

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Armin Saalmüller)

Institut für Mikrobiologie
(Leiterin: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. rer. nat. Monika Ehling-Schulz)

Geno- und phänotypische Charakterisierung rezenter *Mycoplasma bovis*-Isolate aus Österreich

Diplomarbeit
zur Erlangung der Würde des
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

LISA BIBER

Wien, August 2019

Betreuer:

Priv.-Doz. Dr. med. vet. Joachim Spergser Dipl. ECVM

Department für Pathobiologie

Institut für Mikrobiologie

Veterinärplatz 1, 1210 Wien Österreich

Joachim.Spergser@vetmeduni.ac.at

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Allgemeine Erregerigenschaften von <i>Mycoplasma bovis</i>	2
1.2	<i>Mycoplasma bovis</i> -assoziierte Krankheitsbilder	3
1.2.1	Mastitis	4
1.2.2	Arthritis und Pneumonie	4
1.2.3	Otitis media	5
1.2.4	Erkrankungen des Reproduktionstraktes und weitere seltene Krankheitsbilder	5
1.3	Diagnostik, Therapie und Prävention von <i>Mycoplasma bovis</i> -Infektionen	5
1.4	Methoden zur Typisierung von <i>Mycoplasma bovis</i>	7
1.4.1	Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)	8
1.4.2	MALDI-ToF Massenspektrometrie	9
1.4.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	10
1.4.4	Amplified-Fragment-Length-Polymorphism (AFLP)	10
1.4.5	Multilokus Variable-Number of Tandem-Repeats (VNTR) Analyse (MLVA)	11
2	Material und Methode	12
2.1	<i>Mycoplasma bovis</i> -Isolate	12
2.2	Kultivierung von <i>Mycoplasma bovis</i>	15
2.3	Massenspektrometrische Untersuchung von <i>Mycoplasma bovis</i> mittels MALDI-ToF	15
2.4	DNA-Extraktion	16
2.5	Multilokus-Sequenztypisierung	17
3	Ergebnisse	20
3.1	Multilokus-Sequenztypisierung nach Register et al. (2015)	20
3.2	<i>tufA</i> -Sequenzanalyse nach Rosales et al. (2015)	23
3.3	Massenspektrometrie mittels MALDI-ToF	28
4	Diskussion	30
5	Zusammenfassung	33
6	Summary	35
7	Quellen	37
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFLP	<i>Amplified-Fragment-Length-Polymorphism</i>
BALF	Bronchoalveolar-Lavage-Flüssigkeit
Bp	Basenpaare
cgMLST	Kerngenom (<i>core genome</i>) Multilokus-Sequenztypisierung
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
kb	Kilobase
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MALDI-ToF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i> Massenspektrometrie
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
MLVA	<i>Multilocus Variable-Number of Tandem-Repeats-Analyse</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RAPD	<i>Randomly-Amplified-Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction-Fragment-Length-Polymorphism</i>
SP4	<i>Spiroplasma 4</i>
ST	Sequenztyp
VNTR	<i>Variable-Number of Tandem-Repeats</i>
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung und Fragestellung

Mycoplasma (M.) bovis ist ein an das Rind adaptierter Infektionserreger, der verschiedene Krankheitsbilder verursachen aber auch von gesunden, symptomfreien Tieren isoliert werden kann. Der Erreger ist in der Lage, subakute, akute und chronische Erkrankungen des Euters, der Gelenke, des Mittelohres, der Atemwege und der Lunge sowie gelegentlich der Reproduktionsorgane hervorzurufen und dabei hohe wirtschaftliche Verluste zu verursachen. Der Erregereintrag in eine *M. bovis*-freie Herde erfolgt meist durch Zukauf von asymptomatischen Trägertieren. Der Erreger konnte erstmals 2005 in Österreich in einem kleinbäuerlichen Betrieb nachgewiesen werden. Dort verursachte er bei laktierenden Rindern eine hochkontagiöse und akutverlaufende Mastitis. Im Jahre 2007 kam es schließlich zu einem massiven *M. bovis*-Ausbruch in einer Alm-gesommerten Milchviehherde von 100 Tieren in Vorarlberg. Der Erreger blieb bis 2009 in dieser Region endemisch und breitete sich schließlich über weitere Gebiete aus und konnte seither in allen Bundesländern ausgenommen Wien, nachgewiesen werden. In einer vorangegangenen Studie wurden *M. bovis*-Stämme untersucht, die bis zum Jahr 2016 aus unterschiedlichen Ausbrüchen und Krankheitsfällen in Österreich und angrenzenden Nachbarländern isoliert werden konnten. Zur Typisierung wurden die MLVA und MLST eingesetzt. Mit Hilfe der MLST konnten 75% der *M. bovis*-Isolate dem Sequenztyp (ST) 5 zugeordnet werden. Durch Inklusion eines weiteren Haushaltsgenes (*tufA*) konnte das Differenzierungspotential erhöht und ST5 in Subsequenztypen (ST5A, ST5B, ST5C) differenziert werden. Hierbei konnte eine Prädominanz von ST5A festgestellt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die genotypischen Eigenschaften rezenter *M. bovis*-Stämme (gewonnen im Zeitraum 2016 bis 2018) mit jenen, die vor 2016 isoliert wurden zu vergleichen. Des Weiteren wurde zur phänotypischen Charakterisierung der vorwiegend österreichischen *M. bovis*-Isolate erstmalig die MALDI-ToF Massenspektrometrie eingesetzt.

1.1 Allgemeine Erregereigenschaften von *Mycoplasma bovis*

M. bovis wurde erstmals 1961 in den Vereinigten Staaten isoliert (Hale et al., 1962). Taxonomisch gehört der zellwandlose Erreger zur Klasse *Mollicutes*, Ordnung *Mycoplasmatales*, Familie *Mycoplasmataceae*.

Wie alle Vertreter der Klasse *Mollicutes* weist *M. bovis* neben einer geringen Zellgröße auch eine geringe Genomgröße von ca. 1.000 kb auf (Wise et al., 2011, Adamu et al., 2013). Aufgrund der Zellwandlosigkeit besitzt *M. bovis* eine pleomorphe Gestalt und weist eine natürliche Resistenz gegenüber jenen Antibiotika auf, die in die Zellwandsynthese eingreifen (z.B. β -Laktam-Antibiotika).

M. bovis ist nur in oder auf speziellen und komplexen Nährmedien kultivierbar. Wegen seines langsamen Wachstums *in vitro* werden diesen Nährmedien Hemmstoffe wie β -Laktam-Antibiotika und/oder Thalliumsalze zugesetzt, welche eine etwaige Kontamination mit anderen Mikroorganismen verhindern sollen (Selbitz et al., 2011). Die auf Festnährböden ausgebildeten Kolonien sind klein mit einem Durchmesser von 100 μm bis 500 μm und zeigen eine charakteristische Spiegelleiform (Stanbridge, 1971). *M. bovis* weist eine verhältnismäßig hohe Tenazität auf und kann bei einer Temperatur von 4°C für ca. 2 Monate in Schwämmen und Milch bzw. über 2 Wochen in Wasser überleben (Pfützner und Sachse, 1996).

Über die Virulenzfaktoren von *M. bovis* ist wenig bekannt. Der Erreger ist jedoch in der Lage, sich an veränderte Milieubedingungen anzupassen und die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Dies erreicht er durch Ausbildung von variablen Oberflächenproteinen (*variable surface lipoproteins*, *Vsp's*), die mit hoher Frequenz ihre Größe und Expression (ON-OFF) ändern können (Rosengarten et al., 1994, Bürki et al., 2015a). Das Phänomen der Phasen- und Größenvariation konnte bislang nicht eindeutig mit dem Schweregrad von *M. bovis*-Infektionen und der Erregerausbreitung im Körper in Verbindung gebracht werden (McAuliffe et al., 2004, Poumarat et al., 1999), allerdings vermutet man einen Zusammenhang mit der Entstehung von chronischen Verlaufsformen (Chambaud et al., 1999). Außerdem konnte aufgezeigt

werden, dass diese variablen Oberflächenproteine (Vsp's) die Rolle von Adhärenzmolekülen einnehmen und hierbei entscheidend zur Bindung von *M. bovis* an Wirtszellen beitragen können (Sachse et al., 2000).

Daneben konnten in Studien weitere Adhäsine von *M. bovis* identifiziert werden, wie das Vpmax-Adhäsine (Zou et al., 2013), welches die Eigenschaft interner Peptidwiederholungen mit den Vsp-Proteinen teilt, sowie Stoffwechsellzyme, die neben ihrer grundlegenden Funktion auch Adhäsionseigenschaften aufweisen. Hierzu zählen NADH-Oxidase (Zhao et al., 2017), Enolase (Song et al., 2012) und tRNA-Methyltransferase TrmFO (Guo et al., 2017).

Der Erreger ist außerdem in der Lage, durch Produktion toxischer Stoffwechselprodukte wie Wasserstoffperoxide, Wirtszellen direkt zu schädigen (Khan et al. 2005). Zu den weiteren Faktoren und Mechanismen, die zur Pathogenität und Virulenz von *M. bovis* beitragen zählen die Zellinvasion (Bürki et al., 2015b), Biofilmbindung (McAuliffe et al., 2006) und Immunmodulation (Wang et al., 2016).

1.2 *Mycoplasma bovis*-assoziierte Krankheitsbilder

M. bovis ist Verursacher verschiedener Krankheitsbilder, die häufig chronische Verlaufsformen aufweisen. Diese umfassen vorrangig Bronchopneumonien (Caswell und Archambault, 2007, Gagea et al., 2006), Otitis media (Maeda et al., 2003), Mastitiden (Jasper et al., 1974) und Arthritiden (Gagea et al., 2006). Genitalerkrankungen (Doig, 1981, Hermeyer et al., 2012), Meningitis (Ayling et al., 2005) und Keratokonjunktivitis (Alberti et al., 2006) treten nur gelegentlich auf.

1.2.1 Mastitis

Mastitiden, die durch *M. bovis* verursacht werden, treten unabhängig vom Stadium der Laktation auf. So können auch trockenstehende Kühe betroffen sein. Hauptcharakteristika *M. bovis*-assoziierter Mastitiden sind Veränderungen der Milchkonsistenz, diese kann von wässrig bis purulent variieren, ein Anstieg der Gesamtzellzahl der Milch, ein Abfall der Milchproduktion, eine schnelle Ausbreitung von einem Euterviertel zum nächsten und Resistenz gegenüber üblicherweise eingesetzten Antibiotika. Nach zwei Wochen sind die betroffenen Viertel atrophisch und die Milchleistung kann vollständig zum Erliegen kommen (Pfützner und Sachse, 1996).

1.2.2 Arthritis und Pneumonie

Die Hauptsymptome der *M. bovis*-assozierten Arthritis (vorwiegend der Karpal- und Tarsalgelenke) sind akute und schwere Lahmheit sowie Gelenkergüsse. Die Arthritiden treten häufig in Kombination mit Mastitiden oder einer Pneumonie auf. Bei Fleischrassen kommt es oft zum chronischen Pneumonie- und Polyarthritissyndrom (CPPS), bei dem die septische Polyarthritiss mit akuter hochgradiger Lahmheit, Gelenkschwellung, einem Anstieg der inneren Körpertemperatur bis zu 41°C und Lungenentzündungen einhergeht (Maunsell et al., 2011).

