

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Mikrobiologie

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

**Genomische und massenspektrometrische Typisierung von
Mycoplasma cynos-Isolaten aus dem caninen Respirations- und
Urogenitaltrakt**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Antonia Becker

Wien, im Jänner 2024

Betreuer: Priv.-Doz. Dr.med.vet. Joachim Spergser, Dipl.ECVM
Institut für Mikrobiologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet Christine Aurich, Dipl.ECAR

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Preding, den 19.01.2024


Antonia Becker

ZUSAMMENFASSUNG

Mycoplasma (M.) cynos zählt zu den Mitverursachern der Caninen Infektiösen Tracheobronchitis und gilt als die pathogenste Art der beim Hund auftretenden Mykoplasmen. Ursprünglich wurde *M. cynos* als häufiger Besiedler der Schleimhäute der oberen Atemwege beschrieben, wohingegen der Erreger in den letzten Jahren vorrangig im Urogenitaltrakt von Hunden isoliert wird. Ziel dieser Diplomarbeit war es daher, die phäno- und genotypischen Eigenschaften von *M. cynos*-Isolaten aus dem caninen Respirations- und Urogenitaltrakt zu bestimmen und zu vergleichen, um dabei die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Stämme darzulegen.

Insgesamt wurden 55 *M. cynos*-Isolate analysiert, wobei zehn davon aus dem Respirationstrakt von Hunden, 43 aus dem Urogenitaltrakt von Hunden und zwei aus dem Harn von Wölfen stammten. Für die Genotypisierung wurde nach Gesamtgenomsequenzierung der Isolate ein neuetabliertes Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierungsschema (cgMLST) eingesetzt und zur phänotypischen Charakterisierung die ‚Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation mit Flugzeitanalyse‘ Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS). Zur grafischen Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse wurde aus den mittels MALDI-ToF MS generierten Spektren ein Distanz-Dendrogramm und aus den Ergebnissen der cgMLST ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Mithilfe der MALDI-ToF MS konnten die Isolate zwar in vier Gruppen eingeteilt werden, allerdings wiesen die Stämme der einzelnen Gruppen bis auf die höhere Übereinstimmung der generierten Massenspektren keine weiteren Gemeinsamkeiten auf. Im phylogenetischen Stammbaum, basierend auf cgMLST-Allel-Profilen, konnte eine hohe Diversität mit weitreichender Alleldistanz zwischen epidemiologisch nicht zusammenhängenden *M. cynos*-Stämmen ermittelt werden. Daneben gelang aber auch die Gruppierung einzelner Isolate von Tieren, die in demselben Haushalt bzw. in derselben Umgebung lebten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Hunde oder Wölfe, die engen Kontakt zueinander haben, naheverwandte oder sogar klonal-verwandte *M. cynos*-Stämme in sich tragen. Eine Organsystem-assoziierte Gruppierung der untersuchten Stämme war aber auch mittels cgMLST nicht erkennbar. Aufgrund ihres hervorragenden Auflösungsvermögens eignet sich die neuentwickelte cgMLST dennoch bestens für epidemiologische Untersuchungen und für die Aufklärung komplexer epidemiologischer Fragestellungen.

ABSTRACT

Mycoplasma (M.) cynos is considered a contributing cause of canine infectious tracheobronchitis and is known to be the most pathogenic species of canine mycoplasmas. Previously, *M. cynos* was described to primarily colonize the mucous membranes of the upper respiratory tract, however, in recent years, the pathogen has been more frequently determined in the urogenital tract of dogs. Therefore, this diploma thesis aimed to determine and compare the phenotypic and genotypic characteristics of *M. cynos* strains isolated from the canine respiratory and urogenital tract and to delineate the relationship between the strains investigated.

A total of 55 *M. cynos* strains were analyzed comprising ten strains isolated from the respiratory tract of dogs, 43 from the urogenital tract of dogs and two strains from urine samples of wolves. For genotyping a newly established core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme was applied on whole genome sequences whereas for phenotypic characterization 'matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight' (MALDI-ToF) mass spectrometry was employed. To illustrate the relationship between the analyzed strains a distance dendrogram was created based on mass spectra generated by MALDI-ToF and a phylogenetic tree constructed from the results of cgMLST. In the MALDI-ToF distance dendrogram, the isolates were divided into four groups; however, the grouped strains did not share any similarities other than a higher concordance between their mass spectra. In the phylogenetic tree based on allelic profiles resulting from cgMLST, epidemiologically unrelated *M. cynos* strains were shown to be highly diverse whereas strains from animals living in the same household or environment grouped together. From these results, it can be concluded that dogs or wolves that have close contact with each other may harbor closely related or even clonally related *M. cynos* strains. Again, no grouping of strains based on their isolation site was observed using cgMLST. However, the newly established cgMLST scheme demonstrated to be highly discriminatory for the accurate differentiation of *M. cynos* strains and thus should be used in future epidemiologic investigations and to resolve complex epidemiologic issues.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	8
2. LITERATURÜBERSICHT	9
2.1. ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN VON MYKOPLASMEN.....	9
2.2. CANINE MYKOPLASMEN	10
2.3. <i>MYCOPLASMA CYNOS</i>	11
2.3.1. Canine Infektiöse Tracheobronchitis	12
2.3.2. Diagnostik von <i>Mycoplasma cynos</i> -Infektionen	13
2.3.3. Therapie von <i>Mycoplasma cynos</i> -Infektionen	14
2.4. TYPISIERUNG VON MYKOPLASMEN	14
3. MATERIAL UND METHODE	16
3.1. <i>MYCOPLASMA CYNOS</i> -ISOLATE.....	16
3.2. KULTIVIERUNG	18
3.3. ARTDIAGNOSE UND PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG MITTELS MALDI-TOF MASSENSPEKTROMETRIE.....	18
3.4. DNA-EXTRAKTION.....	19
3.5. ERSTELLUNG VON SEQUENZIER-BIBLIOTHEKEN.....	20
3.6. GENOMSEQUENZIERUNG.....	22
3.7. KERNGENOM-MULTILOKUS-SEQUENZTYPISIERUNG	23
4. ERGEBNISSE	25
4.1. PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG MITTELS MALDI-TOF MASSENSPEKTROMETRIE.....	25
4.2. PHYLOGENETISCHE ANALYSE MITTELS KERNGENOM-MULTILOKUS-SEQUENZTYPISIERUNG.....	25
5. DISKUSSION	28
6. LITERATURVERZEICHNIS	30

7.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	34
----	---	----

Abkürzungsverzeichnis

<i>B.</i>	<i>Bordetella</i>
BALF	Bronchoalveolar-Lavage-Flüssigkeit
bp	Basenpaare
cgMLST	<i>Core Genome Multilocus Sequence Typing</i>
kb	Kilobase
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MALDI-ToF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SP4-Medium	Spiroplasma 4-Medium
subsp.	Subspezies

1. Einleitung und Fragestellung

Mycoplasma (M.) cynos gilt weltweit als Mitverursacher der Caninen Infektiösen Tracheobronchitis, ein Krankheitskomplex, der umgangssprachlich auch als Zwingerhusten und im englischsprachigen Raum als Canine Infectious Respiratory Disease (CIRD) bekannt ist (1). Erstmals wurde der Erreger 1973 in der Lunge eines Hundes mit Pneumonie nachgewiesen, danach aber auch im Respirations- und Genitaltrakt sowohl von gesunden Hunden als auch von Hunden mit Atemwegserkrankungen (2, 3).

Der Zwingerhusten ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten beim Hund, dessen typisches Symptom ein milder bis stark ausgeprägter Husten ist. Zusätzlich kann je nach Schweregrad der Erkrankung auch eine Störung des Allgemeinbefindens auftreten.

Vorherige Studien beschäftigen sich hauptsächlich mit dem Vorkommen und der Pathogenität von *M. cynos* im Respirationstrakt (1). Der Erreger wurde zwar schon in einigen Studien im Sperma von Hunden nachgewiesen, allerdings wurde noch nicht bewiesen, ob er negative Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit hat (4, 5). Auch aus dem Urin wurde der Erreger schon isoliert, aber auch hier sind unzureichende Kenntnisse über die Rolle des Erregers als Auslöser von Erkrankungen des Harntrakts vorhanden (6).

