

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)

**Genomische und massenspektrometrische Charakterisierung von
Mycoplasma ovipneumoniae-Isolaten**

Diplomarbeit
Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Birgit Hafellner

Wien, im Juni 2023

Betreuer:

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

Department für Pathobiologie

Institut für Mikrobiologie

Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich

Joachim.spergser@vetmeduni.ac.at

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Literaturübersicht	6
2.1	Allgemeine Eigenschaften von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	6
2.2	Klinik und Pathogenität von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	8
2.3	Epidemiologie von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	10
2.4	Diagnostik von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	12
2.5	Therapie und Prävention von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>-Infektionen	13
2.6	Typisierungsverfahren für <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Mykoplasmen-Stämme	15
3.2	Kultivierung von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	18
3.3	MALDI-ToF Massenspektrometrie	19
3.4	DNA-Extraktion	20
3.5	Bibliothekserstellung und Illumina-Sequenzierung	21
3.6	Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Phänotypische Charakterisierung von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie	24
4.2	Phylogenetische Analyse von <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> mittels Kerngenom-MLST	25
5	Diskussion	27
6	Zusammenfassung	30
7	Summary	31
8	Abkürzungsverzeichnis	32

9	Tabellenverzeichnis.....	33
10	Abbildungsverzeichnis	34
11	Literaturverzeichnis	35

1 Einleitung

Mycoplasma (M.) ovipneumoniae ist Verursacher einer chronischen, nicht-progressiven, auch als ‚atypisch‘ bezeichneten Pneumonie bei Schafen (Jaý et al. 2020, Maksimovic et al. 2022). Während bei älteren Tieren die chronische Verlaufsform vorherrscht, können bei Lämmern unter einem Jahr teils schwere respiratorische Symptome auftreten (Alley et al. 1999, Besser et al. 2019). Neben Schafen gehören auch Ziegen, sowie diverse Wildwiederkäuer, wie Dickhornschafe und Bergziegen zu den Wirten des Erregers (Besser et al. 2008, Besser et al. 2013, Besser et al. 2014, Weyand et al. 2016, Cassirer et al. 2018, Wolff et al. 2019, Shirkey et al. 2021).

Aufgrund des weltweiten Vorkommens und der stetig steigenden Prävalenz in landwirtschaftlichen Betrieben, ist *M. ovipneumoniae* auch von wirtschaftlicher Bedeutung. Die Therapie erkrankter Tiere und die Eliminierung des Erregers aus Beständen gestaltet sich als äußerst schwierig (Bébéar und Peyere 2005, Nicholas et al. 2008, Manlove et al. 2019, Zhao et al. 2021). Daneben weist *M. ovipneumoniae* eine auffallend hohe innerartliche geno- und phänotypische Heterogenität auf (Thirkell et al. 1990a, Ionas et al. 1991a, Parham et al. 2006, Harvey et al. 2007, Maksimovic et al. 2017). Laut neuesten Studien können anhand genotypischer Unterschiede *M. ovipneumoniae*-Stämme geografischen und wirtsspezifischen Clustern zugeordnet werden (Kamath et al. 2019, Jaý et al. 2020).

Ziel dieser Diplomarbeit war es, ausgewählte *M. ovipneumoniae*-Stämme phänotypisch mittels *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight* (MALDI-ToF) Massenspektrometrie, sowie genotypisch mittels Kerngenom (engl. *core genome*) Multilokus-Sequenztypisierung (cgMLST) zu charakterisieren. Anhand der ermittelten cgMLST-Sequenztypen und Protein-Massen-Fingerprints sollen Rückschlüsse auf die geografische Herkunft und die Wirtsspezifität der untersuchten Stämme gezogen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Allgemeine Eigenschaften von *Mycoplasma ovipneumoniae*

Mycoplasma ovipneumoniae ist eine Bakterienart, die taxonomisch der Familie der *Mycoplasmataceae* und der Ordnung *Mycoplasmatales* zugeordnet wird (Balish et al. 2019). Die *Mycoplasmatales* wiederum gehören zur Klasse der *Mollicutes*, deren Vertreter als kleinste sich selbstständig vermehrende Prokaryonten bekannt sind. Im Allgemeinen unterscheiden sich die *Mollicutes* (umgangssprachlich auch als Mykoplasmen bezeichnet) durch ihre Zellwandlosigkeit und kleine Zell- und Genomgröße, sowie den geringen G+C DNA Gehalt von anderen Bakterienarten (Razin et al. 1998)

Der Erreger konnte erstmalig im Jahre 1963 aus Proben von lungenerkrankten Schafen isoliert werden (Mackay et al. 1963) und ist eng mit *M. hyopneumoniae*, dem Erreger der enzootischen Pneumonie beim Schwein, verwandt (Pettersen et al. 1996, Volokhof et al. 2012). Grundsätzlich weist *M. ovipneumoniae* eine ausgesprochen hohe innerartliche genetische wie auch phänotypische Heterogenität auf, weshalb unterschiedliche Stämme innerhalb einer infizierten Herde auftreten können (Ionas et al. 1991ab, Harvey et al. 2007, Xu et al. 2011). Es wird vermutet, dass eine genetisch vielfältige Erregerpopulation besser auf Umweltveränderungen reagieren kann und unter Selektionsdruck schließlich nur optimal angepasste Erregervarianten auf Dauer überleben können (Parham et al. 2006).

