and 40 kDa in size (blue arrows). M: molecular size marker, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 1: serum of patient 1/FD, 2: serum of patient 6/FD, 3: serum of patient 11/FD, 4: serum of patient 13/FD, 5: serum of patient 16/CTRL, 6: serum of patient 42/CTRL, 7: serum of patient 5/FD after antibiotic treatment.

4. Discussion

Mycoplasma canis is a well-known opportunistic canine pathogen commonly associated with lower urinary tract infections and fertility problems [2,3,16,22]. Although the first reports of *M. canis* date back to the 1970s [5,38], many questions about the possible virulence factors that play a crucial role in the establishment of infections, the host immune responses they trigger, and their precise role in long-term disease pathogenesis remain unanswered. The prevalence of mycoplasma infections in dogs is underestimated and difficult to assess. Infections are often subclinical, i.e., do not cause visible health problems with pronounced clinical signs, and standard antibiotic treatment is ineffective, due to the lack of a cell wall [1]. In this study, we aimed to evaluate the value of clinical signs in the diagnosis of *M. canis* infection, the usability of routinely collected diagnostic parameters for early detection of infection, and the accuracy of an individual detection method. We wanted to gain a better understanding of how *M. canis* detection methods could be improved in relation to canine reproductive issues to provide more reliable diagnostic and treatment options in the future.

The treatment of canine fertility disorders is a complex process in which the veterinarian must take into account various causes and have access to a complete medical history, supplemented by a thorough clinical examination. Fertility is a complex biological process, and issues are often a result of multiple factors [6,39–41]. In addition, anamnestic data obtained from owners can be biased. The detection of mycoplasma is rarely requested in clinical samples from dogs and few laboratories worldwide routinely perform mycoplasma cultures. Reports on the detection methods used and the results obtained vary widely from one study to another. Certain species, like *M. haemocanis*, have so far only been identified using molecular techniques [42]. Chalker et al. [25] found that 15% of lung tissue extracts were PCR-positive, but the presence of mycoplasma in these samples was not confirmed by culture methods. At the same time, they found that 20% of culture-positive samples were negative by PCR, which is currently considered the most effective method, especially since it is more sensitive than culture. However, it should be noted that PCR does not prove whether bacteria are alive or not [9,43], except when using viability PCR [44]. It is still unclear which factors have a direct influence on susceptibility to mycoplasma infections. It has not been proven that demographic variables influence susceptibility to infection. However, it is plausible that these variables have an indirect effect that is difficult to determine or measure. For example, age may influence the animal's immune status, which could allow mycoplasmas to evade the immune system. In this study, we could not connect age, sex, breed, and body weight of the dog with the presence of *M. canis* infection. Furthermore, *M. canis* infection was not related to the stage of the reproductive cycle, as previously reported [3,14]. Because blood and urine samples are relatively non-invasive samples that are routinely collected during veterinary examinations, we attempted to identify possible deviations of the blood or urine parameters from the reference values. This would allow rapid confirmation of infection. However, there were no conspicuous abnormalities in hematologic or biochemical parameters that could indicate the possible presence of *Mycoplasma* sp. Ultrasound anomalies were equally present in both groups and could not be associated with mycoplasma infection. There were evident differences in male semen evaluation between the dogs in the FD and CTRL groups, but the number of patients examined was small. Patients in the FD group had no sperm present in the seminal fluid, while males in the CTRL group had normal sperm on examination. Dogs

can be asymptomatic carriers of mycoplasma, and the present clinical examination data seem to support the theory of a subclinical host colonization-type infection.

Another problem is the limited number of reports focusing on the incidence of cultivation of *M. canis* (and other canine mycoplasmas) in clinically healthy individuals. The results of available studies are inconsistent and often contradictory. It has already been shown that *M. canis* is present in clinically healthy dogs as well as in dogs with fertility issues and urogenital disease [3,5,6,22,24,45]. To date, no consensus has been reached as to whether *M. canis* is the cause of urogenital problems or simply appears as part of the normal microbiota. Other mycoplasmas that have been described and isolated from the urogenital tract of healthy and diseased animals are *M. cynos*, *M. spumans*, *M. maculosum*, *M. edwardii*, and *M. molare* [13,16]. In a study by Maksimovič et al. [3], *M. canis* was the most frequently isolated mycoplasma (vaginal swabs) in domestic and stray, intact and spayed females. In the same study, the stages of the reproductive cycle did not appear to affect the number or type of positive isolates. *M. canis* and other canine mycoplasmas were not detected in the uterus. If *M. canis* is indeed part of the normal microbiota in the urethra and uterus, the results of culture-based detection in dogs should be interpreted with caution. Ülgen et al. [22], for example, showed that *M. canis* can be cultured from swabs from dogs with urinary tract infections, but also from urinary tract mucosal samples from healthy dogs. L'Abée-Lund et al. [2] showed that *M. canis* is probably responsible for inflammatory changes in dogs with signs of urogenital disease, as *M. canis* was usually isolated in pure culture and the signs of infection only subsided after treatment with tetracycline, while all previous treatments were unsuccessful. According to the current knowledge, urinary tract or genital infections caused by mycoplasma cannot be differentiated from infections caused by other micro-organisms. Potential new players should also be considered. In a recent report, *M. maculosum* and *M. spumans*, but not *M. canis*, were associated with fertility problems in kennel dogs. One male dog had a low sperm count and low sperm motility, and one female dog was PCR-positive for *M. maculosum* and *M. spumans*. After treatment with doxycycline, the sperm count normalized, and successful pregnancies were achieved after additional treatment with azithromycin [23].

