

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)

# **Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung von österreichischen *Mycoplasma bovis*-Isolaten**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von  
Sabrina Pauli

Wien, August 2023

Betreuer:

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

Institut für Mikrobiologie

Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. vet. Lorenz Khol Dipl. ECBHM

Universitätsklinik für Wiederkäuer

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen/Gedanken als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungskommission in dieser oder einer ähnlichen Form vorgelegt. Sie wurde bisher auch nicht veröffentlicht.

# Inhaltsverzeichnis

Abstract (englisch)	
Abstract (deutsch)	
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Material und Methoden.....	4
2.1 <i>Mycoplasma bovis</i> -Stämme.....	4
2.2 Kultivierung der <i>Mycoplasma bovis</i> -Stämme.....	5
2.3 DNA-Extraktion.....	5
2.4 Bibliotheksherstellung.....	6
2.4.1 DNA-End-Reparatur und A-Tailing.....	6
2.4.2 Barcode-Ligation.....	7
2.4.3 Adapter-Ligation und Aufreinigung .....	8
2.5 Nanoporen-Sequenzierung und Hybrid-Assemblierung.....	8
2.6 Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung.....	8
3. Ergebnisse.....	10
3.1 DNA-Extraktion.....	10
3.2 Nanoporen-Sequenzierung und Hybrid-Assemblierung.....	11
3.3 Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung.....	11
4. Diskussion.....	15
5. Literaturverzeichnis.....	17
6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	22

## Abstract (englisch)

*Mycoplasma (M.) bovis* is the causative agent of bovine mycoplasmosis, a worldwide occurring disease complex associated with mastitis, arthritis, otitis media and pneumonia resulting in significant economic loss in the cattle industry. Little is known about the epidemiology of *M. bovis* in Austria. Therefore, this study aimed at investigating the population structure and relatedness of *M. bovis* strains isolated from Austrian cattle between 2007 and 2023 using a newly established typing method, the core genome multilocus sequence typing (cgMLST). For the development of cgMLST whole genome sequences of 121 Austrian *M. bovis* strains (29 finished genomes, 92 draft genomes) and type strain PG45<sup>T</sup> were applied. By employing Ridom SeqSphere+ software a cgMLST scheme analyzing 495 target genes was established and results compared to those obtained by conventional MLST (7 loci MLST). Using cgMLST the strain cohort was separated into the two main clusters A (n=113) and B (n=8, type strain) with cluster A further divided into sub clusters A1 (n=4) and A2 (n=109). When conventional MLST was applied most of the investigated strains were assigned to sequence type ST21 (n=92, 74%) which only occurred in sub cluster A2. Further noticeable was the singular or temporal and spatial occurrence of sequence types closely related to ST21 (ST182, ST218) and of subgroups (A2a, n=17; A2c, n=12) evolved within ST21. Altogether, the newly developed cgMLST scheme accurately explained the overall relatedness of the investigated *M. bovis* strains thereby allowing for gaining deep insights into the epidemiology and populations structure of *M. bovis* in Austria.

## Abstract (deutsch)

*Mycoplasma (M.) bovis* ist Erreger der bovinen Mykoplasmosen, die sich durch verschiedenste Krankheitsbilder wie Mastitis, Arthritis, Otitis media und Pneumonie äußert und weltweit zu hohen ökonomischen Verlusten führt. Über die Infektionsepidemiologie von *M. bovis* in Österreich ist wenig bekannt. Ziel dieser Diplomarbeit war es, durch Etablierung und Einsatz eines hochauflösenden Typisierungsverfahrens, der Kerngenom (engl. core genome) Multilokus Sequenztypisierung (cgMLST) die Verwandtschaftsverhältnisse und Strukturentwicklungen der im Zeitraum 2007-2023 in Österreich aufgetretenen Erregerpopulationen zu bestimmen. Für die Entwicklung und Durchführung der cgMLST standen Gesamtgenomsequenzen von 121 österreichischen *M. bovis*-Stämmen (29 geschlossene Genome, 92 Entwurfsgenome) und dem Typstamm PG45<sup>T</sup> zur Verfügung. Unter Einsatz der Ridom SeqSphere+ Software konnte ein 495 Zielgene-umfassendes cgMLST-Schema entwickelt und die Typisierungsergebnisse mit jenen der 7-Lokus-MLST verglichen werden. Anhand der cgMLST-Ergebnisse konnte die Stammkohorte in die beiden Hauptcluster A (n=113) und B (n=8, Typstamm) unterteilt und Hauptcluster A wiederum in die beiden Subcluster A1 (n=4) und A2 (n=109) aufgetrennt werden. Mithilfe der 7-Lokus-MLST konnte die überwiegende Mehrheit der untersuchten Stämme dem Sequenztyp ST21 (n=95, 74 %) zugeordnet werden, welcher ausschließlich im Subcluster A2 auftrat. Auffallend war auch das singuläre oder zeitlich und lokal begrenzte Auftreten von sowohl ST21 nahestehenden Sequenztypen (ST182, ST218) als auch von Subgruppen (A2a, n=17; A2c, n=12) innerhalb des Sequenztyps ST21. Insgesamt konnten durch den Einsatz des neuentwickelten cgMLST-Schemas die Verwandtschaftsverhältnisse der in Österreich auftretenden Erregerstämme genau dargestellt und dabei detaillierte Einblicke in die Infektionsepidemiologie und Populationsstruktur von *M. bovis* gewonnen werden.

## **Abkürzungsverzeichnis**

BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
cgMLST	Kerngenom (core genome) Multilokus-Sequenztypisierung
MLVA	Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Vsp	Variable surface protein
RAPD	Randomly-Amplified-Polymorphic DNA
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

## 1. Einleitung und Fragestellung

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien, die taxonomisch der Klasse *Mollicutes* (Phylum *Mycoplasmata*) zugeordnet werden. Die Klasse *Mollicutes* besteht aus mehr als 200 valide beschriebenen Arten, die bei Menschen, Tieren oder Pflanzen nachgewiesen werden können [1]. Neben der Zellwandlosigkeit besitzen Mykoplasmen weitere Merkmale, die sie von anderen Bakterien unterscheiden. Hierzu zählen ihre geringe Zell- und Genomgröße sowie ein relativ niedriger Anteil von Guanin und Cytosin in der Basenzusammensetzung ihrer DNA [1]. Die evolutionär bedingte Genomreduktion führte dazu, dass Mykoplasmen geringe biosynthetische Fähigkeiten aufweisen und so von einer gezielten Nährstoffzufuhr aus ihrer Umgebung angewiesen sind. Dies erklärt die ausgesprochen parasitäre Lebensweise, sowie die häufig zu beobachtenden Wirts- und Gewebespezifitäten von Mykoplasmen [2].

*Mycoplasma (M.) bovis* ist Verursacher der sogenannten Mykoplasmosen der Rinder, einer weltweit auftretenden Erkrankung, die mit einem breiten Spektrum an Krankheitsbildern in Verbindung gebracht wird. Zu diesen zählen Pneumonie, Mastitis, Arthritis und Otitis media [3]. Außerdem gehört *M. bovis* zu den infektiösen Ursachen der multifaktoriell bedingten enzootischen Bronchopneumonie der Rinder [4].

Der Erreger konnte erstmals 1961 in den USA bei einem Rind mit Mastitis nachgewiesen werden [5]. Seitdem konnte sich das Bakterium durch den internationalen Tier- und Rindersamenhandel weltweit ausbreiten. So erreichte *M. bovis* in den 1970er Jahren das Vereinigte Königreich und Kontinentaleuropa. Schließlich wurde der Erreger im Jahre 2017 in Neuseeland und somit im weltweit bis zu diesem Zeitpunkt letzten *M. bovis*-freien Land mit maßgeblicher Milchwirtschaft und Rinderzucht nachgewiesen [3]. In Österreich kam es erstmalig 2007 zu einem verheerenden *M. bovis*-Ausbruch bei almgesommerten Rindern in Vorarlberg, der mit schweren Fällen von Mastitis einherging [6].