Da der Erreger aber immer häufiger im Urogenitaltrakt von Hunden nachgewiesen wird, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Bestimmung und dem Vergleich der phäno- und genotypischen Eigenschaften von *M. cynos*-Isolaten aus dem caninen Respirations- und Urogenitaltrakt. Hierbei sollen unter Einsatz der MALDI-ToF MS und eines neu etablierten cgMLST-Schemas die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Stämme dargelegt und mögliche organsystemspezifische Eigenschaften ermittelt werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Allgemeine Eigenschaften von Mykoplasmen

Taxonomisch zählen die im Allgemeinen als Mykoplasmen bezeichneten Bakterien zum Phylum *Mycoplasmatota*, welches ausschließlich die Klasse *Mollicutes* beinhaltet. Innerhalb der Klasse *Mollicutes* gehören Mykoplasmen zur Ordnung *Mycoplasmatales*, zur Familie *Mycoplasmataceae* und zur Gattung *Mycoplasma*. Das wichtigste Merkmal der *Mollicutes* ist die Zellwandlosigkeit, womit diese Bakterien nur von einer Zellmembran umgeben sind. Dadurch können *Mollicutes* verschiedene Formen aufweisen, von kugel- und birnenförmig bis hin zu verzweigten Filamenten. Außerdem können sie durch das Fehlen der Zellwand bakterien-dichte Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm bis 0,45 µm passieren und sind deshalb gefürchtete Kontaminanten von Zellkulturen (7). Die geringe Zell- und Genomgröße sowie ein niedriger Anteil von Guanin und Cytosin (G+C) in der Basenzusammensetzung der DNA sind weitere Merkmale, die sie von anderen Bakterien unterscheiden (8).

Die Vertreter der Gattung *Mycoplasma*, die aus über 120 Arten besteht, weisen in etwa eine Zellgröße von 0,3-0,9 µm, eine Genomgröße von 580 (*M. genitalium*) bis 1360 Kilobasen (*M. penetrans*) und einen G+C-Gehalt von 24 (*M. mycoides*) bis 40 % (*M. pneumoniae*) auf. Mykoplasmen besiedeln vorwiegend die Schleimhäute des Atmungs- und Urogenitaltrakts, können aber auch im Oropharynx, auf den Bindehäuten, den serösen Häuten der inneren Körperhöhlen, in der Milchdrüse, den Gelenken sowie im Blut auftreten (9). Sie kommen in vielen Säugetieren, Vögeln und Reptilien vor und treten gelegentlich auch bei Fischen und Weichtieren auf. Viele Mykoplasmen sind harmlose Kommensale, während einige Arten als primäre und sekundäre Infektionserreger Erkrankungen wie Bronchopneumonie, Arthritis, Polyserositis, Mastitis, Konjunktivitis, Anämie und Entzündungen der Genitalschleimhäute auslösen können (10).

Aufgrund ihres reduzierten Genoms und der dadurch bedingten eingeschränkten Biosyntheseleistung sind Mykoplasmen auf eine exogene Nährstoffzufuhr angewiesen. Für die Kultivierung von Mykoplasmen werden daher nährstoffreiche Kulturmedien benötigt, die aus tierischem Eiweiß (Peptone, Tryptone), Seren, Hefeextrakt und weiteren wachstumsfördernden Komponenten bestehen. Zusätzlich werden zur Hemmung von zellwandtragenden Bakterien und Pilzen den Kulturmedien β-Laktam-Antibiotika und Thalliumazetat hinzugefügt (9). Auf Nährböden bilden Mykoplasmen nach zwei bis zehn-

tägiger Bebrütung unter aeroben oder mikroaeroben Bedingungen kleine, unter 1 mm große Kolonien aus. Unter mikroskopischer Betrachtung weisen diese Kolonien eine typische Spiegelei-ähnliche Form mit einer zentralen Erhebung und einer flacheren peripheren Zone auf. Außerdem wachsen die Kolonien nicht nur oberflächlich, sondern zentral auch unter der Agaroberfläche (7).

2.2. Canine Mykoplasmen

Im Jahr 1934 wurde das erste Mal über das Auftreten von Mykoplasmen bei Hunden berichtet. Insgesamt wurden in den letzten 70 Jahren mindestens 17 verschiedene Arten von Mykoplasmen aus Hunden isoliert bzw. bei ihnen nachgewiesen (10).

Mykoplasmen gehören zur Normalflora des oberen Respirationstraktes von Hunden, aber nur bei 20-25% der gesunden Hunde besiedeln sie auch die Trachea oder die Lungen. *M. cynos* gilt als einzige canine Mykoplasmenart, mit der experimentell entzündliche Veränderungen im Atmungstrakt ausgelöst werden konnten. Ebenso wurde der Erreger als primäre Ursache einer respiratorischen Erkrankung bei Welpen identifiziert (11). Des Weiteren tragen etwa 30-50% der männlichen und 23-75% der weiblichen Hunde verschiedene Mykoplasmen als Teil der Normalflora in ihrem Urogenitaltrakt (10). Dennoch wurden die Erreger gelegentlich mit entzündlichen Veränderungen der Harnröhre und der Genitalschleimhäute als auch mit Reproduktionsstörungen wie schlechten Empfängnisraten, embryonalem Fruchttod mit fötaler Resorption, Aborten und der Geburt lebensschwacher Welpen assoziiert. Dabei werden *M. canis* und *U. canigenitalium* am häufigsten mit Infertilität und Erkrankungen des Urogenitaltraktes in Verbindung gebracht (11, 12). Auch über das Auftreten von Mykoplasmen-assoziierten Mono- und Polyarthritiden bei Hunden wurde vereinzelt berichtet. In den meisten Fällen konnten dabei prädisponierende Faktoren wie eine immunsupprimierende Therapie, eine erworbene Immundefizienz oder Bissverletzungen festgestellt werden. Als Auslöser von Arthritiden gelten die Arten *M. edwardii* und *M. spumans*. *M. edwardii* konnte außerdem als Verursacher einer eitrigen Meningoenzephalitis bei einem jungen Hund identifiziert werden (11).

Tabelle 1: Canine Mykoplasmen, ihre primären Besiedelungshabitate und assoziierte Erkrankungen

Mykoplasmenart	Primärer Kolonisierungsort	Assoziierte Erkrankungen
<i>M. canis</i>	Urogenitaltrakt	Urethritis, Epididymitis, Orchitis, Vaginitis, Endometritis
<i>M. cynos</i>	Oberer Respirationstrakt	Canine infektiöse Tracheobronchitis, Bronchopneumonie, Pyothorax
<i>M. edwardii</i>	Oropharynx, Urogenitaltrakt	Polyarthritits, Meningoenzephalitis
<i>M. maculosum</i>	Urogenitaltrakt	unbekannt
<i>M. molare</i>	Urogenitaltrakt	unbekannt
<i>M. mucosicanis</i>	Urogenitaltrakt	unbekannt
<i>M. opalescens</i>	Urogenitaltrakt	unbekannt
<i>M. spumans</i>	Urogenitaltrakt, Oropharynx	Polyarthritits
<i>Candidatus M. haematoparvum</i>	Blut	Anämie

2.3. *Mycoplasma cynos*

Im Jahre 1973 wurde *M. cynos* als neue Mykoplasmenart bei Hunden beschrieben. Der Erreger wurde 1971 aus der Lunge eines Hundes, der an einer Lungenentzündung erkrankt war, isoliert (2). In weitere Folge konnte der Erreger im Respirations- und Genitaltrakt von

gesunden Hunden aber auch bei Hunden mit Atemwegserkrankungen nachgewiesen werden (3).