There is an existing need to introduce newer methods to clearly confirm the presence of mycoplasma in canine reproductive tract samples. Culturing is no longer the method of choice to determine the presence of mycoplasma due to the need for selective growth media and the low reproducibility of results. Researchers are trying to introduce new, culture-independent methods for mycoplasmas. Mycoplasmas can be firmly attached to mucosal surfaces and can easily be outcompeted by other, faster-growing micro-organisms. A suitable replacement lies in the precise development of various molecular-based methods.

PCR is a fast, reliable, and sensitive method, that is used in laboratories all over the world. Combined with DNA extraction from vaginal and preputial swabs, which is a non-invasive sampling option, it is the perfect method of choice for the clinical setting. In this study, 10/30 (33.3%) of the included animals were *M. canis*-positive by PCR. However, positive samples were present in the FD and CTRL groups, supporting the hypothesis that *M. canis* is part of the normal mucosal microbiota. It would be very helpful to determine existing molecular differences between *M. canis* isolates from healthy and diseased animals. This would potentially give us much-needed insights into the pathogenicity patterns of different virulent strains. We have already identified a highly virulent *M. canis* strain Larissa (Slovenian isolate) which showed high titers in hemagglutination and hemagglutination inhibition tests and much more prominent neuraminidase enzymatic activity compared to some less virulent strains (PG14^T, UFG4, UF31, LV, and B16/08) [18]. In the future, it would be advantageous to identify these differences at the molecular (gene) level and use them for more precise diagnostics.

To further confirm the involvement of *M. canis* in fertility issues, DNA from vaginal and preputial swabs was subjected to 16S microbiota profiling. This method provides information on the overall composition of the bacterial community present in a sample and indicates potential (new) pathogens. This method is complex and involves many steps

that can influence the results such as sample collection and storage, DNA extraction and amplification, sequencing, and analyses of obtained results, especially in low-biomass samples [46]. However, species-specific identification based on sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene is difficult and does not provide definitive confirmation that a particular pathogen species is also the cause of a disorder or disease. Furthermore, this method is too time-consuming and costly for everyday clinical practice to be considered the method of choice. In this study, only a small proportion of the samples subjected to 16S microbiota profiling provided sufficient genetic material to be included in the final analysis (10/30). If more than one swab sample is taken, it is very difficult to ensure the uniformity of the samples, which must be considered. In addition, different swab types can affect the DNA yield. A better success rate was previously observed by Lyman et al. [47], who were able to amplify 16S rRNA fragments from each sample collected from 50 female dogs using culturette swabs. However, in three samples that were positive for *M. canis* by PCR, the presence of *Mycoplasma* sp. was also confirmed by 16S microbiota profiling (Tables 1 and S3). We also confirmed the presence of several other bacterial species in dogs from the FD and CTRL groups, including *Pseudomonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Fusobacterium* sp., *Streptococcus* sp., and several other mycoplasma species (*M. cynos*, *M. spumans*, *M. opalescens*, and *M. fermentans*). Similarly, Burton et al. [24] identified several other bacterial strains in the genital microbiome of healthy dogs. Further investigation is needed to determine whether any of these strains are associated with fertility challenges.