Das klinische Bild einer durch *M. bovis* verursachten Respirationserkrankung ist nicht sehr spezifisch und inkludiert Fieber, Tachypnoe, Dyspnoe, mit oder ohne nasalen Ausfluss und Husten (Maunsell et al., 2011). Ebenfalls kann eine Mykoplasmen-Pneumonie von Otitis media begleitet sein (Maunsell et al., 2011). Es ist immer noch unklar, warum einige Tiere den Erreger im Respirationstrakt tragen, ohne jegliche Symptome zu zeigen (Nicholas et al., 2008, Wilson et al., 2007).

1.2.3 *Otitis media*

Die klinischen Symptome werden durch starke Ohrenscherzen und gegebenenfalls einer Schädigung des cranialen Nerv VII hervorgerufen. Ohrenscherzen zeigen sich durch Kopfschütteln, Kopfschiefhaltung und Epiphora. Die Symptome können unilateral oder bilateral auftreten und mit purulentem Ohrenausfluss einhergehen. Einige Tiere können auch neurologische Symptome zeigen (Maunsell et al., 2011).

1.2.4 *Erkrankungen des Reproduktionstraktes und weitere seltene Krankheitsbilder*

Selten kann der Erreger über Deckakt, künstliche Befruchtung und Embryonentransfer in den weiblichen Reproduktionstrakt eingebracht werden und dabei zu Infertilität und entzündlichen Veränderungen des Geschlechtsapparates führen (Wrathall et al., 2007, Amram et al., 2013). Das klinische Erscheinungsbild ist nicht von einer herkömmlichen Erkrankung des Reproduktionstraktes zu unterscheiden (Pfützner und Sachse, 1996).

Selten können auch Meningitiden (Ayling et al., 2005) und Keratokonjunktivitiden (Alberti et al., 2006) beobachtet werden.

1.3 Diagnostik, Therapie und Prävention von *Mycoplasma bovis*-Infektionen

Eine optimale Probengewinnung ist für eine sichere Labordiagnose essenziell. Milchproben, Synovia, Bronchioalveolar-Lavage-Flüssigkeit (BALF), Genitalausfluss oder pathologisch verändertes Gewebe müssen unter sauberen und hygienischen Bedingungen entnommen werden, um Kontaminationen zu vermeiden (Pfützner, Sachse, 1996).

Für eine erfolgreiche Anzucht von *M. bovis* werden Spezialnährmedien benötigt, wie zum Beispiel das SP4- oder Hayflick-Medium (Selbitz et al., 2011). Nach einer 2-4 tägigen Bebrütungszeit können die für Mykoplasmen charakteristischen spiegeleiförmigen Kolonien unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen werden. Die Artdiagnose erfolgt über serologische Verfahren unter Anwendung artspezifischer Hyperimmunsereen (Poveda und Nicholas, 1998), artspezifischer PCR (Hotzel et al., 1999) oder 16S-23S-PCR-RFLP-Analyse (Spergser und Rosengarten, 2007). Eine schnelle und genaue Identifizierung von *M. bovis* ermöglicht die MALDI-ToF Massenspektrometrie (Pereyre et al., 2013, Spergser et al., 2019).

Hauptinfektionsquellen sind asymptomatische Trägertiere. Erregerübertragung und -eintrag findet vor allem bei Tiertransporten, Zukäufen in Beständen und Ausstellungen oder Märkten statt (Amram et al., 2013, Aebi et al., 2015). Weitere Übertragungsmöglichkeiten bestehen beim Deckakt sowie bei der künstlichen Befruchtung (Wrathall et al., 2007), Embryotransfer (Bielanski et al., 2000), durch vertikale Übertragung (Sulyok et al., 2014), kontaminierte Gerätschaften und Ausrüstungen wie Melkmaschinen (Fox, 2012, Radaelli et al., 2011, Piccinini et al., 2015) sowie über Aerosole (Tröpfcheninfektion) (Jasper et al., 1979). Eine Übertragung auf den Menschen (Madoff et al., 1979) und andere Tierarten (Dyer et al., 2004, Ongor et al., 2008, Spergser et al., 2013) ist ebenfalls möglich, jedoch äußerst selten.

Eine intermittierende Ausscheidung von *M. bovis* durch infizierte Tiere kann über Monate oder Jahre erfolgen (Bennett und Jasper, 1977, Biddle et al., 2003, Punyapornwithaya et al., 2010). Die Identifizierung und Separation infizierter Tiere, ein optimales Stallklima, Reduktion der Besatzdichte sowie strikte Hygienemaßnahmen sind wichtige Präventionsmaßnahmen, um weitere Ausbrüche und Erregerübertragungen zu reduzieren bzw. zu verhindern (Pfützner und Sachse, 1996, Nicholas und Ayling, 2003).

Die Bekämpfung der *M. bovis*-Infektion erfordert eine frühzeitige Identifizierung infizierter Tiere und deren Behandlung mit antimikrobiellen Wirkstoffen, wie zum Beispiel Tetrazyklinen, Makroliden oder Fluorchinolonen. Es sind jedoch nur wenige Antibiotika speziell für die Behandlung von *M. bovis*-assoziierten Krankheitsbildern bei Rindern zugelassen, außerdem werden zunehmend Resistenzen gegenüber diesen üblicherweise eingesetzten Antibiotika beobachtet (Sato et al., 2013, Lerner et al., 2014, Lysnyansky et al., 2009, Amram et al., 2015, Lysnyansky und Ayling, 2016). Daneben wird die antibiotische Therapie durch Biofilmbildung, intrazellulärer Erreger-Lokalisation und mangelnde Bioverfügbarkeit der eingesetzten Antibiotika in infizierten Gewebestrukturen erschwert (Calcutt et al., 2017).

Maunsell et al. (2011) empfiehlt daher die Merzung aller infizierten Tiere in Milchviehbeständen. Ist dies nicht möglich, sollten zumindest Kühe mit Mastitiden gemerzt und Trägartiere strikt von *M. bovis*-freien Rindern getrennt werden. Darüber hinaus sind intensive Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen des Betriebes (Stall, Gerätschaften) durchzuführen.

Aufgrund mangelnder Therapieerfolge durch Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe, wurde an der Entwicklung geeigneter Impfstoffe geforscht (Nicholas et al., 2002, Zhang et al., 2014). Bisher führte keine Vakzinierungsstudie zu einem nachweislich protektiven Impfstoff. Jedoch konnte eine starke humorale Immunantwort, allerdings kein tatsächlicher Impfschutz gegen *M. bovis* nachgewiesen werden (Prysljak et al., 2013, Caswell et al., 2010). Der Einsatz von bestandsspezifischen Impfstoffen zeigt derzeit bessere Ergebnisse (Perez-Casal et al., 2017).

1.4 Methoden zur Typisierung von *Mycoplasma bovis*

In der Vergangenheit wurden für die Charakterisierung von *M. bovis* verschiedene molekulare Typisierungsmethoden verwendet. Dabei wurden die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) als auch PCR-gestützte Verfahren, wie *Amplified-*

Fragment-Length-Polymorphism (AFLP)-, *Randomly-Amplified-Polymorphic DNA* (RAPD)-, Insertionssequenz (IS)- und *Multilocus Variable-Number of Tandem.Repeats* (VNTR)-Analyse (MLVA) eingesetzt. Jedoch werden diese Typisierungsmethoden vermehrt durch modernere Verfahren wie die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST), *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight* (MALDI-ToF) Massenspektrometrie (MS) und Kerngenom (*core genome*) MLST ersetzt.

Die MLST und die MALDI-ToF MS sind die derzeit gängigsten Geno- und Phänotypisierungsverfahren zur Charakterisierung von *M. bovis*. Diese Methoden ersetzen immer mehr die früher verwendeten phänotypischen (Protein-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Westernblot-Analyse) und genotypischen (MLVA, PFGE, RAPD, AFLP) Differenzierungsverfahren, da sie sich als schnellere, günstigere und zuverlässigere Alternative anbieten.

1.4.1 *Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)*

Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) ist eine robuste und hoch standardisierte Methode, bei der Haushaltsgene mit Hilfe der PCR amplifiziert und ihre Sequenzfolgen bestimmt werden. Für ein aussagekräftiges Ergebnis werden 6 bis 10 Haushaltsgene untersucht, die neben konservierten auch variable Regionen aufweisen. Die erhaltenen Sequenzvarianten (Allele) werden anschließend mit bereits bekannten Sequenzen in Datenbanken verglichen und dabei ein Allel-Nummerncode ermittelt, mit dem schließlich die Zuordnung zu einem bekannten Sequenztyp erfolgt (<https://pubmlst.org/>) (Register et al, 2015). Mit Hilfe dieser Typisierungsmethode konnte in Israel ein Eintrag unterschiedlicher Sequenztypen durch Zukauf von importierten Kälbern in einem einzigen Bestand festgestellt werden (Amram et al., 2013). In Österreich und der Schweiz konnten mittels MLST rezente und ältere *M. bovis*-Isolate (isoliert vor 2007) zwei unterschiedlichen phylogenetischen Clustern zugeordnet werden (Bürki et al., 2016). Sulyok et al. (2014) konnte mehrere Sequenztypen in einem einzigen Bestand feststellen. Register et al. (2015) zeigten auf, dass *M. bovis*-Isolate vom Bison sich genetisch von aus Rindern isolierten

Stämmen unterscheiden. In Frankreich konnte aufgezeigt werden, dass rezente *M. bovis*-Isolate homogener als frühere Isolate (gewonnen vor 2000) sind, was auf die Ausbreitung eines Stammes zurückzuführen war (Becker et al., 2015). Rosales et al. (2015) wiederum konnten mittels MLST *M. bovis* aus verschiedenen Ländern und Kontinenten in zwei klonale Komplexe (*clonal complex*, CC) unterteilen, wobei die Zuordnung wesentlich im Zusammenhang mit dem geographischen Ursprung der untersuchten *M. bovis*-Isolate stand.

Die MLST bietet ein hohes Diskriminierungspotential, allerdings wird gelegentlich die Ergänzung mit der MLVA empfohlen (Sulyok et al., 2014).

