

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Mikrobiologie

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dipl. Ing. agr. Monika Ehling-Schulz)

**Multi-Lokus Sequenztypisierung von invasiven und nicht-invasiven  
*Mycoplasma hyorhinis*-Isolaten aus Lungen, den Gelenken und von  
serösen Häuten erkrankter Schweine**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Magdalena Posch

Wien, im August 2022

**Betreuer:**

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

Institut für Mikrobiologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität  
Wien

**Die vorgelegte Diplomarbeit wurde als Teilergebnis in folgender Publikation veröffentlicht:**

Bünger, M., Posch, M., Wiesauer, J., Loncaric, I., Cabal Rosel, A., Ruppitsch, W., Ladinig, A., Spargser, J. 2021. A core genome multilocus sequence typing scheme for *Mycoplasma hyorhinis*. Veterinary Microbiology 262:109249.

## Inhaltsverzeichnis

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung.....                           | 1  |
| 1.1. Allgemeine Eigenschaften.....           | 1  |
| 1.2. Epidemiologie und Pathogenese.....      | 3  |
| 1.3. Klinik .....                            | 3  |
| 1.4. Diagnostik .....                        | 5  |
| 1.5. Therapie und Prophylaxe .....           | 5  |
| 1.6. Molekulare Infektionsepidemiologie..... | 6  |
| 2. Originalpublikation .....                 | 8  |
| 3. Ergebnisse und Diskussion.....            | 18 |
| 4. Zusammenfassung .....                     | 20 |
| 5. Summary .....                             | 21 |
| Literaturverzeichnis.....                    | 22 |

## 1. Einleitung

*Mycoplasma (M.) hyorhinis* ist ein Bakterium, welches verbreitet in den Schleimhäuten der oberen Atemwege von Schweinen vorkommt. Nach Infektion der Lunge kann sich der Erreger hämatogen in die serösen Häute der großen Körperhöhlen und in die Gelenke ausbreiten und dabei Serositis und Arthritis hervorrufen. In der Regel treten Infektionen mit *M. hyorhinis* bei Ferkeln im Alter von drei bis zehn Wochen auf, die zu Fieber, Dyspnoe und Lahmheiten führen können. Die Pathogenese der Erkrankung und zugrundeliegenden Mechanismen, die zur systemischen Ausbreitung des Erregers führen, sind derzeit unbekannt. Aufgrund fehlender kommerzieller Impfstoffe gegen *M. hyorhinis* im europäischen Raum, erweist sich die Eindämmung von Infektionen in betroffenen Betrieben in der Regel als problematisch. Zu den üblichen Bekämpfungs- und Kontrollstrategien zählen die oft mäßig erfolgreiche Antibiotikatherapie sowie vorbeugende Maßnahmen, die darauf abzielen, die Verbreitung des Erregers einzudämmen und Infektionsketten zu unterbrechen. Hierfür sind jedoch Kenntnisse über die Epidemiologie der *M. hyorhinis*-Infektion als auch über mögliche Erreger-Subtypen, welche bevorzugt die Schleimhautbarriere überwinden und sich im Wirt systemisch ausbreiten können, erforderlich. Ziel dieser Arbeit ist es daher, das Differenzierungspotential von zwei konventionellen Multi-Lokus-Sequenztypisierungsverfahren (MLST) zur Unterscheidung von invasiven und präsumtiv nicht-invasiven *M. hyorhinis*-Isolaten zu bestimmen und die Ergebnisse mit jenen eines neuetablierten Kerngenom-MLST-Schemas zu vergleichen.

### 1.1. Allgemeine Eigenschaften

Der Erreger *M. hyorhinis* gehört taxonomisch zur Ordnung *Mollicutes*, Familie *Mycoplasmataceae* und Gattung *Mycoplasma* (Skerman et al. 1980). Alle Vertreter der *Mollicutes* (im allgemeinen als ‚Mykoplasmen‘ bezeichnet) zeichnen sich durch das Fehlen einer Zellwand aus, wodurch sie problemlos bakteriendichte Filter passieren können und deshalb als Kontaminanten von Zellkulturen gefürchtet werden (Tang et al. 2000, Drexler und Uphoff 2002). Mit einer Genomgröße von 580-1350 kb und einem Durchmesser von etwa 0,2 bis 0,8 µm (Razin et al. 1998), gehören sie zu den kleinsten Vertretern der sich autonom vermehrenden Bakterien (Pieters und Maes 2019). Aufgrund ihres reduzierten Genoms sind Mykoplasmen in ihrer Biosyntheseleistung stark eingeschränkt und dadurch erheblich von

exogener Nährstoffzufuhr (Wirt, Kulturmedium) abhängig. Mykoplasmen benötigen daher für die Kultur komplexe und reichhaltige Medien.

*M. hyorhinis* zeichnet sich, im Vergleich zu anderen porcinen Mykoplasmen-Arten, durch ein sehr viel schnelleres Wachstum aus. Die Kultivierung auf Nährmedien dauert in der Regel drei bis fünf Tage. Nach dieser Zeitspanne lassen sich charakteristische spiegeleiförmige Kolonien beobachten, die einen Durchmesser von 0,2 bis 1 mm aufweisen (Palzer et al. 2020). Da die einzelnen Kolonien meist zu klein sind, um sie mit freiem Auge zu erkennen, wird zur genaueren Betrachtung ein Stereomikroskop verwendet. Zudem besitzt *M. hyorhinis* die Fähigkeit nicht nur Glukose, sondern im Vergleich zu anderen porcinen Mykoplasmen-Arten, auch ein größeres Spektrum an verschiedenen Kohlenhydraten zu verstoffwechseln (Siqueira et al. 2013, Ferrarini et al. 2016). Die Fermentation von Glukose hat schließlich zur Folge, dass sich das verwendete Kulturmedium ansäuert, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt (Palzer et al. 2020) und daher ein Kultivierungserfolg schnell sichtbar wird.

Bislang wurden vier geschlossene Vollgenomsequenzen von porcinen *M. hyorhinis*-Stämmen veröffentlicht und/oder in der NCBI Genomdatenbank hinterlegt, und zwar vom Typstamm BTS-7<sup>T</sup> (Nasenisolat, USA, CP064323), dem Arthritis-auslösende Stamm SK76 (USA, CP003914) (Goodison et al. 2013) und die aus Schweinelungen stammenden Stämme HUB-1 (China, CP002170) (Liu et al. 2010) und JF5820 (Schweiz, CP035041). Die veröffentlichten Genome weisen eine Größe von etwa 840-850 kb auf und bestehen aus einem einzelnen zirkulären Chromosom mit einem C+G Gehalt von 25,9 % (Palzer et al. 2020).

Die Virulenzfaktoren und Pathogenitätsmechanismen von *M. hyorhinis* sind noch weitgehend unbekannt (Palzer et al. 2020). Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese könnten jedoch variablen Oberflächenproteine (Vlp; kurz für *variable surface lipoproteins*) spielen, welche eine hohe Anzahl von Phasen- und Größenvariationen aufweisen (Rosengarten und Wise 1991). Derzeit umfasst die Proteinfamilie der Vlp's sieben bekannte oberflächenassoziierte Lipoproteine (VlpA, VlpB, VlpC, VlpD, VlpE, VlpF und VlpG) (Citti et al. 2000). Die phasenvariable Expression jedes Vlp-Gens wird durch Mutationen in der Promotorregion kontrolliert, während die Größenvariation auf Insertionen/Deletionen in der sequenzdivergenten repetitiven C-terminalen Region jedes Vlp-Gens beruht (Yogev et al. 1995; Citti et al. 2000). Diese Veränderungen in der antigenen Zusammensetzung von oberflächenassoziierten Vlp's könnten die Kolonisierung und Anheftung von *M. hyorhinis* an Wirtszellen verbessern (Xiong et al. 2016a, b) und zur Immunevasion im Wirt beitragen (Citti

et al. 1997). Daneben konnte in einer Studie aufgezeigt werden, dass *M. hyorhinis* bei der Verstoffwechselung von Glycerin in Dihydroxyacetonphosphat Wasserstoffperoxid erzeugen kann, welches möglicherweise im Wirt zytotoxische Wirkung aufweisen könnte (Ferrarini et al. 2016).

## **1.2. Epidemiologie und Pathogenese**

*M. hyorhinis* ist ein beim Schwein sehr häufig vorkommender Mikroorganismus, der vor allem bei Absetzferkeln zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen kann. Die Ferkel infizieren sich häufig kurz nach der Geburt (Friis und Feenstra 1994), dennoch treten die klinischen Symptome erst ab einem Lebensalter von drei Wochen auf. Zu dieser Lebensperiode findet bei den meisten Betrieben das Absetzen und die Zusammenführung der Ferkel oftmals aus verschiedenen Betrieben statt. Da in dieser Zeitspanne ein höherer Keimdruck herrscht und das Immunsystem der Absetzferkel schwächer ist, steigt die Infektionsrate drastisch (Clavijo et al. 2017, Luehrs et al. 2017, Roos et al. 2019).

*M. hyorhinis* kommt als Kommensale in den Schleimhäuten der oberen Atemwege und in den Tonsillen vor. Eine absteigende Ausbreitung und Infektion der Lunge ist ohne weiteres möglich (Friis und Feenstra 1994). Es wird angenommen, dass nach absteigender Ausbreitung der Erreger vorwiegend das Epithel der unteren Atemwege besiedelt und es dort zu Schädigungen der Zilien und zu einer Ausdünnung der Epithelschicht kommt (Lee et al. 2016).

Nach Durchdringen der Schleimhautbarriere und hämatogenen Ausbreitung, besiedelt *M. hyorhinis* vor allem die serösen Häute der großen Körperhöhlen und die Gelenke. Die genauen Mechanismen, die zu dieser systemischen Ausbreitung führen, sind bislang nicht bekannt (Pieters und Maes 2019).

## **1.3. Klinik**

Die ersten klinischen Symptome treten üblicherweise in einem Alter von drei bis zehn Wochen auf (Heinritzi 2006). Zu den ersten Anzeichen zählen häufig ein gesträubtes Borstenkleid, ein

vermindertes Allgemeinverhalten, eine reduzierte Futteraufnahme sowie dezente und wiederkehrende Temperaturerhöhungen (Lahrman und Plonait 2001).

Wie bereits angeführt siedeln sich diese Bakterien an den serösen Häuten im Bereich der großen Körperhöhlen an. Dort verursachen sie eine Polyserositis (Pleuritis, Perikarditis, Peritonitis), welche zu respiratorischen Symptomen führen kann. Häufig wird *M. hyorhinis* auch mit charakteristischen Lungenläsionen in Verbindung gebracht. Diese ähneln zwar der durch *M. hyopneumoniae* verursachten Enzootischen Pneumonie (Stemke et al. 1992), allerdings wird die Relevanz von *M. hyorhinis* bei der Entstehung von Lungenerkrankungen kontrovers diskutiert. *M. hyorhinis* gilt nachweislich als Sekundärerreger des *Porcine Respiratory Disease Complex* (PRDC) (Lee et al. 2016, Fourour et al. 2019), ebenso wird dem Erreger ein Zusammenwirken mit dem Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom-Virus (PRRSV) sowie dem Porzinen Circovirus Typ 2 (PCV-2) zugeschrieben. Dabei kann es zu einer erheblichen Verschlechterung des bereits pathologisch veränderten Lungengewebes kommen (Chen et al. 2016, Lee et al. 2016).

Ein weiteres charakteristisches Symptom ist die ausgeprägte Gelenkschwellung, welche im Zuge einer Synovialitis und vermehrten Gelenksfüllung zustande kommt und selten zu einer Kapselfibrose oder einer Veränderung der Gelenkflächen führen kann (Heinritzi 2006). Abrupt auftretende Lahmheiten sind daher ein typisches Krankheitsbild. Diese können nach drei bis zehn Tagen wieder zurückgehen. Wenn dies jedoch nicht der Fall ist, können sich die Bewegungsstörungen drastisch verschlimmern (Selbitz 2015) und bis zu zwei Monate anhalten (Lahrman und Plonait 2001). Die pathologische Grundlage dieser Symptome sind eine serofibrinöse bis fibrinopurulente Arthritis und Polyserositis (Palzer et al. 2020).