Another source of information is the use of serological methods to detect specific antibodies. By collecting blood sera from canine patients, we were able to perform serological tests. We hoped to be able to relate data on the presence of specific antibodies against mycoplasma in canine sera to the molecular data we obtained. However, most of the dog sera used for DIBA and Western blot analyses contained specific and non-specific antibodies and reacted in many reactions against *M. canis* and the cell lysates of mycoplasma strains used. There has long been a problem with cross-reactivity between different mycoplasma strains in serology. Cross-reactivity has been previously demonstrated [26,38] and serologic results should be interpreted with caution, especially when no titration of sera was performed and no paired samples collected a few weeks apart were collected. Furthermore, the presence of antibodies in serum indicates that the animal has been in contact with a particular bacterial strain at a certain time, but this does not reflect the current infection status. Nevertheless, serologic testing can help us gain insight into possible virulence factors. We have detected antibody responses to various *M. canis* proteins, with responses to 55 and 40 kDa proteins being most prominent in the *M. canis* Larissa cell lysate. Similarly, we have previously identified novel virulence factors in *M. cynos* [35].

This study has several limitations that should be considered when planning new, more in-depth studies. Two of the most important limitations are the small number of animals included and the imbalance between male and female representatives in both study groups. Future studies need to focus on a larger number of subjects of both sexes to gain new insights into clinical symptoms and microbiota composition to better assess the relationship between mycoplasma load and clinical signs in males and females. A large number of animals could also help to gain new insights into inter-individual variability in health and disease. Identifying the causes of strain variability and differences in virulence may help us find new markers of pathogenicity. Further characterization of strains in a cohort with the development of more reliable techniques is necessary, and an in-depth knowledge of the diversity of their phylogenetic origin and taxonomy is required for a correct interpretation of the results obtained. Studying the molecular structure of individual strains and their exact mechanism of pathogenicity will give us more information on how to successfully combat the infection. In the future, we should focus on the individual virulence factors and how they can be used for targeted detection. Further studies are needed to clarify how these organisms evade the host's immune defenses. As molecular methods advance, we are gaining new insights into inherent microbial communities and the complex relationships behind some often-unexplained health problems in veterinary medicine.

To successfully combat mycoplasma-related fertility problems in dogs, it is essential to raise awareness of this problem among owners and breeders and thereby increase the number of dogs tested. We recommend that *M. canis*-positive dogs with fertility problems are treated according to current guidelines. As mycoplasma can be part of the commensal microbiota, preventive treatment of animals without fertility problems remains controversial, especially in view of increasing antibiotic resistance and possible drug side effects. Future studies are needed to establish clinical standards and determine the cause of action for *M. canis*-positive dogs without fertility problems.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens13050391/s1>, Figure S1: Clustal Omega alignment of the nine partial *M. canis* neuraminidase gene sequences; Table S1: Representation of all numerical values of monitored hematological and biochemical parameters for patients in FD and CTRL group; Table S2: Sperm parameters of four males from CTRL group. Table S3: Results of 16S microbiota profiling; Table S4: Alpha diversity metrics of the 10 samples that were included in the final 16S microbiota profiling.

Author Contributions: Conceptualization, N.T., S.S.S., B.S. and S.K.; methodology, S.S.S., B.S., S.K. and P.K.; validation, B.S. and S.K.; formal analysis, S.S.S., B.S., B.P. and S.K.; investigation, S.S.S., B.S., P.K. and S.K.; resources, B.S. and N.T.; data curation, B.P.; writing—original draft preparation, S.S.S. and S.K.; writing—review and editing, S.S.S., B.S., P.K., N.T., B.P. and S.K.; visualization, S.S.S., B.P. and S.K.; supervision, B.S., N.T. and S.K.; project administration, S.S.S., N.T. and S.K.; funding acquisition, N.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Slovenian Research and Innovation Agency (ARIS)—research core funding nos. P4-0053 and P4-0092.

Institutional Review Board Statement: On 20 December 2016, the Animal Welfare Committee of the Faculty of Veterinary Medicine in Ljubljana confirmed that the described case does not involve animal experimentation. Therefore, no permit for animal experimentation is required for the implementation of the described topic of this study.

Informed Consent Statement: The owners signed an informed consent agreement to participate in the study.

Data Availability Statement: Partial *M. canis* neuraminidase sequences are available in GenBank under accession number PP430513, PP430514, PP430515, PP430516, PP430517, PP430518, PP430519, PP430520, and PP430521.