1.4.2 MALDI-ToF Massenspektrometrie

Becker et al. (2015) berichtete erstmalig über den Einsatz der MALDI-ToF MS zur phänotypischen Charakterisierung von *M. bovis*-Isolaten. Bei der MALDI-ToF MS wird der Erreger mit einer Matrixlösung versetzt und auf eine Trägerplatte aufgetragen. Die Matrixlösung wird anschließend im Hochvakuum unter Laserbeschuss explosionsartig verdampft, hierbei werden die zu untersuchenden Proteine des Erregers mitgerissen. Bei diesem Vorgang findet eine Ionisierung der Proteine statt, welche in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Darauf folgend wird die von Ladung und Masse abhängige Flugzeit der Ionen bis zum Detektoraufschlag exakt bestimmt und die unterschiedlichen Proteinmassen in einem Gesamtspektrum dargestellt (Schubert und Weig, 2009). Schließlich können Distanzwerte der generierten Spektren, die auf Peak-Verschiebungen sowie unterschiedliche Peak-Intensitäten beruhen, ermittelt und als Dendrogramm dargestellt werden. Becker et al. (2015) gelang es mithilfe der MALDI-ToF MS, die untersuchten *M. bovis*-Stämme in zwei Hauptcluster zu gruppieren. Das Dendrogramm der MALDI-ToF MS zeigte dabei die gleiche Topologie wie die in den MLST- und MLVA-Stammbäumen.

Die MALDI-ToF MS stellt sich daher als schnelle, günstige und zuverlässige Methode zur Charakterisierung von *M. bovis* dar (Schubert und Kostrzewa, 2017).

1.4.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE wurde in den frühen achtziger Jahren entwickelt und zur Typisierung von verschiedenen Mykoplasmenarten eingesetzt (Pyle et al., 1988, Wenzel und Herrmann, 1989, Bautsch et al., 1988). Vor der eigentlichen PFGE wird die chromosomale DNA zunächst an wenigen Stellen, die im Genom verteilt vorliegen mit Hilfe eines Restriktionsenzym gespalten. Danach werden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt, wodurch Bandenmuster erzeugt werden, die für verschiedene Stämme spezifisch sind (Parker et al., 2018). Der Unterschied zur herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese besteht darin, dass kein homologes Feld angelegt wird, sondern die Fragmente in einem periodisch für kurze Zeit umgepolten Feld aufgetrennt werden (Burmeister, 1992). Die PFGE stellt sich als eine mäßig reproduzierbare Methode mit hohem Differenzierungspotential zur Unterscheidung von *M. bovis* dar. Jedoch ist das Typisierungsverfahren sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv und erfordert außerdem die Anschaffung teuren Equipments (Citti et al., 2000, Pinho et al., 2012, Arcangioli et al., 2012).

1.4.4 Amplified-Fragment-Length-Polymorphism (AFLP)

Der AFLP ist eine PCR-basierende Technik, bei der DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, mit Adapter ligiert und eine Teilmenge von Restriktionsfragmenten selektiv amplifiziert wird (Parker et al., 2018). Soehnen et al. (2011) untersuchte 192 *M. bovis*-Isolate (2007-2008) mittels AFLP und konnten dabei 39 Profile feststellen. Die AFLP gilt als sehr genau, jedoch weist sie eine geringe Reproduzierbarkeit auf (Kusiluka et al., 2000, Soehnen et al., 2011).

1.4.5 Multilokus Variable-Number of Tandem-Repeats (VNTR) Analyse (MLVA)

Bei der MLVA werden Unterschiede in der Anzahl an Tandem-Wiederholungen in verschiedenen Genloci bestimmt. Dafür werden die Loci mittels PCR vervielfältigt und die Anzahl der Tandem-Wiederholungen durch Längenbestimmung der Amplifikationsprodukte berechnet.

Die MLVA-Analyse ist eine wertvolle Methode, um Übertragungswege und die Ausbreitung von *M. bovis* darzustellen (Pinho et al., 2012, Spargser et al., 2013, Amram et al., 2013, Sulyok et al., 2014).

3.4.6 Kerngenom (core genome) MLST (cgMLST)

Einen neuen Ansatz für die Typisierung von *M. bovis* bietet die cgMLST die erstmalig erfolgreich von Haapala et al. (2018) zur Typisierung von *M. bovis* eingesetzt wurde. Hierbei konnte eine begrenzte Diversität von finnischen *M. bovis*-Isolaten aufgezeigt, sowie die Verbreitung von *M. bovis* über Rindersamen dargestellt werden. Die cgMLST kombiniert die klassische MLST mit der Gesamtgenomsequenzierung (de Been et al., 2015, Mellmann et al., 2011). Dabei werden Hunderte von Allelen des Gesamtgenoms verglichen und Polymorphismen bestimmt (Higgins et al., 2017, Kohl et al., 2014). Durch die Darstellung in einem Spanning-Tree können die Polymorphismen sichtbar gemacht werden (Haapala et al., 2018).

Die cgMLST wird vermehrt für die Stammdifferenzierung und für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt. Das Verfahren bietet sich als eine effiziente, genaue und reproduzierbare Methode zur Untersuchung von Stämmen derselben Art an (Ghanem et al., 2015, Neumann et al., 2018).

2 Material und Methode

2.1 *Mycoplasma bovis*-Isolate

In dieser Arbeit wurden insgesamt 71 kryokonservierte *M. bovis*-Isolate aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der veterinärmedizinischen Universität Wien verwendet. Die ausgewählten Stämme wurden mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie und Multilokus-Sequenztypisierung untersucht.

Die Stämme wurden aus verschiedenen anatomischen Quellen isoliert (Lunge, Bronchoalveolar-Lavage (BAL), Milch, Euter, äußerer Gehörgang (als Ohr bezeichnet), Bulla tympanica (BT), Gelenk, Auge, Samen, Nase und Lymphknoten). Alle Isolate wurden aus klinischem Probenmaterial im Zeitraum 2001-2018 isoliert.

Tabelle 1: Bezeichnung und Herkunft der untersuchten *M. bovis*-Stämme (geographische Herkunft, Isolierungsjahr, Habitat)

Nr.	Proben-ID	Geografische Herkunft	Isolierungsjahr	Habitat
1	1395	OOE	2010	LUNGE
2	3985/1	OOE	2017	BAL
3	397	NOE	2013	OHR
4	1172	NOE	2017	LUNGE
5	171	NOE	2013	LUNGE
6	3735/14	OOE	2017	MILCH
7	325/12	NOE	2012	LUNGE
8	60	NOE	2017	GELENK
9	3804/4	STM	2016	KONJUNKTIVA
10	2092	NOE	2016	LUNGE
11	2462	NOE	2017	OHR
12	1102-6012	D	2011	UNBEKANNT
13	1885/1	NOE	2017	OHR

14	1299	STM	2018	BAL
15	501/4	TIR	2017	MILCH
16	3092	OOE	2017	BAL
17	466/2	TIR	2017	MILCH
18	1271/1+2	OOE	2018	BAL
19	593/5	TIR	2017	MILCH
20	7	Ä	2003	MILCH
21	24	NOE	2013	LUNGE
22	401	OOE	2017	OHR
23	474/2	OOE	2017	BAL
24	1193	WIEN	2003	UNBEKANNT
25	3736	OOE	2017	AUGE
26	1793/2	WIEN	2002	UNBEKANNT
27	1793/1	WIEN	2002	UNBEKANNT
28	381/1	TIR	2014	AUGE
29	189	NOE	2014	LUNGE
30	3512	NOE	2016	LUNGE
31	2859	NOE	2017	LUNGE
32	426	NOE	2018	LYMPHKNOTEN
33	2569	NOE	2017	LUNGE
34	2952	NOE	2017	LUNGE
35	3933	NOE	2017	MILCH
36	3633/1	OOE	2017	MILCH
37	2651/4	NOE	2017	NASE
38	205	I	2010	MILCH
39	59144a1	D	2001	GELENK
40	444	NOE	2013	LUNGE
41	3395	OOE	2017	BAL
42	2951	OOE	2017	BAL
43	411	NOE	2014	GELENK
44	141	OOE	2018	LUNGE
45	3539	NOE	2017	LUNGE
46	3942	NOE	2017	GELENK

47	1803K2	NOE	2010	LUNGE
48	694	OOE	2012	LUNGE
49	8	NOE	2013	LUNGE
50	1345/M2	D	2016	MILCH
51	861M1	SLO	2012	MILCH
52	39M3	SLO	2012	MILCH
53	381/2	TIR	2014	AUGE
54	3220	NOE	2016	OHR
55	314	NOE	2012	BT
56	85M	STM	2014	EUTER
57	1155	NL	2018	UNBEKANNT
58	4242	OOE	2018	BAL
59	3915	OOE	2018	BAL
60	3917	OOE	2018	BAL
61	3534	OOE	2018	BAL
62	3519	NOE	2018	LUNGE
63	4423	OOE	2018	NASE
64	3508	NOE	2018	LUNGE
65	3380	NOE	2018	LUNGE
66	4352	OOE	2018	BAL
67	4568	OOE	2018	BAL
68	4173	OOE	2018	BAL
69	3964	OOE	2018	BAL
70	3153	OOE	2018	NASE
71	3230	NOE	2018	LUNGE

NOE = Niederösterreich, OOE = Oberösterreich, STM = Steiermark, TIR = Tirol,
SLO = Slowakei, D = Deutschland, I = Italien, NL = Niederlande, Ä = Ägypten

2.2 Kultivierung von *Mycoplasma bovis*

Ein modifiziertes SP4-Medium, hergestellt am Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, wurde für die Anzucht der Isolate verwendet. Hierfür wurden ca. 100 µl der bei -80°C eingefrorenen Isolate in 3 ml Medium überführt und bei 37°C aerob bebrütet. Nach Farbumschlag, der Mykoplasmenwachstum anzeigte (farbliche Veränderung des Phenolrot-Indikators bei pH-Wert-Veränderung infolge von Natriumpyruvat-Oxidationsprozessen) und in der Regel nach 1-3 Tagen Bebrütungsdauer eintrat, wurden die Kulturen für weitere Untersuchungen aufbereitet.

2.3 Massenspektrometrische Untersuchung von *Mycoplasma bovis* mittels MALDI-ToF

Die gewonnenen Kulturen wurden zum Zwecke der Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-ToF MS analysiert. Hierzu wurde 1 ml der Flüssigkultur in Eppendorf-Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und anschließend bei 20 000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 100 µl Wasser (HPLC grade, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) resuspendiert. Danach folgte ein weiteres Zentrifugieren für 5 min bei 20 000 x g. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 15 µl 70%iger Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) gelöst und mit 15 µl Acetonitril (100%ig, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) vermischt. Danach wurde die Suspension bei 20 000 x g für 2 min zentrifugiert. Ein µl des Proteinextrakts wurde schließlich auf eine MALDI-Trägerplatte aus Edelstahl (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) pipettiert und unter Abzug getrocknet. Anschließend wurde das luftgetrocknete Proteinextrakt mit 1 µl der Matrixlösung (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 250 µl 50% Acetonitril, 47,5% destilliertem Wasser, 2,5% Trifluoressigsäure; Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) überschichtet. Nach der Trocknung wurden die Proben im MALDI-ToF Biotyper (Microflex LT, Bruker

Daltronik, Bremen, Deutschland) massenspektrometrisch analysiert. Hierbei wurden Spektren von Proteinmassen im Bereich zwischen 3 und 15 kDa durch manuellen Laserbeschuss (240 Laserschüsse, 60 Hertz Stickstofflaser, linearer, positiver Ionenmodus) und unter Verwendung der Bruker FlexControl 3.4 Software generiert und diese softwarebasiert mit Referenzspektren einer in-House Mykoplasmen-Referenzdatenbank verglichen. Dabei wurde ein numerischer Wert (*score value*) berechnet und so die Übereinstimmung der gemessenen Probe mit den Referenzspektren in der Datenbank ermittelt. Dabei ließen nur Score-Werte über 2.00 eine sichere Bestimmung der Artzugehörigkeit der untersuchten Isolate zu.