Infektionen mit *M. bovis* führen weltweit zu immensen ökonomischen Verlusten. So wurde der wirtschaftliche Schaden in den USA auf 32 Millionen Dollar pro Jahr in der Fleischindustrie und auf 108 Millionen Dollar in der Milchindustrie geschätzt [7].

Wie alle Mykoplasmen weist *M. bovis* neben einer geringen Zellgröße auch eine geringe Genomgröße von ca. 1 Mb auf [8]. Aufgrund der Zellwandlosigkeit besitzt *M. bovis* eine pleomorphe Gestalt und eine natürliche Resistenz gegenüber allen Antibiotika, die in die Zellwandsynthese eingreifen (z.B.  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Glykopeptid-Antibiotika). Über die Virulenzfaktoren von *M. bovis* ist nur wenig bekannt. Der Erreger besitzt jedoch die Fähigkeit, sich an veränderte Milieubedingungen anzupassen und die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Dies erreicht der Erreger mithilfe phasen- und größenvariabler Oberflächenproteine,

den sogenannten Vsp's (*variable surface lipoproteins*) [9, 10]. Zusätzlich tragen die Vsp's als Bindungsmoleküle zur Zytadhärenz von *M. bovis* an Wirtszellen bei [11]. Daneben konnten weitere Adhäsine identifiziert werden, wie das Vsp-ähnliche Vpmax-Adhäsın [12], die Lipase MilA [13], das Adhäsın P27 [14], sowie Stoffwechsellzyme, die neben ihren Metabolismus-Funktionen auch Adhäsionseigenschaften aufweisen. Hierzu zählen die NADH-Oxidase [15], Enolase [16], Fruktose-1,6-Biphosphat-Alsolase [17] und die tRNA-Methyltransferase TrmFO [18]. Weitere bekannte Mechanismen, die zur Pathogenität von *M. bovis* beitragen, sind die Produktion toxischer Stoffwechselprodukte [19], die Zellinvasion [20], Biofilmbindung [21] und die Immunmodulation [22, 23].

Bis heute gilt in der Diagnostik von *M. bovis* die mikrobielle Kultur als Goldstandard-Nachweismethode [24]. Durch die eingeschränkte Biosyntheseleistung des Erregers werden hierfür reichhaltige Nährmedien benötigt, die aus Rinderherz-Infusion, Peptone, Tryptone, Seren, Hefeextrakt und weiteren wachstumsfördernden Zusätzen bestehen. Zusätzlich werden zur Hemmung der oftmals überwuchernden Begleitflora den Medien  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Thalliumazetat hinzugefügt [24]. Auf Festnährböden bildet *M. bovis* nach 3-7-tägiger Bebrütung unter mikroaeroben Verhältnisse kleine, spiegeleiförmige Kolonien aus, welche erst unter dem Stereomikroskop sichtbar sind [24]. Die Artdiagnose erfolgt heute vorwiegend durch Sequenzierung des 16S rRNA-Gens oder die Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight (MALDI-ToF) Massenspektrometrie [25, 26].

Die Behandlung von *M. bovis*-Infektionen ist äußerst schwierig. Aufgrund der Zellwandlosigkeit und des fehlenden Folsäure-Metabolismus weist *M. bovis* eine natürliche Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Sulfonamide/Trimethoprim auf [27, 28]. Zur Therapie der Mykoplasmosen des Rindes werden daher antimikrobielle Wirkstoffe, wie z.B. Tetrazykline, Makrolide, Phenicole (Florfenicol) oder Fluorchinolone eingesetzt. Nichtsdestotrotz wird zunehmend über Resistenzen gegenüber diesen Wirkstoffgruppen berichtet. Die antibiotische Therapie von *M. bovis*-Infektionen ist außerdem durch Biofilmbildung *in vivo*, intrazellulärer Lokalisation des Erregers sowie die geringe Bioverfügbarkeit der eingesetzten Antibiotika in betroffenen Gewebestrukturen beeinträchtigt [27, 28]. Aufgrund der ausgesprochenen Therapieresistenz von klinisch-manifesten *M. bovis*-Infektionen werden daher die Metzgerei oder strikte Abtrennung aller infizierten Tiere, die Quarantäne von Neuzugängen und die wiederholte Testung der Herde, sowie intensive Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in betroffenen Betrieben empfohlen [29]. Trotz Forschung auf dem Gebiet der Vakzine-Entwicklung, sind derzeit keine kommerziellen Impfstoffe gegen *M. bovis* verfügbar. Die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffs wird vor allem durch die ausgesprochene Heterogenität des Erregers, sowie die mangelnden Kenntnisse über protektive Erregerkomponenten und die vom Erreger ausgelöste Wirtsimmunantwort erschwert [30].

Über die Infektionsepidemiologie von *M. bovis* ist wenig bekannt. Als Hauptinfektionsquelle gelten asymptomatische Trägertiere, die bei Tiertransporten, Bestandszukäufen, Ausstellungen und Märkten, sowie bei der Nutzung von Gemeinschaftsalmen den Erreger unbemerkt weitergeben. Die Erregerübertragung erfolgt zumeist direkt über infektiöse Aerosole (Tröpfcheninfektion), aber auch indirekt über kontaminierte Gerätschaften, wie Melkmaschinen. Weitere Übertragungsmöglichkeiten bestehen beim Deckakt, der künstlichen Besamung und dem Embryotransfer, sowie durch die vertikale Übertragung [31].

Zur Aufklärung infektionsepidemiologischer Fragestellungen zu *M. bovis*-Infektionen haben sich in der Vergangenheit molekularer Typisierungsverfahren wie PCR-gestützte Methoden (z.B. *Randomly-Amplified-Polymorphic DNA* (RAPD)-Analyse, *Multilocus Variable-Number of Tandem Repeats* (VNTR)-Analyse (MLVA)) und schließlich die auf Amplikon-Sequenzierung beruhende Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) durchgesetzt ([6, 32]. Bei der MLST von *M. bovis*-Isolaten werden Fragmente der sieben Haushaltsgene *dnaA*, *gltX*, *gpsA*, *gyrB*, *pta2*, *tdk* und *tkf* mittels PCR amplifiziert und die Sequenzfolgen bestimmt. Die erhaltenen Allel-Sequenzen werden schließlich mit Datenbankeinträgen (<https://pubmlst.org/>) verglichen und einem bekannten Sequenztyp zugeordnet [33]. Mithilfe dieser Methode konnten bisher in zahlreichen Studien grundsätzliche epidemiologische Fragestellung zur *M. bovis*-Infektion beantwortet werden [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40]. Die Kerngenom-MLST (englisch *core genome* MLST, cgMLST) ist eine Erweiterung der MLST und bietet durch die Kombination mit der Genomsequenzierung eine höhere Auflösung. Dabei werden Hunderte von Genen, die das Kerngenom bilden, verglichen und infolge Allel-Profile erstellt. In rezenten Untersuchungen wurde dieser Ansatz für die Typisierung von *M. bovis* zunehmend erfolgreich eingesetzt [41, 42, 38, 43].