Acknowledgments: The authors express their gratitude to all dog owners who consented to participate in the study. Additionally, the staff of the Clinical Laboratory and Diagnostic Imaging at the Small Animal Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine in Ljubljana are acknowledged for their invaluable assistance and support during the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Razin, S.; Glaser, G.; Amikam, D. Molecular and biological features of mollicutes (mycoplasmas). *Ann. Microbiol.* **1984**, *135A*, 9–15. [[CrossRef](#)]
2. L'Abée-Lund, T.M.; Heiene, R.; Friis, N.F.; Ahrens, P.; Sørum, H. *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway. *Vet. Rec.* **2003**, *153*, 231–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Maksimović, Z.; Maksimović, A.; Halilbašić, A.; Rifatbegović, M. Genital mycoplasmas of healthy bitches. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2018**, *30*, 651–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Baba, E.; Hata, H.; Fukata, T.; Arakawa, A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. *Am. J. Vet. Res.* **1983**, *44*, 606–609.
5. Olson, P.N.; Mather, E.C. Canine vaginal and uterine bacterial flora. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1978**, *172*, 708–711. [[PubMed](#)]
6. Jagódka, D.; Kaczorek-Lukowska, E.; Graczyk, R.; Socha, P. Vaginal aerobic bacteria of healthy bitches and those with fertility problems. *Pol. J. Vet. Sci.* **2023**, *26*, 733–739. [[CrossRef](#)]
7. Jang, S.S.; Ling, G.V.; Yamamoto, R.; Wolf, A.M. Mycoplasma as a cause of canine urinary tract infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1984**, *185*, 45–47.