Außerdem wurden Spektren-Distanzwerte, die auf unterschiedliche Intensitäten und Verschiebungen der Proteinpeaks beruhen, softwarebasiert ermittelt und diese als Dendrogramm dargestellt.

2.4 DNA-Extraktion

Für die DNA Extraktion wurde 1 ml der Flüssigkultur in ein Eppendorf-Gefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und anschließend bei 20 000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 300 µl Resuspensionslösung, 20 µl Proteinase K-Lösung und 200 µl Lysepuffer vermischt und gevortext. Danach wurden die Gefäße in einen Wärmeblock verbracht, wo sie für 10 min bei 70°C inkubiert wurden. Zur Vorbereitung der DNA-Extraktionsfilter wurden diese zwischenzeitlich mit 500 µl Filterpräparationspuffer beschickt und bei 12 000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde entfernt. Die Proben wurden nach Wärmebehandlung mit 200 µl 96%-igem Ethanol versetzt und gevortext. Aus der Lösung wurden 500 µl entnommen und in die vorbereiteten Gefäße mit Filter überführt. Diese wurden bei 12 000 x g für 1 min zentrifugiert. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde verworfen und anschließend der Filter mit 500 µl Ethanol-Waschlösung bei 12 000 x g für 1 min gewaschen. Dieser Schritt wurde wiederholt, diesmal bei 14 000

x g für 3 min zentrifugiert. Danach wurde die Waschlösung entfernt und die Filterröhrchen leer bei 14 000 x g für 1 min zentrifugiert, um Reste der Waschlösung zu entfernen. Die Filter wurden in neue Gefäße verbracht und mit 200 µl Elutionslösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die eluierte DNA durch Zentrifugieren bei 12 000 x g für 1 min gesammelt.

2.5 Multilokus-Sequenztypisierung

Im Rahmen der Multilokus-Sequenztypisierung nach Register et al. (2015) wurden die Haushaltsgene folgender Enzyme untersucht: Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (*gpsA*), Thymidin-Kinase (*tdk*), DNA-Gyrase Subunit B (*gyrB*), Glutamyl-tRNA-Ligase (*gltX*), Alkohol-Dehydrogenase-1 (*adh-1*), Thymidin-Transketolase (*tkt*) und Phosphat-Acetyltransferase-2 (*pta-2*).

Hierzu wurde ein PCR-Master-Mix mit insgesamt 25 µl angesetzt. Dieser bestand aus folgenden Substanzen: 9 µl DNA-freies Wasser (PCR grade), 12,5 µl *One Taq Quick Load Polymerase* mit dNTPs, MgCl₂ und Standardpuffer (New England Bio Labs, Massachusetts, USA), jeweils 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (25 pmol/ µl) und 2,5 µl der zuvor extrahierten DNA. Anschließend wurde die PCR unter folgenden thermozyklischen Bedingungen durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 5 Minuten, 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 10 Sekunden, Annealing bei 55°C für 30 Sekunden. Elongation bei 72°C für eine Minute und die finale Elongation bei 72°C für 5 Minuten. Hierfür wurde der Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Die 71 *M. bovis*-Stämme wurden weiters auf das Haushaltsgen *tufA* (Gen für den Translationelongationsfaktor TufA) (Rosales et al., 2015) untersucht. Hierzu wurden die thermozyklischen Bedingungen wie folgt angepasst: Denaturierung bei 95°C für 5

Minuten, 30 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 1 Minute, Annealing bei 56°C für 1 Minute, Elongation bei 72°C für 1 Minute und die finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten.

Tabelle 2: Analysierte Haushaltsgene, eingesetzte Primersequenzen und generierte Amplikonlängen bei der MLST von *M. bovis*-Isolaten

Primer-ID (Haushaltsgene)	Primersequenz (5' - 3')	Amplikon- längen (bp)	Referenz	
<i>gpsA f</i>	AAAATGTGAGGAATTGATCA	521	Register et al. (2015)	
<i>gpsA r</i>	CCAATTCCAATTGCTAAAAC			
<i>tdk f</i>	ATGTATTTAAAAAGTGGATTAGG	572		
<i>tdk r</i>	TATCTCATAGCTTTTTTAGC			
<i>gyrB f</i>	AGCTTGCTAATTGCACCA	678		
<i>gyrB r</i>	TATTTTGAACAAATTTTGCAT			
<i>gltX f</i>	TGGTGAGTATTCAATAAGGT	530		
<i>gltX r</i>	GTTTTGAGAATCATTGCA			
<i>adh-1 f</i>	GGAGTAACTAGTTACAAAGCACTTA	546		
<i>adh-1 r</i>	TGCTAGTTGTTCAAACACGT			
<i>tkf f</i>	CCAAGTTATATTATGGTGCA	533		
<i>tkf r</i>	CCACCATATAAATTAATGCC			
<i>pta-2 f</i>	AATTCGTAATGGCAAAGAAG	490		
<i>pta-2 r</i>	CTTAGCTTTTCTTACATTTAGGT			
<i>tufA f</i>	TGATTACTGGTGCTGCTCAA	499		Rosales et al. (2015)
<i>tufA r</i>	TTTCACCAGGTTGAACGAAT			

f=forward, r= reverse

Anschließend wurden die PCR Produkte in einem 2%-igen Agarosegel (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) bei 210 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in eine Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) verbracht und nach ausreichender Einwirkzeit im Transilluminator (Bio-Rad Laboratories GmbH, Wien, Österreich) analysiert. Die Amplifikate konnten hiermit sichtbar gemacht, fotografiert und gespeichert werden.

Zur enzymatischen Aufreinigung wurden 10 µl der PCR-Produkte mit 1 µl Exonuclease 1 (New England Bio Labs, Massachusetts, USA) und 2 µl Shrimp-Alkalin-Phosphatase (rSAP) (New England Bio Labs, Massachusetts, USA) vermischt. Anschließend folgte eine Wärmebehandlung bei 37°C für 15 min und bei 80°C für weitere 15 min. Danach wurden 12 µl des Gemisches in 96 Well-Platten übertragen und mit jeweils 3 µl des verwendeten Vorwärts-Primers vermischt. Die Platten wurden verschlossen und an LGC Genomics GmbH (Berlin) zur Sequenzierung versendet.

Die ermittelten Sequenzen wurden schließlich mittels ClustalW-Alignment (MEGA6-Software-Paket) ausgerichtet und manuell kuriiert. Die hierbei erhaltenen Sequenzfolgen wurden anschließend mit jenen in der öffentlich zugänglichen *pubmlst*-Datenbank verglichen (https://pubmlst.org/bigbdb?db=pubmlst_mbovis_seqdef) und einer Allel-Nummer zugeordnet. Konnte die ermittelte Sequenzfolge keiner Allel-Nummer zugeordnet werden, wurde eine neue Allel- und Sequenztyp-Nummer beantragt. Die Zuordnung der ermittelten *tufA*-Gensequenzen erfolgte durch BLAST-Vergleich mit GenBank-Einträgen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Zur phylogenetischen Verwandtschaftsanalyse der untersuchten Isolate wurden schließlich die Haushaltsgen-Sequenzen verknüpft und nach ClustalW-Alignment eine Neighbour-Joining-Distanzanalyse mit Bootstrapping (1000 Replikationen) unter Einsatz des Kimura-2-Parameter-Substitutionsmodells durchgeführt (MEGA 6) und dabei ein phylogenetischer Stammbaum konstruiert.

3 Ergebnisse

3.1 Multilokus-Sequenztypisierung nach Register et al. (2015)

Insgesamt konnten bei 68 *M. bovis*-Isolaten die partiellen Gensequenzen von sieben Haushaltsgenen (*gpsA*, *tdk*, *gyrB*, *gltX*, *adh-1*, *tkt*, *pta-2*) bestimmt werden. Bei drei Stämmen konnte trotz Wiederholungsuntersuchungen das *adh-1*-Gen nicht nachgewiesen werden. Nicht zuordbaren Allelen mit neuartigen Sequenzfolgen sowie Allel-Nummerncodes, die keinem Sequenztyp zugeordnet werden konnten, wurden neue Allel- und Sequenztyp-Nummern zugewiesen.

Fünfunddreißig der insgesamt 71 *M. bovis*-Isolate konnten dem Sequenztyp 5 (ST5) zugeordnet werden (49%). Jeweils 3 Isolate wurden ST62 (3220, 4423, 3380) und ST166 (411, 4242, 3915) zugeteilt. Je 2 Isolate gehörten zu ST70 (466/2, 8), ST94 (1345/M2, 39M3), ST160 (7 Ägypten, 1193), ST162 (1793/1, 1793/2), ST163 (381/1, 381/2) und ST169 (3534, 3508). Fünfzehn der untersuchten Isolate (21%) waren Singletons und somit nur einem Sequenztyp zuordenbar. Bei 3 Isolaten konnten durch den fehlenden Nachweis von *adh-1* kein Sequenztyp ermittelt werden (397, 3539, 3153).

Insgesamt wurden 13 neue Sequenztypen (ST158-ST170) ermittelt und in die Datenbank integriert. Zwei neue Allele konnten für das Haushaltsgen *adh-1* (Alkohol-Dehydrogenase-1) und ein neues Allel für *tdk* (Thymidin-Kinase) nachgewiesen werden. Bei allen anderen Haushaltsgenen waren die ermittelten Allele bereits bekannt.