Durch die schmerzhaft Peritonitis und Pleuritis sind betroffenen Schweine, vor allem im Bereich des Abdomens, besonders berührungsempfindlich, wodurch diese häufig in einer bevorzugten Brustlage und entlastenden Streckbewegungen beobachtet werden können (Lahrman und Plonait 2001). Zudem werden auch immer wieder Rhinitiden durch *M. hyorhinis* beobachtet. Diese klinische Symptomatik zeigt sich jedoch in einem geringeren Ausmaß, da sie zumeist nur bei jungen Saugferkeln auftritt (Reiner 2015).

Zusätzlich lässt sich vermuten, dass ebenso Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem auftreten können, welche sich in Form einer Meningitis äußern (Bünger et al. 2020). In vereinzelten Fällen führen Meningitissymptome und Arthritis im Alantookzipitalgelenk zu einer *Otitis interna* ähnlichen Kopf-Schiefhaltung (Lahrman und Plonait 2001). Die meisten

Schweine leiden unter den bereits angeführten Krankheitssymptomen, jedoch werden immer wieder auch Erkrankungen wie *Otitis media* (Morita et al. 1995), Aborte (Shin et al. 2003) und Konjunktivitis (Resende et al. 2019) infolge einer Infektion mit *M. hyorhinis* beobachtet.

#### 1.4. Diagnostik

Die Verdachtsdiagnose wird anhand der Anamnese und der klinischen Symptome gestellt. Abgesehen vom klinischen Erscheinungsbild der betroffenen Schweine, ist die Untersuchung der Synovia, welche durch eine Gelenkspunktion gewonnen wird, und von Serosentupferproben (Lahrmann und Plonait 2001), wesentlich für die endgültige Diagnosestellung (Heinritzi 2006). Für die Probenentnahme werden bevorzugt akut betroffene Tiere in einem Alter unter zehn Wochen, ohne vorhergehende antibiotische Behandlung herangezogen (Palzer et al. 2006, Gomes Neto et al. 2012). Chronisch erkrankte Schweine sollten nicht beprobt werden, da sich *M. hyorhinis* durch die häufig auftretenden Sekundärinfektionen schwer nachweisen lässt (Palzer et al. 2020). Die entnommene Gelenksflüssigkeit und Serosentupfer können mithilfe der PCR auf *M. hyorhinis* DNA untersucht werden, was in der Routine mittlerweile das Standardverfahren darstellt.

Die Kultivierung von *M. hyorhinis* gestaltet sich vergleichsweise zeitintensiver wie auch teurer und wird daher üblicherweise nicht in der Routinediagnostik angewandt (Palzer et al. 2020).

#### 1.5. Therapie und Prophylaxe

Im Allgemeinen werden Mykoplasmeninfektionen mit Antibiotika behandelt, jedoch weisen die Erreger aufgrund ihrer Zellwandlosigkeit eine intrinsische Resistenz gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika auf (Heinritzi 2006). Trotz der immer häufiger bei Absetzferkeln auftretenden Mykoplasmen-Polyserositis und -Polyarthritits wurde bislang noch keine geeignete Therapie gefunden, die zu einem gänzlich zufriedenstellenden Ergebnis führt. Auch die Therapie mit den beiden Antibiotika Lincomycin und Tylosin, welche in einer *in vitro* Studie gemäß Empfindlichkeitstestung die beste Wirkung aufwiesen, erzielten *in vivo* nicht immer den gewünschten Effekt (Lahrmann und Plonait 2001). Außerdem zeigt *M. hyorhinis* zunehmend Resistenzen gegenüber Antibiotika, die üblicherweise in der Schweinemedizin zur Behandlung

von Mykoplasmeninfektionen eingesetzt werden, wodurch die Therapie der *M. hyorhinis*-assoziierten Polyserositis und Polyarthrits weiterhin erschwert wird (Bekö et al. 2019).

Durch den mäßigen Therapieerfolg ist die Prophylaxe umso wichtiger. Dabei muss grundsätzlich darauf geachtet werden, dass die allgemeinen Management- und Hygienemaßnahmen, wie etwa die fachgerechte Stallreinigung und -desinfektion sowie die Minimierung von Stress, beispielsweise durch die Reduzierung der Belegdichte auf ein tiergerechtes Maximum, eingehalten werden.

Über ein angemessenes Impfprogramm, bezüglich *M. hyorhinis*, wird bereits diskutiert. Bislang wurde von einem inaktivierten Impfstoff berichtet, welcher durch *M. hyorhinis* ausgelöste Symptome, wie Polyserositis und Arthritis, verhindern soll (Martinson et al. 2018). Zusätzlich soll ein weiterer inaktivierter Impfstoff eine deutliche Reduktion von Läsionen in der Lunge und Trachea zeigen (Lee et al. 2018). Zudem werden in der Praxis auch häufig stallspezifische Vakzine verwendet. Experten und Expertinnen vermuten jedoch, dass noch einiges an Forschung notwendig sein wird, um einen Impfstoff gegen diesen Erreger zu entwickeln, welcher die systemische Ausbreitung und Infektion von serösen Häuten und Gelenke verhindert (Lee et al. 2018).

## 1.6. Molekulare Infektionsepidemiologie

Seit geraumer Zeit werden sequenzbasierte Genotypisierungsverfahren zur Überwachung von Mykoplasmeninfektionen sowie zur Identifizierung von Infektionsquellen, Infektionsketten und Übertragungswegen eingesetzt. Dazu gehören unter anderem die Multi-Lokus-Sequenztypisierung (MLST) (Mayor et al. 2008, Manso-Silván et al. 2012), die Multi-Lokus Variable-Number of Tandem Repeat-Analyse (MLVA) (Nathues et al. 2011, Dos Santos et al. 2015), die Single-Nucleotide-Variant (SNV)-Analyse (Kinnear et al. 2021) und die Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP)-Analyse (Ghanem und El-Gazzar 2018, Kovács et al. 2020, Yair et al. 2020).

Seit 2014 steht für *M. hyorhinis* ein MLST-Schema basierend auf den Haushaltsgenen *dnaA*, *rpoB*, *gyrB*, *gltX*, *adk* und *gmk*, zur Verfügung (Tocqueville et al. 2014), welches in den darauffolgenden Jahren weiterentwickelt wurde (Trüeb et al. 2016). Zudem wurden weitere MLST-Schemata, wie beispielsweise das MLST-s-Protokoll entwickelt, welches neben zwei

Haushaltsgenen (*pdhB* und *ung*) auch zwei Oberflächenprotein-Gene (*p95* und *mtlD*) beinhaltet (Clavijo et al. 2019), ebenso wie das MLST-Protokoll nach Földi et al. (2020), welches auf den Haushaltsgenen *lepA*, *rpoB*, *rpoC*, *gltX*, *uvrA* und *valS* basiert.

Im Großen und Ganzen eignet sich die konventionelle MLST nur begrenzt zur Unterscheidung zwischen nahverwandten *M. hyorhinis* Stämmen. Im Vergleich dazu hat sich die sogenannte Kerngenom-Multi-Lokus-Sequenztypisierung (cgMLST; kurz für *core genome multilocus sequence typing*) als überlegenes Typisierungsinstrument speziell für epidemiologische Studien erwiesen. Basierend auf den Ergebnissen bereits bestehender cgMLST-Schemata für diverse Mykoplasmenarten, wie *M. gallisepticum*, *M. synoviae* und *M. anserisalpingtonis* (Ghanem und El-Gazzar 2018, Ghanem et al. 2017, Kovács et al. 2020), kann darauf geschlossen werden, dass die cgMLST ebenso genaue, reproduzierbare und übertragbare Resultate liefert und somit zur Ausbruchsuntersuchung von *M. hyorhinis* verwendet werden kann.

## 2. Originalpublikation

Die angewandten Methoden, verwendeten Materialien und die Forschungsergebnisse der vorgelegten Diplomarbeit sind in der Originalpublikation "A core genome multilocus sequence typing scheme for *Mycoplasma hyorhinitis*" angeführt. Der Anteil der eigenen Arbeit an der Publikation bestand aus Kultivierung der beschriebenen Isolate, der DNA-Extraktion, sowie der Durchführung der konventionellen MLST.

Zusammengefasst wurden vorerst ca. 100 µl von den bei -80 °C gelagerten *M. hyorhinitis*-Stämmen (71 Isolate aus Österreich, 2 Isolate aus Deutschland) entnommen und aufgetaut. Anschließend wurden ein bis zwei Tropfen der aufgetauten Stämme auf eine SP4-Agarplatte pipettiert, mit einer Öse ausgestrichen und für bis zu sieben Tage bei 37 °C bebrütet. Danach wurden Einzelkolonien unter Verwendung einer sterilen Glaspipette ausgestochen und in SP4-Flüssigmedium überführt, welches bei 37 °C für sieben Tage bebrütet wurde.

Die DNA-Extraktion wurde mit Hilfe des MagAttract® HMW DNA-Extraktionskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anwendungsprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Zur Analyse der *M. hyorhinitis* Stämme mittels konventioneller MLST wurden zwei bereits veröffentlichte MLST-Schemata herangezogen, welche in der Studie zur weiteren Unterscheidung MLSTa (Tocqueville et al. 2014, Trüeb et al. 2016) und MLSTb (Földi et al. 2020) genannt wurden. Dabei wurden Genfragmente der Haushaltsgene *dnaA*, *rpoB*, *gyrB*, *gltX*, *adk* und *gmk* (Trüeb et al. 2016) mittels PCR amplifiziert und die Sequenzfolgen durch Sanger-Sequenzierung bestimmt, während die Genfragmente der Haushaltsgene *lepA*, *rpoB*, *rpoC*, *gltX*, *uvrA* und *valS* (Földi et al. 2020) aus Ganzgenomsequenzen (siehe Originalpublikation) extrahiert wurden. Die daraus resultierenden Allel-Sequenzen wurden schließlich mit veröffentlichten Datensätzen verglichen und bestehenden Allel-Nummern bzw. Sequenztypen zugeordnet. Konnten die ermittelten Sequenzfolgen keiner Allel-Nummer zugeordnet werden, wurde eine neue Allel- und Sequenztyp-Nummer bestimmt. Die Trennschärfe der konventionellen MLST-Schemata wurde anhand des Simpson's Index of Diversity (ID) (Hunter und Gaston 1988) unter Einsatz des Online-Tool Comparing Partitions (<http://www.comparingpartitions.info/>) ermittelt und verglichen. Zudem wurde zur Darstellung von Übereinstimmungen zwischen cgMLST, MLSTa und MLSTb der Adjusted-Rand-Koeffizient mithilfe des Comparing Partitions-Tools bestimmt.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## A core genome multilocus sequence typing scheme for *Mycoplasma hyorhinis*

Moritz Büniger<sup>a,b</sup>, Magdalena Posch<sup>a</sup>, Julia Wiesauer<sup>a</sup>, Igor Lončarić<sup>a</sup>, Adriana Cabal Rosel<sup>c</sup>, Werner Ruppitsch<sup>c</sup>, Andrea Ladinig<sup>b</sup>, Joachim Spargser<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Veterinary Medicine Vienna, Institute of Microbiology, Veterinärplatz 1, 1210, Vienna, Austria

<sup>b</sup> University of Veterinary Medicine Vienna, University Clinic for Swine, Veterinärplatz 1, 1210, Vienna, Austria

<sup>c</sup> Austrian Agency for Health and Food Safety, Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Währinger Straße 25A, 1096, Vienna, Austria

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

cgMLST  
Epidemiology  
*Mycoplasma hyorhinis*  
Swine

### ABSTRACT

*Mycoplasma (M.) hyorhinis* is a commensal and pathobiont residing in the upper respiratory tract in swine and with the ability to spread systemically, mainly causing polyserositis and polyarthritis in nursery pigs. Since little is known on the epidemiology of *M. hyorhinis* infection, whole genome sequences of 73 strains isolated from pigs in Austria (n = 71) and Germany (n = 2), that have been isolated from clinically affected pigs during routine diagnostics, and publicly available genomes of eight *M. hyorhinis* strains were analyzed in the presented study. For this purpose, a core genome multi locus sequence typing (cgMLST) scheme encompassing 453 target genes was developed using the Ridom® SeqSphere + software. Results were compared to two previously described conventional MLST schemes and to a core genome single nucleotide polymorphism (cgSNP) analysis approach. Core genome MLST showed high diversity among the *M. hyorhinis* strains studied and while certain isolates from one farm or a single animal formed cgMLST clusters ( $\leq 8$  allele differences), no isolates with identical allele profiles were identified. In addition, cgMLST had superior discriminatory power (Simpson's ID = 0.995) over conventional MLST (Simpson's ID = 0.952 and 0.985), while demonstrating a lack of congruence between conventional MLST and genome-wide relationship. Core genome SNP results were highly congruent with cgMLST results but lacked in resolution when comparing closely related isolates. Thus, cgMLST is the most suitable method for epidemiological investigations such as outbreak analysis, and to gain insights into *M. hyorhinis* population structure.