Bereits 1978 konnte anhand einer experimentellen Infektion aufgezeigt werden, dass *M. cynos* bei jungen Hunden Bronchitis, Peribronchitis und entzündliche Veränderungen im angrenzenden Lungengewebe hervorrufen kann (13). Des Weiteren wurde im Jahre 2007 eine natürlich auftretende primäre *M. cynos*-Infektion bei Golden Retriever-Welpen beschrieben, die zu fatalen Bronchopneumonien und Pleuritiden geführt hat (14). Generell zeigt sich, dass der Erreger eher bei jüngeren Hunden Atemwegserkrankungen hervorruft als bei älteren (1). Außerdem gilt *M. cynos* als Mitverursacher der Caninen Infektiösen Tracheobronchitis und ist dabei die einzige canine Mykoplasmenart, die im Zusammenhang mit dieser Erkrankung nachgewiesen wurde (1).

Über die Pathogenitätsfaktoren von *M. cynos* ist nur wenig bekannt. Neben einem Hämagglutinin, welches höchstwahrscheinlich als Bindungsmolekül den Kontakt des Erregers mit den Wirtszellen vermittelt (15), dürfte vor allem eine sezernierte Sialidase, die vermutlich für die bakterielle Kolonisierung und Gewebeinvasion verantwortlich ist, wesentlich zur Pathogenität und Virulenz von *M. cynos* beitragen (16).

Das bisher einzig bekannte vollständige Genom von *M. cynos* ist jenes vom Stamm C142. *M. cynos* C142 wurde aus der Trachea eines Hundes, der Symptome einer respiratorischen Erkrankung wie trockenen Husten und Nasenausfluss zeigte, in den USA isoliert. Das vollständige zirkuläre Genom besteht aus 998.123 bp mit einem durchschnittlichen G+C-Gehalt von 26 %. Es wurden 883 kodierende DNA-Sequenzen (CDS) ermittelt, von denen 491 eine funktionelle Identität zugewiesen wurde (17).

2.3.1. Canine Infektiöse Tracheobronchitis

Die Canine Infektiöse Tracheobronchitis, umgangssprachlich auch als Zwingerhusten und im englischsprachigen Raum als Canine Infectious Respiratory Disease (CIRD) bekannt, ist ein multifaktoriell-bedingter Krankheitskomplex der oberen und unteren Atemwege von Hunden. Der Zwingerhusten ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten bei Hunden, weltweit verbreitet und tritt üblicherweise bei Hunden in Gruppenhaltungen wie in Tierheimen oder Hundezuchten auf (18).

Typische klinische Symptome sind Nasenausfluss, Atemnot, milder bis schwerer Husten, Fieber und Lethargie (18, 19). In unkomplizierten Fällen zeigen die Hunde nur anfallartigen,

trockenen Husten ohne oder mit nur milden Allgemeinstörungen und teilweise serösem Nasenausfluss. In schwereren Fällen treten Fieber, feuchter Husten, Störungen des Allgemeinbefindens und bei Auskultation und im Röntgen sichtbare Zeichen einer Pneumonie auf (20).

Die klassischen Erreger der CIRDC sind das Canine Parainfluenzavirus (CPIV), das Canine Adenovirus (CAV), das Canine Staupe-Virus (CDV), das Canine Herpesvirus (CHV) und *Bordetella (B.) bronchiseptica*. Zu den neu auftretenden Erregern zählen das Canine Influenzavirus (CIV), das Canine Respiratorische Coronavirus (CRCoV), *Mycoplasma cynos* und *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (18).

Die Diagnose wird in den meisten Fällen aufgrund der Anamnese, der klinischen Untersuchung und dem typischen Krankheitsverlauf gestellt. Prinzipiell können die viralen Erreger mittels PCR und bakterielle Mitverursacher über kulturelle Verfahren nachgewiesen werden, allerdings ist das nur bei schweren Fällen und bei Ausbrüchen in Tierheimen oder Hundezuchten sinnvoll (20).

Der wichtigste Therapieansatz ist die Verschleppung der Erreger zu verhindern, indem man strenge Hygienemaßnahmen beachtet. Bei milden Verläufen sollte auf den Einsatz von Medikamenten verzichtet und auf eine Spontanheilung gewartet werden. In schweren Fällen sollte vor allem bei jüngeren Patienten frühzeitig eine antibiotische Behandlung gestartet werden. Ein gut geeignetes Antibiotikum stellt Doxycyclin dar, weil es sowohl gegen *B. bronchiseptica* als auch Mykoplasmen wirkt. Gegen Mykoplasmen zeigen auch Fluorchinolone wie Enrofloxacin eine gute Wirksamkeit. Zusätzlich zur Antibiose kann man bei nichtproduktivem Husten und nach Ausschluss einer Pneumonie auch ein Antitussivum einsetzen (20).

2.3.2. Diagnostik von *Mycoplasma cynos*-Infektionen

M. cynos konnte bereits in den Konjunktiven, in der Nasen- und Mundhöhle, dem oberen und unteren Respirationstrakt, dem Genitaltrakt, dem Urin und im Samen von Hunden nachgewiesen werden (3, 4, 6). Die Kultur von *M. cynos* erfolgte dabei in und auf speziellen Nährmedien, wie zum Beispiel SP4-Medium/Agar oder Hayflick-Medium/Agar. Nach der Bebrütung für zwei bis zehn Tagen unter mikroaeroben Bedingungen auf Agarnährböden werden die für Mykoplasmen typischen spiegeleiförmigen Kolonien unter Einsatz eines Plattenmikroskop sichtbar (7). Allerdings können Mykoplasmen anhand ihrer

Koloniemorphologie nicht identifiziert werden. Traditionell erfolgte die Artdiagnose kultivierter Mykoplasmen durch serologische Methoden, die von der Verfügbarkeit spezies-spezifischer Antiseren abhängig sind (21). Im Jahr 2004 wurden schließlich spezies-spezifische PCRs für einige canine Mykoplasmen, auch für *M. cynos*, entwickelt (1). Auch die 16S-23S PCR-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP) Analyse ermöglicht die Identifizierung caniner Mykoplasmenisolate (22). Heute wird jedoch für die schnelle und genaue Identifizierung von *M. cynos* vorrangig die MALDI-ToF Massenspektrometrie eingesetzt (23).

2.3.3. Therapie von *Mycoplasma cynos*-Infektionen

Mykoplasmen sind aufgrund ihrer Zellwandlosigkeit von Natur aus resistent gegenüber β -Laktam-Antibiotika und durch Anwendung dieser kann die Infektion sogar verschlimmert werden (10). Mykoplasmen sind im Allgemeinen empfindlich gegenüber Fluorchinolonen, Makroliden, Tetrazyklinen, Phenicolen, Aminoglykosiden und Pleuromutilinen, Grundsätzlich wird jedoch durch den Einsatz dieser Wirkstoffgruppen *in vivo* keine Erregereliminierung erreicht (7). Nichtsdestotrotz wurden zur Behandlung von *M. cynos*-Infektionen bereits Fluorchinolone (Enrofloxacin) und Makrolide (Erythromycin) erfolgreich eingesetzt (14, 24). Immer häufiger wird jedoch auch über Resistenzen gegenüber diesen Wirkstoffgruppen berichtet (25).

2.4. Typisierung von Mykoplasmen

Zur Typisierung von Mykoplasmen wurden viele unterschiedliche Verfahren entwickelt. Zu den in der Vergangenheit und heute nur mehr begrenzt eingesetzten Genotypisierungsmethoden gehören die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und verschiedene PCR-gestützte Verfahren wie *Randomly-Amplified-Polymorphic DNA* (RAPD), *Variable-Number of Tandem Repeats* (VNTR) oder *Multilocus-VNTR-Analysis* (MLVA). Mit den Fortschritten bei den Sequenzierungstechnologien wurden diese bandenbasierten Methoden immer mehr durch DNA-Sequenzanalyseverfahren abgelöst. Zu diesen modernen Methoden zählt die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST), bei der zumeist sieben Haushaltsgene mittels PCR amplifiziert und die Sequenzfolgen über Sanger-Sequenzierung bestimmt und verglichen werden (26). Eine Erweiterung der klassischen MLST ist die Kerngenom-MLST (cgMLST). Bei diesem hochauflösenden Typisierungsverfahren werden

die Genome von Erregerisolaten sequenziert und schließlich die aus hunderten Genen bestehenden Kerngenome verglichen und dabei Allel-Profile erstellt (27). Für die phänotypische Charakterisierung von Mykoplasmen eignet sich die MALDI-ToF Massenspektrometrie und Vergleichsanalysen der dabei erzeugten Protein-Massen-Fingerprints (28).