In Österreich konnte sich der Erreger nach dem verheerenden Ausbruch in einer almgesommerten Milchviehherde (100 Tiere, Alpe Mittelargen, Vorarlberg) im Jahre 2007 über das gesamte Bundesgebiet ausbreiten. Erste infektionsepidemiologische Analysen unter Einsatz PCR-gestützter Typisierungsverfahren (RAPD, MLVA) deuteten auf die Ausbreitung eines einzigartigen Erregerklons hin [6]. Ziel dieser Diplomarbeit ist es nun, diese ersten Erregertypisierungsergebnisse mithilfe eines hochauflösenden Typisierungsverfahrens, der cgMLST, zu überprüfen, sowie Strukturentwicklungen in den im Zeitraum 2007-2023 in Österreich aufgetretenen Erregerpopulationen zu bestimmen, um dabei Einblicke in die Infektionsepidemiologie von *M. bovis* in der österreichischen Rinderpopulation zu erhalten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 *Mycoplasma bovis*-Stämme

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden insgesamt 121 österreichische *M. bovis*-Stämmetypisiert. Davon stammten 107 Isolate aus der institutseigenen Sammlung an *M. bovis*-Stämmen, die im Rahmen diagnostischer Untersuchungen im Zeitraum 2007-2023 am Institut für Mikrobiologie gewonnen werden konnten, während 14 Stämme von der AGES Linz zur Verfügung gestellt wurden. Die Auswahl der 107 Stämme aus der institutseigenen Sammlung (bestehend aus ca. 1200 *M. bovis*-Isolaten) erfolgte nach epidemiologischen Kriterien (Jahr der Isolierung, Bundesland, Probenart), wobei im Verhältnis der pro Jahr zur Verfügung stehenden Isolate bundesland- und probenartspezifische Repräsentanten ausgewählt wurden. Die Stämme wurden mit Stammnummerncodes gekennzeichnet, die sich aus der Probennummer, dem Herkunftsbundesland (BLD für Burgenland, K für Kärnten, NOE für Niederösterreich, OOE für Oberösterreich, STM für Steiermark, SZB für Salzburg, TIR für Tirol und VBG für Vorarlberg) (ausgenommen den von der AGES Linz übermittelten Stämmen, die allesamt von oberösterreichischen Betrieben stammten), dem Jahr der Isolierung und der Probenart (G für Gelenk, L für Lunge oder bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit, M für Milch, N für Nase, O für Ohr, P für Pleura, S für Samen) zusammensetzten. Von 120 Stämmen standen Entwurfsgenome (assemblierte Illumina-Sequenzen) und von einem Stamm (1E2007VBG [CP119269], Vorarlberger Ausbruchsstamm aus dem Jahre 2007) ein geschlossenes und veröffentlichtes Hybrid-Genom (hybridassemblierte Illumina- und Nanoporen-Sequenzen) zur Verfügung. Da für die Etablierung eines an die österreichische Erregerpopulation angepassten cgMLST-Schemas weitere geschlossene Genome erforderlich sind, wurden von den 120 *M. bovis*-Stämmen mit vorhandenen Entwurfsgenomen 28 Stämmen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und für die Nanoporen-Sequenzierung vorbereitet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Für die Nanoporen-Sequenzierung ausgewählte *M. bovis*-Isolate

Stammnummer	Probennummer	Bundesland	Isolierungsjahr	Probenart
Moll2VBG09M	Moll2-6	Vorarlberg	2009	Milch
39BLD10L	39	Burgenland	2010	Lunge
1264TIR10S	1264	Tirol	2010	Samen
1395OOE10L	1395	Oberösterreich	2010	Lunge
299TIR11M	299	Tirol	2011	Milch
8NOE13L	8	Niederösterreich	2013	Lunge
24NOE13L	24	Niederösterreich	2013	Lunge
85STM14M	85/M	Steiermark	2014	Euter
320BNOE16P	320B	Niederösterreich	2016	Pleura

385STM16L	385/1	Steiermark	2016	Lunge
60NOE17G	60	Niederösterreich	2017	Gelenk
401OOE17O	401	Oberösterreich	2017	Ohr
1172NOE17L	1172	Niederösterreich	2017	Lunge
2951OOE17L	2951	Oberösterreich	2017	BALF*
3539NOE17L	3539	Niederösterreich	2017	Lunge
3735OOE17M	3735/14	Oberösterreich	2017	Milch
3985OOE17L	3985/1	Oberösterreich	2017	BALF*
141OOE18L	141	Oberösterreich	2018	Lunge
2199STM18L	2199	Steiermark	2018	BALF*
3220NOE18L	3230	Niederösterreich	2018	Lunge
3519NOE18L	3519	Niederösterreich	2018	Lunge
3534OOE18L	3534	Oberösterreich	2018	BALF*
3915OOE18L	3915	Oberösterreich	2018	BALF*
3964OOE18L	3964	Oberösterreich	2018	Lunge
4377OOE19N	4377	Oberösterreich	2019	Nase
2987NOE20L	2987	Niederösterreich	2020	BALF*
3088NOE20L	3088	Niederösterreich	2020	BALF*
3654SZB20L	3654	Salzburg	2020	Lunge

\*Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit

## 2.2 Kultivierung der *Mycoplasma bovis*-Stämme

Von den kryokonservierten Stämmen wurden jeweils eine kleine Menge (ca. 10 µl) entnommen, aufgetaut und mit einer Einwegöse auf modifiziertem SP4-Agarmedium (Institut für Mikrobiologie, Vetmeduni) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden dann für 1-3 Tage bei 37°C und 6%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, bis gut ausgebildete Einzelkolonien sichtbar waren. Anschließend wurde von jedem Stamm eine Einzelkolonie mit Hilfe einer Glaspipette unter stereomikroskopischer Kontrolle gepickt und in modifiziertem SP4-Flüssigmedium (Institut für Mikrobiologie, Vetmeduni) gegeben. Diese wurde aerob bei 37°C inkubiert, bis ein subtiler Farbumschlag von Rot in ein helleres Rot erfolgte. Dies dauerte im Durchschnitt wiederum ca. 2 Tage. Schließlich wurde die erhaltene Flüssigkultur aliquotiert (je 500 µl) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

## 2.3 DNA-Extraktion

Zur Vorbereitung der DNA-Extraktion wurde ein kryokonserviertes Aliquot der *M. bovis*-Einzelkoloniekultur aufgetaut und in 20 ml modifiziertem SP4-Flüssigmedium überführt und bei 37°C aerob bebrütet.

Nach Farbumschlag wurde das Gesamtvolumen der Flüssigkultur in 10 x 2-ml Röhren pipettiert und diese für 10 Minuten bei 13.500 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und Reste des Flüssigmediums abpipettiert. Die gewonnenen Pellets wurden im Anschluss zusammengeführt. Hierfür wurden in das erste Röhren 200 µl Phosphatgepufferte Saline (PBS) pipettiert und das Pellet resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in das nächstgereichte Röhren transferiert und das Pellet resuspendiert, bis am Ende der Röhrenreihe (10. Röhren) alle gewonnenen Pellets/Stamm zu einer hochkonzentrierten Bakteriensuspension zusammengemischt wurden.

Für die anschließende DNA-Extraktion wurde der *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Deutschland) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. In die hochkonzentrierte Bakteriensuspension wurden hierfür zunächst 30 µl Proteinase K und 200 µl Lyse-Puffer AL zugegeben. Die Mischung wurde gevortext und dann in einem Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) bei 56°C inkubiert und alle 10 Minuten gevortext, bis die Bakteriensuspension als klare Flüssigkeit erschien. Danach wurde die Mischung kurz auf Raumtemperatur abgekühlt.

Im Anschluss wurden 30 µl der im Kit enthaltenen RNase-Lösung zugegeben, gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden 200 µl Ethanol absolut dazugegeben, die Mischung gevortext und in ein Röhren mit Filtersäule überführt. Es folgte die Zentrifugation für eine Minute bei 13.500 x g. Nach Verwerfen des Filtrats wurden 500 µl Waschlösung AW1 in die Filtersäule pipettiert und das Röhren eine Minute bei 13.500 x g zentrifugiert. Nach neuerlichem Abkippen des Filtrats wurden 500 µl Waschlösung AW2 in das Filterröhren hinzu pipettiert und für 3 Minuten bei 18.000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Filtersäule in ein neues Röhren gegeben und in die Mitte des Filters 70 µl Elutionspuffer AE getropft. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Filterröhren erneut für eine Minute bei 13.500 x g zentrifugiert und dabei das DNA-Extrakt gewonnen. Im Anschluss wurde mithilfe des NanoDrop 2000-Meßgeräts (Biorad, Österreich) die DNA-Konzentration bestimmt und die Reinheit der DNA überprüft. Danach wurde das DNA-Extrakt entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

## **2.4 Bibliotheksherstellung**

Die Bibliothekserstellung erfolgte nach Angaben in den von Oxford Nanopore Technologies im Webpage-Mitgliederbereich zur Verfügung gestellten Protokollen.