### 1. Introduction

*Mycoplasma (M.) hyorhinis* is a ubiquitously occurring commensal and pathobiont in swine that resides in the upper airways (Friis and Feenstra, 1994; Kobisch and Friis, 1996; Rovira, 2009). *M. hyorhinis* colonizes the respiratory epithelium, where it is suspected to damage the cilia and reduce epithelial thickness, which may favor systemic spread (Lee et al., 2016), although mechanisms underlying systemic infection are only poorly understood (Pieters and Maes, 2019). *M. hyorhinis* commonly causes polyserositis and polyarthritis in piglets ranging from 3 to 10 weeks of age, while older piglets most often only develop mild arthritis (Friis and Feenstra, 1994; Kobisch and Friis, 1996; Rovira, 2009). *M. hyorhinis* has also been shown to be an important factor in the

Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) where it acts as a secondary pathogen (Lee et al., 2016) but is also capable of inducing lung lesions after experimental infection (Lin et al., 2006; Lee et al., 2018). Other clinical manifestations such as otitis and eustachitis (Morita et al., 1995, 1999), abortion (Shin et al., 2003), conjunctivitis (Resende et al., 2019) and meningitis (Büniger et al., 2020) have also been reported in conjunction with *M. hyorhinis* infection. However, the role and importance of *M. hyorhinis* in the pathogenesis of these diseases remain uncertain until further investigated.

In general, *M. hyorhinis* infection is difficult to control and to eliminate from affected farms. Since no commercial vaccines against *M. hyorhinis* are currently available in Europe, control of infection relies on antibiotic treatment and/or measures preventing further spread of

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [moritz.buenger@vetmeduni.ac.at](mailto:moritz.buenger@vetmeduni.ac.at) (M. Büniger), [1607150@students.vetmeduni.ac.at](mailto:1607150@students.vetmeduni.ac.at) (M. Posch), [1208052@students.vetmeduni.ac.at](mailto:1208052@students.vetmeduni.ac.at) (J. Wiesauer), [igor.loncaric@vetmeduni.ac.at](mailto:igor.loncaric@vetmeduni.ac.at) (I. Lončarić), [adriana.cabal-rosel@ages.at](mailto:adriana.cabal-rosel@ages.at) (A. Cabal Rosel), [werner.ruppitsch@ages.at](mailto:werner.ruppitsch@ages.at) (W. Ruppitsch), [andrea.ladinig@vetmeduni.ac.at](mailto:andrea.ladinig@vetmeduni.ac.at) (A. Ladinig), [joachim.spargser@vetmeduni.ac.at](mailto:joachim.spargser@vetmeduni.ac.at) (J. Spargser).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109249>

Received 6 June 2021; Accepted 30 September 2021

Available online 5 October 2021

0378-1135/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

the pathogen and interrupting infection chains. For monitoring *Mycoplasma* infections, and to identify infection sources and modes of transmission, sequence-based genotyping methods such as multilocus sequence typing (MLST) (Mayor et al., 2008; Manso-Silván et al., 2012), multiple locus variable number of tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) (Nathues et al., 2011; Dos Santos et al., 2015), single nucleotide variant (SNV) analysis (Kinnear et al., 2021) and single nucleotide polymorphism (SNP) analysis (Ghanem and El-Gazzar, 2018; Kovács et al., 2020; Yair et al., 2020) have been described. The first MLST protocol for *M. hyorhinis* was developed by Tocqueville et al. (2014) based on the housekeeping genes *dnaA*, *rpoB*, *gyrB*, *glx*, *adk* and *gmk*, which had a higher power of discrimination than gene sequencing of the high-affinity transport system protein p37. This protocol was enhanced and simplified by Trüeb et al. (2016), by designing new primers for the six MLST genes allowing amplification and sequencing with one protocol. Clavijo et al. (2019) designed a MLST-s protocol that included two genes encoding surface proteins (*p95*, *mtlD*) next to two housekeeping genes (*pdhB*, *ung*) to further improve discriminatory power (Clavijo et al., 2019). Very recently, Földi et al. (2020) developed a new MLST for *M. hyorhinis* utilizing the housekeeping genes *lepA*, *rpoB*, *rpoC*, *glx*, *uvrA* and *valS* and compared it to the previously described MLST (Tocqueville et al., 2014; Trüeb et al., 2016) and MLST-s (Clavijo et al., 2019), resulting in a higher discriminatory power for the new MLST scheme; nevertheless, the authors recommended combining MLST with MLVA for fine-scale typing of *M. hyorhinis* (Földi et al., 2020). Overall, the resolution of conventional MLST seemed to be rather moderate for the differentiation of closely related *M. hyorhinis* strains in previous studies. In contrast, core genome multi locus sequence typing (cgMLST) based on whole genome sequencing (WGS) data has been proven to be a superior typing tool highly suited for epidemiologic studies including outbreak analyses. Core genome MLST schemes for several microbial pathogens including mycoplasmas like *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. anserisalpiginidis* (Ghanem and El-Gazzar, 2018; Ghanem et al., 2018; Kovács et al., 2020) have been established, providing accurate, reproducible, portable, and comparable typing results, and therefore exhibiting sufficient discriminatory power for outbreak investigations.

Here, we report the development and evaluation of a standardized cgMLST scheme for the accurate typing of *M. hyorhinis* strains by characterizing isolates predominantly recovered from Austrian pig herds and by comparing cgMLST results with those of conventional MLST schemes.

## 2. Material and methods

### 2.1. *Mycoplasma hyorhinis* strains and whole genome sequencing

Whole genome sequences of 81 *M. hyorhinis* strains were analyzed in the study including 71 strains isolated from pigs in Austria, two strains isolated from pigs in Germany, and eight *M. hyorhinis* strains for which finished genomes were publicly available (PG42<sup>T</sup> [IMT49388], SK76, HUB-1, JF5820, GDL-1, DBS1050, MCLD, MDBK-IPV) (Genbank accession numbers provided in Table S1). All Austrian and the two German *M. hyorhinis* strains were obtained from pigs between 2009 and 2020 during routine diagnostic examinations of porcine samples taken from different body sites including the nasal cavity, lungs, serous membranes (serosa), joints (synovia), eyes and the brain. All sampled animals showed clinical disease and/or pathologic lesions associated with *M. hyorhinis* infection (Table S1). All piglets and samples had been referred to the University Clinic for Swine for diagnostic purposes by the owner and herd veterinarian. The two German strains originated from different farms, while the 71 Austrian *M. hyorhinis* isolates originated from a total of 48 pig farms. More than one *M. hyorhinis* strain were derived from 14 farms ( $n = 37$  strains); on 10 of these farms, multiple isolates were derived from one individual pig ( $n = 22$  strains) (Table S1). *M. hyorhinis* strains were cultured and identified to the species level using 16S rRNA gene sequencing (isolates collected before 2016) or by MALDI-TOF mass spectrometry (MS) (isolates from 2016 on) as described previously

(Spergser et al., 2019; Bünger et al., 2020). All isolates were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further investigation.

For WGS, Austrian and German *M. hyorhinis* isolates were thawed and streaked onto SP4 agar plates (Bünger et al., 2020). After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere for up to 7 days, a single colony was picked from each isolate and cultured in 3 mL SP4 medium to the late logarithmic growth phase. Cultures were rechecked for species affiliation using MALDI-TOF MS and DNA was then extracted using MagAttract<sup>®</sup> HMW DNA Kit according to the protocol of the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany). Quantity and quality of extracted DNA were determined by NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (Thermo Scientific, Vienna, Austria). Whole genome sequencing was performed on ready-to-sequence libraries prepared by the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) and the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, USA) was used for paired-end sequencing. Raw reads were quality checked, trimmed, and *de novo* assembled using SPAdes 3.10, with default parameters (Bankevich et al., 2012). Whole genome sequences of all 73 sequenced *M. hyorhinis* strains were deposited at Genbank and are accessible under the accession numbers provided in Table S1.

### 2.2. Core genome MLST

A cgMLST scheme for *M. hyorhinis* was developed using Ridom<sup>®</sup> SeqSphere + version 7.0 (Ridom<sup>®</sup> GmbH, Münster, Germany; <https://www.ridom.de/seqsphere/>) as described previously for two other *Mycoplasma* species (Ghanem and El-Gazzar, 2018; Ghanem et al., 2018). Briefly, the reference genome of *M. hyorhinis* type strain PG42<sup>T</sup> (CP064323) and 20 query genomes were utilized for the development of an *ad hoc* cgMLST scheme. Query genomes were selected based on MLST analysis of 80 *M. hyorhinis* genomes blasted (Altschul et al., 1990) against core genes of the reference genome identified after filtration. Afterwards, a minimum spanning tree (MST) was generated including all the blasted *M. hyorhinis* isolates. Of those, 20 *M. hyorhinis* isolates exhibiting >100 allele differences to their closest relatives and representing the overall diversity of the studied *M. hyorhinis* population (geography, year of isolation, source) were selected to be included as query genomes (Table S1). As first step in cgMLST development, a target gene set appropriate for cgMLST was defined using the cgMLST Target Definer tool of SeqSphere + with default parameters that filtered the reference genome to exclude unfit gene targets. Filters included a homologous gene filter (excluding genes with > 90 % identity and > 100 bp overlap), a start codon filter (excluding genes missing a start codon), a minimum length filter (excluding genes < 50 bp), a stop codon filter (excluding genes devoid of a stop codon, with multiple stop codons, or with a stop codon not located at the end of the gene), and a gene overlap filter (excluding the shorter of two genes that overlap by > 4 bp) (Ghanem and El-Gazzar, 2018; Ghanem et al., 2018). Then the 20 query genomes were blasted pairwise against the reference genome's target gene set to select shared fit targets. All reference genome-filtered genes that were found in all query genomes with a sequence identity of > 90 % and 100 % overlap formed the final targets of the cgMLST scheme. For cgMLST evaluation, the remaining 60 genomes (Table S1) were used to identify the percentage of cgMLST targets present in the *M. hyorhinis* strain cohort (good cgMLST target genes). Finally, all 81 *M. hyorhinis* strains were analyzed by the developed cgMLST scheme to define individual allelic profiles utilized to construct an MST by pairwise ignoring missing values. To determine allelic distances between closely related *M. hyorhinis* strains, isolates recovered from the lung and inner organs of individual pigs were compared and the threshold for clonal cluster definition was set based on the results of the cgMLST MST within individual pigs. Furthermore, a phylogenetic tree was calculated using the neighbor joining (NJ) algorithm implemented in the SeqSphere + software and visualized by applying iTOL (v. 5.7; <https://itol.embl.de/>) (Letunic and Bork, 2019).

### 2.3. Core genome SNP typing

For comparative purposes and to evaluate the resolution of the *M. hyorhinis* cgMLST, a single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis was performed using the Find Nucleotide Variants tool of SeqSphere + with default parameters excluding insertions/deletions and neighboring SNPs located within 300 bp or less to minimize effects of recombination induced polymorphisms. For each *M. hyorhinis* strain, a concatenated sequence of cgMLST target genes was aligned to the reference sequence, and a neighbor-joining phylogenetic tree was generated based on the core genome SNPs after exclusion of target genes that were not found in all 81 *M. hyorhinis* strains.