Zur Typisierung von *M. cynos* kamen bislang nur die PFGE und die RAPD-Analyse zum Einsatz. Mithilfe dieser beiden Typisierungsverfahren konnten die Verwandtschaftsverhältnisse von 14 *M. cynos*-Isolaten aus den Atemwegen von sechs Hunden in Zwingerhaltung ermittelt werden. Die meisten Isolate zeigten dabei sehr ähnliche Bandenprofile und einige waren weder mit der PFGE noch mit der RAPD-Analyse zu unterscheiden, was auf die Persistenz einiger Stämme innerhalb der Zwinger schließen ließ (29).

3. Material und Methode

3.1. *Mycoplasma cynos*-Isolate

In dieser Arbeit wurden 55 *M. cynos*-Isolate aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien untersucht. Die Stämme waren bei -80 °C in SP4-Flüssigmedium kryokonserviert.

Die Isolate stammen aus dem Respirations- und Urogenitaltrakt von 52 Hunden (zwei Isolate stammten vom selben Tier) und dem Harn zweier Wölfe (Tab. 1).

Tabelle 2: Stammnummer, Laboruntersuchungsnummer (Diagnostik), Isolierungsjahr und Habitat der untersuchten *M. cynos*-Isolate

Stammnummer	Untersuchungsnummer	Isolierungsjahr	Probenart
1478S02	1478	2002	Samen
1334Pr06	1334	2006	Prostatasekret
1049H07	1049	2007	Harn
105S08	105	2008	Samen
2297B08	2297	2008	BALF
2651B08	2651	2008	BALF
2117H09	2117	2009	Harn
1781H10	1781	2010	Harn
2296B10	2296	2010	BALF
2716V11	2716	2010	Vaginaltupfer
2002S11	2002	2011	Samen
248S12	248	2012	Samen
406S13	406	2013	Samen
283B13	283	2013	BALF
304S14	304	2014	Samen
2039B15	2039	2015	BALF
3256N15	3256	2015	Nasentupfer
3619B17	3619	2017	BALF
346S18	346	2018	Samen
3204B18	3204	2018	BALF
4256S18	4256	2018	Samen
93V19	93	2019	Vaginaltupfer

763S19	763	2019	Samen
818Pe19	818	2019	Penistupfer
1209V19	1209	2019	Vaginaltupfer
1396S19	1396	2019	Samen
3746N19	3746	2019	Nasentupfer
3923V19	3923	2019	Vaginaltupfer
200H20	200	2020	Harn/Wolf
329S20	329	2020	Samen
471S20	471	2020	Samen
607H20	607	2020	Harn/Wolf
643S20	643	2020	Samen
2296S20	2296	2020	Samen
2969S20	2969	2020	Samen
3002S20	3002	2020	Samen
3647V20	3647	2020	Vagina
3648S20	3648	2020	Samen
379S21	379	2021	Samen
1076V21	1076	2021	Vaginaltupfer
3012S21	3012	2021	Samen
3300S21	3300	2021	Samen (selbes Tier wie 3012 nach Enrofloxacin-Therapie)
4154H21	4154	2021	Harn
1554S21	1554	2021	Samen
2637H22	2637	2022	Harn
2810S22	2810	2022	Samen
3176L22	3176	2022	Lunge
3842Pr22	3842	2022	Prostatasekret
4001S22	4001	2022	Samen
513S23	513	2023	Samen
518S23	518	2023	Samen
1029Pr23	1029	2023	Prostatasekret
1062Pr23	1062	2023	Prostatasekret
1048S23	1048	2023	Samen
1437V23	1437	2023	Vaginaltupfer

BALF Bronchoalveolar-Lavage-Flüssigkeit

3.2. Kultivierung

Der erste Schritt der Kultivierung bestand darin, einen Tropfen der aufgetauten Isolate auf eine SP4-Agarplatte (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) aufzutragen und mit einer sterilen Impföse einen Verdünnungsausstrich durchzuführen. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C unter 5%iger CO₂-Atmosphäre bebrütet.

Nachdem die Kulturen innerhalb von fünf bis sieben Tagen gewachsen waren, wurde eine einzelne Kolonie von der Platte ausgestochen und in 3 ml SP4-Medium (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) überführt. Die Flüssigkulturansätze wurden wiederum für ein bis drei Tage bei 37 °C aerob bebrütet, bis es zu einem Farbumschlag von rot zu orange oder gelb kam. Dieser Farbumschlag basiert auf einem Phenolrotindikator, der sich im Flüssigmedium befindet und die Farbe wechselt, sobald es zu einer Ansäuerung durch den Abbau von Glukose (Glykolyse) kommt.

Sobald der Farbumschlag eintrat, wurden drei Aliquots von je 500 µl bei -75 °C für die spätere Verwendung eingefroren und 1 ml der Flüssigkultur mittels MALDI-ToF MS analysiert.

3.3. Artdiagnose und phänotypische Charakterisierung mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie

Zur Bestätigung der Artzugehörigkeit und für die phänotypische Charakterisierung der *M. cynos*-Isolate wurde die MALDI-ToF Massenspektrometrie eingesetzt. Dafür wurde 1 ml der Flüssigkultur in ein Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) verbracht und bei 20 000 x g für sieben Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 100 µl Wasser (HPLC grade, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) resuspendiert. Danach wurde das Röhrchen wieder bei 20 000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zur Proteinextraktion das Pellet in 15 µl 70%iger Ameisensäure (Sigma-Aldrich) und 15 µl Acetonitril (100%ig, Sigma-Aldrich) aufgelöst. Es folgte ein weiteres Zentrifugieren bei 20 000 x g für zwei Minuten. Anschließend wurden 0,7 µl des erhaltenen Proteinextrakts auf eine MALDI-Trägerplatte aus Edelstahl (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) aufgetragen, luftgetrocknet und mit 0,7 µl Matrixlösung (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, Bruker Daltonics) überschichtet und wieder luftgetrocknet. Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden die Proben im

Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics) unter Einsatz der FlexControl 3.4 Software analysiert. Die erhaltenen Spektren wurden dann mit jenen einer In-House Referenzspektren-Datenbank verglichen und dabei die Artzugehörigkeit zu *M. cynos* bestätigt. Im Anschluss wurden die generierten Spektren mithilfe der FlexAnalysis 3.4 Software (Bruker Daltonics) an die Grundline angepasst und unter Einsatz der MBT Compass Explorer Software (Bruker Daltonics) schließlich Distanzwerte basierend auf Peak-Intensitätsunterschieden und -Verschiebung berechnet und diese als Dendrogramm dargestellt.

3.4. DNA-Extraktion

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde vorerst ein eingefrorenes Aliquot pro Stamm aufgetaut, in 6 ml SP4-Medium überführt und bis zum Farbumschlag bei 37°C aerob bebrütet. Anschließend wurde je 1 ml der Flüssigkultur in sechs Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf SE) überführt und für sieben Minuten bei 20 000 x g zentrifugiert. Es wurden wiederum die flüssigen Überstände abpipettiert, sodass nur noch die Pellets in den Röhrchen zurückblieben.

Anschließend wurde die DNA-Extraktion mithilfe des kommerziellen MagAttract® HMW DNA Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden die vorbereiteten Pellets pro Stamm zusammengeführt und in 180 µl ATL-Lysepuffer aufgelöst. Zusätzlich wurden noch 20 µl Proteinase K-Lösung und 4 µl RNase A hinzugefügt. Die Suspension wurde mit 150 µl Buffer AL-Lösung (Lysepuffer) versetzt und kurz gevortext.