Neben der beschriebenen innerartlichen Variabilität verfügt *M. ovipneumoniae* über diverse Virulenzfaktoren, die zur Pathogenität des Erregers im Wirtsorganismus beitragen. Ein bedeutsamer Virulenzfaktor ist die Polysaccharidkapsel, welche die Zellmembran des zellwandlosen Erregers umgibt. Sie ist entscheidend für die Adhäsion an Zilien-tragende Epithelien des Wirtsorganismus (Niang et al. 1998c) und spielt eine tragende Rolle in der dortigen Auslösung von Entzündungsreaktionen (Jiang et al. 2017a), sowie der vorzeitigen Apoptose von Epithelzellen (Jiang et al. 2017b). Außerdem konnten bei *M. ovipneumoniae* zwei Hämolsine identifiziert werden, die den Bakterientoxinen Hämolsin A (HlyA) und Hämolsin C (HlyC) sehr ähnlich sind (Yang et al. 2011). Daneben führt die Ausbildung von toxischen Stoffwechselprodukten, wie Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikale, zu einer verminderten ziliären Aktivität als auch zur direkten Gewebeschädigung (Miles et al. 1991, Niang et al. 1998ab). Hierfür konnten die Gene *glpF*, *glpK* und *glpD* des Glycerin-

Stoffwechsels verantwortlich gemacht werden (Yang et al. 2011). Darüber hinaus weist *M. ovipneumoniae* immunmodulatorische Eigenschaften auf, die zu Veränderungen in der Aktivität von Makrophagen und Lymphozyten führen können (Niang et al. 1997, Shahzad et al. 2010).

Auf festen Nährböden bildet *M. ovipneumoniae* keine für Mykoplasmen typischen Spiegeleikolonien aus (Arachambault et al. 2013), da die üblicherweise in den Agar eindringenden Kolonie-Zentralzonen bei *M. ovipneumoniae* fehlen (Rahman et al. 2016). Stattdessen erscheinen vor allem größere Kolonien granuliert, da sie über die Oberfläche verteilt radiäre Vertiefungen aufweisen (Clarke et al. 1974, DaMassa 1992). Die Kultur des Erregers stellt sich durch sein langsames Wachstum und seine auf den Wirtsorganismus angepasste Lebensweise als durchaus anspruchsvoll dar (Weiser et al. 2012, Arachambault et al. 2013). Somit müssen alle Nährstoffe, zu deren Eigensynthese der Erreger durch Genomreduktion nicht in der Lage ist, durch das Kulturmedium zugeführt werden. Dies geschieht durch die Zugabe von Seren, Hefeextrakt, Wachstumsfaktoren und Vitaminen (Tully 1995). Darüber hinaus enthalten die Medien für die Primärkultur Hemmstoffe, wie Thalliumsalze und Penicilline, um das gleichzeitige Wachstum der Begleitmikroflora zu verhindern (Razin 1983, Jennings-Gaines 2016). Geeignete Kulturmedien sind beispielsweise SP4 (Tully 1995, Ackerman 2019), TSB-1 (Patel et al. 2008) und Friis Medium (Cook et al. 2016). Trotz der Verwendung geeigneter Kulturmedien kommt es nicht selten zu Wachstumszeiten von sieben Tagen und mehr, sowie zum schnellen Absterben der Mykoplasmen nach einer kurzen stationären Wachstumsphase (Wang et al. 2020).

2.2 Klinik und Pathogenität von *Mycoplasma ovipneumoniae*

Mycoplasma ovipneumoniae ist Verursacher einer chronischen (auch als atypisch oder chronisch nicht-progressiv bezeichneten) Lungenentzündungen bei Schafen. Besonders betroffen sind Lämmer unter zwölf Monaten in der Intensivhaltung (Sheehan et al. 2007). Bei adulten Schafen treten seltener klinische Erkrankungen auf (Nicholas et al. 2015).

Die Erregerübertragung auf Jungtiere erfolgt üblicherweise durch Tröpfcheninfektion ausgehend von der kommensalisch besiedelten Nasenhöhle der Mutterschafe (Besser et al. 2019). Bei einer Übertragung im Frühling, kurz nach der Geburt, etabliert sich der Erreger während der Sommermonate in den Lungen der Lämmer, weshalb das entstehende Krankheitsbild in Australien auch als Sommerpneumonie bezeichnet wird (Alley et al. 1999).