### 2.4. Conventional MLST

MLST analyses were performed on *M. hyorhinis* strains according to two published MLST schemes, termed here as MLSTa (Tocqueville et al., 2014; Trüeb et al., 2016) and MLSTb (Földi et al., 2020), either by amplifying gene fragments from *dnaA*, *rpoB*, *gyrB*, *gltX*, *adk* and *gmk* (Trüeb et al., 2016) or by analyzing gene fragments from *lepA*, *rpoB*, *rpoC*, *gltX*, *uvrA*, and *valS* (Földi et al., 2020) extracted from WGS. For MLSTa, resulting allele sequences were compared with those published at PubMLST (<https://pubmlst.org/mhyorhinis/>) and field strains were assigned to sequence types (STs) according to their MLST profiles. In case of field strains harboring novel allele sequences, sequences were deposited at the PubMLST database and new STs were defined. For MLSTb, sequences extracted from WGS were compared to entries in the Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>; *lepA*: MT090880-MT090918, *rpoB*: MT090841-MT090879, *rpoC*: MT090802-MT090840, *gltX*: MT090919-MT090957, *uvrA*: MT090763-MT090801, *valS*: MT106126-MT106164). Since all investigated field strains either showed novel allele sequences in at least one of the analyzed house-keeping genes or new allelic profile combinations (STs), an arbitrary number (starting from the already defined allele and ST numbers) was assigned to each new allelic type or allele combination with identical sequences or combinations being assigned the same allele or ST number. Minimum spanning trees (MSTs) based on allelic profiles (STs) obtained from investigated *M. hyorhinis* strains were generated using GrapeTree (Zhou et al., 2017) including profiles available at the PubMLST database (MLSTa) or published by Földi et al. (2020) (MLSTb).

The discriminatory power of cgMLST and conventional MLST schemes were determined and compared based on the Simpson's index of diversity (ID) (Hunter and Gaston, 1988) by applying the online tool Comparing Partitions (<http://www.comparingpartitions.info/>) using default parameters. To assess the overall concordance between cgMLST, MLSTa and MLSTb, Adjusted Rand coefficients (Hubert and Arabie, 1985) also using default parameters were calculated by Comparing Partitions.

## 3. Results

### 3.1. Whole genome sequencing

All 73 *M. hyorhinis* isolates were successfully sequenced using an Illumina MiSeq platform. Resulting raw reads (mean number 375,200) were quality filtered and assembled *de novo* generating assemblies with a mean size of 823.025 Kb (all representing full genomes of *M. hyorhinis*), a mean number of 63.1 contigs (>300 bases), and an average calculated coverage of 40.6. Raw reads and genome assemblies were deposited at GenBank databases (accession numbers are presented in Table S1).

### 3.2. Development and evaluation of the *M. hyorhinis* cgMLST scheme

Based on the *M. hyorhinis* PG42<sup>T</sup> reference genome (CP064323)

containing 708 genes with coding DNA sequences, a reference task template was generated that retained a total of 656 genes after filtering. Using seven finished genomes and WGS of 13 isolates sequenced in our study as query genomes, a cgMLST scheme with 453 target genes (495,930 bases) was defined, covering 59 % of the reference genome sequence. The number of accessory genes was 203 (207,861 bases), representing 25.7 % of the reference genome sequence. Core target genes defined are listed in Table S2. For evaluation purposes, WGS of 60 *M. hyorhinis* isolates were loaded into SeqSphere + and typed according to the 453 cgMLST target scheme. At least 97 % (mean 98.9 % ± 0.92 standard deviation) good cgMLST target genes were found in all WGS used for evaluation. The average number of alleles for 453 targets was 15 alleles (range 2–60 alleles). To determine clonal cluster distances, a subset of 18 isolates recovered from the lung and inner organs of eight pigs was used. The isolates 1366L18, 1366N18, 3051L16 and 3051S16 from the two pigs g and k (Table S1) were excluded from cluster threshold determination as they showed numbers of allele differences that are not expected for a clonal cluster (Fig. 1, Ghanem et al., 2018). The maximum number of allele differences observed among these strains was eight alleles, thus we defined a difference of eight alleles as the threshold for distinct clonal clusters. Based on this threshold, 10 different clonal clusters comprising 18 isolates from eight pigs (eight farms) and five isolates from different animals kept in two farms (farms B and N) were identified (Figs. 1, 2, 3 and Fig. S1).

### 3.3. Typing of *M. hyorhinis* strains using cgMLST

The cgMLST scheme was tested on all 81 strains to investigate the epidemiology of *M. hyorhinis*, to obtain insights into its population structure, and to evaluate the relatedness of the 71 included Austrian strains. Allelic profiles for all strains are listed in Table S2. Overall, results of cgMLST showed a high degree of diversity among epidemiologically unrelated *M. hyorhinis* strains including those isolated in Austria, illustrated by a high number of allele differences between unrelated strains (Fig. 1). Moreover, there was a clear separation between the Austrian and German strain cohort and the eight strains with publicly available genome sequences that originated from different parts of the world (Figs. 2 and 3). On the other hand, epidemiologically related strains grouped together or were even part of a clonal cluster as shown for strains concurrently isolated either from individual pigs (from different body sites) or from different animals in farm A and C–N (Figs. 2 and 3). Even isolates recovered at different time points from animals in farm B, D, F, H, J, K, and N, with time intervals between isolations ranging from three months (farm J, 450L20/450S20 – 450N20) to four years (farm H, 2731S16/2731J16 – 2731N20; farm K, 3051L16/3051S16 – 3051N20) grouped together (Figs. 2 and 3), albeit expressing higher numbers of allele differences (Fig. 1). Although several strains isolated from individual pigs or from different animals per farm were typed into the same clonal cluster, distances between other isolates from individual pigs or from different animals per farm were > 60 different alleles indicating a diverse population of *M. hyorhinis* existing in certain farms (C, G, I, K) or even in individual animals (no. 1366, 3051) (Figs. 1 and 2). Furthermore, four strains (1474S18, 560N15, 3933N18, 87\_4N17) isolated from four different farms clustered close to farm A-, B- or N-related strains (Fig. 2) which could be explained by the fact that corresponding farms were located in the same federal state and in three of the four cases in the same district (Table S1). No further correlation was identified between source, year of isolation, federal state, district, and the distinct clonal clusters defined (Table S1, Fig. 3). Altogether, cgMLST typed the 81 *M. hyorhinis* strains into 68 different STs based on > 8 allele differences (threshold for clonal clusters) resulting in a Simpson's ID of 0.995.

### 3.4. Comparison between cgMLST and cgSNP typing

To evaluate the resolution of the newly defined *M. hyorhinis* cgMLST,

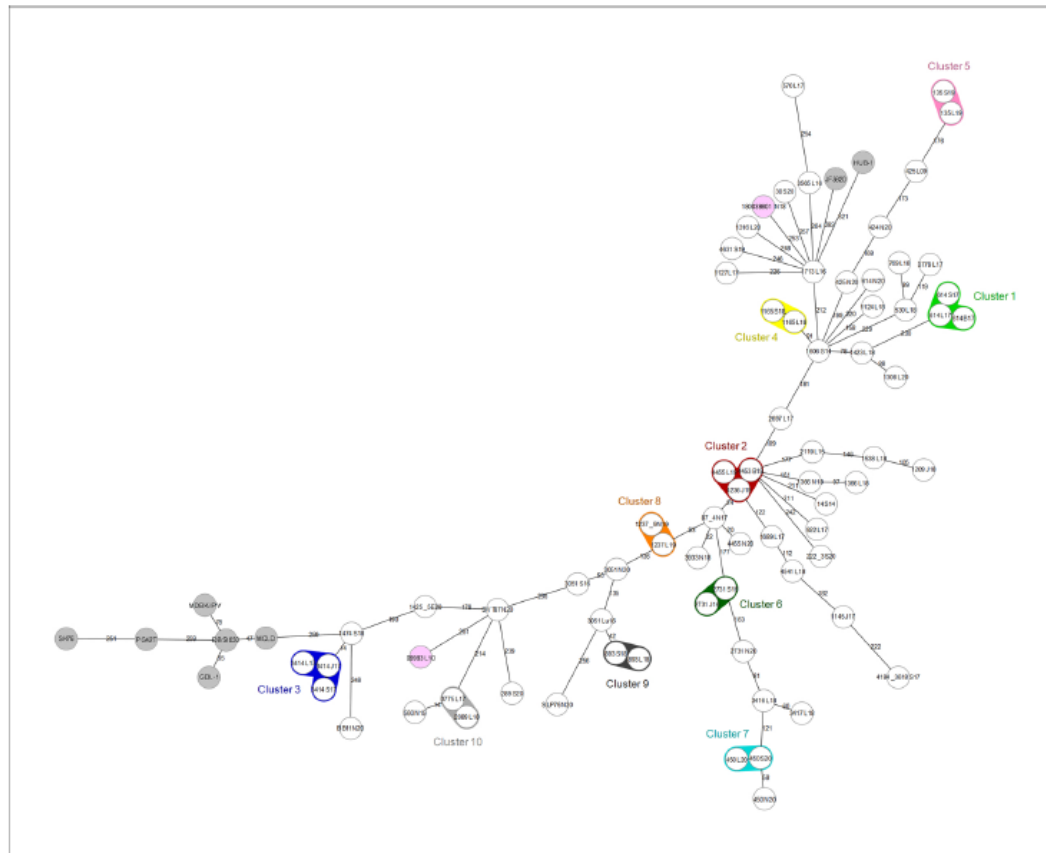


Fig. 1. Minimum spanning tree based on allelic profiles of 453 core genome targets from 81 *M. hyorhinis* strains.

The distance matrix underlying the network was built from all pairwise allelic profile comparisons of 453 cgMLST targets using the pairwise ignoring-missing-values option in SeqSphere+ software. Ten distinct clonal clusters with fewer than 8 allele differences are color coded. Strain origin is indicated by the color of the circles: pink = Germany; grey = publicly available genome, white = Austria. The number on connecting lines illustrates the number of differing alleles in a pairwise comparison.

results obtained were compared with a cgSNP typing approach. Two hundred and eighty-eight cgMLST target genes were present in all 81 strains and therefore included in cgSNP analysis. A total of 3822 filtered SNP positions were identified and considered for tree calculation. The resulting neighbor joining (NJ) tree (Fig. S1) was compared to the NJ tree built from cgMLST profiles of the 81 *M. hyorhinis* strains (Fig. 2). This demonstrated a high degree of congruence between the topologies of closely related strains and concordant clustering according to cgMLST clonal cluster definition with a weaker resolution observed for cgSNP typing. More distantly related strains, however, performed differently with the two typing methods applied.

### 3.5. Typing of *M. hyorhinis* strains using conventional MLST schemes

All 81 *M. hyorhinis* strains were also tested by two previously described MLST schemes, here termed as MLSTa (Tocqueville et al., 2014; Trüeb et al., 2016) and MLSTb (Földi et al., 2020). By applying MLSTa resulting STs were compared with those published in the PubMLST database (231 strains in total, including the 81 *M. hyorhinis* strains) (Fig. S2A). The 81 *M. hyorhinis* strains were typed into 42 STs (Simpson's ID of 0.952) with ST40 being the most prevalent ( $n = 15$ ) followed by ST92 ( $n = 6$ ), ST95, and ST98 (both  $n = 4$ ). By utilizing the recently published MLSTb, the analyzed 81 *M. hyorhinis* strains belonged to 54 different STs (Simpson's ID of 0.985) predominantly assigned to

ST49 ( $n = 5$ ), ST60, ST67, ST73, and ST75 (all  $n = 4$ ). Comparison of resulting STs was limited to *M. hyorhinis* strains from Hungary ( $n = 38$ ) and Slovakia ( $n = 1$ ) which were published by Földi et al. (2020, Fig. S2B), as no MLSTb results for other strains are available to date. When STs obtained from MLSTa and MLSTb were compared to cgMLST results and clonal cluster formation, lower resolution capabilities of both conventional MLST schemes were evident (Fig. 2) and the Adjusted Rand coefficients defining the proportion of congruence between the typing methods used were moderate (0.496 for cgMLST-MLSTb) to extremely low (0.278 for MLSTa-MLSTb, and 0.179 for cgMLST-MLSTa) indicating moderate to very low concordance between the utilized typing methods.