Anschließend wurde das Röhrchen 30 Minuten lang bei 56 °C im Thermomixer (Eppendorf SE) bei 900 rpm (*rounds per minute*) inkubiert. Nach der Inkubation wurden 15 µl der MagAttract-Suspension G, in der Magnetkügelchen enthalten sind, und 280 µl MB-Bindungspuffer zugegeben. Wiederum wurde das Röhrchen für drei Minuten bei Raumtemperatur im Thermomixer (1400 rpm) inkubiert. Das Röhrchen wurde danach in einen magnetischen Röhrchenhalter (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gestellt, sodass die Magnetkügelchen, an deren Oberfläche sich die DNA bindet, aus der Suspension geholt wurden. Der flüssige Überstand wurde entfernt und es wurden 700 µl MW1Waschlösung hinzu pipettiert. Das Tube wurde für eine Minute bei Raumtemperatur im Thermomixer (1400 rpm) inkubiert und der Überstand entfernt. Diese Vorgänge wurden mit der gleichen Waschlösung noch einmal und anschließend zweimal mit

der PE-Waschlösung wiederholt. Nach Verbringen des Röhrchens in die Magnethalterung wurde die PE-Waschlösung abpipettiert und die Magnetkügelchen zweimal mit 700 µl Nuklease-freiem Wasser vorsichtig gewaschen. Im Anschluss wurden 50 µl AE-Elutionslösung in das Röhrchen mit den Magnetkügelchen pipettiert und die Suspension für drei Minuten bei Raumtemperatur im Thermomixer (1400 rpm) inkubiert. Danach wurde das Röhrchen in die Magnethalterung verbracht und dabei die Magnetkügelchen von der DNA-Suspension abgetrennt. Diese wurde in ein neues Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Davor wurde allerdings noch die Konzentration der DNA mittels Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen.

3.5. Erstellung von Sequenzier-Bibliotheken

Für das Erstellen von Sequenzier-Bibliotheken wurden die DNA-Extrakte aufgetaut. Danach wurden 10-30 µl der DNA-Lösung, je nach gemessener Konzentration, in ein neues Röhrchen überführt, sodass sich eine DNA-Gesamtmenge von 100-500 ng ergab. Wenn das DNA-Volumen weniger als 30 µl betrug, wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA anhand der Anleitung „Illumina DNA Prep Reference Guide“ und mit den dazu benötigten Reagenzien (Illumina, Inc., USA) aufgearbeitet.

Der erste Schritt war die sogenannte Tagmentierung der genomischen DNA, wobei Beads-gebundene Transposomen verwendet wurden, um die DNA zu fragmentieren und mit Adaptersequenzen zu versehen. Dafür wurde zunächst ein Tagmentierungs-Mastermix hergestellt, indem man pro Probe je 11 µl an Beads-gebundenen Transposomen (BLT, Illumina, San Diego, Kalifornien, USA) mit je 11 µl eines Tagmentierungs-Puffers (TB1, Illumina) mischte. Je 20 µl dieses Mastermixes wurden in die Röhrchen mit der DNA gefüllt. Die Proben wurden zum Vermischen jeweils zehnmals pipettiert und in PCR-Reaktionsgefäße (Eppendorf SE) überführt. Anschließend wurden sie in einem PCR-Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) gestellt und das TAG-Programm gestartet. Für das TAG-Programm wurde beim Thermocycler die Option zum Vorheizen des Deckels gewählt und auf 100 °C eingestellt. Das Reaktionsvolumen wurde auf 50 µl gesetzt und der Reaktionsmix bei 55 °C für 15 Minuten inkubiert.

Im nächsten Schritt, der Reinigung nach der Tagmentierung, wurde die mit Adapter versehene DNA, die an die Beads gebunden war, gewaschen. Dafür wurden jeweils 10 µl

Tagmentierungs-Stopp-Puffer (TSB, Illumina) in die Röhren hinzugefügt und wieder zehnmal pipettiert. Danach wurden die Röhren wieder in den Thermocycler gestellt und diesmal das PTC-Programm gestartet. Für das PTC-Programm wurden die Einstellungen des TAG-Programms übernommen, lediglich die Temperatur wurde auf 37 °C für 15 Minuten eingestellt. Nach Beendigung des Programms wurde der Inhalt aus den PCR-Reaktionsgefäßen wieder in 1,5 ml Eppendorf-Röhren transferiert und diese in eine magnetischen Röhrenhalter gestellt. Nachdem die Flüssigkeit klar war, wurde der Überstand entfernt. Darauf folgte ein Waschschriff, wobei je 100 µl des Tagmentierungs-Wasch-Puffers (TWB, Illumina,) in die nicht mehr im Magnethalter stehenden Röhren gefüllt und gut mit den Beads vermischt wurden. Anschließend wurden die Röhren wieder in den Magnethalter gestellt und der Überstand wieder abpipettiert. Diese Schritte wurden noch zweimal wiederholt, nur dass bei der zweiten Wiederholung die Flüssigkeit nicht entfernt wurde.

Es folgte die Amplifikation der tagmentierten DNA, wofür ein PCR-Programm mit begrenzten Zyklen verwendet wurde. Durch den PCR-Schritt wurden Index-1-Adapter (i7), Index-2-Adapter (i5) und Sequenzen hinzugefügt, die für die Bildung von Sequenzierungsclustern benötigt wurden. Zunächst wurde dafür ein PCR-Mastermix hergestellt, indem man pro Probe je 22 µl verstärkten PCR-Mix (EPM, Illumina) und je 22 µl Nuklease-freies Wasser mischte. Nun wurde der flüssige Überstand aus den Röhren im Magnethalter entfernt und die Röhren wurden aus dem Halter genommen. Sofort wurden je 40 µl PCR-Mastermix zu den Beads gegeben und so oft pipettiert, bis die Beads vollständig in Suspension waren. Dann wurden in jedes Röhren 10 µl der Indexadapter (IDT for Illumina RNA/DNA UD Indexes, Illumina) pipettiert, der Inhalt durch zehnmaliges Pipettieren gut durchmischt und in neue PCR-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden diese wieder in den Thermocycler platziert und das BLT PCR-Programm gestartet. Für das BLT PCR-Programm wurde ebenfalls die Option zum Vorheizen des Deckels gewählt und auf 100 °C eingestellt, sowie das Reaktionsvolumen auf 50 µl gesetzt. Die Temperaturen wurden folgendermaßen eingestellt: drei Minuten bei 68 °C, drei Minuten bei 98 °C, jeweils fünf Zyklen bei 98 °C für 45 Sekunden, bei 62 °C für 30 Sekunden und bei 68 °C für zwei Minuten, sowie am Ende noch eine Minute bei 68 °C.

Im vierten Schritt wurden die amplifizierten Bibliotheken mittels eines doppelseitigen Bead-Reinigungsverfahrens gereinigt. Hierfür wurden die Röhren aus dem Thermocycler in den Magnethalter verbracht. Nach Aufklärung der Flüssigkeit wurden 45 µl in ein neues

Röhrchen transferiert. Dazu wurden 40 µl Nuklease-freies Wasser und 45 µl IPB-Reinigungsbeads (Illumina) hinzugefügt. Das Ganze wurde zum Mischen zehnmal pipettiert und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Mischung für weitere fünf Minuten im Magnethalter inkubiert. Währenddessen wurden neue Röhrchen vorbereitet, in die 15 µl der IPB gefüllt wurden. Nach der Inkubation wurden 125 µl des Überstandes zu den 15 µl IPB hinzugefügt, wieder zehnmal pipettiert und für fünf Minuten inkubiert. In der Magnethalterung wurden die Röhrchen dann weitere fünf Minuten inkubiert und danach der Überstand entfernt. Es folgte ein Waschschrift, der zweimal hintereinander durchgeführt wurde. Dabei wurden 200 µl 80%iges Ethanol in die Röhrchen mit den Beads pipettiert und nach 30 Sekunden wieder entfernt. Die Beads wurden anschließend im Magnethalter für fünf Minuten getrocknet und danach wurden die Röhrchen aus dem Magnethalter entfernt. Es wurden 32 µl eines Resuspensionspuffers (RSB, Illumina,) in jedes Röhrchen transferiert und mit einer Pipette vermischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen in den Magnethalter verbracht und für weitere zwei Minuten inkubiert. Nachdem die Flüssigkeit klar war, wurden 30 µl davon in ein neues Röhrchen transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.6. Genomsequenzierung

Als Vorbereitung für die Genomsequenzierung mittels MiniSeq-Sequenzierungsplattform (Illumina) wurden je 5 µl der einzelnen Sequenzier-Bibliotheken zusammengemischt und gevortext. Danach wurde die Konzentration des Bibliotheken-Pools mittels Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Anschließend wurden die gepoolten Bibliotheken auf die Ausgangskonzentration von 2 nmol verdünnt, um sie dann zu denaturieren und auf die endgültige Ladekonzentration von 1,3 pmol zu verdünnen.