### **2.4.1 DNA-End-Reparatur und A-Tailing**

Zu Beginn wurden die DNA-Extrakte durch Zugabe von Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 200 ng/µl eingestellt. Anschließend wurden 10 µl der DNA-Lösung mit 38 µl Nuklease-freiem Wasser vermengt und 3,5 µl *NEBNext FFPE DNA Repair Buffer* (New

England Biolabs), 3,5 µl *Ultra II End-Prep Reaction Buffer* (New England Biolabs), 3 µl *Ultra II End-Prep Enzyme Mix* (New England Biolabs) sowie 2 µl *NEBNext FFPE DNA Repair Mix* (New England Biolabs) hinzu pipettiert. Die Mischung wird gut gemischt, in ein 0,2 ml PCR-Röhrchen übertragen und in einem Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Österreich) für 5 Minuten bei 20°C und dann für weitere 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch in ein 1,5 ml-Röhrchen transferiert und 60 µl magnetische *AMPure XP Beads* (Beckman Coulter) hinzugegeben und gemischt. Danach wurde das Röhrchen an einem Hula-Mixer befestigt und die Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur durch Rotation gemischt. Zum Abscheiden der an die magnetische *AMPure XP Beads*-gebundene DNA wurde das Röhrchen in ein Magnetgestell verbracht und solange inkubiert, bis die Flüssigkeit klar wurde und ein Pellet entstanden war. Die klare Flüssigkeit wurde abpipettiert und das Pellet mit 200 µl 70%igem Alkohol gewaschen, dieser wurde wieder abpipettiert. Nach Wiederholung des Alkoholwaschschriffs wurde das Pellet getrocknet, 10 Sekunden zentrifugiert, das Röhrchen wieder im Magnetgestell platziert und der restliche Alkohol abpipettiert. Nun wurde das Pellet mit 25 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Röhrchen mit dem Gemisch verweilte dann wieder im Magnetgestell, bis die Flüssigkeit klar war. Diese wurde abpipettiert und in ein neues Röhrchen gegeben. Danach folgte die Messung der DNA mit dem NanoDrop 2000-Messgerät.

#### **2.4.2 Barcode-Ligation**

Zunächst wurden 750 ng der reparierten DNA in ein neues Röhrchen transferiert und auf ein Endvolumen von 22,5 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Danach wurden 2,5 µl *Barcode* (Oxford Nanopore Technologies) und 25 µl *Blunt/TA Ligase Master Mix* (New England Biolabs) zur Verbesserung der Ligation zugegeben, die Probe gut vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl *AMPure XP Beads* (Beckman Coulter) wurde die Suspension für 5 Minuten unter Einsatz des Hula Mixers gemischt. Im Anschluss wurde die DNA-Lösung herunter 10 Sekunden zentrifugiert und in das Magnetgestell verbracht. Die klare Flüssigkeit wurde abpipettiert und das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Wiederholung des Waschschriffs wurde der restliche Alkohol entfernt und das Pellet kurz getrocknet. Dann wurde das Röhrchen vom Magnetgestell genommen, das Pellet in 26 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Röhrchen zur Abtrennung der DNA von den *AMPure XP Beads* nochmal in das Magnetgestell gesteckt und schließlich das klare DNA-Eluat entnommen. Es folgte eine weitere NanoDrop-Messung.

### 2.4.3 Adapter-Ligation und Aufreinigung

Zunächst wurden bis zu sechs der Barcode-ligierten Sequenzier-Bibliotheken zu gleichen Teilen auf eine Endkonzentration von 750 ng in 65 µl gepoolt. Danach wurden 5 µl *Adapter Mix II* (Oxford Nanopore Technologies), 20 µl *NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer* (New England Biolabs) und 10 µl *Quick T4 DNA Ligase* (New England Biolabs) hinzu pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 µl *AMPure XP Beads* (Beckman Coulter) zugegeben und die Suspension im Hula Mixer für 5 Minuten gemischt. Im Anschluss wurde das Röhrchen in das Magnetgestell gesteckt und die klare Flüssigkeit abpipettiert. Das Pellet wurde nun in 250 µl *Short Fragment Buffer* (Oxford Nanopore Technologies) resuspendiert, wieder zurück auf den Magneten gestellt und der Überstand abpipettiert, sobald die Flüssigkeit klar war. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Das Röhrchen wurden anschließend runterzentrifugiert, zurück auf den Magneten gestellt und die restliche Flüssigkeit abpipettiert. Das Pellet wurde kurz getrocknet und schließlich in 15 µl Elutionspuffer resuspendiert. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Röhrchen nochmals auf den Magneten gestellt und das Eluat nach Abtrennung der *AMPure XP Beads* in ein neues Röhrchen pipettiert. Abschließend folgte die NanoDrop-Messung.

Die weiteren Untersuchungsmethoden wurden von Mitarbeiter:innen und dem Leiter der Arbeitsgruppe Klinische Mikrobiologie und Diagnostik am Institut für Mikrobiologie durchgeführt und werden daher zusammengefasst dargestellt.

### 2.5 Nanoporen-Sequenzierung und Hybrid-Assemblierung

Die Genomsequenzierung der 28 *M. bovis*-Stämme wurde unter Einsatz der Nanoporen-Sequenzierungstechnologie an einer MinION-Plattform (Oxford Nanopore, Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Fließzelle für die nachfolgende Sequenzierung vorbereitet (*Priming*) und schließlich 75 µl der mit Sequenzierungspuffer und *Loading Beads* vermengten DNA-Bibliothek in das Fließzellen-Portal getropft. Es folgte die Sequenzierung für ca. 50 Stunden mit Echtzeit-*Basecalling*, *Demultiplexing* und Rohdatengewinnung unter Einsatz der MinKNOW-Software. Die dabei generierten langen *Reads* wurden schließlich mit den in vorangegangenen Studien ermittelten kurzen Illumina-*Reads* in der Unicycler-Pipeline (<https://github.com/rrwick/Unicycler/>) hybridassembliert. Hierbei konnten von allen 28 *M. bovis*-Stämmen geschlossene Genome generiert werden.

### 2.6 Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung

Zur Etablierung eines an die österreichische *M. bovis*-Population angepassten Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung (cgMLST) Schemas wurden zunächst das veröffentlichte Referenzgenom des österreichischen Ausbruchstamms 1E2007VVBG (CP119269) und die im

Rahmen dieser Diplomarbeit erzeugten Gesamtgenome der 28 *M. bovis*-Stämmen in das Ridom SeqSphere+ Software-Programm (Ridom GmbH, Deutschland) geladen. Danach folgte die Auswahl von cgMLST-tauglichen Zielgenen unter Einsatz des Ridom Target-Definer-Tools mit Standardfilterfunktionen. Nach paarweisem Vergleich der Zielgene (Referenzgenom versus 28 Abfragegenome) wurden nur jene Zielgene in das endgültige cgMLST-Schema aufgenommen, die eine Sequenzidentität von >90 % und eine vollständige Überlappung aufwiesen. Nach diesen Entwicklungsschritten wurden schließlich alle 121 österreichischen *M. bovis*-Stämme mithilfe der neuetablierten cgMLST typisiert und hierbei individuelle Allelprofile erzeugt. Zeitgleich wurden die *M. bovis*-Stämme mittels systemintegrierter 7-Lokus-MLST (PubMLST, Register et al. 2020) analysiert und definierten Sequenztypen zugeordnet. Abschließend wurde zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse ein Neighbour-Joining-Stammbaum (Funktion der Ridom SeqSphere+ Software) konstruiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 DNA-Extraktion

Die aus klonalen Populationen gewonnenen DNA-Extrakte erfüllten bei 25 *M. bovis*-Stämmen auf Anhieb die für die Nanoporen-Sequenzierung geltenden Konzentrations- und Qualitätskriterien. Bei einem Stamm (3088NOE20L) musste die DNA-Extraktion wiederholt werden, bei zwei weiteren Stämmen (24NOE20L, 385STM16L) entsprachen erst die DNA-Extrakte des 3. Ansatzes den erforderlichen Qualitätskriterien. Folgende Kriterien mussten dabei erfüllt sein: DNA-Konzentration  $\geq 40$  ng/ $\mu$ l, Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm (Nukleinsäure) zu 280 nm (Proteine, Phenole) = 1,8-2,4 und Absorptionsverhältnis bei den Wellenlängen 260 nm (Nukleinsäuren) zu 230 nm (organische Substanzen)  $\geq 2,0$ .