Tabelle 3: Bestimmung von Allel-Nummern und Sequenztypen mittels MLST nach Register et al. (2015)

Proben-ID	Ort/ der Isolierung	Jahr	adh1	gltX	gpsA	gyrB	pta2	tdk	tkf	ST
1395	OOE10		4	3	3	3	2	3	6	5
3985/1	OOE17		4	3	3	3	2	3	6	5
397	NOE13		-	3	3	3	2	3	6	-
1172	NOE17		4	3	3	3	2	3	6	5
171	NOE13		4	3	3	3	2	3	6	5
3735/14	OOE17		4	3	3	3	2	3	6	5
325/12	NOE12		4	3	3	3	2	3	6	5
60	NOE17		4	3	3	3	2	3	6	5
3804/4	STM16		4	3	3	3	2	3	6	5
2092	NOE16		4	3	3	3	2	3	6	5
2462	NOE17		4	3	3	3	2	3	6	5
1102-6012	D11		3	2	4	2	1	3	2	17
1885/1	NOE17		4	3	3	3	2	3	6	5
1299	STM18		4	3	3	3	2	3	6	5
501/4	TIR17		4	3	3	3	2	3	6	5
3092	OOE17		4	3	1	4	5	3	3	158*
466/2	TIR17		4	3	1	3	2	3	6	70
1271/1+2	OOE18		4	3	3	3	5	3	6	12
593/5	TIR17		4	3	3	3	2	3	6	5
7	Ä03		3	2	3	2	1	3	2	160*
24	NOE13		4	3	4	8	2	3	6	36
401	OOE17		4	3	3	3	2	16	6	159*
474/2	OOE17		4	3	3	3	5	3	3	27
1193	WIEN03		3	2	3	2	1	3	2	160*
3736	OOE17		4	3	4	3	2	3	6	161*
1793/2	WIEN02		16	2	4	7	1	3	2	162*
1793/1	WIEN02		16	2	4	7	1	3	2	162*

381/1	TIR14	16	3	3	3	2	3	6	163*
189	NOE14	4	3	3	3	2	3	6	5
3512	NOE16	4	3	3	3	2	3	6	5
2859	NOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
426	BISON18	4	3	3	3	2	3	6	5
2569	NOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
2952	NOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
3933	NOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
3633/1	OOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
2651/4	NOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
205	I10	3	3	3	3	2	3	6	38
59144a1	D01	3	2	3	7	1	3	2	164*
444	NOE13	1	3	4	3	2	3	6	165*
3395	OOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
2951	OOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
411	NOE14	17	3	3	3	2	3	6	166*
141	OOE18	4	3	3	3	2	3	6	5
3539	NOE17	-	3	3	3	2	3	6	-
3942	NOE17	4	3	3	3	2	3	6	5
1803K2	NOE10	1	2	3	4	5	1	3	167*
694	OOE12	1	2	1	4	5	1	3	18
8	NOE13	4	3	1	3	2	3	6	70
1345/M2	D16	1	3	3	5	2	2	3	94
861M1	SLO12	3	3	4	2	1	3	2	168*
39M3	SLO12	1	3	3	5	2	2	3	94
381/2	TIR14	16	3	3	3	2	3	6	163*
3220	NOE16	1	3	3	3	2	3	6	62
314	NOE12	4	3	3	3	2	3	6	5
85M	STM14	4	3	3	3	2	3	6	5
1155	NL18	1	2	1	3	5	1	3	14
4242	OOE18	17	3	3	3	2	3	6	166*
3915	OOE18	17	3	3	3	2	3	6	166*
3917	OOE18	4	3	3	3	2	3	6	5

3534	OOE18	4	3	3	3	2	1	6	169*
3519	NOE18	4	3	3	3	2	3	6	5
4423	OOE18	1	3	3	3	2	3	6	62
3508	NOE18	4	3	3	3	2	1	6	169*
3380	NOE18	1	3	3	3	2	3	6	62
4352	OOE18	4	3	3	3	2	3	6	5
4568	OOE18	17	3	3	3	2	1	6	170*
4173	OOE18	4	3	3	3	2	3	6	5
3964	OOE18	4	3	3	3	2	3	6	5
3153	OOE18	-	3	3	3	2	1	6	-
3230	NOE18	4	3	3	3	2	3	6	5

*in dieser Arbeit neu etablierte Sequenztypen.

3.2 *tufA*-Sequenzanalyse nach Rosales et al. (2015)

Bei der *tufA*-Sequenzierung nach Rosales et al. (2015) konnten ausschließlich 2 unterschiedliche Allele, nämlich R144B08 und RPG45, ermittelt werden. Dabei wurde das Allel R144B08 häufiger (67,6%) nachgewiesen.

Jene 35 *Mycoplasma bovis*-Isolate, die den Sequenztyp 5 (ST5) aufwiesen, konnten durch die *tufA*-Sequenzanalyse weiter differenziert werden, wobei 22 Isolate (62,9%) dem Sequenztyp 5A (R144B08) und 13 Isolate (37,1%) dem Typ 5B (RPG45) zugeordnet wurden.

Tabelle 4: Ergebnisse der *tufA*-Sequenzierung nach Rosales et al. (2015)

Proben-ID	Ort/ Jahr der Isolierung	ST	<i>tufA</i>
1395	OOE10	5B	RPG45
3985/1	OOE17	5B	RPG45
397	NOE13	-	R144B08
1172	NOE17	5A	R144B08
171	NOE13	5A	R144B08
3735/14	OOE17	5A	R144B08
325/12	NOE12	5B	RPG45
60	NOE17	5A	R144B08
3804/4	STM16	5B	RPG45
2092	NOE16	5A	R144B08
2462	NOE17	5A	R144B08
1102-6012	D11	17	RPG45
1885/1	NOE17	5A	R144B08
1299	STM18	5A	R144B08
501/4	TIR17	5A	R144B08
3092	OOE17	158	R144B08
466/2	TIR17	70	R144B08
1271/1+2	OOE18	12	R144B08
593/5	TIR17	5A	R144B08
7	Ä03	160	RPG45
24	NOE13	36	R144B08
401	OOE17	159	R144B08
474/2	OOE17	27	R144B08
1193	WIEN03	160	RPG45
3736	OOE17	161	R144B08
1793/2	WIEN02	162	RPG45
1793/1	WIEN02	162	RPG45
381/1	TIR14	163	R144B08
189	NOE14	5B	RPG45

3512	NOE16	5B	RPG45
2859	NOE17	5B	RPG45
426	BISON18	5B	RPG45
2569	NOE17	5B	RPG45
2952	NOE17	5B	RPG45
3933	NOE17	5A	R144B08
3633/1	OOE17	5A	R144B08
2651/4	NOE17	5A	R144B08
205	I10	38	R144B08
59144a1	D01	164	RPG45
444	NOE13	165	R144B08
3395	OOE17	5A	R144B08
2951	OOE17	5A	R144B08
411	NOE14	166	R144B08
141	OOE18	5A	R144B08
3539	NOE17	-	R144B08
3942	NOE17	5A	R144B08
1803K2	NOE10	167	RPG45
694	OOE12	18	RPG45
8	NOE13	70	R144B08
1345/M2	D16	94	R144B08
861M1	SLO12	168	RPG45
39M3	SLO12	94	R144B08
381/2	TIR14	163	R144B08
3220	NOE16	62	R144B08
314	NOE12	5A	R144B08
85M	STM14	5B	RPG45
1155	NL18	14	RPG45
4242	OOE18	166	R144B08
3915	OOE18	166	R144B08
3917	OOE18	5A	R144B08
3534	OOE18	169	R144B08
3519	NOE18	5A	R144B08

4423	OOE18	62	R144B08
3508	NOE18	169	R144B08
3380	NOE18	62	R144B08
4352	OOE18	5B	RPG45
4568	OOE18	170	R144B08
4173	OOE18	5A	R144B08
3964	OOE18	5B	RPG45
3153	OOE18	-	R144B08
3230	NOE18	5A	R144B08

Alle Stämme mit dem Sequenztyp 5A wurden aus den österreichischen Bundesländern Niederösterreich, Oberösterreich, Steiermark und Tirol isoliert. Die meisten Isolate stammten hierbei aus Niederösterreich, wo der Sequenztyp 5A dominierte. In den anderen Bundesländern waren ST5A und ST5B gleichermaßen vertreten.

Die Haushaltsgensequenzen von *gpsA*, *tdk*, *gyrB*, *gltX*, *adh-1*, *tkf* und *pta-2* (Register et al., 2015) wurden mit den *tufA*-Gensequenzen (Rosales et al., 2015) verknüpft, die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten *M. bovis*-Isolate berechnet und in Form eines phylogenetischen Stammbaumes dargestellt (Abb. 1).

Der phylogenetische Stammbaum zeigt eine Verteilung in zwei Hauptgruppen, wobei über 77% der *M. bovis*-Isolate sich in Cluster I gruppieren. Darüber hinaus befinden sich alle ST5A und ST5B im Cluster I. Lediglich 7 Stämme (861M1, 1102-6012, 7, 1793/1, 1793/2, 1193, 59144a1) die im Zeitraum zwischen 2001 und 2012 in Deutschland, Slowakei und Österreich isoliert werden konnten, gruppieren sich im Cluster II. Des Weiteren befinden sich im Cluster II (ausgenommen 1102-6012) ausschließlich neu ermittelte Sequenztypen. Neun Stämme konnten keinem Cluster zugeordnet werden.

Abbildung 1: MLST nach Register et al. (2015) und *tufA*-Sequenzierung. Phylogenetischer Stammbaum mit Clusterformation berechnet aus den verknüpften Haushaltsgenen *gpsA*, *tdk*, *gyrB*, *gltX*, *adh-1*, *tkl*, *pta-2* (Register et al. 2015) und *tufA* (Rosales et al., 2015). Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert, es sind ausschließlich Bootstrap-Werte über 70 angegeben. Der Maßstab Balken vermittelt die Distanz zwischen den Sequenztypen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

3.3 Massenspektrometrie mittels MALDI-ToF

Mithilfe der MALDI-ToF Massenspektrometrie konnten Spektren für alle untersuchten Isolate generiert und mit einer In-House Referenzdatenbank verglichen und als *M. bovis* identifiziert werden.

Die ermittelten Distanzwerte der generierten Spektren, die auf Peak-Verschiebungen sowie Unterschieden in den Peak-Intensitäten beruhten, wurden in einem Dendrogramm dargestellt. Auch mittels MALDI-ToF MS war eine deutliche Clusterbildung in zwei Hauptcluster erkennbar. Cluster I stimmte mit Cluster II des MLST-Stammbaums überein. Durch die MALDI-ToF MS wurden auch jene Stämme, die bei der MLST keinem Cluster zugeordnet werden konnten, im Cluster II integriert. Eine Differenzierung von ST5 in ST5A und ST5B war jedoch nicht möglich. Die ermittelten Distanzwerte erlaubten nur eine Unterscheidung zwischen den MLST-Cluster II-zugehörigen und den restlichen untersuchten *M. bovis*-Stämmen (MLST-Cluster I-Stämme, keinem MLST-Cluster-zugehörige Stämme).