### 4. Discussion

This study describes the first WGS based typing of *M. hyorhinis* that yields high discriminatory power, differentiating 81 strains into 68 cgMLST STs. Comparison with conventional MLST (Fig. 2) confirms the higher discriminatory power of cgMLST over conventional MLST previously described for other *Mycoplasma* species (Ghanem and El-Gazzar, 2018; Kinnear et al., 2021). Additionally, some results of conventional MLSTa also contradict cgMLST data, as isolates typed into STs 40, 80, 92 and 98 each contained groups of isolates that were only distantly related when genome-wide allele calling was performed (Fig. 2). The more

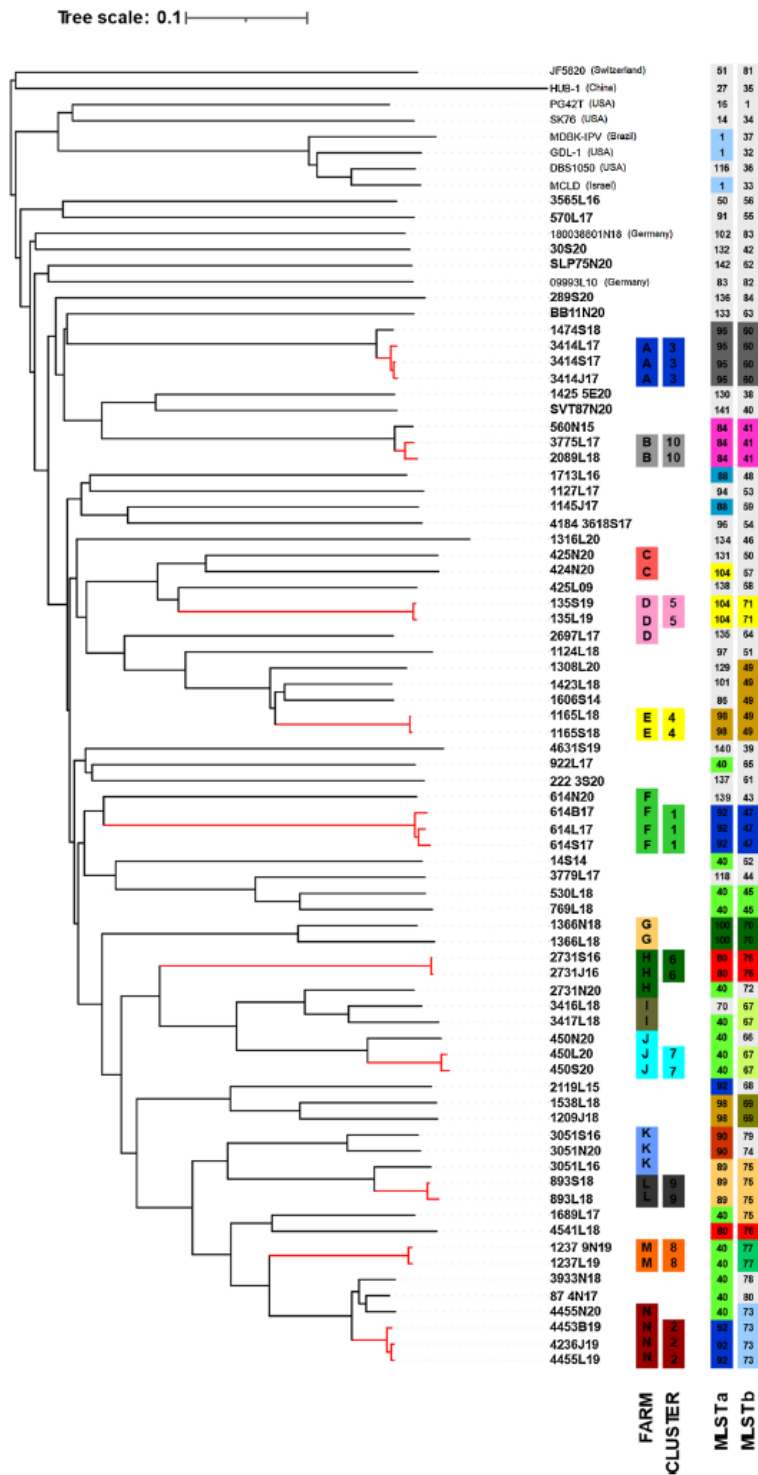


Fig. 2. Phylogenetic tree based on allelic profiles of 453 core genome targets from 81 *M. hyorhinis* strains.

The tree was built using the neighbor-joining algorithm and pairwise ignoring-missing-values option in SeqSphere+. Clades of clonal clusters are highlighted in red. Data on farm, clonal cluster and STs resulting from MLSTa and MLSTb are depicted opposed to the tree. Visualization was realized using iTOL. Origin of strains not from Austria are indicated behind the strain designation.

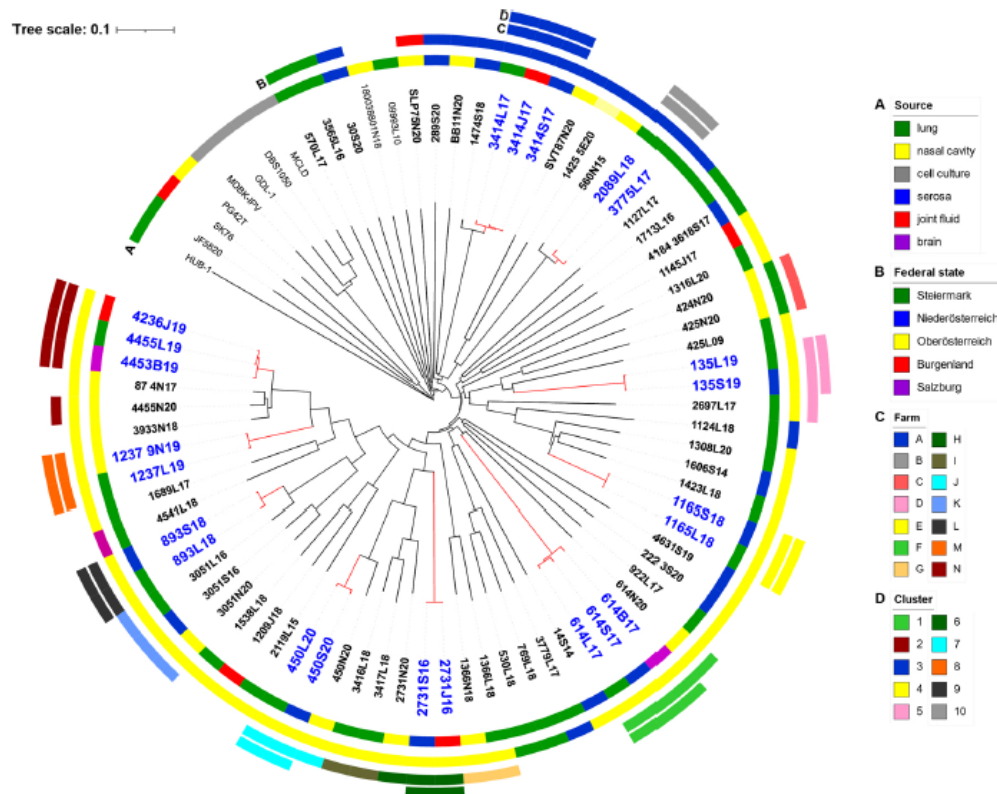


Fig. 3. Neighbor joining phylogenetic tree based on cgMLST analysis of 81 *M. hyorhinis* strains.

cgMLST was calculated with SeqSphere+ (pairwise ignoring-missing-values option). Clades of clonal clusters are colored in red and strains comprising distinct clusters highlighted in blue. Available metadata for source or sample type (A), Austrian federal state (B), farm (C), and clonal cluster (D) are depicted as colored circles. Visualization was realized using iTOL.

recent MLSTb seemed to reflect genome-wide relationship much better (Fig. 2), although the moderate Adjusted Rand coefficients indicate that sequence typing of only few selected housekeeping genes does not always reflect the genomic relationship between isolates correctly, limiting the suitability of conventional MLST protocols for epidemiological studies and outbreak analyses. Higher efforts in both cost and time are the main downsides of cgMLST compared to conventional MLST and MLST-s protocols (Trüeb et al., 2016; Clavijo et al., 2019; Foldi et al., 2020). However, isolation of *M. hyorhinis* is less laborious and time-consuming than for certain other *Mycoplasma* species and next generation sequencing is developing quickly, making WGS faster and more affordable and, therefore, more suitable for epidemiologic investigations. Compliant with previous studies (Ghanem and El-Gazzar, 2018; Ghanem et al., 2018; Kovács et al., 2020), comparison of cgSNP and cgMLST typing results in our study revealed high congruence in topology and concordant clustering (Fig. 2, Fig. S1) of closely related strains with a small advantage for cgMLST in resolution especially for closely related isolates. The latter is due to cgSNP being limited to target genes that are present in all strains, while cgMLST includes all genes that were pairwise compared ignoring missing values.

In the present study, the threshold for clonal clusters was determined at  $\leq 8$  allele differences, which is similar to the cluster typing threshold of  $\leq 10$  allele differences that was previously described for *M. gallisepticum* (Ghanem et al., 2018) and should also account for nucleotide variability within one strain that might occur after repeated passages (Ghanem and El-Gazzar, 2018). Clonal clusters were only formed by isolates from one farm and/or individual pigs. However, this was not

true for all isolates from one farm or pig as some showed distinctly larger allele differences (farms C, G, I, K; Fig. 1,2) indicating diverse *M. hyorhinis* populations within single farms and individual animals that consist of several subpopulations more distantly related to each other. On the other hand, as differences of  $\geq 58$  alleles occurred after only three months on farm J (450S20 – 450N20), another possible explanation for those larger differences is rapid evolution of *M. hyorhinis* strains within one system which has already been shown for *M. gallisepticum* (Delaney et al., 2012). Another finding of note is the relatedness of isolates from farm K, where two isolates taken from the same animal in 2016 (3051L16, 3051S16) were both closer related to a nasal isolate from 2020 (3051N20) than to each other (Fig. 1), supporting the theory of diverse subpopulations that are related but undergo constant and rapid changes. It also suggests populations on single farms being relatively stable over time, which is reinforced by two isolates from farm B that formed a clonal cluster (Fig. 1, Cluster 10) despite the samples being taken six months apart. In general, pig farms in Austria are concentrated in certain regions, resulting in a high number of isolates from these areas in our sample pool, but information about relations in pig flow or pig trade relations were mainly unavailable for this study. At large, the correlation of geographical origin of isolates and their relationship seems to be low for isolates in the present study. These findings are compliant with findings from Kovács et al. (2020) that could not show any correlation between geographical distances and cgMLST results for *M. anserisalpiginidis*, while isolates from the same integration were more closely related, probably due to host movement or contact. Thus, for our study, close relationship between isolates from different farms (Fig. 2

and 3) can most likely be explained by an epidemiological relationship such as a related pig flow. In most cases, isolates from one system were closer related than isolates that presumably were not epidemiologically related, even if the isolates did not form a clonal cluster and/or were collected at different time points. Furthermore, cgMLST was able to differentiate between isolates from individual animals and did not find isolates with identical allele profiles. Thus, this study confirms previous conclusions on cgMLST as a highly suitable tool for epidemiological studies such as outbreak investigations and pathogen tracing of *Mycoplasma* species (Ghanem and El-Gazzar, 2018; Ghanem et al., 2018; Kovács et al., 2020), now including *M. hyorhinis*.