Typischerweise kommt es zu Beginn der Erkrankung zu matt-roten kollabierten Lungenanteilen, die mit einer Bronchiolitis einhergehen. Innerhalb von zwei bis drei Wochen entwickeln sich diese zu festen, rot-grauen Hepatisationsherden, die im Endstadium zur grauen Hepatisation führen können (Nicholas 2008). Darüber hinaus können mit Fortschreiten der Erkrankung fibrinopurulente Pleuritiden und Perikarditiden, sowie Abszessbildungen in den Lungen der Tiere auftreten (Nicholas 2002). Histopathologisch zeigen sich massiv konsolidierte Areale, die mit einer Hyperplasie des Bronchialepithels und des peribronchialen lymphatischen Gewebes einhergehen. Innerhalb der Luftwege fällt ein von neutrophilen Granulozyten dominiertes Exsudat auf (Lindström et al. 2018). Somit handelt es sich hierbei auf histologischer Ebene um eine eitrig-nekrotisierende Alveolitis sowie eine schwere nekrotisierende Bronchiolitis (Nicholas 2002).

Klinisch präsentiert sich eine Infektion durch Husten und mukopurulenten Nasenausfluss einhergehend mit einer erhöhten Atemfrequenz. Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg der inneren Körpertemperatur, sowie zu einem Rückgang der Fresslust. Dadurch kommt es in weiterer Folge zu einer verminderten Wachstumsrate bei Lämmern und zu einer geringeren Laktationsleistung bei Muttertieren (Jones et al. 1982, Ayling und Nicholas 2007). Generell stellt sich das Ausmaß der klinischen Erscheinungen sehr heterogen dar und reicht von asymptomatischer Besiedelung der Atemwege bis hin zu schwerwiegenden pneumonischen Krankheitsbildern (McAuliffe et al. 2003). Gründe hierfür könnten Unterschiede in der Virulenz der einzelnen Stämme, eine unterschiedliche Immunantwort der betroffenen

Wirtstiere, wie auch eine altersabhängige Prädisposition, sein (Johnson et al. 2022). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Ausprägung einer klinisch manifesten Lungenerkrankung ist die Anwesenheit von bakteriellen Sekundärerregern. Zu diesen zählen *Bibersteinia trehalosi*, *Pasteurella multocida* (Besser et al. 2008, Wolff et al. 2019) und *Mannheimia haemolytica* (Jones et al. 1978, Gilmour et al. 1979, Nicholas et al. 2015), welche einen schwereren Verlauf begünstigen.

Nach Infektion kommt es zu einer sehr variablen Antikörperbildung des Wirtsorganismus, welche wiederum auf Unterschiede in der Antigenkomposition von *M. ovipneumoniae* schließen lässt (Thirkell et al. 1990b, Lin et al. 2008).

Neben dem Hauptwirt Schaf können auch bei Ziegen Pneumonien durch *M. ovipneumoniae* auftreten (Rifatbegovic et al. 2011). Hierbei kommt es zu ähnlichen Symptomen und Krankheitsverläufen wie beim Schaf (Goltz et al. 1986, Mohan et al. 1992, Martenchar et al. 1995), allerdings beobachtet man eine Häufung der Erkrankung im Winter und Frühling, da sich die Tiere aufgrund der kälteren Außentemperaturen auf engerem Raum aufhalten (Rong 2014).

Weiters können *M. ovipneumoniae*-Infektionen auch bei Wildwiederkäuern, wie Bergziegen (*Oreamnos americanus*) (Wolff et al. 2019) und Dall-Schafen (*Ovis dalli dalli*) auftreten (Black et al. 1988). Bei Moschusochsen (*Ovibos moschatus*) (Handeland et al. 2014), Elchen (*Alces alces*) (Highland et al. 2018) und Karibus (*Rangifer tarandus granti*) (Rovani et al. 2019) wurde der Erreger ebenfalls nachgewiesen. Besonders häufig leiden nordamerikanische Dickhornschafe (*Ovis canadensis canadensis*) an *M. ovipneumoniae* bedingten Lungenerkrankungen (Besser et al. 2008, Besser et al. 2013, Besser et al. 2014, Weyand et al. 2016, Cassirer et al. 2018, Shirkey et al. 2021).