Um die Pools auf eine Ausgangskonzentration von 2 nmol zu bringen, wurde mit folgender Formel, in die das Ergebnis der Fluorometer-Messung (ng/µl) eingesetzt wurde, die Molarität der gepoolten Bibliotheken ausgerechnet:

$$Molarität = \frac{\left(\frac{ng}{\mu l}\right)}{660 \frac{g}{mol} \times 600 bp}$$

Hier ein Beispiel, wenn die gemessene Konzentration 7,71 ng/µl beträgt:

$$\text{Molarität} = \frac{(7,71 \frac{ng}{\mu l})}{660 \frac{g}{mol} \times 600 bp} = 1,947 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-5} = 20 \times 10^{-6} \text{ nmol}/\mu l$$

Die benötigten Volumina an Bibliotheken-Pool und Resuspensionspuffer (RSB, Illumina, Inc., USA) zum Erhalt eines Gesamtvolumens von 50 μl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$x \mu l = \frac{50 \mu l \times 2 \text{ nmol}}{y \frac{\text{nmol}}{\mu l}}$$

Hierbei steht x für das μl -Volumen an Bibliotheken-Pool und y für die errechnete Molarität. Das Volumen an RSB wurde berechnet, indem man von 50 μl das errechnete Volumen an Bibliotheken-Pool abzog.

Ein Beispiel mit der im vorigen Beispiel ausgerechneten Molarität:

$$x \mu l = \frac{50 \mu l \times 2 \text{ nmol}}{20 \frac{\text{nmol}}{\mu l}}$$

Nun wurde der gemischte Pool auf 1 nmol verdünnt, indem weitere 50 μl RSB zugefügt wurden. Für die Denaturierung wurden von dieser Verdünnung 5 μl in ein neues Röhrchen überführt und 5 μl 0,1N NaOH hinzugegeben. Der Mix wurde gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Denaturierung wurden nach der Inkubation 5 μl RSB hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Lösung durch die Zugabe von 985 μl Hybridisierungspuffer (HT1, Illumina) auf 5 pmol diluiert und gevortext. Um auf die endgültige Ladekonzentration von 1,3 pmol zu kommen, wurden 130 μl der eben hergestellten Verdünnung mit 370 μl HT1 vermischt. Anschließend wurde die MiniSeq-Plattform (Illumina) mit einer Mid Output-Fließzelle und einer Waschkartusche beladen (Illumina), der Bibliotheken-Pool auf die Fließzelle transferiert und das Sequenzierungsprogramm gestartet. Nach einem 17-stündigen Sequenzierungslauf wurden die systemintern nach Indices-getrennte Rohsequenzdaten auf die Geneious Prime-Software-Plattform (Biomatters, Auckland, Neuseeland) geladen. Nach Qualitätsfilterung und Trimmung der Illumina-Reads wurden diese mithilfe der systemintegrierten SPAdes-Software assembliert und dabei sogenannte *Contigs* (Sätze aus sich überlappenden DNA-Stücken) generiert.

3.7. Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung

Die SeqSphere+ Software (Ridom GmbH, Deutschland) wurde verwendet, um ein cgMLST-Schema für *M. cynos* zu entwickeln. Dafür wurde das veröffentlichte Referenzgenom von *M. cynos* C142 (NC_019949) und sechs Abfragegenome, die aus den im Rahmen dieser Arbeit generierten Genomen nach Herkunft ausgewählt wurden (200H20 – Harn/Wolf 2020, 329S20 – Samen/Hund 2020, 2651B08 – BALF/Hund 2008, 2716V11 – Vagina/Hund 2011, 3176L22 – Lunge/Hund 2022, 3300S21 – Samen/Hund 2021), auf die Ridom SeqSphere-Plattform geladen. Anschließend wurden mit dem *Target-Definer-Tool* cgMLST-taugliche Zielgene im Referenzgenom unter Einsatz von Standardfiltern ausgewählt. Danach wurden die ermittelten Zielgene des Referenzgenoms paarweise mit den sechs Abfragegenomen verglichen. Davon wurden aber nur jene Gene in das cgMLST-Schema aufgenommen, die eine Sequenzidentität von >90 % und eine Überlappung von 100 % aufweisen konnten. Nachdem das Typisierungsschema entwickelt wurde, wurden alle 55 generierten *M. cynos*-Genome und das Referenzgenom von *M. cynos* C142 mit der neuetablierten cgMLST analysiert und individuelle Allel-Profile erstellt. Abschließend wurde ein Neighbour-Joining-Stammbaum zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse konstruiert.

4. Ergebnisse

4.1. Phänotypische Charakterisierung mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie

Mithilfe der MALDI-ToF Massenspektrometrie konnten alle 55 untersuchten Stämme als *M. cynos* identifiziert werden.

Von den generierten Spektren wurde, basierend auf Distanzwerten, ein Dendrogramm erstellt, um mögliche Verwandtschaftsgrade zwischen den Isolaten feststellen zu können. Im Dendrogramm kann man zwar vier Cluster erkennen, diese scheinen aber keiner bestimmten Systematik zu folgen.

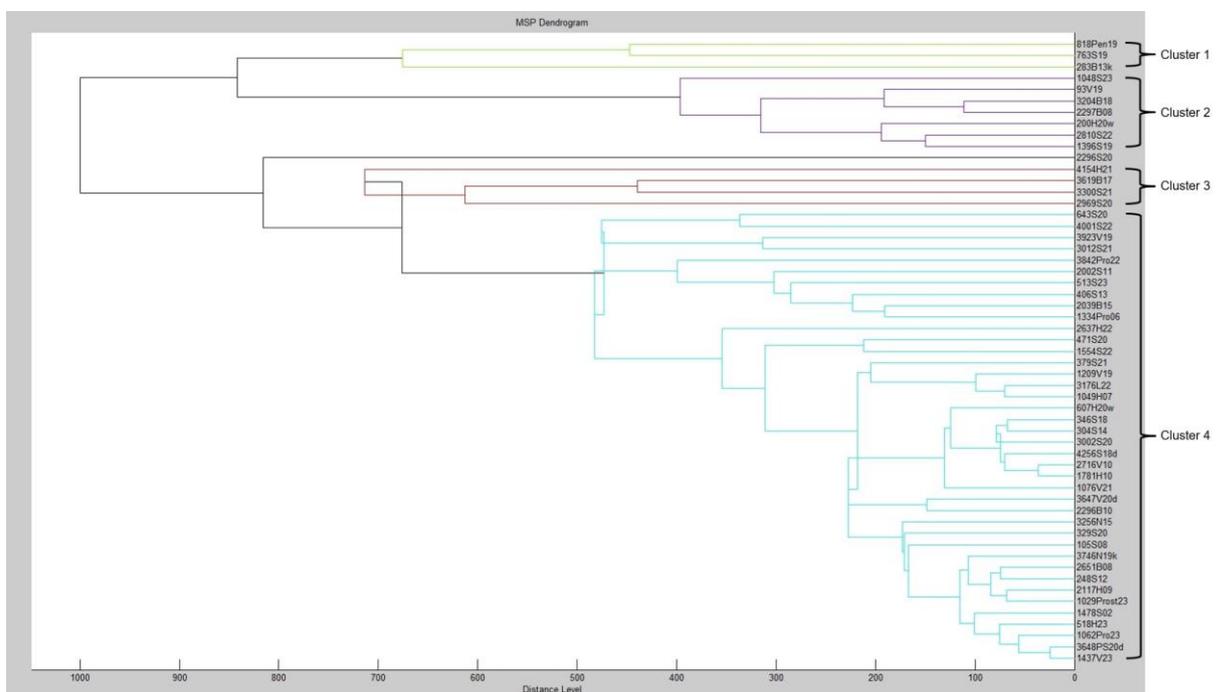


Abbildung 1: Auf Distanzwerten (x-Achse) basierendes Dendrogramm der mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie generierten Spektren der untersuchten *M. cynos*-Stämme (n=xx)