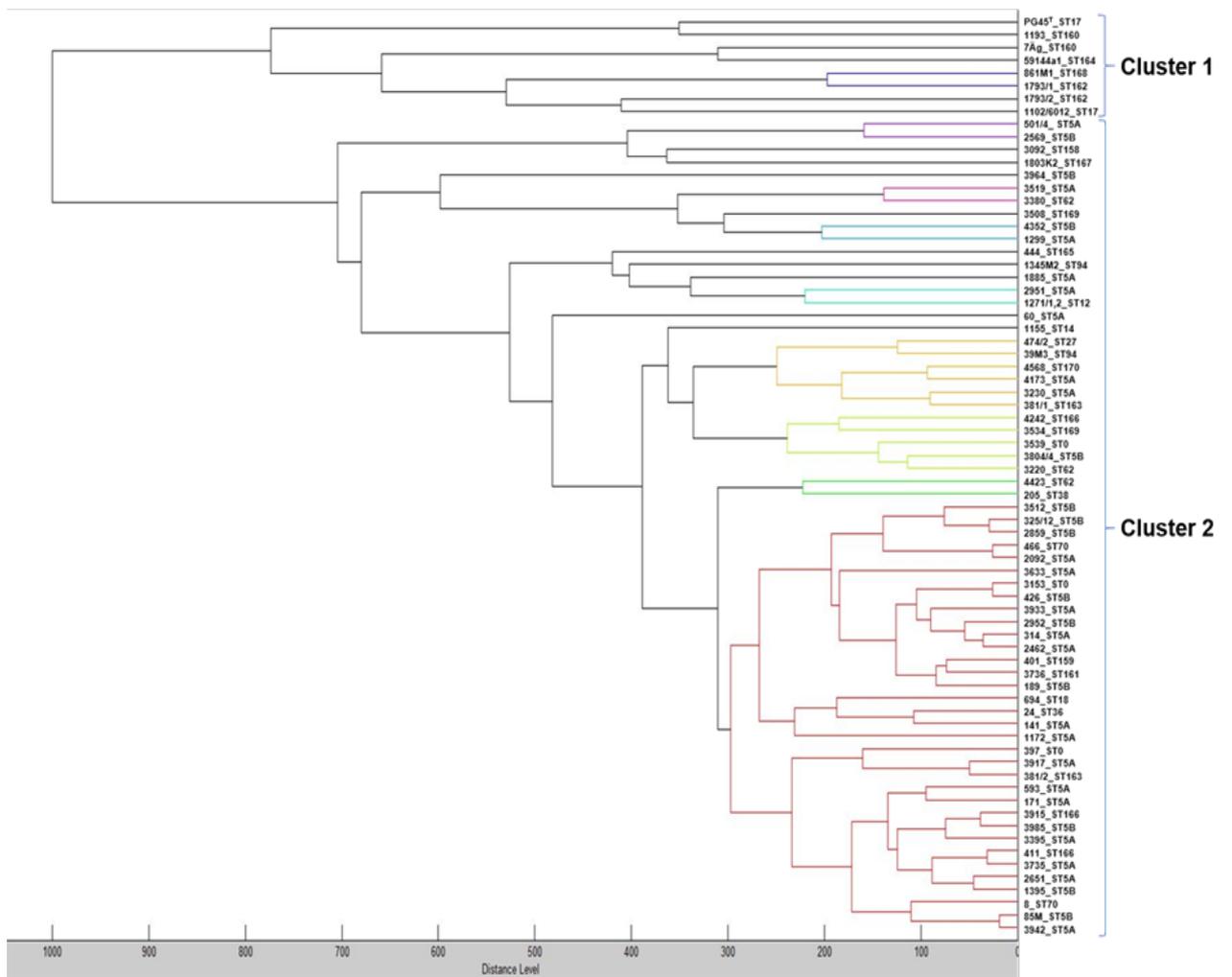


Abbildung 2: MALDI-ToF MS. MALDI-ToF-Spektren-Distanz-Dendrogramm der 71 untersuchten *M. bovis*-Isolate

4 Diskussion

Aufgrund seiner hohen Kontagiosität und ausgesprochenen Therapieresistenz sowie fehlender immunprophylaktischen Maßnahmen verursacht *M. bovis* weltweit hohe wirtschaftliche Verluste. Für die Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen wurden bereits etablierte genotypische Charakterisierungsverfahren, vor allem die MLVA und MLST, eingesetzt (Nicholas et al., 2008, Sulyok et al., 2014, Becker et al., 2015). Becker et al. (2015) setzte erstmalig die MALDI-ToF MS als phänotypisches Charakterisierungsverfahren zur epidemiologischen Abklärung ein.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die genotypischen Eigenschaften rezenter *M. bovis*-Stämme (isoliert im Zeitraum 2016 bis 2018) mit jenen der vor 2016 gewonnenen Isolate zu vergleichen. Die Stämme wurden außerdem erstmalig durch den Einsatz der MALDI-ToF MS untersucht und differenziert. In einer vorangegangenen Studie gelang es Jaenich (2017) *M. bovis*-Stämme, die bis zum Jahre 2016 isoliert werden konnten, mittels MLST zu differenzieren. Dabei konnte erstmalig der Subsequenztyp ST5B im Jahr 2014 in einem steirischen Milchviehbetrieb (Pothmann et al., 2015) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine Prädominanz des ST5A in Österreich beobachtet.

In dieser Diplomarbeit konnte mittels MLST festgestellt werden, dass der Sequenztyp ST5 in allen Bundesländern (ausgenommen Wien) nachgewiesen werden kann. Des Weiteren ist ST5A in Österreich weiterhin am häufigsten vertreten. Durch Untersuchung weiterer älterer Stämme, konnte in der vorliegenden Arbeit ST5B bereits 2010 in Oberösterreich nachgewiesen werden.

Insgesamt ergab die MLST, dass 49% der untersuchten Stämme dem Sequenztyp ST5 zugeordnet werden kann. Jaenich (2017) konnte in seiner Arbeit 75% der *M. bovis*-Isolate dem Sequenztyp ST5 zuordnen und somit ebenfalls die Prädominanz des ST5 feststellen. Die Ausbreitung eines in Österreich zwischen 2007 und 2011 epidemischen *M. bovis* Stammes, wurde bereits in einer früheren Studie (Spergser et al., 2013) aufgezeigt. Allerdings wurde hierfür die MLVA und die RAPD-Analyse zur Typisierung eingesetzt. Die Verbreitung dieser einzelnen Stammvariante ist vermutlich

auf die österreichischen kleinbäuerlichen Betriebsstrukturen und den regional begrenzten Tierhandel zurückzuführen.

In der vorliegenden Arbeit konnten 13 neue Sequenztypen (ST158-ST170) ermittelt werden. Trotz der Dominanz von ST5, wurden die restlichen 36 Isolate weiteren 24 Sequenztypen (inklusive der 13 neuen Sequenztypen) zugeordnet. Die Heterogenität der neben ST5 in Österreich auftretenden *M. bovis*-Stämmen erscheint beachtlich, ist aber mit anderen MLST-Studien vergleichbar (Register et al., 2015, Bürki et al., 2016). In Israel (Amram et al., 2013, Lysnyanky et al., 2016) konnte eine weitaus heterogenere *M. bovis*-Stammpopulation aufgezeigt werden. Gründe dafür sind intensiver Tierhandel und Importe von Rindern aus Ländern, in welchen *M. bovis* endemisch auftritt.

Durch den Einsatz eines weiteren Genlocus (*tufA*) wurde das Diskriminierungspotenzial des angewandten MLST-Verfahrens erhöht und die dem ST5 zugeordneten Isolate konnten in zwei Subsequenztypen (ST5A, ST5B) unterteilt und somit wertvolle Erkenntnisse zur Infektionsepidemiologie der *M. bovis*-Infektion in Österreich gewonnen werden. Rund 63 % der *M. bovis*-Stämme wurden dem ST5A zugeteilt, wobei hier 57 % durch rezente *M. bovis*-Isolate vertreten waren. Durch die Integration weiterer Stämme, welche vor 2016 isoliert wurden, konnte der ST5B bereits 2010 in Oberösterreich isoliert werden. Manso-Silvan et al. (2012) empfehlen sogar die Inklusion von Nicht-Haushaltsgenen, um das Diskriminierungspotential von Sequenzanalysen zu erhöhen. Sulyok et al. (2014) raten zur Kombination von MLST und MLVA, da die MLVA eine weitere Differenzierung der Isolate ermöglicht, dies erscheint aufwendiger aber wesentlich zielführender.

Die Verwandtschaftsverhältnisse der 71 *M. bovis*-Isolate konnten in einem phylogenetischen Stammbaum aufgezeigt werden. Hierbei wurde kein geographischer Zusammenhang bei der Gruppierung in beide Hauptcluster festgestellt. Register et al. (2015) konnte ebenfalls in ihrer Studie keine Besonderheiten bei der Zuordnung von *M. bovis*-Stämmen unterschiedlichen geographischen Ursprungs in die jeweiligen phylogenetischen Cluster erkennen. Allerdings wurde in der vorgelegten Studie ein zeitlicher Zusammenhang im Cluster II beobachtet, in dem sich bis auf 2 Stämme

(1102-6012, 861) nur Isolate gruppierten, die vor 2007 isoliert werden konnten. Eine Differenzierung zwischen alten und neueren *M. bovis*-Isolaten konnte bereits in früheren Studien aufgezeigt werden (Bürki et al., 2016, Becker et al., 2015).

Durch die MALDI-ToF Massenspektrometrie konnten alle Stämme korrekt als *M. bovis* (Werte über 2,0) identifiziert werden. Das Spektren-Distanz-Dendrogramm zeigte hinsichtlich der Differenzierung zwischen alten und neueren *M. bovis*-Stämmen die gleiche Topologie wie im MLST-Stammbaum. Becker et al. (2015) konnte in ihrer Studie eine massenspektrometrische Differenzierung in alte und rezente *M. bovis*-Stämme ebenfalls feststellen. Das Differenzierungspotential der MALDI-ToF MS konnte auch in weiteren Mykoplasmenstudien aufgezeigt werden (Goto et al., 2012, Pereyre et al., 2013, Xiao et al., 2014).

Die MALDI-ToF MS lässt eine Differenzierung zwischen alten und rezenten *M. bovis*-Stämmen zu, allerdings ist eine weitere Differenzierung unter Anwendung des systemintegrierten Algorithmus nicht möglich. Durch den Einsatz von speziellen Software-Programmen (z.B. ClinPro Tools) könnte das Differenzierungspotential der MALDI-ToF MS für *M. bovis* jedoch vermutlich erhöht werden (Xiao et al., 2014).

5 Zusammenfassung

M. bovis ist ein an das Rind adaptierter Infektionserreger, der verschiedene Krankheitsbilder hervorruft und durch Therapieresistenz und fehlende immunprophylaktischen Maßnahmen hohe wirtschaftliche Verluste verursacht. Infektionsepidemiologische Untersuchungen unter Anwendung geeigneter Typisierungsverfahren ermöglichen die Identifizierung von Infektionsquellen, Infektionsketten und Infektionsdynamiken. Ziel dieser Diplomarbeit war es daher, ausgewählte *M. bovis*-Stämme (n=71) auf ihre phäno- und genotypischen Eigenschaften zu untersuchen, um zeitliche und geographische Besonderheiten der untersuchten *M. bovis*-Stämme darstellen zu können. Dabei wurden insgesamt 47 rezente Stämme (isoliert 2016 bis 2018) mit 24 älteren *M. bovis*-Isolaten (isoliert vor 2016) verglichen. Zur Genotypisierung wurde die MLST nach Register et al. (2015) verwendet und durch Inklusion von *tufA* das Diskriminierungspotential erhöht. Zur phänotypischen Charakterisierung der vorwiegend österreichischen *M. bovis*-Stämme wurde erstmalig die MALDI-ToF MS eingesetzt.