2.3 Epidemiologie von *Mycoplasma ovipneumoniae*

Mycoplasma ovipneumoniae ist als Pneumonie-Erreger, sowie als Wegbereiter für Sekundärinfektionen bei kleinen Wiederkäuern weltweit verbreitet (Nicholas et al. 2008). So wurde das Bakterium im Jahr 2011 in den USA bei 88,5 % der mittels Nasentupfern beprobten schafhaltenden Betriebe nachgewiesen (Manlove et al. 2019). In China lag die Seroprävalenz in der Xinjiang Region, in der eine sehr hohe Anzahl von Schafen gehalten wird, im Zeitraum von 2012 bis 2014 bei 17,8 %. Zusätzlich konnte in 10,2 % der untersuchten Nasentupfer und in 28,9 % der untersuchten Lungen *M. ovipneumoniae* nachgewiesen werden, wobei sich hierbei Unterschiede zwischen den untersuchten Schafrassen ergaben (Cheng et al. 2015). Darauffolgend wurden zwischen 2018 und 2020 in derselben Region bereits über 40 % der Proben positiv auf *M. ovipneumoniae* getestet (Zhao et al. 2021). Auch in verschiedenen Ländern Europas wurde der Erreger mehrfach nachgewiesen, wie beispielsweise im Vereinigten Königreich, wo *M. ovipneumoniae* zwischen 2005 und 2019 über die Hälfte der isolierten Mykoplasmen aus kleinen Wiederkäuern darstellte (Deeney et al. 2021). In Frankreich wurde im Laufe der letzten Jahre ebenfalls ein Anstieg der Fallzahlen sowohl bei Schafen als auch bei Ziegen beobachtet, was darauf schließen lässt, dass *M. ovipneumoniae* als ätiologischer Faktor immer mehr an Bedeutung gewinnt (Jay et al. 2020).

Nach der Übertragung durch engen Kontakt zwischen Mutter- und Jungtier (Nicholas 2008), wirken diverse prädisponierende Faktoren schwächend auf das Immunsystem der Lämmer. Hierzu zählen hohe Außentemperatur gepaart mit einer relativ niedrigen Luftfeuchtigkeit in den Frühlings- bis Sommermonaten (Fernandéz et al. 2016), intensive Haltung bei gleichzeitig unzureichender Ventilation (Hervás et al. 1996), sowie Transportstress (Alley et al. 1999). Dadurch kommt es in weiterer Folge zu Sekundärinfektionen, die dann schwere Formen der Lungenerkrankung hervorrufen können (Di Provvido et al. 2017). Weiters scheinen auch Rasseunterschiede in der Empfänglichkeit für *M. ovipneumoniae* zu bestehen. Suffolk Schafe etwa werden im Vergleich zu anderen Rassen häufiger positiv getestet (Mousel et al. 2021), während Bashbay Schafe eine gewisse Resistenz gegenüber dem Erreger aufweisen (Du et al. 2020).

Die Heterogenität der von *M. ovipneumoniae* ausgelösten Krankheitsbilder begründet sich vermutlich auch auf das Auftreten einer großen Anzahl unterschiedlicher *M. ovipneumoniae*-

Stämme innerhalb einer Herde (Parham et al. 2006) und sogar innerhalb eines Individuums (Ionas et al. 1991). Darüber hinaus scheinen wirtsspezifische Unterschiede zwischen Isolaten von Ziegen und Schafen zu bestehen (Maksimovic et al. 2017). Somit könnte die Tatsache, dass die Infektion zwar zu einer geringen Mortalität, jedoch zu einer stark variierenden Morbidität führt (Nicholas 2008), durch die sehr variable Antigenkomposition von unterschiedlichen Stämmen bedingt sein (Thirkell et al. 1990a). Man geht weiters davon aus, dass die Stämme, die in den Lungen von Schlachtkörpern gefunden werden, primär aus den Nasenhöhlen stammen und sich in weiterer Folge in die unteren Atemwege ausbreiten. Jedoch unterscheiden sich nasale Stämme in ihrer Fähigkeit die Lunge besiedeln zu können (Ionas et al. 1985).

Durch die verminderten Wachstumsraten der Lämmer und Einbußen in der Fleischqualität (Besser et al. 2019), gewinnt *M. ovipneumoniae* auch aus wirtschaftlicher Sicht an Relevanz. So halbierte sich etwa die tägliche Gewichtszunahme, sobald mehr als 20 % der Lungenoberfläche eines Tieres pneumonisch verändert war (Baird et al. 2012). Zusätzlich von Bedeutung ist, dass der Erreger, sobald er einmal in einen Betrieb eingetragen wurde, dort über Jahre persistieren kann, wodurch immer wieder Krankheitsausbrüche auftreten (Nicholas et al. 2015). Infolge akkumulieren sich im Laufe der Zeit die Kosten, die durch die verringerte Leistung entstehen (Manlove et al. 2019).

2.4 Diagnostik von *Mycoplasma ovipneumoniae*

Als Probenmaterial für den Nachweis von *M. ovipneumoniae* eignen sich Abstriche aus der Nasenhöhle erkrankter und asymptomatisch besiedelter Tiere (Ongor et al. 2011), wie auch verändertes Lungenmaterial von Schlachttieren (Dae et al. 2020). Der direkte Erregernachweis erfolgt schließlich mithilfe kultureller Verfahren oder mittels PCR (Nicholas et al. 2008).