Tabelle 2: Die aus klonalen *Mycoplasma bovis* Populationen gewonnenen DNA-Extrakte mit Konzentrations- (ng/ $\mu$ l) und Absorptionsverhältniswerten bei 260/280 nm und 260/230 nm

Stammnummer	ng/ $\mu$ l	260/280	260/230
MOLL2VBG09M	490,8	2,32	2,00
39BLD10L	1057,0	2,31	2,04
1264TIR10S	763,1	2,36	2,60
1395OOE10L	1102,4	2,37	2,57
299TIR11M	1239,1	2,32	2,29
8NOE13L	617,1	2,28	2,46
24 NOE13L	860,9	2,23	2,49
85STM14M	42,2	2,18	2,15
320BNOE16P	2177,1	2,35	2,51
385STM16L	445,0	1,93	2,39
60NOE17G	1081,6	2,17	2,37
401OOE17O	678,7	2,39	2,50
1172NOE17L	1188,7	2,34	2,52
2951OOE17L	1231,5	2,33	2,58
3539NOE17L	1483,7	2,32	2,51
3735OOE17M	311,9	2,26	2,09
3985OOE17L	674,8	2,37	2,44
141OOE18L	1415,0	2,35	2,47
2199STM18L	360,6	2,27	2,20
3230NOE18L	1217,8	2,30	2,36

3519NOE18L	1180,7	2,23	2,52
3534OOE18L	1542,2	2,32	2,21
3915OOE18L	926,3	2,11	2,39
3964OOE18L	176,5	2,26	2,33
4377OOE19N	1062,4	2,21	2,42
2987NOE20L	1013,0	2,20	2,37
3088NOE20L	304,1	2,06	2,22
3654SZB20L	892,8	2,32	2,51

### 3.2 Nanoporen-Sequenzierung und Hybrid-Assemblierung

Mithilfe der Nanoporen-Sequenzierung und nachfolgenden Hybrid-Assemblierung (lange Nanoporen-Reads mit kurzen Illumina-Reads) konnten von allen 28 *M. bovis*-Stämmen geschlossene Genome generiert werden. Die Genome wiesen Längen von 1.024.300 bis 1.135.513 Basen und einen G + C Gehalt von 29-29,3 % auf.

### 3.3 Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung

Bei der Neuetablierung eines an die österreichische Erregerpopulation angepassten cgMLST-Verfahrens wurden insgesamt 495 Zielgene (58 % der 857 kodierenden Sequenzen des Referenzgenoms) als cgMLST-tauglich ermittelt und in das endgültige cgMLST-Schema aufgenommen.

Mithilfe der cgMLST konnten die untersuchten *M. bovis*-Stämme in zwei Gruppen, nämlich in ein Hauptcluster A (113 österreichische *M. bovis*-Stämme) und ein Hauptcluster B (acht österreichische *M. bovis*-Stämme und Typstamm PG45<sup>T</sup>), unterteilt werden. Das Hauptcluster A ließ sich wiederum in zwei Subgruppen, Subcluster A1 (vier österreichische *M. bovis*-Stämme) und A2 (109 österreichische *M. bovis*-Stämme), unterteilen. Somit konnte die überwiegende Mehrheit (90 %) der untersuchten österreichischen *M. bovis*-Stämme dem Subcluster A2 zugeordnet werden. Während die im Hauptcluster B und Subcluster A1 gruppierten *M. bovis*-Isolate ausschließlich aus dem Respirationstrakt niederösterreichischer (B [Jahre 2010, 2020, 2023]), oberösterreichischer (A1 [Jahre 2017, 2018, 2022], B [Jahre 2012, 2022]) und burgenländischer (B [Jahr 2010]) Rinder stammten, waren im Subcluster A2 *M. bovis*-Stämme aus dem gesamten Bundesgebiet und aus unterschiedlichen Körperregionen (Respirationstrakt, Ohr, Gelenk, Euter, seröse Häute) sowie aus den Jahren 2007 bis 2022 vertreten (Abb. 1).

Mithilfe der klassischen 7-Lokus MLST konnte die überwiegende Mehrheit der untersuchten *M. bovis*-Stämme dem Sequenztyp ST21 (n= 95; 74 % der untersuchten *M. bovis*-Isolate) zugeordnet werden, wobei dieser Sequenztyp ausschließlich im Subcluster A2 auftrat.

Daneben konnten im Subcluster A2 vier *M. bovis*-Isolate dem Sequenztyp ST218 (Niederösterreich, 2020), sieben *M. bovis*-Stämme dem Sequenztyp ST182 (Oberösterreich, 2018, 2022; Niederösterreich, 2020, 2021) und jeweils ein *M. bovis*-Isolat den Sequenztypen ST96 (Niederösterreich, 2013), ST206 (Niederösterreich, 2013), ST209 (Oberösterreich, 2017) sowie ST19 (Niederösterreich, 2021) zugeordnet werden. Im Hauptcluster B waren wiederum drei Stämme dem Sequenztyp ST8 (Burgenland, 2010; Niederösterreich, 2010; Oberösterreich 2012), fünf Stämme dem Sequenztyp ST4 (Niederösterreich 2020, 2023; Oberösterreich 2022) und der Typstamm PG45<sup>T</sup> dem Sequenztyp ST12 zuordenbar. Letztlich konnten die vier, ausschließlich aus Oberösterreich stammenden *M. bovis*-Isolate des Subclusters A1 als Sequenztyp ST26 (2017), ST207 (2017), ST217 (2018) und ST208 (2022) identifiziert werden (Abb. 1).

Bei genauerer Betrachtung von Subcluster A2 konnten drei weitere Subgruppierungen (A2a, A2b, A2c) festgestellt werden (Abb. 2). Dabei waren in der Subgruppe A2a ausschließlich *M. bovis*-Stämme (n=17) des Sequenztyps ST21 vertreten, die aus oberösterreichischen und niederösterreichischen Rindern in den Jahren 2014 bis 2022 isoliert werden konnten. Gleichwohl waren alle *M. bovis*-Stämme der Subgruppe A2c (n=12) dem Sequenztyp ST21 zuordenbar, wobei diese Stämme erstmalig 2014 in der Steiermark auftraten und sich infolge in die benachbarten Bundesländer (Niederösterreich, Oberösterreich, Burgenland) ausbreiten konnten. Der letztmalige Nachweis dieser Stammvariante (A2c) gelang 2019 in einem burgenländischen Rinderbetrieb. Die Subgruppe A2b stellt sich im Stammbaum als zentrale Kerngruppe dar. Sie beinhaltet insgesamt 72 *M. bovis*-Stämme von denen 59 (82 %), inklusive der drei Index-Stämme (Ausbruchs isolate aus dem Jahre 2007, Vorarlberg) dem Sequenztyp ST21 zugordnet werden konnten. Diese *M. bovis*-Isolate des Sequenztyps ST21 der Subgruppe A2b stammten aus unterschiedlichen Körperregionen und konnten bundesweit im Zeitraum 2007 bis 2022 isoliert werden. Die restlichen Isolate gehörten, wie bereits in der Übersicht erläutert, zu den Sequenztypen ST218 (vier Isolate aus Niederösterreich, 2020), ST182 (sieben Isolate aus Oberösterreich, 2018, 2022 und Niederösterreich, 2020, 2021), ST96 (ein Isolat aus Niederösterreich, 2013) und ST206 (ein Isolat aus Niederösterreich, 2013) (Abb. 2).