4.2. Phylogenetische Analyse mittels Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung

Bei der Neuetablierung des cgMLST-Verfahrens konnten insgesamt 493 Zielgene (63 % der 780 kodierenden Sequenzen des Referenzgenoms) als cgMLST-tauglich ermittelt und in das endgültige cgMLST-Schema aufgenommen werden. Im phylogenetischen Stammbaum, der auf Grundlage der ermittelten Allel-Profile generiert wurde, konnten keine größeren

Gruppierungen festgestellt werden. Die Genome zeigten insgesamt eine hohe Diversität und nur einzelne Stämme erwiesen sich als näher verwandt. So wiesen die Isolate 200H20 und 607H20, welche beide aus Wölfen stammten, eine nahe Verwandtschaft auf. Als klonal verwandt zeigten sich die Isolate 3012S21 und 3300S21, die vom selben Tier vor und nach einer Enrofloxacin-Therapie stammten. Darüber hinaus gruppierten sich die Stämme 471S20 und 329S20, die von zwei Beagles der Veterinärmedizinischen Universität Wien isoliert werden konnten, und die Isolate 3648S20 und 3647V20, die aus dem Samen eines Rüden und aus der Vagina der zuvor von diesem Rüden gedeckten Hündin stammten. Eine mäßig nähere Verwandtschaft war auch zwischen dem Isolat 2651B08 und dem Referenzstamm C142 (NC_019949) erkennbar. Außerdem wiesen die Isolate 283B13 und 2039B15, die von zwei in einem Haushalt lebenden Hunden in einem Abstand von zwei Jahren isoliert werden konnten, eine nahe Verwandtschaft auf.



Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der mittels cgMLST untersuchten *M. cynos*-Stämme (n=xx)

5. Diskussion

Mycoplasma cynos ist die veterinärmedizinisch relevanteste Art der bei Hunden auftretenden Mykoplasmen. Bis heute gilt der Erreger als häufiger Besiedler der caninen oberen Atemwege und als bedeutsamer Mitverursacher der Caninen Infektiösen Tracheobronchitis (1). Nichtsdestotrotz konnte *M. cynos* im Rahmen diagnostischer Untersuchungen am Institut für Mikrobiologie in den letzten Jahren kaum im caninen Respirationstrakt, dafür aber umso häufiger im caninen Urogenitaltrakt nachgewiesen werden. Ob es sich dabei um zwei unterschiedliche Erregerpopulationen handelt, die aufgrund ihrer Eigenschaften bevorzugt die Atemwege oder den Urogenitaltrakt besiedeln, war bisher unbekannt. Ziel dieser Diplomarbeit war es daher, ausgewählte *M. cynos*-Isolate aus dem Respirations- und Urogenitaltrakt des Hundes phäno- und genotypisch zu charakterisieren und durch Vergleichsanalysen die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Stämme darzulegen.

Zur phänotypischen Charakterisierung kam die MALDI-ToF MS zum Einsatz, die sich in einer früheren Studie als ausgezeichnete Methode zur Identifizierung von Mykoplasmen-Isolaten herausgestellt hat (23). Dabei werden Massen-Fingerprints von hauptsächlich ribosomalen Proteinen erzeugt, die durch Vergleich mit Referenzspektren für die Artdiagnose herangezogen werden. In einigen weiteren Studien diente die MALDI-ToF MS aber auch als Methode zur Differenzierung von Mykoplasmen-Isolaten innerhalb einer Mykoplasmenart. So konnten *M. bovis*-Isolate mithilfe der MALDI-ToF MS in Subtypen abhängig von ihrem Isolierungsjahr eingeteilt (30) und *M. agalactiae*-Stämme nach ihrer geografischen Herkunft gruppiert werden (31). Im Gegensatz dazu konnten die hier untersuchten *M. cynos*-Stämme mittels MALDI-ToF MS zwar in vier Cluster unterteilt werden, die Gruppierungen scheinen allerdings keiner Systematik zu folgen. So weisen die Isolate innerhalb der Gruppen bis auf die höhere Übereinstimmung der generierten Massenspektren keine weiteren Gemeinsamkeiten wie Isolierungsjahr, Isolierungszeitraum, Probenart oder Organsystem auf. Daneben gliedern sich teilweise auch Isolate, die sich in der cgMLST als klonal verwandt darstellten (z.B. 200H20 und 607H20 oder 3012S21 und 3300S21) in unterschiedliche Gruppen ein. Auf den ersten Blick erscheint daher die MALDI-ToF MS als Methode zur phänotypischen Verwandtschaftsanalyse von *M. cynos*-Isolaten als völlig ungeeignet. Näher betrachtet könnte die Fehlleistung der MALDI-ToF MS aber auch auf eine mangelhafte Standardisierung der Kulturprobengewinnung im Rahmen der Arbeit zurückzuführen sein. Frühere Studien weisen darauf hin, dass qualitativ hochwertige MALDI-ToF-Massenspektren nur von Mykoplasmenkulturen in der mittleren bis späten exponentiellen Wachstumsphase

erzeugt werden können (23, 32, 33). Da *M. cynos*-Stämme eine hohe wachstumskinetische Variabilität aufweisen, erscheint es für MALDI-ToF-basierte Verwandtschaftsanalysen als unerlässlich, den geeigneten Zeitpunkt der Kulturprobengewinnung durch Darstellung von stammspezifischen Wachstumskurven zu bestimmen.

Mithilfe der neuetablierten cgMLST konnten hingegen sehr wohl nahe phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse zwischen epidemiologisch zusammenhängenden *M. cynos*-Isolaten ermittelt werden. So wiesen *M. cynos*-Stämme von Hunden bzw. Wölfen, die in engem Kontakt miteinander standen (z.B. zwei Wölfe eines Rudels, zwei Beagles der Vetmeduni, zwei Hunde eines Haushalts, Rüde und gedeckte Hündin), einen hohen phylogenetischen Verwandtschaftsgrad auf. Ähnliche Resultate zeigte auch eine Typisierungsstudie aus dem Jahr 2009, in der *M. cynos*-Isolate aus sechs Hunden mittels PFGE und RAPD analysiert wurden. Auch damals konnte ein hoher Verwandtschaftsgrad zwischen *M. cynos*-Stämmen aus Hunden, die sich im selben Zwinger aufgehalten haben, festgestellt werden (29).