Für den kulturellen Nachweis können Medien wie Eaton's (Nicholas und Baker 1998, Patel et al. 2008), Hayflick's (Weiser et al. 2012), SP4 (Tully 1995, Ackerman et al. 2019) und Friis (Kobisch und Friis 1996, Cook et al. 2016), wie auch das für *M. ovipneumoniae* eigens entwickelte TSB-1 Medium (Patel et al. 2008) verwendet werden. Es erfolgt eine aerobe Bebrütung über mehrere Tage bei 37°C und 5-10%iger CO₂-Atmosphäre, bis auf den Festnährböden die für *M. ovipneumoniae* typischen Kolonien sichtbar werden (Parham et al. 2006, Jennings-Gaines et al. 2016, Rahman et al. 2016). In Flüssigkulturen kommt es beim Wachstum von *M. ovipneumoniae* und den damit einhergehenden Stoffwechselprozessen zu einer Absenkung des pH-Wertes, welche einen Farbumschlag des im Medium enthaltenen Phenolrot-Indikators bewirkt (Kobisch und Friis 1996).

Der molekulargenetische Nachweis mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) basiert auf der Amplifikation des Hitzeschockprotein 70-Gens (*hsp70*) mit anschließender Sequenzbestimmung oder der 16S rDNA-Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese (DGGE) (McAuliffe et al. 2003a, McAuliffe et al. 2003b, McAuliffe et al. 2005, Yang et al. 2013, Kilic et al. 2013). Darüber hinaus stehen für den quantitativen Nachweis Real-Time-PCR-Verfahren zur Verfügung (Yang et al. 2014, Nicholas 2008).

Zum indirekten Erregernachweis können ELISA sowie der indirekte Hämagglutinationstest angewendet werden (Thirkell et al. 1991, Giangaspero et al. 2012, Rong et al. 2014). Einschränkungen bestehen jedoch darin, dass die Antikörperbildung gerade zu Erkrankungsbeginn inkonstant und gering ausfällt (Niang et al. 1999). Daher empfiehlt es sich, gepaarte Serumproben zu untersuchen. Fallen die Antikörpertiter in der zweiten Probe höher aus, kann dies als aktive Infektion gewertet werden (Nicholas et al. 2008).

2.5 Therapie und Prävention von *Mycoplasma ovipneumoniae*-Infektionen

Die antibiotische Therapie bestätigter Mykoplasmen-Infektionen stellt aufgrund von intrinsischen und erworbenen Resistenzen eine große Herausforderung dar. Da Mykoplasmen keine Zellwand besitzen, sind alle Wirkstoffgruppen, die in die Zellwandsynthese eingreifen, wie beispielsweise Beta-Laktame und Glykopeptide, wirkungslos (Bébéar und Peyere 2005). Zusätzlich bestehen intrinsische Resistenzen gegenüber Sulfonamiden, Trimethoprim und Polymyxinen (Gautier-Bouchardon 2018). Als wirksam erwiesen sich *in vitro* Fluorchinolone, Tetracykline und Makrolide (Nicholas et al. 2015). Jedoch zeigen *in vivo* vor allem Makrolide, aber auch Tetracykline oft nicht die gewünschte Wirksamkeit (Gautier-Bouchardon 2018). Die beste Wirkung, zumindest *in vitro*, scheinen Fluorchinolone zu zeigen (Maksimovic et al. 2020). Diese gehören jedoch zu den Reserveantibiotika und dürfen daher nur unter bestimmten Voraussetzungen in der Tiermedizin angewendet werden (Kundmachung zu §20 Abs. 3 Tierärztegesetz). Hinzu kommt, dass auch wenn nach der Gabe von antimikrobiellen Substanzen klinisch eine Besserung durch Eindämmung der Sekundärinfektionen eintritt (Ayling und Nicholas 2007), Mykoplasmen häufig nicht aus dem Bestand eliminiert werden können (Besser et al. 2018).

Kommerzielle Impfstoffe gegen *M. ovipneumoniae* sind zum heutigen Zeitpunkt nicht erhältlich. Stallspezifische Impfstoffe können zwar nach bestätigtem Krankheitsgeschehen eingesetzt werden (Dudek et al. 2022), durch die Variabilität des Erregers bildet sich jedoch oft nur eine Schutzwirkung gegen einzelne Stämme aus (Weiser et al. 2012). Dennoch konnte experimentell ein signifikanter Anstieg der Antikörpertiter durch den Einsatz von bestandsspezifischen inaktivierten Impfstoffen bei Auen nachgewiesen werden. Diese impfstoffinduzierte Immunantwort kann von Mutterschafen auf ihre Jungtiere durch passiven Transfer über das Kolostrum übergehen (Ziegler et al. 2014).