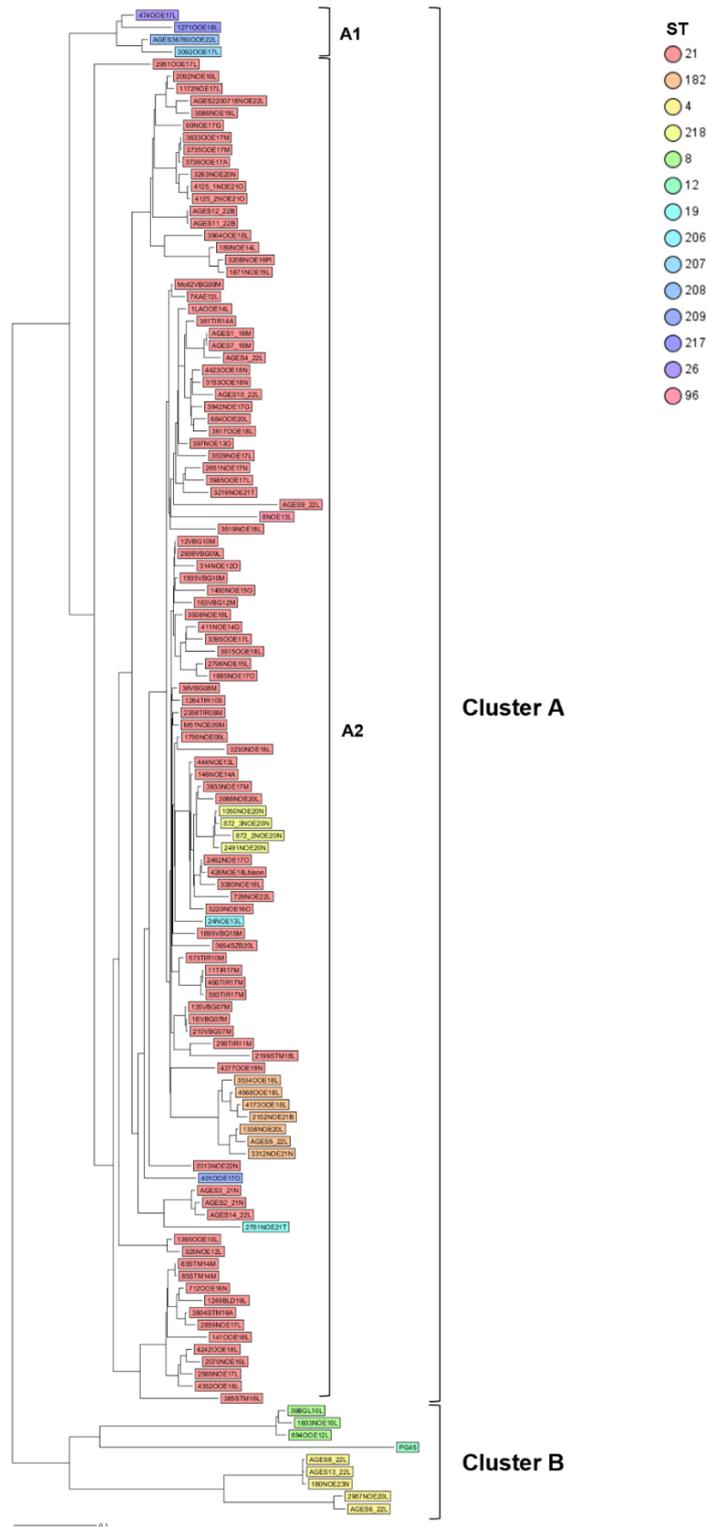


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von 121 österreichischen *M. bovis*-Isolaten und dem Typstamm PG45<sup>T</sup>, basierend auf Allel-Profilen von 495 cgMLST-Zielgenen, mit Bildung von Haupt- (A, B) und Subclustern (A1, A2), sowie Zuordnung der Stämme zu Sequenztypen (7-Lokus MLST).

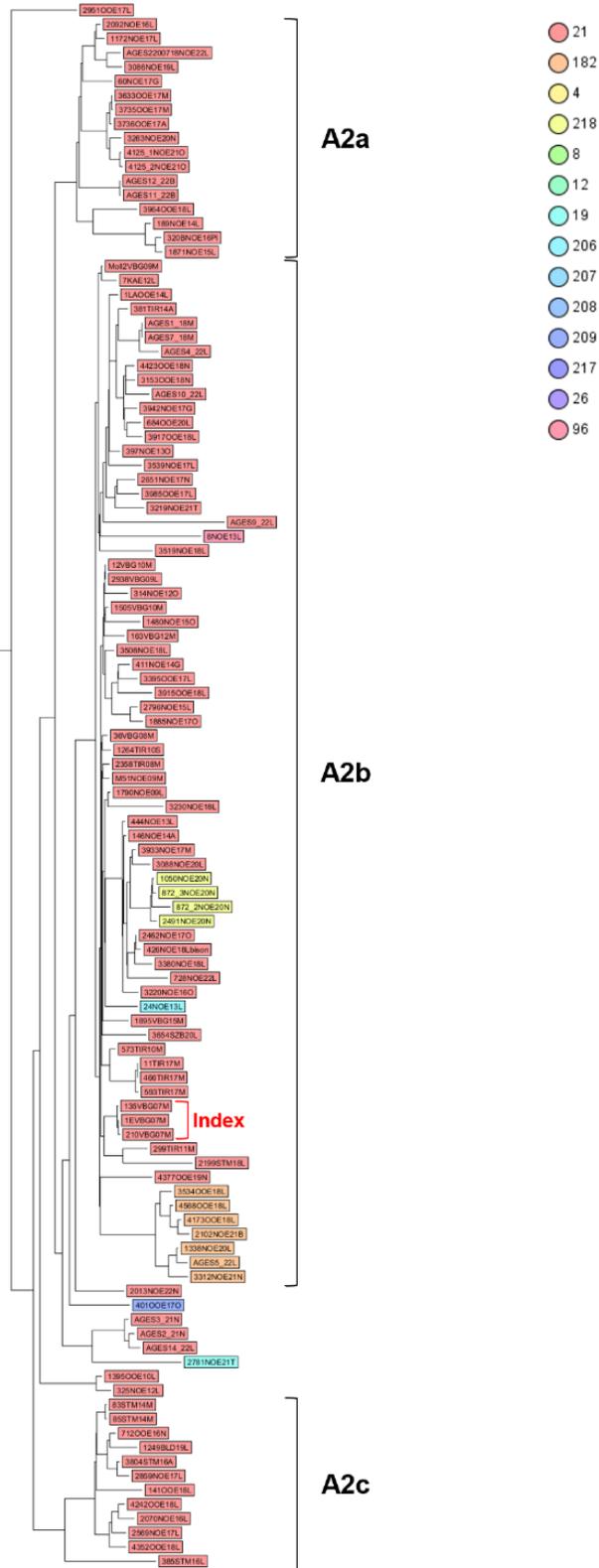


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum von 109 österreichischen *M. bovis*-Isolaten des Subclusters A2 mit Bildung der Subgruppen A2a, A2b (Kerngruppe, inklusive Index-Stämme) und A2c, sowie Zuordnung der Stämme zu Sequenztypen (7-Lokus MLST).