Durch die MLST nach Register et al. (2015) war es möglich, 35 der 71 untersuchten *M. bovis*-Isolate dem Sequenztyp 5 zuzuordnen. Durch die Kombination der MLST und der *tufA*-Sequenzanalyse wurden ST5 weiter zu ST5A und ST5B differenziert. Hierbei zeigte sich, dass ST5A in Österreich weiterhin dominiert. Die restlichen 36 Stämme konnten 24 Sequenztypen zugeordnet werden, wobei davon 13 als neue, bislang noch nicht beschriebene Sequenztypen identifiziert werden konnten. Die phylogenetische Untersuchung verdeutlichte, dass sich eine Mehrheit der untersuchten *M. bovis*-Isolate (n=55, vorwiegend ST5A und ST5B) dem Cluster I zuordnen lässt. Cluster II umfasste ausschließlich ältere *M. bovis*-Stämme (isoliert vor 2012).

Die MALDI-ToF MS ermöglichte eine genaue Differenzierung zwischen älteren Stämmen (MLST Cluster II) und rezenten *M. bovis*-Isolaten. Eine weitere Differenzierung rezenter Stämme, wie es die MLST-Analyse erlaubte, war jedoch nicht möglich.

Zusammenfassend konnte durch die durchgeführten MLST- und MALDI-ToF MS-Untersuchungen ein Überblick zu den jüngsten Entwicklungen in der *M. bovis*-Infektionsepidemiologie in Österreich ermittelt werden. Ein tieferer Einblick in die Infektionsepidemiologie von *M. bovis* ist jedoch nur durch Verbesserungen in den angewandten Typisierungsmethoden, wie der Einsatz von speziellen Software-Programmen zur Analyse von MALDI-ToF Spektren und/oder die Kombination von MLST mit der Gesamtgenomsequenzierung (cgMLST) zu erreichen.

6 Summary

M. bovis is an infectious agent adapted to cattle, which causes various diseases and high economic losses due to its resistance to therapy and the lack of immunoprophylactic measures. Epidemiologic investigations employing appropriate typing methods allow tracing sources as well as routes and dynamics of infection. It was therefore the objective of this diploma thesis to examine selected *M. bovis* strains (n=71) on their phenotypic and genotypic traits in order to show temporal and geographical features of the investigated *M. bovis* strains. A total of 47 recent strains (isolated 2016 to 2018) were compared with 24 older *M. bovis* isolates (isolated prior to 2016). For genotyping, the MLST typing scheme described by Register et al. (2015) was used and by including *tufA* the potential for discrimination was increased. For the first time, MALDI-ToF MS was used for the phenotypic characterization of predominantly Austrian *M. bovis* strains.

By using the MLST described by Register et al. (2015), it was possible to assign 35 of the 71 *M. bovis* isolates analysed to sequence type ST5. The combination of MLST and *tufA* sequence analysis further allowed differentiating ST5 into ST5A and ST5B. This showed that ST5A still dominates in Austria. For the remaining 36 strains 24 sequence types could be assigned, of which 13 were new, not yet described sequence types. Phylogenetically a majority of investigated *M. bovis* strains (n=55, predominately ST5A and ST5B) was assigned in cluster I. Cluster II included only older *M. bovis*-strains isolated before 2012.

MALDI-ToF MS allowed a precise differentiation between older strains (MLST cluster II strains) and recent *M. bovis* isolates. However, a further differentiation of recent strains, as demonstrated by the MLST analysis, was not possible.

In summary, MLST and MALDI-ToF MS provided an overview of the recent developments in the epidemiology of *M. bovis* in Austria. However, to gain deeper insights into the epidemiology of *M. bovis* improvements of applied typing methods are required, such as the employment of specialised software programs in analysing

MALDI-ToF spectra and/or the combination of MLST with whole genome sequencing (cgMLST).

7 Quellen

Adamu J.Y., Wawegama N.K., Browning G.F., Markham P.F. 2013. Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis. *Research in Veterinary Science* **95**: 321-325.

Aebi M., van den Borne B.H., Raemy A., Steiner A., Pilo P., Bodmer M. 2015. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Veterinaria Scandinavica* **57**: 10.

Amram E., Freed M., Khateb N., Mikula I., Blum S., Spargser J., Sharir B., Ozeri R., Harrus S., Lysnyansky I. 2013. Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Mycoplasma bovis* isolated from local and imported cattle. *Veterinary Journal* **197**: 286–290.

Amram E., Mikula I., Schnee C., Ayling R. D., Nicholas R. A. J., Rosales R. S., Harrus S., Lysnyansky I. 2015. 16S rRNA gene mutations associated with decreased susceptibility to tetracycline in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**: 796-802.

Arcangioli M. A., Aslan H., Tardy F., Poumarat F., Le Grand D. 2012. The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. *Veterinary Journal* **192**: 96-100.

Ayling R., Nicholas R., Hogg R., Wessels J., Scholes S., Byrne W., Hill M., Moriarty J., O'Brien T. 2005. *Mycoplasma bovis* isolated from brain tissue of calves. *Veterinary Record* **156**: 391-392.

Alberti A., Addis M.F., Chessa B., Cubeddu T., Profiti M., Rosati S., Ruiu A., Pittaub M. 2006. Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **18**: 41-51.

Bautsch W. 1988. Rapid physical mapping of the *Mycoplasma mobile* genome by two-dimensional field inversion gel electrophoresis techniques. *Nucleic Acids Research* **16**: 11461–11467.

Becker C.A., Thibault F.M., Arcangioli M.A., Tardy F. 2015. Loss of diversity within *Mycoplasma bovis* isolates collected in France from bovines with respiratory diseases over the last 35 years. *Infection, Genetics and Evolution* **33**: 118-126.

Bennett R. H., Jasper D.E. 1977. Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. *The Cornell Veterinarian*, **67**: 361–373.

Bielanski A., Devenish J., Phipps-Todd B. 2000. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* in semen on fertilization and association with *in vitro* produced morula and blastocyst stage embryos. *Theriogenology* **53**: 1213–1223.

Biddle M.K., Fox L.K., Hancock D.D. 2003. Patterns of mycoplasma shedding in the milk of dairy cows with intramammary mycoplasma infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **223**: 1163–1166.

Bürki S., Gaschen V., Stoffel M. H., Stojiljkovic A., Frey J., Kuehni-Boghenbor K., Pilo, P. 2015. Invasion and persistence of *Mycoplasma bovis* in embryonic calf turbinate cells. *Veterinary Research* **46**: 53.

Bürki S., Frey J., Pilo P. 2015. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology* **179**: 15-22.

Bürki S., Spergser J., Bodmer M., Pilo P. 2016. A dominant lineage of *Mycoplasma bovis* is associated with an increased number of severe mastitis cases in cattle. *Veterinary Microbiology* **196**: 63-66.

Calcutt M.J., Lysnyansky I., Sachse K., Fox L.K., Nicholas R.A.J., Ayling R.D. 2018. Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: An aid to identify future development requirements. *Transboundary and Emerging Diseases* **65**: 91–109.

Caswell J.L., Archambault M. 2007. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Animal Health Research Reviews* **8**: 161-86.

Caswell J.L., Bateman K.G., Cai H.Y., Castillo-Alcala F. 2010. *Mycoplasma bovis* in respiratory disease of feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **26**: 365–379.

Chambaud I., Wroblewski H., Blanchard A. 1999. Interactions between mycoplasmas lipoproteins and the host immune system. *Trends in Microbiology* **7**: 493-499.

Citti C., Lischewski A., Siebert-Gulle K. & Rosengarten R. 2000. Limitation of pulsed field gel electrophoresis analysis for the typing of *Mycoplasma bovis*. In: Poveda J.B., Fernandez A., Johansson K.-E. & Frey J. (Hrsg.). *Mycoplasma of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, European Commission, Brussels: 46-49.

De Been M., Pinholt M., Top J., Bletz S., Mellmann A., van Schaik W., Brouwer E., Rogers M., Kraat Y., Bonten M., Corander J., Westh H., Harmsen D., Willems R.J. 2015. Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* **53**:3788–3797.

Doig P.A. 1981. Bovine genital mycoplasmosis. *Canadian Veterinary Journal* **22**: 339-343.

Dyer N.W., Krogh D.F., Schaan L.P. 2004. Pulmonary mycoplasmosis in farmed white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Wildlife Diseases* **40**: 366–370.

Fox L.K. 2012. *Mycoplasma mastitis*: Causes, transmission, and control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **28**: 225-237.

Gagea M.I., Bateman K.G., Shanahan R.A., van Dreumel T., McEwen B.J., Carman S., Archambault M., Caswell J.L. 2006. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **18**: 29-40.

Ghanem M., Wang L., Zhang Y., Edwards S., Lu A., Ley D., El-Gazzar M. 2018. Core genome multilocus sequence typing: a standardized approach for molecular typing of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Clinical Microbiology* **56**: 01145-17.

Goto K., Yamamoto M., Asahara M., Tamura T., Matsumura M., Hayashimoto N., Makimura K. 2012. Rapid identification of *Mycoplasma pulmonis* isolated from laboratory mice and rats using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Veterinary Medical Science* **74**:1083–1086.

Guo Y., Zhu H., Wang J., Huang J., Khan F. A., Zhang J., Chen X. 2017. TrmFO, a fibronectin-binding adhesin of *Mycoplasma bovis*. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: pii:E1732.

Haapala V., Pohiányirta T., Vähänikkilä N., Halkilahti J., Simonen H., Pelkonen S., Soveri T., Simojoki H., Autio T. 2018. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Veterinary Microbiology* **216**: 60-66.

Hale H.H., Helmboldt C.F., Plastringe W.N., Stula E.F. 1962. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinarian* **52**: 582-591.

Hermeyer K., Peters M., Brugmann M., Jacobsen B., Hewicker-Trautwein M. 2012. Demonstration of *Mycoplasma bovis* by immunohistochemistry and in situ hybridization in an aborted bovine fetus and neonatal calf. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **24**: 364-369.

Higgins P.G., Prior K., Harmsen D., Seifert H. 2017. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. PLoS One **12**: e0179228.

Hotzel H., Heller M., Sachse K. 1999. Enhancement of *Mycoplasma bovis* detection in milk samples by antigen capture prior to PCR. Molecular and Cellular Probes **13**: 175–178.

Jaenich S. 2017. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) von *Mycoplasma bovis*-Isolaten. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien. (Diplomarbeit)

Jasper D.E., Al-Aubaidi J.M., Fabricant J. 1974. Epidemiologic observations on mycoplasma mastitis. Cornell Veterinarian **64**: 407–415.

Jasper D.E. 1979. Bovine mycoplasmal mastitis. Journal of the American Veterinary Medical Association **175**:1072–1074.

Khan L.A., Miles R.J., Nicholas R.A.J. 2005. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of *in vitro* passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂. Veterinary Research Communications **29**: 181-188.

Kohl T.A., Diel R., Harmsen D., Rothganger J., Walter K.M., Merker M., Weniger T., Niemann S. 2014. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *Journal of Clinical Microbiology* **52**: 2479–2486.

Kusiluka L.J., Ojeniyi B. & Friis N.F. 2000. Genetic variations among *Mycoplasma bovis* strains isolated from Danish cattle. *FEMS Microbiology Letters* **192**: 113–118.

Lerner U., Amram E., Ayling R. D., Mikula I., Gerchman I., Harrus S. 2014. Acquired resistance to the 16-membered macrolides tylosin and tilmicosin by *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology* **168**: 365–371.