Weitere präventive Maßnahmen stellen die Kontrolle des Tierverkehrs und die Quarantäne neu zugekaufter Tiere dar. Klinisch erkrankte sowie asymptomatische Trägertiere sollen durch systematische Testungen erkannt und isoliert bzw. aus dem Bestand entfernt werden (Nicholas 2008, Garwood et al. 2020, Maksimovic et al. 2022). Darüber hinaus muss eine Immunsuppression der gehaltenen Tiere, beispielsweise durch Stress unbedingt vermieden werden (Pitcher und Nicholas 2005).

2.6 Typisierungsverfahren für *Mycoplasma ovipneumoniae*

Zur Beantwortung infektionsepidemiologischer Fragestellungen werden gegenwärtig bevorzugt molekulare Typisierungsverfahren zur Charakterisierung von Mykoplasmen-Isolaten eingesetzt (Cassirer et al. 2017, Kamath et al. 2019).

Für die phänotypische Charakterisierung von Mykoplasmen eignet sich die MALDI-ToF Massenspektrometrie. Die Technologie basiert auf der massenspektrometrischen Analyse von bakteriellen ribosomalen Proteinen und dem Vergleich der dabei erzeugten Protein-Massen-Fingerprints (Pereyre et al. 2013, Xiao et al. 2014, Becker et al. 2015, Barbosa et al. 2022).

Zur genotypischen Charakterisierung von Mykoplasmen hat sich seit geraumer Zeit die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) durchgesetzt (Tatay-Dualde et al. 2017). Hierbei werden üblicherweise fünf bis sieben Haushaltsgene, welche an basalen Zellfunktionen beteiligt sind, auf Allel-Unterschiede untersucht. Im Gegensatz zu phänotypischen Typisierungsverfahren können hierbei aufgrund der Verwendung von Sequenzdaten Veränderungen auf DNA-Ebene erkannt werden. Ein wesentlicher Vorteil besteht darin, dass keine lebenden Mikroorganismen oder hochwertige genomische DNA vorliegen müssen. Weiters können mittels MLST bis zu mehrere tausend Isolate gleichzeitig analysiert werden, wodurch der Personal- und Kostenaufwand gerade bei Studien mit großen Datensätzen erheblich gesenkt werden kann (Belén et al. 2009). Für *M. ovipneumoniae* steht derzeit kein klassisches MLST-Schema zur Verfügung. Stattdessen werden Sequenzunterschiede in den 16S rRNA-Genen und in der 16S-23S intergenischen Spacer-Region ermittelt und die Typisierung durch Bestimmung von Sequenzunterschieden in den Haushaltsgenen *rpoB* und *gyrB* ergänzt. Unter Anwendung dieses auf vier Gen-Loci beschränkten Typisierungsverfahrens können *M. ovipneumoniae*-Isolate geographischen als auch wirtsspezifischen Clustern zugeordnet werden, eine präzise Verwandtschaftsanalyse ist durch das mangelnde Auflösungsvermögen jedoch nicht möglich (Kamath et al. 2016, Cassirer et al. 2017, Kamath et al. 2019).

3 Material und Methoden

3.1 Mykoplasmen-Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden 56 kryokonservierte *M. ovipneumoniae*-Stämme und der Typstamm Y-98^T untersucht. Der Großteil der Stämme (n = 30) wurde aus Lungenproben von isländischen Schafen in den Jahren 2015 bis 2018 isoliert. Zweiundzwanzig Isolate stammten von Schafen und Ziegen aus Österreich. Diese konnten aus Lungenproben, der Nasenhöhle, der Trachea und bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) gewonnen werden. Jeweils zwei Isolate stammten von Ziegen aus Deutschland und dem Sudan. Die ältesten, in dieser Arbeit untersuchten Stämme kommen aus dem Jahr 2000, die neuesten aus dem Jahr 2022.

Tabelle 1: Isolierungsjahr, Wirt, Probenart und Herkunftsland der untersuchten Isolate

Stamnummer	Jahr	Wirt	Probe	Land
MoS5859_6L2018I	2018	Schaf	Lunge	Island
MoS5669_1L2018I	2018	Schaf	Lunge	Island
MoS5858_2L2018I	2018	Schaf	Lunge	Island
MoS5945_6L2018I	2018	Schaf	Lunge	Island
MoS5667_11L2018I	2018	Schaf	Lunge	Island
MoS5668_2L2018I	2018	Schaf	Lunge	Island
MoS5857_3L2018I	2018	Schaf	Lunge	Island
MoS5165_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5169_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5309_3L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5313_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5319_4L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5321_3L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5322_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5342_1L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5345_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5351_1L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5353_1L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island