## 4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, durch den Einsatz eines hochauflösenden molekularen Typisierungsverfahrens tiefe Einblicke in die Infektionsepidemiologie von *M. bovis* in der österreichischen Rinderpopulation zu erhalten. Dafür wurde ein an die österreichische *M. bovis*-Erregerpopulation angepasstes cgMLST entwickelt und erstmalig an 121 österreichischen *M. bovis*-Stämmen, die im Zeitraum 2007 bis 2023 isoliert werden konnten, eingesetzt. Die infektionsepidemiologische Fragestellung beruht hierbei auf eine, nach einem verheerenden *M. bovis*-Ausbruch in einer almgesommerten Milchviehherde in Vorarlberg im Jahre 2007 [44], rasch zu beobachtende Erregerausbreitung über das gesamte Bundesgebiet mit endemischem Auftreten des Erregers bis zum heutigen Tag. Vor 2007 konnte der Erreger nur einmalig in einem niederösterreichischen Rinderbetrieb ohne weitere Ausbreitungstendenz in benachbarte Betriebe nachgewiesen werden [44]. Erste Untersuchungen zur Infektionsepidemiologie von *M. bovis* unter Einsatz PCR-gestützter Typisierungsverfahren (RAPD, MLVA) deuteten auf die Ausbreitung eines einzigartigen Erregerklons, ausgehend vom Ausbruchsgeschehen im Jahre 2007, hin [6]. In rezenten Studien zur Abklärung infektionsepidemiologischer Fragestellungen zu *M. bovis* wurden jedoch vorrangig oder ausschließlich Sequenz-gestützte Typisierungsverfahren wie die konventionelle 7-Lokus-MLST [34, 35, 36, 33 37, 38, 39, 40] oder jüngst die hochauflösende, auf Gesamtgenomsequenzen basierende cgMLST [41, 42, 38, 43] eingesetzt. Auch bei anderen Mykoplasmenarten, wie *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. anserisalpingitidis* und *M. hyorhinis*, gilt die cgMLST durch ihr hohes Auflösungsvermögen heute als bevorzugtes Typisierungswerkzeug zu Abklärung von Ausbruchsgeschehen sowie zur Darstellung von Erregerpopulationsstrukturen und Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Erregerstämmen [45, 46, 47, 48].

In der vorliegenden Studie konnten die 121 österreichischen *M. bovis*-Stämme und der Typstamm PG45<sup>T</sup> in die beiden Hauptcluster A und B gruppiert werden. Diese phylogenetische Auftrennung von *M. bovis* in eine dem Typstamm PG45<sup>T</sup> verwandtschaftlich nahestehenden (Hauptcluster B) und in eine seit der Jahrtausendwende aufkommenden und derzeit in Frankreich, in den nordischen Ländern und im alpinen Raum dominierenden Erregerpopulation (Hauptcluster A), konnte bereits in einigen früheren Studien festgestellt werden [35, 37, 42]. Bei den im Hauptcluster B gruppierten Stämmen des Sequenztyps ST8 (n=3), die im Voralpengebiet in den Jahren 2010-2012 isoliert werden konnten, könnte es sich um Reliktstämme aus der früher in Europa dominierenden Erregerpopulation handeln. Von einem solchen kurzzeitigen Wiederauftreten von Stämmen der verdrängten Typstamm-assoziierten *M. bovis*-Klade wurde auch in Frankreich berichtet [42]. Ob es sich bei der in den letzten Jahren (2020-2023) in Ober- und Niederösterreich nachgewiesenen Stämmen des

Sequenztyps ST4 (n=5; Hauptcluster B) um dasselbe Phänomen des kurzzeitigen Wiederauftretens von Stämmen der alten *M. bovis*-Klade handelt, kann erst in zukünftigen Studien ermittelt werden.

Über 93 % der 121 österreichischen *M. bovis*-Stämme konnten dem Hauptcluster A zugeordnet werden, der sich wiederum in einen kleinen, aus vier Stämmen bestehenden Subcluster A1 und in einen großen Subcluster A2 (109 Stämme) unterteilen ließ. Während die vier Subcluster A1-Stämme zu vier unterschiedliche Sequenztypen gehörten, konnte eine überwiegende Mehrheit (74 %) der Subcluster A2-Stämme dem Sequenztyp ST21 zugeordnet werden, welcher in allen Bundesländern (Ausnahme Wien) und im Zeitraum 2007-2022 auftrat. Sequenztyp ST21 ist ein in der westlichen Hemisphäre vorkommender Erregerklon, der bisher als nicht dominierender Sequenztyp bei Rindern in den USA, in Canada, Schweiz, Ungarn, Rumänien und Israel nachgewiesen werden konnte [40; [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)]. Das plötzliche Auftreten, die Ausbreitungsdynamik und Persistenz von ST21 in der österreichischen Rinderpopulation ist einzigartig und weltweit mit keinem *M. bovis*-infektionsepidemiologischen Szenario vergleichbar. Die kleinbäuerliche Struktur und der lokal begrenzte Tierhandel könnte für die stete Ausbreitung von ST21 mitverantwortlich sein. Die Ausbreitung und Persistenz des Sequenztyps wird vor allem durch kurze Asttiefen und somit geringe Allel-Distanz zwischen ST21-Stämmen in der Kerngruppe A2b verdeutlicht. Auffallend ist auch das singuläre oder zeitlich und lokal begrenzte Auftreten von neuen, dem ST21 verwandtschaftlich nahestehenden Sequenztypen (ST182, ST218), die sich augenscheinlich durch Punktmutationen in einem der sieben Haushaltsgene (7-Lokus-MLST) aus ST21 entwickelt haben. Ein zeitlich und lokal begrenztes Auftreten von Subgruppen (A2a, A2c) ließ sich auch innerhalb der ST21-Erregerpopulation darstellen. Ein Zusammenhang zwischen dem plötzlichen Auftreten dieser aus und innerhalb von ST21 entstanden Erregerstämmen und dem Schweregrad ausgelöster Krankheitssymptome wird vermutet und konnte bereits für Subgruppe A2c dokumentiert werden [49].

Insgesamt konnten durch die Anwendung eines neuentwickelten und an die österreichische *M. bovis*-Erregerpopulation angepassten cgMLST-Schemas detaillierte Einblicke in die Infektionsepidemiologie und Populationsstruktur von *M. bovis* in der österreichischen Rinderpopulation gewonnen werden. Der Einsatz dieses hochauflösenden Typisierungsverfahrens in zukünftigen infektionsepidemiologischen Studien zu *M. bovis* in Österreich, sowie in Ausbruchsanalysen und Überwachungsprogrammen ist zu empfehlen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4): 1094–1156.
2. Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews* 83: 417–432.
3. Dudek K., Nicholas R. A. J., Szacawa E., Bednarek D. 2020. *Mycoplasma bovis* Infections- Occurrence, diagnosis and control. *Pathogens* 9(8): 640.
4. Cantón G., Llada I., Margineda C., Urzizbiría F., Fanti S., Sciolo V., Fiorentino M. A., Uriarte E. L., Morrell E., Sticotti E., Tamiozzo P. 2022. *Mycoplasma bovis*-pneumonia and polyarthritis in feedlot calves in Argentina: First local isolation. *Revista Argentina de Microbiología* 54(4): 299–304.
5. Hale. H. H. Helmboldt C. F., Plastridge W. N., Stula E. F. 1962. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *The Cornell Veterinarian*, 52: 582–591.
6. Spergser J., Macher K., Kargl M., Lysnyansky I., Rosengarten, 2013: Emergence, re-emergence, spread and host species crossing of *Mycoplasma bovis* in the Austrian Alps caused bei a single endemic strain. *Veterinary Microbiology* 164(3-4): 299–306.
7. McDaniel A. J., Derscheid R. J. 2021. MALDI-TOF mass spectrometry and high-resolution melting PCR for the identification of *Mycoplasma bovis* isolates. *BMC Veterinary Research* 17: 170.
8. Wise K. S., Calcutt M. J., Foecking M. F., Röske K., Madupu R., Methé B. A. 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523). *Infection and Immunity* 79(2): 982-983.
9. 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 renerated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. *Infection and Immunity* 62(11): 5066–5074.
10. Bürki S., Frey J., Pilo P. 2015. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology* 179: 15–22.
11. Sachse K., Helbig J. H., Lysanyansky 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(2): 680–687.