Lysnyansky I., Mikula I., Gerchman I., Levisohn S. 2009. Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 4911–4914.

Lysnyansky I., Ayling R. D. 2016. *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Frontiers in Microbiology* **27**: 595.

Lysnyansky I., Freed M., Rosales R. S., Mikula I., Khateb N., Gerchman I., Levisohn S. 2016. An overview of *Mycoplasma bovis* mastitis in Israel (2004-2014). *The Veterinary Journal* **207**: 180–183.

Madoff S., Pixley B., DelGiudice A., Moellering R.C.J.R. 1979. Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. *Journal of Clinical Microbiology* **9**: 709–711.

Maeda T., Shibahara T., Kimura K., Wada Y., Sato K., Imada Y., Ishikawa Y., Kadota K. 2003. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *Journal of Comparative Pathology* **129**: 100–110.

Manso-Silván L., Dupuy V., Lysnyansky I., Ozdemir U. & Thiaucourt F. 2012. Phylogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by multilocus sequencing. *Veterinary Microbiology* **161**: 104-112.

Maunsell F.P., Woolums A.R., Francoz D., Rosenbusch R.F., Step D.L., Wilson D.J., Janzen E.D. 2011. *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **25**: 772-783.

McAuliffe L., Ellis R. J., Miles K., Ayling R. D., Nicholas R. A. J. 2006. Biofilm formation by *Mycoplasma* species and its role in environment persistence and survival. *Microbiology* **152**: 913–922.

McAuliffe L., Kokotovic B., Nicholas R.A.J. 2004. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4556–4565.

Mellmann A., Harmsen D., Cummings C.A., Zentz E.B., Leopold S.R., Rico A., Prior K., Szczepanowski R., Ji Y., Zhang W., McLaughlin S.F., Henkhaus J.K., Leopold B., Bielaszewska M., Prager R., Brzoska P.M., Moore R.L., Guenther S., Rothberg J.M., Karch H. 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One **6**: e22751.

Neumann B., Prior K., Bender J.K., Harmsen D., Klare I., Fuchs S., Bethe A., Zühlke D., Göhler A., Schwarz S., Schaffer K., Riedel K., Wieler L.H., Werner G. 2019. A core genome multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis*. Journal of Clinical Microbiology **57**: 1686-18.

Nicholas R.A.J., Ayling R.D., Stipkovits L.P. 2002. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. Vaccine **20**: 3569–3575.

Nicholas R.A.J., Ayling R.D. 2003. *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. Research in Veterinary Science **74**: 105–112.

Nicholas R.A.J., Ayling R.D. & McAuliffe, L. 2008. Bovine respiratory disease. Mycoplasma Diseases in Ruminants, CAB International, Wallingford, UK: 132-168.

Ongor H., Kalin R., Karahan M., Cetinkaya B., McAuliffe L., Nicholas R.A.J. 2008. Isolation of *Mycoplasma bovis* from broiler chickens in Turkey. *Avian Pathology* **37**: 587–588.

Parker A.M., Sheehy P.A., Hazelton M.S., Bosward K.L., House J.K. 2018. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **32**: 1241–1252.

Pereyre S., Tardy F., Renaudin H., Cauvin E., Del Pra Netto Machado L., Tricot A., Benoit F., Treilles M., Bebear C. 2013. Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 3314–3323.

Perez-Casal J., Prysliak T., Maina T., Suleman M., Jimbo S. 2017. Status of the development of a vaccine against *Mycoplasma bovis*. *Vaccine* **35**: 2902–2907.

Pfützner H., Sachse K. 1996. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Revue Scientifique et Technique* **15**: 1477–1494.

Piccinini R., Gosney F., Snel G.G.M., Luini M.V., Nicholas R.A.J. 2015. Environmental survival of *Mycoplasma bovis* on a white veal farm. *Veterinary Record Case Reports* **3**: e000207.

Pinho L., Thompson G., Rosenbusch R.F. & Carvalheira J. 2012. Genotyping of *Mycoplasma bovis* isolates using multiple locus variable number tandem repeat analysis. *Journal of Microbiological Methods* **88**: 377–385.

Pothmann H., Spersger J., Elmer J., Prunner I., Iwersen M., Klein-Jöbstl D., Drillich M. 2015. Severe *Mycoplasma bovis* outbreak in an Austrian dairy herd. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **27**: 777-783.

Poumarat F., Solsona M., Boldini M. 1994. Genomic, protein and antigenic variability of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology* **40**: 305–321.

Punyapornwithaya V., Fox L.K., Hancock D.D., Gay J.M., Alldredge J.R. 2010. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. *Preventive Veterinary Medicine* **93**:66–70.

Poveda J.B. & Nicholas R.A.J. 1998. Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolism inhibition tests. *Mycoplasma Protocols*: 105-111.

Prysliaik T., van der Merwe J., Perez-Casal J. 2013. Vaccination with recombinant *Mycoplasma bovis* GAPDH results in a strong humoral immune response but does not protect feedlot cattle from an experimental challenge with *M. bovis*. *Microbial Pathogenesis* **55**: 1-8.

Pyle L. E., Corcoran L. N., Cocks B. G., Bergemann A. D., Whitley J. C., Finch L. R. 1988. Pulsed-field electrophoresis indicates larger-than-expected sizes for mycoplasma genomes, *Nucleic Acids Research* **16**: 6015–6025.

Radaelli E., Castiglioni V., Losa M., Benedetti V., Piccinini R., Nicholas R.A.J., Scanziani E., Luini M. 2011. Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a north italian herd. *Research in Veterinary Science* **91**: 251-253.

Register K. B., Thole L., Rosenbush R. F., Minion F. C. 2015. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma bovis* reveals host-specific genotypes in cattle versus bison. *Veterinary Microbiology* **175**: 92-98.

Rosales R.S., Churchward C.P., Schnee C., Sachse K., Lysnyansky I., Catania S., Iob L., Ayling R.D., Nicholas R.A.J. 2015. Global multilocus sequence typing analysis of *Mycoplasma bovis* isolates reveals two main population clusters. *Journal of Clinical Microbiology* **53**: 789-794.

Rosengarten R., Behrens A., Stetefeld A., Heller M., Ahrens M., Sachse K., Yogev D., Kirchhoff H. 1994. Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. *Infection and Immunity* **62**: 5066-5074.

Sachse K., Helbig J. H., Lysnyansky I., Grajetzki C., Müller W., Jacobs E., Yogev D. 2000. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infection and Immunity* **68**: 680–687.

Sato T., Okubo T., Usu M., Higuchi H., Tamura Y. 2013. Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. *Journal of Veterinary Medical Science* **75**: 1063–1065.

Schubert S., Kostrzewa M. 2017. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. *Current Issues in Molecular Biology* **23**: 17-20.

Schubert S., Weig M. 2009. MALDI-TOF-MS-basierte Verfahren zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen. In: Neumeister B., Geiss H. K., Braun R. W., Kimmig P. Hrsg. *Mikrobiologische Diagnostik*. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme Verlagsgruppe, 166-168.

Selbitz H.J., Truyen U., Valentin-Weigand P. 2011. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart: Enke. 319-326.

Soehnen M.K., Kariyawasam S., Lumadue J.A., Pierre T.A., Wolfgang D.R., Jayarao B.M. 2011. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory showing genetic diversity. Journal of Dairy Science **94**: 1893-1899.

Song Z., Li Y., Liu Y., Xin J., Zou X., Sun W. 2012. α -Enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis*. PLoS One **7**: e38836.

Spergser J., Rosengarten R. 2007. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. Veterinary Microbiology **125**: 170–174.

Spergser J, Macher K., Kargl M., Lysnyansky I., Rosengarten R. 2013. Emergence, reemergence, spread and host species crossing of *Mycoplasma bovis* in the Austrian Alps caused by a single endemic strain. Veterinary Microbiology **164**: 299–306.

Spergser J., Hess C., Loncaric I., Ramírez A. S. 2019. MALDI-ToF mass spectrometry is a superior diagnostic tool for the identification and differentiation of mycoplasmas isolated from animals. Journal of Clinical Microbiology **57**: 1-16.

Stanbridge E. 1971. Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriological Reviews* **35**: 206–227.

Sulyok K.M., Kreizinger Z., Fekete L., Jánosi S., Schweitzer N., Turcsányi I., Makrai L., Erdélyi L.K., Gyuranecz M. 2014. Phylogeny of *Mycoplasma bovis* isolates from Hungary based on multi locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Veterinary Research* **10**: 108.

Wang Y., Liu S., Li Y., Wang Q., Shao J., Chen Y., Xin, J. 2016. *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1b production through the NF- κ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. *Developmental and Comparative Immunology* **55**: 111–118.

Wenzel R., Herrmann R. 1989. Cloning of the complete *Mycoplasma pneumoniae* genome. *Nucleic Acids Research* **17**: 7029–7043.

Wise K.S., Calcutt, M.J., Foecking M.F., Roske K., Madupu R., Methe B.A. 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC25523). *Infection and Immunity* **79**: 982-983.

Wilson D. J., Skirpstunas R. T., Trujillo J. D., Cavender K. B., Bagley, C. V., Harding R. L. (2007). Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **230**: 1519–1523.

Wrathall A.E., Ayling R.D., Simmons H.A. 2007. Risks of transmitting mycoplasmas by semen and embryo transfer techniques in cattle, sheep, goats and pigs. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **2**: 1–31.

Zhao G., Zhang H., Chen X., Zhu X., Guo Y., He C., Guo, A. 2017. *Mycoplasma bovis* NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O₂ reducing enzyme and an adhesin. *Scientific Reports* **7**: 44.

Zhang R., Han X., Chen Y., Mustafa R., Qi J., Chen X., Hu C., Chen H., Guo A. 2014. Attenuated *Mycoplasma bovis* strains provide protection against virulent infection in calves. *Vaccine* **32**: 3107–3114.

Zou X., Li Y., Wang Y., Zhou Y., Liu Y. 2013. Molecular cloning and characterization of a surface-localized adhesion protein in *Mycoplasma bovis* hubei-1 strain. *Plos One* **8**: e69644.

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Tabelle 1: Bezeichnung und Herkunft der untersuchten *M. bovis*-Stämme (geographische Herkunft, Isolierungsjahr, Habitat).
- Tabelle 2: Analysierte Haushaltsgene, eingesetzte Primersequenzen und generierte Amplikonlängen bei der MLST von *M. bovis*-Isolaten.
- Tabelle 3: Bestimmung von Allel-Nummern und Sequenztypen mittels MLST nach Register et al. (2015).
- Tabelle 4: Ergebnisse der *tufA*-Sequenzierung nach Rosales et al. (2015).
- Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum mit Clusterformation berechnet aus den verknüpften Haushaltsgenen *gpsA*, *tdk*, *gyrB*, *gltX*, *adh-1*, *tkl*, *pta-2* (Register et al. 2015) und *tufA* (Rosales et al., 2015).
- Abbildung 2: MALDI-ToF-Spektren-Distanz-Dendrogramm.