MoS5354_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5419_1L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5422_1L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5424_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5437_3L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5440_3L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5463_3L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5464_3L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5466_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5473_2L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS5474_3L2016I	2016	Schaf	Lunge	Island
MoS6328_3L2015I	2015	Schaf	Lunge	Island
MoZ5N2001A	2001	Ziege	Nase	Österreich
MoZ1N2001A	2001	Ziege	Nase	Österreich
MoS92N2004A	2004	Schaf	Nase	Österreich
MoZ7059L2005D	2005	Ziege	Lunge	Deutschland
MoZ181_710T2007A	2007	Ziege	Trachea	Österreich
MoSVS5B2007A	2007	Schaf	BALF	Österreich
MoZ278N2007A	2007	Ziege	Nase	Österreich
MoZ279L2007A	2007	Ziege	Lunge	Österreich
MoZ167L2008A	2008	Ziege	Lunge	Österreich
MoZ168T2008A	2008	Ziege	Trachea	Österreich
MoZ169N2008A	2008	Ziege	Nase	Österreich
MoZ172N2008A	2008	Ziege	Nase	Österreich
MoZGL19L2000S	2000	Ziege	Lunge	Sudan
MoZF38L2000S	2000	Ziege	Lunge	Sudan
MoS167L2009A	2009	Schaf	Lunge	Österreich
MoS1839L2009A	2009	Schaf	Lunge	Österreich
MoZ679L2015A	2015	Ziege	Lunge	Österreich
MoZ792L2017A	2017	Ziege	Lunge	Österreich

MoZ2167_1B2017A	2017	Ziege	BALF	Österreich
MoZ2167_2B2017A	2017	Ziege	BALF	Österreich
MoS2970T2019A	2019	Schaf	Trachea	Österreich
MoZ2059N2020A	2020	Ziege	Nase	Österreich
MoZAnicon2020D	2020	Ziege	unbekannt	Deutschland
MoZ225L2022A	2022	Ziege	Lunge	Österreich
MoS933N2022A	2022	Schaf	Nase	Österreich
MoS3261N2022A	2022	Schaf	Nase	Österreich

3.2 Kultivierung von *Mycoplasma ovipneumoniae*

Für die Kultivierung wurden die Isolate auf Friis-Agarplatten (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) ausgestrichen und bei 37°C bei mikroaeroben Bedingungen bebrütet. Nach einer stammabhängigen Bebrütungszeit von drei bis 14 Tagen wurde von jedem Stamm eine Einzelkolonie mithilfe einer Glaspipette gepickt, in 3 ml Friis-Flüssigmedium überführt und erneut bei 37°C aerob bebrütet. Das Wachstum von *M. ovipneumoniae* konnte mittels eines im Medium befindlichen Phenolrotindikators, welcher einen pH-Wert-abhängigen Farbwechsel von Rot auf Orange-Gelb anzeigt, festgestellt werden. Basierend auf Glukose-Fermentationsprozessen kommt es zu einer Ansäuerung und damit zum beschriebenen Farbumschlag. Die Inkubationszeit bis zum Umschlag variierte ebenfalls zwischen 3 und 14 Tagen.

Da manche Stämme besseres Wachstum in modifiziertem SP4-Medium (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) zeigten, wurde die zuvor beschriebene Kultivierung bei diesen Stämmen auf dieselbe Weise mit modifiziertem SP4-Medium durchgeführt.

3.3 MALDI-ToF Massenspektrometrie

Zur Vorbereitung der MALDI-ToF massenspektrometrischen Untersuchung wurden zunächst die Flüssigkulturen einer Proteinextraktion unterzogen. Dafür wurde 1 ml Flüssigkultur in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verbracht und für 7 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 100 µl Wasser (HPLC-Grad, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) resuspendiert und für 5 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Zellpellet mit 15 µl 70%iger Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) und mit 15 µl 100%igem Acetonitril (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) gemischt und danach für 2 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert.

Zur Durchführung der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde jeweils 1 µl des Proteinextrakts auf eine wiederverwendbare Trägerplatte aus poliertem Edelstahl (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) aufgetragen und luftgetrocknet. Anschließend wurden die luftgetrockneten Proteinextrakte mit 1 µl Matrix-Lösung (2,5 mg α - Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure [Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland] in 250µl Lösungsmittel, bestehend aus 50 % Acetonitril, 47,5 % H₂O und 2,5 % Trifluoressigsäure [Sigma-Aldrich, Wien, Österreich]) überschichtet und erneut luftgetrocknet.

Die Trägerplatte wurde daraufhin in den MALDI-ToF Biotyper (Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) eingeschleust und das Probenmaterial mit einem Stickstofflaser in linearem, positivem Ionenmodus 240-mal manuell unter Einsatz der FlexControl 3.4 Software (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) beschossen. Mithilfe der FlexAnalysis 3.4 Software (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) wurden die dabei generierten Spektren einer Qualitätskontrolle unterzogen und an die Grundlinie angepasst. Anschließend wurden unter Einsatz der MBT Compass Explorer Software (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland), basierend auf Peak-Intensitätsunterschieden und Peak-Verschiebungen, Spektren-Distanzwerte errechnet und als Dendrogramm dargestellt.