As of our findings, cgMLST does not seem to reflect any aspects of pathogenicity, such as virulence, likelihood of systemic spread or affinity to certain organs, currently precluding the utility of this method for risk-based diagnostics. However, when analyzing *M. pneumoniae* strains, SNP analysis has proven to be superior to MLST while typing non-housekeeping genes (Touati et al., 2015) and has been used to determine macrolide susceptibility (Ji et al., 2014). Further, MLST-s added surface protein encoding genes to improve discriminatory power over the original MLST protocol (Clavijo et al., 2019), so did MLVA when combined with the recently described MLSTb (Földi et al., 2020). It is to be expected, that using the combination of MLSTb and MLVA on the data set of this study would yield a discriminatory power much closer to that of cgMLST. However, as this study was focused on the development of a standalone method that can be operated *in silico* on WGS data, a direct comparison of cgMLST with MLSTb combined with MLVA was not included in this study. In conclusion, adding MLVA, explorative SNP or accessory gene typing on top of the cgMLST scheme might improve the discriminatory power in differentiating closely related *M. hyorhinis* strains even further which might allow drawing conclusions on pathogenicity.

Finally, this study only contains isolates originating from farms with clinical disease which has been the reason for the initiation of diagnostics including *M. hyorhinis* detection. Thus, the isolates analyzed in this study are neither representative for the entire *M. hyorhinis* population in the respective farms, nor do the samples reflect the existing *M. hyorhinis* population in Austria correctly. To improve the understanding of *M. hyorhinis* population structure and epidemiology as well as pathogenesis of infection, analyzing a more representative sample pool that includes commensal isolates from apparently unaffected farms is required, as is documentation of pig flow or other potential pathogen transmission modes. Also, as our findings suggest the possible occurrence of multiple subpopulations of *M. hyorhinis* within a farm, analyzing larger sample sizes from each farm is advisable.

## 5. Conclusion

In summary, the cgMLST scheme developed here demonstrated to be highly discriminatory for the accurate differentiation of *M. hyorhinis* strains, which can be as well used in an outbreak investigation context as a complement to epidemiological data.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

We are grateful to Martina Zimmermann for technical assistance and

to the veterinary practitioners for sending in their diagnostic samples.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109249>.

## References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Bankovich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V. M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotdin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Bünger, M., Brunthaler, R., Unterwiesing, C., Loncaric, I., Dippel, M., Ruczkicka, U., Schwarz, L., Griessler, A., Voglmayr, T., Verhovsek, D., Ladinig, A., Spersger, J., 2020. *Mycoplasma hyorhinis* as a possible cause of fibrinopurulent meningitis in pigs? - a case series. *Porc. Heal. Manag.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00178-8>.
- Clavijo, M.J., Sreevatsan, S., Johnson, T.J., Rovira, A., 2019. Molecular epidemiology of *Mycoplasma hyorhinis* porcine field isolates in the United States. *PLoS One* 14, e0223653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223653>.
- Delaney, N.F., Balenger, S., Bonneaud, C., Marx, C.J., Hill, G.E., Ferguson-Noel, N., Tsai, P., Rodrigo, A., Edwards, S.V., 2012. Ultrafast evolution and loss of CRISPRs following a host shift in a novel wildlife pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS Genet.* 8 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002511>.
- Dos Santos, L.F., Clavijo, M.J., Sreevatsan, S., Rovira, A., Moreira, M.A.S., Pieters, M., 2015. Genotyping of *Mycoplasma hyorhinis* using multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *J. Microbiol. Methods* 111, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2015.02.003>.
- Földi, D., Bekő, K., Felde, O., Kreisinger, Z., Kovács, Á.B., Tóth, F., Bányai, K., Kiss, K., Biksi, I., Gyuranecz, M., 2020. Genotyping *Mycoplasma hyorhinis* by multi-locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Vet. Microbiol.* 249 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108836>.
- Friis, N.F., Feenstra, A.A., 1994. *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. *Acta Vet. Scand.* 35, 93–98. <https://doi.org/10.1111/BF03548359>.
- Ghanem, M., El-Gazzar, M., 2018. Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. *Vet. Microbiol.* 218, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.021>.
- 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*. *J. Clin. Microbiol.* 56, 1–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.01145-17>.
- Hubert, L., Arabie, P., 1985. Comparing partitions. *J. Classif.* 193–218.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>.
- Ji, M., Lee, N.S., Oh, J.M., Jo, J.Y., Choi, E.H., Yoo, S.J., Kim, H.B., Hwang, S.H., Choi, S.H., Lee, S.O., Kim, M.N., Sung, H., 2014. Single-nucleotide polymorphism PCR for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and determination of macrolide resistance in respiratory samples. *J. Microbiol. Methods* 102, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2014.04.009>.
- Kinnear, A., Waldner, M., McAllister, T.A., Zaheer, R., Register, K., Jelinski, M., 2021. Application of four genotyping methods to *Mycoplasma bovis* isolates derived from western Canadian feedlot cattle. *J. Clin. Microbiol.* 59 <https://doi.org/10.1128/jcm.00044-21>.
- Kobisch, M., Friis, N.F., 1996. Swine mycoplasmoses. *OIE Rev. Sci. Tech.* 15, 1569–1605. <https://doi.org/10.20506/rst.15.4.983>.
- Kovács, Á.B., Kreisinger, Z., Forró, B., Gröszner, D., Mitter, A., Marton, S., Bali, K., Sawicka, A., Tomczyk, G., Bányai, K., Gyuranecz, M., Gyuranecz, M., 2020. The core genome multi-locus sequence typing of *Mycoplasma anseris/pingitidis*. *BMC Genomics* 21, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06817-2>.
- Lee, J.A., Oh, Y.R., Hwang, M.A., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Choi, I.S., Lee, S.W., 2016. *Mycoplasma hyorhinis* is a potential pathogen of porcine respiratory disease complex that aggravates pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 177, 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.06.008>.
- Lee, J.A., Hwang, M.A., Han, J.H., Cho, E.H., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Choi, I.S., Lee, S.W., 2018. Reduction of mycoplasmal lesions and clinical signs by vaccination against *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 196, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.12.001>.
- Letunic, I., Bork, P., 2019. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47, 256–259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- Lin, J.H., Chen, S.P., Yeh, K.S., Weng, C.N., 2006. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Vet. Microbiol.* 115, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.004>.
- Manso-Silvén, L., Dupuy, V., Lysnyansky, I., Ozdemir, U., Thiaucourt, F., 2012. Phylogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by

- multilocus sequencing. *Vet. Microbiol.* 161, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.015>.
- Mayor, D., Jores, J., Korczak, B.M., Kuhnert, P., 2008. Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Vet. Microbiol.* 127, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.010>.
- Morita, T., Fukuda, H., Awakura, T., Shimada, A., Umemura, T., Kazama, S., Yagihashi, T., 1995. Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media. *Vet. Pathol.* 32, 107–111. <https://doi.org/10.1177/030098589503200202>.
- Morita, T., Ohiwa, S., Shimada, A., Kazama, S., Yagihashi, T., Umemura, T., 1999. Intranasally inoculated *Mycoplasma hyorhinis* causes eustachitis in pigs. *Vet. Pathol.* 36, 174–178. <https://doi.org/10.1354/vp.36-2-174>.
- Nathues, H., Beilage, Egrosse, Kreienbrock, L., Rosengarten, R., Spersger, J., 2011. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vet. Microbiol.* 152, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.029>.
- Pieters, M., Maes, D., 2019. *Mycoplasmosis. Diseases of Swine*, 12th edition, pp. 863–883.
- Resende, T.P., Pieters, M., Vannucci, F.A., 2019. Swine conjunctivitis outbreaks associated with *Mycoplasma hyorhinis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 31, 766–769. <https://doi.org/10.1177/1040638719865767>.
- Rovira, A., 2009. Review of *Mycoplasma hyorhinis*. *Allen D. Leman Swine Conf.* 87–88.
- Shin, J.H., Joo, H.S., Lee, W.H., Seok, H.B., Calsamig, M., Pijoan, C., Molitor, T.W., 2003. Identification and characterization of cytopathogenic *Mycoplasma hyorhinis* from swine farms with a history of abortions. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 501–509. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.501>.
- Spersger, J., Hess, C., Loncaric, I., Ramirez, A.S., 2019. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry is a superior diagnostic tool for the identification and differentiation of mycoplasmas isolated from animals. *J. Clin. Microbiol.* 57, 1–16. <https://doi.org/10.1128/JCM.00316-19>.
- Tocqueville, V., Ferré, S., Nguyen, N.H.P., Kempf, I., Marois-Créhana, C., 2014. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma hyorhinis* strains identified by a real-time TaqMan PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1664–1671. <https://doi.org/10.1128/JCM.03437-13>.
- Touati, A., Blouin, Y., Sirand-Pugnet, P., Renaudin, H., Oishi, T., Vergnaud, G., Bébear, C., Pereyrea, S., 2015. Molecular epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae*: genotyping using single nucleotide polymorphisms and snapshot technology. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3182–3194. <https://doi.org/10.1128/JCM.01156-15>.
- Trüeb, B., Catelli, E., Luehrs, A., Nathues, H., Kuhnert, P., 2016. Genetic variability and limited clonality of *Mycoplasma hyorhinis* in pig herds. *Vet. Microbiol.* 191, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.015>.
- Yair, Y., Borovok, I., Mikula, I., Falk, R., Fox, L.K., Gophna, U., Lysnyansky, I., 2020. Genomics-based epidemiology of bovine *Mycoplasma bovis* strains in Israel. *BMC Genomics* 21, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6460-0>.
- Zhou, Z., Alikhan, N.F., Sergeant, M.J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A.P., Carriço, J. A., Achtman, M., 2017. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *bioRxiv* 1395–1404. <https://doi.org/10.1101/216788>.