Insgesamt weisen die Ergebnisse der cgMLST eindeutig darauf hin, dass einzelne *M. cynos*-Stämme durch engen Kontakt übertragen werden und sich so in Tiergruppen ausbreiten können. Im Gegensatz dazu zeichneten sich in der cgMLST-Analyse epidemiologisch nicht zusammenhängende *M. cynos*-Stämme durch eine hohe Diversität mit weitreichender Alleldistanz aus. Dies erscheint nicht ungewöhnlich, da in früheren cgMLST-Studien bereits ähnlich heterogene Erregerpopulationen bei anderen Mykoplasmenarten, wie *M. gallisepticum*, *M. synoviae* und *M. hyorhinae* festgestellt wurden (34–36). Im vorliegenden cgMLST-Stammbaum war keine organsystemspezifische Gruppierung der untersuchten *M. cynos*-Stämme erkennbar. Dies lässt vermuten, dass die für einen möglicherweise bestehenden Gewebetropismus von *M. cynos*-Subpopulationen verantwortlichen Gene nicht im Kerngenom, sondern im akzessorischen Genom verankert sind. Diese Hypothese ließe sich zukünftig durch Entwicklung und Einsatz eines geeigneten Pangenom-MLST-Schemas verifizieren. Nichtsdestotrotz eignet sich die im Rahmen dieser Arbeit neuentwickelte cgMLST hervorragend für epidemiologische Untersuchungen von *M. cynos*-Infektionen und für die Aufklärung komplexer epidemiologischer Fragestellungen wie die Darstellung von Übertragungswegen und Infektionsquellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Chalker VJ, Owen WMA, Paterson C, Barker E, Brooks H, Rycroft AN, Brownlie J. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology* 2004; 150(10):3491–7. doi: 10.1099/mic.0.26848-0.
2. Rosendal S. Mycoplasmas as a possible cause of enzootic pneumonia in dogs. *Acta veterinaria Scandinavica* 1972; 13(1):137–9.
3. Rosendal S. *Mycoplasma cynos*, a New Canine *Mycoplasma* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1973; 23(1):49–54. doi: 10.1099/00207713-23-1-49.
4. Lechner D, Aurich J, Spergser J, Aurich C. Double semen collection at a 1-h interval in dogs decreases the bacterial contamination of canine ejaculates. *Theriogenology* 2023; 208:126–31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.06.002.
5. Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WT. The genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* flora of healthy and diseased dogs. *Canadian journal of comparative medicine* 1981; 45(3):233–8.
6. Jang SS, Ling GV, Yamamoto R, Wolf AM. *Mycoplasma* as a cause of canine urinary tract infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1984; 185(1):45–7.
7. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 10. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015.
8. Trachtenberg S. Mollicutes. *Current biology* 2005; 15(13):R483-4. doi: 10.1016/j.cub.2005.06.049.
9. Quinn PJ. *Veterinary microbiology and microbial diseases*. 2nd edition. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011.
10. Chalker VJ. Canine mycoplasmas. *Research in veterinary science* 2005; 79(1):1–8. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.10.002.
11. Greene CE, Chalker VJ. Nonhemotropic Mycoplasmal, Ureaplasma, and L-form Infections. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. St. Louis: Elsevier Saunders; 2012. S. 319–25.
12. Pretzer SD. Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen. *Theriogenology* 2008; 70(3):320–6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.035.

13. Rosendal S. Canine mycoplasmas: pathogenicity of mycoplasmas associated with distemper pneumonia. *The Journal of infectious diseases* 1978; 138(2):203–10. doi: 10.1093/infdis/138.2.203.
14. Zeugswetter F, Weissenböck H, Shibly S, Hassan J, Spargser J. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies. *The Veterinary record* 2007; 161(18):626–7. doi: 10.1136/vr.161.18.626.
15. Kastelic S, Cizelj I, Narat M, Tozon N, Chalker VJ, Lysnyansky I, Spargser J, Benčina D. Molecular characterisation of the *Mycoplasma cynos* haemagglutinin HapA. *Veterinary microbiology* 2015; 175(1):35–43. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.026.
16. May M, Brown DR. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Veterinary microbiology* 2009; 137(3-4):380–3. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.009.
17. Walker CA, Mannering SA, Shields S, Blake DP, Brownlie J. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma cynos* Strain C142. *Genome announcements* 2013; 1(1). doi: 10.1128/genomeA.00196-12.
18. Maboni G, Seguel M, Lorton A, Berghaus R, Sanchez S. Canine infectious respiratory disease: New insights into the etiology and epidemiology of associated pathogens. *PLoS one* 2019; 14(4):e0215817. doi: 10.1371/journal.pone.0215817.
19. Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. *Veterinary research* 2007; 38(2):355–73. doi: 10.1051/vetres:2006058.
20. Kohn B, Schwarz G. *Praktikum der Hundeklinik*. 12. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2017.
21. Rosendal S. Canine mycoplasmas: serological studies of type and reference strains, with a proposal for the new species, *Mycoplasma opalescens*. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 1975; 83(5):463–70. doi: 10.1111/j.1699-0463.1975.tb00126.x.
22. Spargser J, Rosengarten R. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Veterinary microbiology* 2007; 125(1-2):170–4. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.045.
23. Spargser J, Hess C, Lončarić I, Ramírez AS. 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* 2019; 57(9). doi: 10.1128/JCM.00316-19.
24. Pinkos AC, Friedrichs KR, Monaghan KN, Sample SH, Trepanier LA. Transient cold agglutinins associated with *Mycoplasma cynos pneumonia* in a dog. *Veterinary clinical pathology* 2015; 44(4):498–502. doi: 10.1111/vcp.12286.
 25. Gautier-Bouchardon AV. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiology spectrum* 2018; 6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018.
 26. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(6):3140–5. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
 27. Maiden MCJ, van Jansen Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews Microbiology* 2013; 11(10):728–36. doi: 10.1038/nrmicro3093.
 28. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical chemistry* 2015; 61(1):100–11. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770.
 29. Mannering SA, McAuliffe L, Lawes JR, Erles K, Brownlie J. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. *Veterinary microbiology* 2009; 135(3-4):292–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.058.
 30. Becker CAM, Thibault FM, Arcangioli M-A, Tardy F. Loss of diversity within *Mycoplasma bovis* isolates collected in France from bovines with respiratory diseases over the last 35 years. *Infection, genetics and evolution* 2015; 33:118–26. doi: 10.1016/j.meegid.2015.04.019.
 31. Barbosa MS, Spargser J, Marques LM, Timenetsky J, Rosengarten R, Chopra-Dewasthaly R. Predominant Single Stable VpmaV Expression in Strain GM139 and Major Differences with *Mycoplasma agalactiae* Type Strain PG2. *Animals* 2022; 12(3). doi: 10.3390/ani12030265.
 32. Pereyre S, Tardy F, Renaudin H, Cauvin E, Del Prá Netto Machado L, Tricot A, Benoit F, Treilles M, Bébéar C. 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* 2013; 51(10):3314–23. doi: 10.1128/JCM.01573-13.
33. Bokma J, Pardon B, van Driessche L, Gille L, Deprez P, Haesebrouck F, Boyen F. Optimizing identification of *Mycoplasma bovis* by MALDI-TOF MS. *Research in veterinary science* 2019; 125:185–8. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.06.010.
34. Bünger M, Posch M, Wiesauer J, Loncaric I, Cabal Rosel A, Ruppitsch W, Ladinig A, Spargser J. A core genome multilocus sequence typing scheme for *Mycoplasma hyorhinis*. *Veterinary microbiology* 2021; 262:109249. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109249.
35. Ghanem M, El-Gazzar M. Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. *Veterinary microbiology* 2018; 218:84–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.021.
36. Ghanem M, Wang L, Zhang Y, Edwards S, Lu A, Ley D, El-Gazzar M. Core Genome Multilocus Sequence Typing: a Standardized Approach for Molecular Typing of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of clinical microbiology* 2018; 56(1). doi: 10.1128/JCM.01145-17.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Auf Distanzwerten (x-Achse) basierendes Dendrogramm der mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie generierten Spektren der untersuchten <i>M. cynos</i> -Stämme (n=xx)	25
Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der mittels cgMLST untersuchten <i>M. cynos</i> -Stämme (n=xx)	27
Tabelle 1: Canine Mykoplasmen, ihre primären Besiedelungshabitate und assoziierte Erkrankungen	11
Tabelle 2: Stammnummer, Laboruntersuchungsnummer (Diagnostik), Isolierungsjahr und Habitat der untersuchten <i>M. cynos</i> -Isolate	16