8. Dong, J.; Tsui, W.N.T.; Leng, X.; Fu, J.; Lohman, M.; Anderson, J.; Hamill, V.; Lu, N.; Porter, E.P.; Gray, M.; et al. Validation of a real-time PCR panel for detection and quantification of nine pathogens commonly associated with canine infectious respiratory disease. *MethodsX* **2023**, *11*, 102476. [[CrossRef](#)]
9. Jambhekar, A.; Robin, E.; Le Boedec, K. A systematic review and meta-analyses of the association between 4 mycoplasma species and lower respiratory tract disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 1880–1891. [[CrossRef](#)]
10. Yondo, A.; Kalantari, A.A.; Fernandez-Marrero, I.; McKinney, A.; Naikare, H.K.; Velayudhan, B.T. Predominance of Canine Parainfluenza Virus and *Mycoplasma* in Canine Infectious Respiratory Disease Complex in Dogs. *Pathogens* **2023**, *12*, 1356. [[CrossRef](#)]
11. Klein, S.; Klotz, M.; Eigenbrod, T. First isolation of *Mycoplasma canis* from human tissue samples after a dog bite. *New Microbes New Infect.* **2018**, *25*, 14–15. [[CrossRef](#)]
12. Sidrak, D.; Green, J.; Nawathe, P.; Morgan, M.; Soni, P.R. Canine-to-human transmission of *Mycoplasma canis* in the central nervous system. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* **2022**, *11*, 28–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rosendal, S. Canine mycoplasmas: Their ecologic niche and role in disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1982**, *180*, 1212–1214. [[PubMed](#)]
14. Groppetti, D.; Pecile, A.; Barbero, C.; Martino, P.A. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology* **2012**, *77*, 1549–1556. [[CrossRef](#)]
15. Doig, P.A.; Ruhnke, H.L.; Bosu, W.T. The genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* flora of healthy and diseased dogs. *Can. J. Comp. Med.* **1981**, *45*, 233–238.
16. Chalker, V.J. Canine mycoplasmas. *Res. Vet. Sci.* **2005**, *79*, 1–8. [[CrossRef](#)]
17. Dawood, A.; Algharib, S.A.; Zhao, G.; Zhu, T.; Qi, M.; Delai, K.; Hao, Z.; Marawan, M.A.; Shirani, I.; Guo, A. Mycoplasmas as host pantropic and specific pathogens: Clinical implications, gene transfer, virulence factors, and future perspectives. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 855731. [[CrossRef](#)]
18. Koprivec, S.; Benčina, D. Characteristics of Neuraminidases and Haemagglutinins from Bacteria *Mycoplasma canis* and *Mycoplasma cynos*. Ph.D. Thesis, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, 2016.
19. Grundy, S.A.; Feldman, E.; Davidson, A. Evaluation of infertility in the bitch. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* **2002**, *17*, 108–115. [[CrossRef](#)]
20. Memon, M.A. Common causes of male dog infertility. *Theriogenology* **2007**, *68*, 322–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Hagman, R. Molecular aspects of uterine diseases in dogs. *Reprod. Domest. Anim.* **2017**, *52* (Suppl. 3), 37–42. [[CrossRef](#)]
22. Ulgen, M.; Cetin, C.; Sentürk, S.; Ozel, A.E.; Ozdemir, U. Urinary tract infections due to *Mycoplasma canis* in dogs. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **2006**, *53*, 379–382. [[CrossRef](#)]
23. Tamiozzo, P.J. *Mycoplasma maculosum* and *Mycoplasma spumans* associated with fertility disorders in dogs from a Bernese Mountain dog kennel. *Rev. Argent. Microbiol.* **2022**, *54*, 39–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Burton, E.N.; Cohn, L.A.; Reiner, C.N.; Rindt, H.; Moore, S.G.; Ericsson, A.C. Characterization of the urinary microbiome in healthy dogs. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chalker, V.J.; Barker, E.; Brownlie, J. The use of pcr and culture for the detection of canine respiratory mycoplasmas. In Proceedings of the International Organisation of Mycoplasma 14th International Conference, Vienna, Austria, 12 July 2002.
26. Sperser, J.; Rosengarten, R. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Vet. Microbiol.* **2007**, *125*, 170–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dong, J.; Tsui, W.N.T.; Leng, X.; Fu, J.; Lohman, M.; Anderson, J.; Hamill, V.; Lu, N.; Porter, E.P.; Gray, M.; et al. Development of a three-panel multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of nine canine respiratory pathogens. *J. Microbiol. Methods* **2022**, *199*, 106528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Canonne, A.M.; Peters, I.; Roels, E.; Desquilbet, L.; Clercx, C. Detection of specific bacterial agents by quantitative PCR assays in the bronchoalveolar lavage fluid of dogs with eosinophilic bronchopneumopathy vs. dogs with chronic bronchitis and healthy dogs. *Vet. J.* **2018**, *232*, 52–56. [[CrossRef](#)]
29. Chalker, V.J.; Owen, W.M.; Paterson, C.; Barker, E.; Brooks, H.; Rycroft, A.N.; Brownlie, J. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology* **2004**, *150*, 3491–3497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Rapp, B.A.; Wheeler, D.L. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 17–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zhang, J.; Madden, T.L. PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* **1997**, *7*, 649–656. [[CrossRef](#)]
32. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539. [[CrossRef](#)]
33. Gohl, D.M.; Vangay, P.; Garbe, J.; MacLean, A.; Hauge, A.; Becker, A.; Gould, T.J.; Clayton, J.B.; Johnson, T.J.; Hunter, R.; et al. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 942–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Kastelic, S.; Cizelj, I.; Narat, M.; Tozon, N.; Chalker, V.J.; Lysnyansky, I.; Spersger, J.; Benčina, D. Molecular characterisation of the *Mycoplasma cynos* haemagglutinin HapA. *Vet. Microbiol.* **2015**, *175*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. May, M.; Brown, D.R. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* **2009**, *137*, 380–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rosendal, S. Canine mycoplasmas: Serological studies of type and reference strains, with a proposal for the new species, *Mycoplasma opalescens*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B* **1975**, *83*, 463–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Abah, K.O.; Fontbonne, A.; Partyka, A.; Nizanski, W. Effect of male age on semen quality in domestic animals: Potential for advanced functional and translational research? *Vet. Res. Commun.* **2023**, *47*, 1125–1137. [[CrossRef](#)]
40. Sones, J.; Balogh, O. Body Condition and Fertility in Dogs. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **2023**, *53*, 1031–1045. [[CrossRef](#)]
41. Hallberg, I.; Olsson, H.; Lau, A.; Wallander, S.; Snell, A.; Bergman, D.; Holst, B.S. Endocrine and dog factors associated with semen quality. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 718. [[CrossRef](#)]
42. Messick, J.B.; Walker, P.G.; Raphael, W.; Berent, L.; Shi, X. ‘Candidatus mycoplasma haemodidelphidis’ sp. nov., ‘Candidatus mycoplasma haemolamae’ sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): Phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, *52*, 693–698. [[CrossRef](#)]
43. Domrazek, K.; Kaszak, I.; Kanafa, S.; Sacharczuk, M.; Jurka, P. The influence of *Mycoplasma* species on human and canine semen quality: A review. *Asian J. Androl.* **2023**, *25*, 29–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kumar, S.S.; Ghosh, A.R. Assessment of bacterial viability: A comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology* **2019**, *165*, 593–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rota, A.; Corro, M.; Patuzzi, I.; Milani, C.; Masia, S.; Mastroianni, E.; Petrin, S.; Longo, A.; Del Carro, A.; Losasso, C. Effect of sterilization on the canine vaginal microbiota: A pilot study. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Banchi, P.; Colitti, B.; Opsomer, G.; Rota, A.; Van Soom, A. The dogma of the sterile uterus revisited: Does microbial seeding occur during fetal life in humans and animals? *Reproduction* **2024**, *167*, e230078. [[CrossRef](#)]
47. Lyman, C.C.; Holyoak, G.R.; Meinkoth, K.; Wieneke, X.; Chillemi, K.A.; DeSilva, U. Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210157. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.