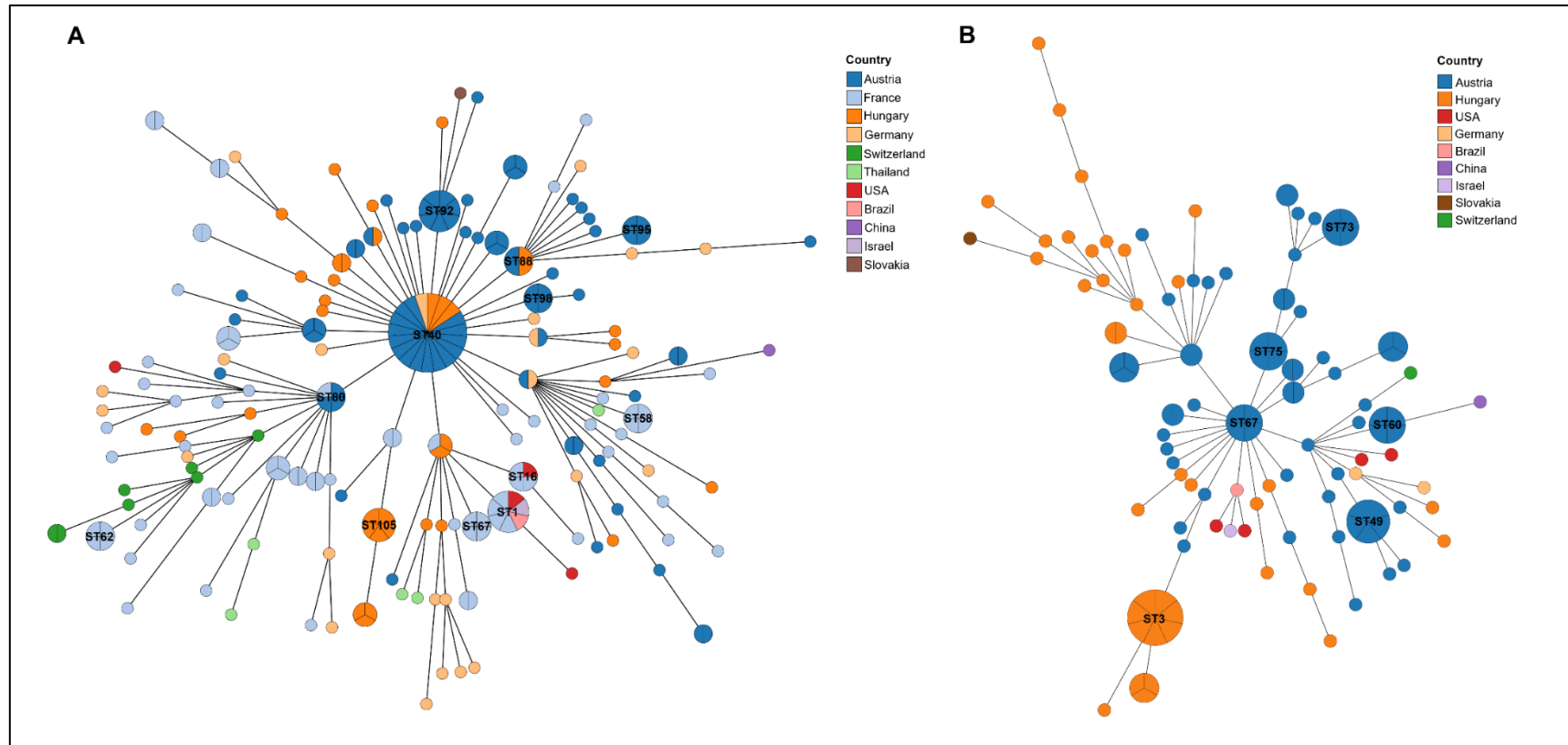


Abbildung 1: Minimale Spannbäume zur Darstellung der mittels MLSTa (A) und MLSTb (B) ermittelten Sequenztypen der 81 untersuchten *M. hyorhinis*-Stämmen. Die Ergebnisse der MLSTa wurden mit Datensätzen in der öffentlich zugänglichen PubMLST-Datenbank ([www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)) verglichen, während die Ergebnisse der MLSTb publizierten Datensätzen (Földi et al. 2020) gegenübergestellt wurden. Die dargestellten Knotengrößen sind hierbei proportional zur Häufigkeit der nachgewiesenen Sequenztypen. Die minimalen Stammbäume wurden mit der Software Grape Tree konstruiert.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Unter Anwendung der MLSTa wurden 81 *M. hyorhina*-Stämme (71 Erregerisolate aus Österreich, zwei Erregerisolate aus Deutschland, acht *M. hyorhina*-Stämme mit publizierten Ganzgenomsequenzen) in 42 Sequenztypen (ST) (Simpson's ID von 0,952) unterteilt, wobei ST40 am häufigsten nachgewiesen werden konnte ( $n = 15$ ), gefolgt von ST92 ( $n = 6$ ), ST95 und ST98 (beide  $n = 4$ ) (Abb. 1A). Anzumerken ist, dass auch drei ungarische und ein deutscher *M. hyorhina*-Stamm dem Sequenztyp ST40 zugeordnet wurden. Zudem wurden den Sequenztypen ST80 ( $n = 3$ ) und ST88 ( $n = 2$ ) ebenso *M. hyorhina*-Stämme aus Frankreich (ST80) bzw. Ungarn (ST88) zugewiesen. Wurde hingegen die erst kürzlich veröffentlichte MLSTb angewendet, gehörten 81 analysierte *M. hyorhina*-Stämme zu 54 verschiedenen Sequenztypen (Simpson's ID von 0,985), welche vorwiegend den Sequenztypen ST49 ( $n = 5$ ), ST60, ST67, ST73 und ST75 (alle  $n = 4$ ) zugewiesen wurden (Abb. 1B). Die Gegenüberstellung der resultierenden Sequenztypen beschränkte sich hierbei auf *M. hyorhina*-Stämme aus Ungarn und der Slowakei, welche von Földi et al. (2020) veröffentlicht wurden, da bisher keine MLSTb-Ergebnisse für andere Stämme verfügbar sind.

Insgesamt wiesen die MLSTa und MLSTb im Vergleich zur cgMLST ein geringeres Differenzierungspotential auf. Insbesondere nahverwandte *M. hyorhina*-Isolate konnten mit den angewandten konventionellen MLST-Schemata nicht differenziert werden. Auch eine Unterscheidung zwischen invasiven und präsumtiv nicht-invasiven *M. hyorhina*-Isolaten gelang weder mit MLSTa noch mit MLSTb.

Die Adjusted-Rand-Indizes, die den Prozentsatz der Übereinstimmungen zwischen den verwendeten Typisierungsmethoden definieren, lagen im mittleren (0,496 für cgMLST-MLSTb) bis sehr niedrigen Bereich (0,278 für MLSTa-MLSTb, 0,179 für cgMLST-MLSTa) und zeigten somit eine mäßige bis sehr niedrige Übereinstimmung zwischen den verwendeten Typisierungsmethoden auf. Während einige Resultate der MLSTa den Ergebnissen der cgMLST eindeutig widersprachen, stimmten die Ergebnisse der MLSTb deutlich besser mit jenen der cgMLST überein. Insgesamt wurden mittels konventioneller MLST die genomischen Verwandtschaftsverhältnisse (cgMLST) nicht immer korrekt dargestellt, wodurch die Tauglichkeit der konventionellen MLST für Ausbruchsanalysen stark eingeschränkt ist. Nichtsdestotrotz punktet die MLST gegenüber der cgMLST durch ihren geringeren Zeit- und Kostenaufwand (Trüb et al. 2016, Clavijo et al. 2019, Földi et al. 2020).

Abschließend ist anzumerken, dass in diese Studie nur Isolate aus Betrieben mit klinischen Erkrankungen einbezogen wurden. Infolgedessen repräsentieren die in dieser Studie untersuchten Isolate weder die gesamte *M. hyorhinis*-Population der jeweiligen Betriebe noch spiegeln sie die bestehende *M. hyorhinis*-Population in Österreich wider. Um ein besseres Verständnis hinsichtlich der *M. hyorhinis*-Populationsstruktur und Epidemiologie sowie der Pathogenese der Infektion zu erzielen, ist die Untersuchung eines repräsentativeren Probenpools erforderlich, der eindeutig kommensalistische *M. hyorhinis*-Isolate miteinbezieht.

#### 4. Zusammenfassung

*Mycoplasma (M.) hyorhinis* ist ein ubiquitär in den oberen Atemwegen von Schweinen auftretendes Bakterium. Nach systemischer Ausbreitung kann der Erreger vor allem bei Ferkeln im Alter von drei bis zehn Wochen Polyserositis und Polyarthritits hervorrufen. Über die Pathogenese der Erkrankung und die involvierten Pathomechanismen sowie über die Epidemiologie von *M. hyorhinis* ist derzeit wenig bekannt. Zudem erweist sich die Eindämmung der Infektion in betroffenen Betrieben, aufgrund fehlender kommerzieller Impfstoffe gegen *M. hyorhinis* im europäischen Raum, in der Regel als problematisch. Zur Bekämpfung und Kontrolle von *M. hyorhinis*-Infektionen werden üblicherweise oft mäßig erfolgreiche Antibiotikatherapien sowie vorbeugende Maßnahmen eingesetzt, die darauf abzielen, die Verbreitung des Erregers einzudämmen und Infektionsketten zu unterbrechen. Hierfür sind Kenntnisse über die Epidemiologie der *M. hyorhinis*-Infektion als auch über mögliche Erreger-Subtypen, welche die Fähigkeit besitzen sich im Wirt systemisch auszubreiten, erforderlich. Ziel dieser Arbeit war es, das Differenzierungspotential von zwei konventionellen MLST-Schemata (MLSTa, MLSTb) zur Unterscheidung von invasiven (Serosa, Gelenke) und präsumtiv nicht-invasiven *M. hyorhinis*-Isolaten (Lunge) zu bestimmen und die Ergebnisse mit jenen eines neu etablierten Kerngenom-MLST-Schemas (cgMLST) zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 81 *M. hyorhinis*-Isolate (71 Erregerisolate aus Österreich, zwei Erregerisolate aus Deutschland, acht *M. hyorhinis*-Stämme mit publizierten Ganzgenomsequenzen) mittels MLSTa und MLSTb analysiert. Insgesamt wiesen die MLSTa und MLSTb im Vergleich zur cgMLST ein geringeres Differenzierungspotential auf. Insbesondere nahverwandte *M. hyorhinis*-Isolate konnten mit den angewandten konventionellen MLST-Schemata nicht differenziert werden. Auch eine Unterscheidung zwischen invasiven und präsumtiv nicht-invasiven *M. hyorhinis*-Isolaten gelang weder mit MLSTa noch mit MLSTb. Eine beträchtliche Anzahl der MLSTa-Typisierungsergebnisse widersprach außerdem den Ergebnissen der cgMLST, wohingegen die Ergebnisse der MLSTb deutlich besser mit jenen der cgMLST übereinstimmten. Zusammengefasst konnte durch die vorgelegte Arbeit aufgezeigt werden, dass sich die konventionelle MLST als alleinige angewandte Methode nicht zur Beantwortung komplexer epidemiologischer Fragestellungen eignet. Hierfür sind hochauflösende Typisierungsverfahren wie die cgMLST erforderlich, welche ein höheres Potential aufweisen, genomische Beziehungen korrekt darzustellen.

## 5. Summary

*Mycoplasma (M.) hyorhinis* is a bacterium that occurs ubiquitously in the upper respiratory tract of pigs. After systemic spread, the pathogen can cause polyserositis and polyarthritis, especially in piglets aged three to ten weeks. Currently, little is known about the pathogenesis of the disease and the pathomechanisms involved, as well as the epidemiology of *M. hyorhinis*. In addition, containment of the infection in affected farms usually proves problematic due to the lack of commercial vaccines against *M. hyorhinis* in the European region. Common control strategies include antibiotic therapy, which is often moderately successful, and preventive measures. These strategies aim to contain the spread of the pathogen and interrupt infection chains. Therefore, knowledge about the epidemiology of *M. hyorhinis* infection as well as about possible pathogen subtypes that can spread systemically in the host is required. This diploma thesis intended to determine the differentiation potential of two conventional MLST schemes (MLSTa, MLSTb), to distinguish between invasive (serosa, joints) and presumptive noninvasive *M. hyorhinis* isolates (lungs), and to compare the results with those of a newly established core genome MLST scheme (cgMLST). For this purpose, a total of 81 *M. hyorhinis* isolates (71 pathogen isolates from Austria, two pathogen isolates from Germany, eight *M. hyorhinis* strains with published whole genome sequences) were analyzed using MLSTa and MLSTb. Overall, MLSTa and MLSTb showed a lower differentiation potential compared to cgMLST. Closely related *M. hyorhinis* isolates could not be differentiated with the applied conventional MLST schemes. Furthermore, differentiation between invasive and presumptively noninvasive *M. hyorhinis* isolates was not possible with either MLSTa or MLSTb. Moreover, a considerable number of the MLSTa typing results contradicted the cgMLST results, whereas the MLSTb results were in much better agreement with those of the cgMLST. In conclusion, the presented diploma thesis showed that conventional MLST as a sole method is not suitable to answer complex epidemiological questions. For this purpose, high-resolution typing methods like cgMLST, which represent the genomic relationships correctly, are required.

## Literaturverzeichnis

- Bekő, K., Felde, O., Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Hrivnák, V., Kiss, K., Biksi, I., Jerzsele, Á., Gyuranecz, M. (2019). Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from swine in Hungary. *Veterinary Microbiology* **228**, 196-201. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.11.027.
- Bünger, M., Brunthaler, R., Unterweger, C., Loncaric, I., Dippel, M., Ruczizka, U., Schwarz, L., Griessler, A., Voglmayr, T., Verhovsek, D., Ladinig, A., Spargser, J. (2020). *Mycoplasma hyorhinis* as a possible cause of fibrinopurulent meningitis in pigs? – a case series. *Porcine Health Manager* **6**, 38. doi: 10.1186/s40813-020-00178-8.
- Chen, D., Wei, Y., Huang, L., Wang, Y., Sun, J., Du, W., Wu, H., Liu, C. (2016). Synergistic pathogenicity in sequential coinfection with *Mycoplasma hyorhinis* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology* **182**, 123-30. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.11.003.
- Citti, C., Kim, M.F., Wise, K.S. (1997). Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infections and Immunity* **65**(5), 1773-1785. doi: 10.1128/iai.65.5.1773-1785.1997.
- Citti, C., Watson-McKown, R., Drosse, M., Wise, K.S. (2000). Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Bacteriology* **182**(5), 1356-1363. doi: 10.1128/JB.182.5.1356-1363.2000.
- Clavijo, M.J., Murray, D., Oliveira, S., Rovira, A. (2017). Infection dynamics of *Mycoplasma hyorhinis* in three commercial pig populations. *The Veterinary Record* **181**(3), 68. doi: 10.1136/vr.104064.
- Clavijo, M.J., Sreevatsan, S., Johnson, T.J., Rovira, A. (2019). Molecular epidemiology of *Mycoplasma hyorhinis* porcine field isolates in the United States. *PLoS ONE* **14**(10), e0223653. doi:10.1371/journal.pone.0223653.
- Dos Santos, L.F., Clavijo, M.J., Sreevatsan, S., Rovira, A., Moreira, M.A., Pieters, M. (2015). Genotyping of *Mycoplasma hyorhinis* using multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *Journal of Microbiological Methods* **111**, 87-92. doi:10.1016/j.mimet.2015.02.003.