12. Zou X., Li Y., Zhou Y., Liu Y., Xin J. 2013. Molecular cloning and characterization of a surface-localized adhesion protein in *Mycoplasma bovis* Hubei-1 strain. PLoS One 8(7): e69644.
13. Adamu J. Y., Mitiku F., Hartley C. A., Sansom F. M., Marena M. S., Markham P. F., Browning G. F. 2020. *Mycoplasma bovis* mbfN encodes a novel LRR lipoprotein that undergoes proteolytic processing and binds host extracellular matrix components. Journal of Bacteriology 203(2): e00154-20.
14. Chen X., Huang J., Zhu H., Guo Y., Khan F. A., Menghwar H., Zhao G., Guo A. 2018. P27 (MBOV\_RS03440) is a novel fibronectin binding adhesin of *Mycoplasma bovis*. International Journal of Medical Microbiology 308: 848–857.
15. Zhao G., Zhang H., Chen X., Zhu X., Guo Y., He C., Khan F. A., Chen Y., Hu C., Chen H., Guo A. 2017. *Mycoplasma bovis* NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O<sub>2</sub> reducing enzyme and an adhesin. Scientific Reports 7(1): 44.
16. Song Z., Li Y., Liu Y., Xin J., Zou X., Sun W. 2012.  $\alpha$ -Enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis*. PLoS One 7(6): e38836.
17. Huang J., Zhu H., Wang J., Gu Y., Zhi Y., Wie H., Li H., Guo A., Liu D., Chen X. 2019. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase is involved in *Mycoplasma bovis* colonization as fibronectin-binding adhesin. Research in Veterinary Science 124: 70–78.
18. Guo Y., Zhu H., Wang J., Huang J., Khan F. A., Zhang J., Guo A., Chen X. 2017. TrmFO, a fibronectin-binding adhesin of *Mycoplasma bovis*. International Journal of Molecular Science 18(8): 1732.
19. Khan L. A., Miles R. J., Nicholas R. A. J. 2005. Hydrogen peroxide production of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalacticae* and effect of in-vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Veterinary Research Communications 29: 181–188.
20. 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(1): 53.
21. McAuliffe L., Ellis R. J., Miles K., Ayling R. D., Nicholas R. A. J. 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. Microbiology 152: 913–922.

22. Wang Y., Liu S., Li Y., Wang Q., Shao J., Chen Y., Xin J., 2016. *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 $\beta$  production through the NF- $\kappa$ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. *Developmental and Comparative Immunology* 55: 111–118.
23. Askar H., Chen S., Hao H., Yan X. Ma L., Liu Y., Chu Y. 2021. Immune evasion of *Mycoplasma bovis*. *Pathogens* 10(3): 297.
24. Parker A. M., Sheehy P. A., Hazelton M. S., Boswars K. L., House J. K. 2018 A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32(3): 1241–1252.
25. Pereyre S., Tardy F., Renaudin H., Cauvin E., Del Prá Netto Machado L., Tricot A., Benoit F., Treilles M., Bébéar 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(10): 3314–3323.
26. Spergser J., Hess C., Loncaric I., Ramírez, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 57(9): e00316-19.
27. Calcutt M. J., Lysnyanski J., Sachse K., Fox L. K., Nicholas R. A. J., Ayking R. D. 2017. Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: An aid to identify future development requirements. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, Suppl. 1: 91–109.
28. Gautier-Bouchardon A.V. 2018: Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiology Spectrum* Vol. 6(4): 10.1128.
29. Maunsell F. P., Woolums A. R., Francoz D., Rosenbusch R. F., Step D. L., Wilson D. J., Janzen E. D. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25(4): 772–783.
30. Perez-Casal J., Prysljak T., Maina T., Suleman M., Jimbo S. 2017: Status of the development of a vaccine against *Mycoplasma bovis*. *Vaccine* Vol. 35(22): 2902–2907.
31. Dudek K., Nicholas R. A. J., Szacawa E., Bednarek D. 2020. *Mycoplasma bovis* Infections-Occurrence, diagnosis and control. *Pathogens* 9(8): 640.
32. Sulyok K. M., Kreizinger Z., Fekete L., Jánosi S., Schweitzer N., Turcsány I., Makrai L., Erdélyi 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.
33. Register K., Lysnyansky I., Jelinski M. D., Boatwright W. D., Waldner M., Bayles D. O., Pilo P., Alt D. P. 2020 Comparison of two multilocus sequence typing schemes for *Mycoplasma*

*bovis* and revision of the PubMLST reference method. *Journal of Clinical Microbiology* 58(6): e00283-20.

34. 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. *The Veterinary Journal* 197(2): 286–290.

35. Becker A. M., Thibault F. M., Arcangiolo 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.

36. 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.

37. Bürki S., Spargser 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: 62–66.

38. 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): e0004421.

39. Menghwar H., Prysliak T., Perez-Casal, 2021: Phylogeny of *Mycoplasma bovis* isolates from cattle and bison based on multi locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem repeats. *Veterinary Microbiology* 258: 109124.

40. García-Galán A., Baranowski E., Hygonenq M.-C., Walch M., Croville G., Citti C. De la fe C., Nouvel L.-N. 2022. Genome mosaicism in field strains of *Mycoplasma bovis* as footprints of in-host horizontal chromosomal transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 88(1): e0166121.

41. Haapala V., Pohjanvirta T., Väkänikkilä 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.

42. Tardy F., Aspan A., Autio T., Ridley A., Tricon A., Colin A., Pohjanvirta T., Smid B., Harders F., Lindegaard M., Lauritsen K. T., Lyhs U., Wisselinks H. J., Strube M. L. 2020. *Mycoplasma bovis* in nordic European countries: Emergence and dominance of a new clone. *Pathogens* 9(11): 875.

43. Menghwar H., Guo A., Chen Y., Lysnyansky I., Parkerf A, Prysliak T., Perez-Casal J., 2022: A core genome multilocus sequence typing (cgMLST) analysis of *Mycoplasma bovis* isolates. *Veterinary Microbiology* 273: 109532.
44. Baumgartner M., Winter P., Rosengarten R., Spargser J. 2006. First report of a highly contagious mastitis in an Austrian dairy herd caused by *Mycoplasma (M.) bovis* and *M. bovigenitalium*. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 93:18–25.
45. Ghanem, M., El-Gazzar, M., 2018. Development of a *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. *Veterinary Microbiology* 218: 84–89.
46. 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*. *Journals of Clinical Microbiology* 56: 1–11.
47. 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 anserisalpingitidis*. *BMC Genomics* 21: 1–8.
48. 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.
49. Pothmann H., Spargser 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.

## 6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Für die Nanoporen-Sequenzierung ausgewählte *M. bovis*-Isolate

Tabelle 2: Die aus klonalen Populationen gewonnenen DNA-Extrakte mit Konzentrations- (ng/μl) und Absorptionsverhältnisswerten bei 260/280 nm und 260/230 nm

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von 121 österreichischen *M. bovis*-Isolaten und dem Typstamm PG45<sup>T</sup>, basierend auf Allel-Profilen von 495 cgMLST-Zielgenen, mit Bildung von Haupt- (A, B) und Subclustern (A1, A2), sowie Zuordnung der Stämme zu Sequenztypen (7-Lokus MLST).

Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum von 109 österreichischen *M. bovis*-Isolaten des Subclusters A2 mit Bildung der Subgruppen A2a, A2b (Kerngruppe, inklusive Index-Stämme) und A2c, sowie Zuordnung der Stämme zu Sequenztypen (7-Lokus MLST).