- Drexler, H.G., Uphoff, C.C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* **39**(2), 75-90. doi: 10.1023/A:1022913015916.
- Ferrarini, M.G., Siqueira, F.M., Mucha, S.G., Palama, T.L., Jobard, É., Elena-Herrmann, B., Vasconcelos, A.T.R., Tardy, F., Schrank, I.S., Zaha, A., Sagot, M.-F. (2016). Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. *BMC Genomics* **17**, 353. doi: 10.1186/s12864-016-2644-z.
- Fourour, S., Tocqueville, V., Paboeuf, F., Lediguerher, G., Morin, N., Kempf, I., Marois-Créhan, C. (2019). Pathogenicity study of *Mycoplasma hyorhinis* and *M. flocculare* in specific-pathogen-free pigs pre-infected with *M. hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* **232**, 50-57. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.04.010.
- Földi, D., Bekö, K., Felde, O., Kreizinger, Z., Kovács, Á.B., Tóth, F., Bányai, K., Kiss, K., Biksi, I., Gyuranecz, M. (2020). Genotyping *Mycoplasma hyorhinis* by multi-locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Veterinary Microbiology* **249**, 1-8. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108836.
- Friis, N.F., Feenstra, A.A. (1994). *Mycoplasma Hyorhinis* in the Etiology of Serostitis among Piglets. *Acta Veterinaria Scandinavica* **35**, 93-98. doi: 10.1186/BF03548359.
- Ghanem, M., Wang, L., Zhang, Y., Edwards, S., Lu, A., Ley, D., El-Gazzar, M. (2017). Core Genome Multilocus Sequence Typing: a Standardized Approach for Molecular Typing of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Clinical Microbiology* **56**(1), 1-11. doi:10.1128/JCM.01145-17.
- Ghanem, M., El-Gazzar, M. (2018). Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. *Veterinary Microbiology* **218**, 84-89. doi:10.1016/j.vetmic.2018.03.021.
- Gomes Neto, J.C., Gauger, P.C., Strait, E.L., Boyes, N., Madson, D.M., Schwartz, K.J., (2012). *Mycoplasma*-associated arthritis: Critical points for diagnosis. *Journal of Swine Health and Production* **20**(2), 82-86.
- Goodison, S., Urquidi, V., Kumar, D., Reyes, L., Rosser, C.J. (2013). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma hyorhinis* Strain SK76. *Genome Announcement* **1**(1), e00101-12. doi: 10.1128/genomeA.00101-12.

- Heinritzi, K. (2006). Gliedmaßen- und Skeletterkrankungen. In: Heinritzi, K., Gindele, H.R., Reiner, G., Schnurrbusch, U., Loeffler, K., Strauch, D. (Hrsg.). *Schweinekrankheiten*. 1. Auflage. Stuttgart: Eugen Ulmer, 74-88.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatroy ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26**(11), 2465-2466. doi: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
- Kinnear, A., Waldner, M., Mcallister, T.A., Zaheer, R., Register, K., Jelinski, M. (2021). Application of Four Genotyping Methods to *Mycoplasma bovis* Isolates Derived from Western Canadian Feedlot Cattle. *Journal of Clinical Microbiology* **59**(7), e00044-21. doi:10.1128/JCM.00044-21.
- Kovács, Á.B., Kreizinger, Z., Forró, B., Gróznér, D., Mitter, A., Marton, S., Bali, K., Sawicka, A., Tomczyk, G., Bányai, K., Gyuranecz, M. (2020). The core genome multi-locus sequence typing of *Mycoplasma anserisalpingtonis*. *BMC Genomics* **21**(1), 1-8. doi:10.1186/s12864-020-06817-2.
- Lahrman, K.H., Plonait, H. (2001). Gliedmaßen- und Skeletterkrankungen. In: Waldmann, K.-H., Wendt, M. (Hrsg.). *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. 3. Auflage. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 261-305.
- Lee, J.-A., Oh, Y.-R., Hwang, M.-A., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Song, C.-S., Choi, I.-S., Lee, S.-W. (2016). *Mycoplasma hyorhinis* is a potential pathogen of porcine respiratory disease complex that aggravates pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **177**, 48-51. doi:10.1016/j.vetimm.2016.06.008.
- Lee, J.-A., Hwang, M.-A., Han, J.-H., Cho, E.-H., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Song, C.-S., Choi, I.-S., Lee, S.-W. (2018). Reduction of mycoplasmal lesions and clinical signs by vaccination against *Mycoplasma hyorhinis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **196**, 14-17. doi:10.1016/j.vetimm.2017.12.001.
- Liu, W., Fang, L., Li, S., Li, Q., Zhou, Z., Feng, Z., Luo, R., Shao, G., Wang, L., Chen, H., Xiao, S. (2010). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain HUB-1. *Journal of Bacteriology* **192**(21), 5844-5845. doi: 10.1128/JB.00946-10.

- Luehrs, A., Siegenthaler, S., Grützner, N., Grosse Beilage, E., Kuhnert, P., Nathues, H. (2017). Occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* infections in fattening pigs and association with clinical signs and pathological lesions of Enzootic Pneumonia. *Veterinary Microbiology* **203**, 1-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.02.001.
- 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**(1-2), 104-112. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.015.
- Martinson, B., Zoghby, W., Barrett, K., Bryson, L., Christmas, R., Minion, F.C., Kroll, J. (2018). Efficacy of an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs. *Vaccine* **36**(3), 408-412. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.063.
- Mayor, D., Jores, J., Korczak, B.M., Kuhnert, P. (2008). Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: A diverse pathogen with limited clonality. *Veterinary Microbiology* **127**(1-2), 63-72. doi:10.1016/j.vetmic.2007.08.010.
- Morita, T., Fukuda, H., Awakura, T., Shimada, A., Umemura, T., Kazama, S., Yagihashi, T. (1995). Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media. *Veterinary Pathology* **32**, 107-111. doi: 10.1177/030098589503200202.
- Nathues, H., Beilage, E.G., Kreienbrock, L., Rosengarten, R., Spargser, J. (2011). RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Veterinary Microbiology* **152**(3-4), 338-345. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.029.
- Palzer, A., Ritzmann, M., Hafner-Marx, A., Wolf, G., Heinritzi, K. (2006). Nachweis von *Haemophilus parasuis* und *Mycoplasma hyorhinis* bei Schweinen sowie Assoziation dieser Erreger mit klinischen und pathologisch-anatomischen Befunden. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **113**(6), 227-230.
- Palzer, A., Ritzmann, M., Spargser, J. (2020). *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in pig herds. In: Maes, D., Sibila, M., Pieters, M. (Hrsg.). *Mycoplasmas in Swine*. Leuven: Uitgeverij ACCO, 247-265.

- Pieters, M., Maes, D. (2019). Mycoplasmosis. In: Zimmermann, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Zhang, J. (Hrsg.). Diseases of Swine, 11. Auflage. Hoboken: Wiley Blackwell, 863-883.
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**(4), 1094-1156. doi: 10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998.
- Reiner, G. (2015). Krankes Schwein - kranker Bestand. 1. Auflage. Stuttgart: Ulmer Verlag.
- Resende, T.P., Pieters, M., Vannucci, F.A. (2019). Swine conjunctivitis outbreaks associated with *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **31**(5), 766-769. doi: 10.1177/1040638719865767.
- Roos, L.R., Surendran Nair, M., Rendahl, A.K., Pieters, M. (2019). *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* dual detection patterns in dams and piglets. *PLoS ONE* **14**(1), e0209975. doi: 10.1371/journal.pone.0209975.
- Rosengarten, R., Wise, K.S. (1991). The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis*: combinatorial expression of distinct size variant lipoproteins generating high-frequency surface antigenic variation. *Journal of Bacteriology* **173**(15), 4782-4793. Doi: 10.1128/jb.173.15.4782-4793.1991.
- Selbitz, H.-J. (2015). Zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes. In: Selbitz, H.-J., Truyen, U., Valentin-Weingand, P. (Hrsg.). Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 10. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 315-324.
- Shin, J.H., Joo, H.S., Lee, W.H., Seok, H.B., Calsamig, M., Pijoan, C., Molitor, T.W. (2003). Identification and characterization of cytopathogenic *Mycoplasma hyorhinis* from swine farms with a history of abortions. *Journal of Veterinary Medical Science* **65**(4), 501-509. doi: 10.1292/jvms.65.501.
- Siqueira, F.M., Thompson, C.E., Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Reolon, L., Almeida, L.G., Da Fonsêca, M.M., De Souza, R., Prosdocimi, F., Schrank, R.S., Ferreira, H.B., De Vasconcelos, A.T.R., Zaha, A. (2013). New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from comparative genome analysis. *BMC Genomics* **14**, 175. doi: 10.1186/1471-2164-14-175.

- Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**, 225-420. doi: 10.1099/00207713-30-1-225.
- Stemke, G.W., Laigret, F., Grau, O., Bové, J.M. (1992). Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(2), 220–225. doi: 10.1099/00207713-42-2-220.
- Tang, J., Hu, M., Lee, S., Roblin, R. (2000). A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma*/*Acholeplasma* contaminants in cell culture. *Journal of Microbiological Methods* **39**(2), 121-126. doi: 10.1016/s0167-7012(99)00107-4.
- Tocqueville, V., Ferré, S., Nguyen, N.H., Kempf, I., Marois-Créhan, C. (2014). Multilocus Sequence Typing of *Mycoplasma hyorhinis* Strains Identified by a Real-Time TaqMan PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* **52**(5), 1664-1671. doi:10.1128/JCM.03437-13.
- Trüeb, B., Catelli, E., Luehrs, A., Nathues, H., Kuhnert, P. (2016). Genetic variability and limited clonality of *Mycoplasma hyorhinis* in pig herds. *Veterinary Microbiology* **191**, 9-14. doi:10.1016/j.vetmic.2016.05.015.
- Xiong, Q., Zhang, B., Wang, J., Ni, B., Ji, Y., Wei, Y., Xiao, S., Feng, Z., Liu, M., Shao, G. (2016a). Characterization of the role in adherence of *Mycoplasma hyorhinis* variable lipoproteins containing different repeat unit copy numbers. *Veterinary Microbiology* **197**, 39-46. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.10.025.
- Xiong, Q., Wang, J., Ji, Y., Ni, B., Zhang, B., Ma, Q., Wei, Y., Xiao, S., Feng, Z., Liu, M., Shao, G. (2016b). The functions of the variable lipoprotein family of *Mycoplasma hyorhinis* in adherence to host cells. *Veterinary Microbiology* **186**, 82-89. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.01.017.
- Yair, Y., Borovok, I., Mikula, I., Falk, R., Fox, L.K., Grophna, U., Lysnyansky, I. (2020). Genomics-based epidemiology of bovine *Mycoplasma bovis* strains in Israel. *BMC Genomics* **21**(1), 1-11. doi:10.1186/s12864-020-6460-0.

Yogev, D., Watson-McKown, R., Rosengarten, R., Wise, K.S. (1995). Increased structural and combinatorial diversity in an extended family of genes encoding Vlp surface proteins of *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Bacteriology* **177**(19), 5636-5643. doi: 10.1128/jb.177.19.5636-5643.1995.