3.4 DNA-Extraktion

Zur Vorbereitung der Gesamtgenomsequenzierung wurde zunächst qualitativ hochwertige DNA aus den Flüssigkulturen gewonnen. Hierfür wurde das MagAttract HMW (*High Molecular Weight*) DNA Extraktionskit (Qiagen N.V., Niederlande) verwendet. Zuerst wurde 1 ml der Flüssigkultur in ein Reaktionsgefäß pipettiert (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), bei 20.000 x g für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde mit 180 µl Puffer ATL, sowie 20 µl Proteinase K vermischt und anschließend bei 56°C und 900 rpm (*rounds per minute*) in einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten geschüttelt und inkubiert. Nach einer dreiminütigen Abkühlphase wurden die Proben gevortext, mit 4 µl RNase A vermischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 15 µl Suspension G, in welcher die für den Extraktionsvorgang entscheidenden *Magnetic Beads* enthalten sind, sowie 280 µl Puffer MB dazu pipettiert und nach erneutem Vortexen das Probenmaterial bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert. Darauffolgend wurden die Reaktionsgefäße in eine Magnethalterung (*MagJET Separation Rack*, Thermo Scientific) verbracht. Nach Abtrennung der *Magnetic Beads* aus der Suspension konnte der Überstand abpipettiert werden.

Anschließend wurden die jeweiligen Probengefäße wieder aus der Magnethalterung entfernt. Für den ersten Waschschrift wurden 700 µl Puffer MW1 hinzugefügt und das Probenmaterial bei Raumtemperatur für eine Minute in dem Thermomixer bei 1400 rpm geschüttelt. Daraufhin wurden die Proben wiederum in den Magnetständer überführt. Der hier beschriebene Waschschrift wurde daraufhin noch einmalig mit Puffer MW1 und zweimalig mit Puffer PE wiederholt.

Nach einer erneuten Abtrennung der *Magnetic Beads* und Entfernung des Überstandes wurden die Reaktionsgefäße in der Magnethalterung belassen, um die Magnetpartikel zweimalig mit jeweils 700 µl Nuklease-freiem Wasser zu waschen. Danach wurden die Probengefäße von der Magnethalterung genommen und 80 µl AE-Puffer zu den *Magnetic Beads* pipettiert. Nach einer weiteren dreiminütigen Inkubation im Thermomixer bei Raumtemperatur und 1400 rpm wurden die Probengefäße abermals in die Magnethalterung verbracht. Abschließend konnte das gewonnene DNA-Extrakt in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

3.5 Bibliothekserstellung und Illumina-Sequenzierung

Um einen DNA-Input von 100 bis 500 ng für die Illumina-Sequenzierung zu erreichen, wurde zunächst eine Nanodrop-Messung (ThermoScientific, Wien, Österreich) zur DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Reinheit der extrahierten DNA wurde durch deren UV-Absorptionsgrad ermittelt.

Die Bibliotheksherstellung wurde unter Einsatz des Illumina *DNA Prep Kits* (Illumina Inc., San Diego, USA) von Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Gesamtgenomsequenzierung der *M. ovipneumoniae*-Stämme unter Einsatz der Illumina MiniSeq-Sequenzierungsplattform (Illumina Inc., San Diego, USA) des Instituts für Mikrobiologie.

3.6 Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung

Zur Etablierung eines cgMLST-Schemas für *M. ovipneumoniae* wurde die Ridom SeqSphere+ Version 7.0 Software (Ridom GmbH, Münster, Deutschland) verwendet (Ghanem und El-Gazzar 2018, Ghanem et al. 2018, Büniger et al. 2021). Zunächst wurde das geschlossene Referenzgenom des Typstammes Y-98^T und 15 weitere in der NCBI GenBank Datenbank verfügbare Genomsequenzen (Tabelle 2) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) auf die Ridom SeqSphere-Plattform geladen. Danach wurden mithilfe des Target-Definer-Tools cgMLST taugliche Zielgene im Referenzgenom ausgewählt, wobei folgende Filter angewendet wurden: 1) Filter für homologe Gene (Ausschluss von Genen mit > 90% Identität und >100 bp), 2) Filter für Startcodon (Ausschluss von Genen ohne Startcodon), 3) Filter für die Mindestlänge (Ausschluss von Genen < 50 bp), 4) Filter für Stoppcodon (Ausschluss von Genen mit fehlendem, mehrfachen oder falsch platziertem Stoppcodon) und 5) Filter für Überlappungen (Ausschluss des kürzeren von zwei Genen, die sich um mehr als 4 bp überlappen). Daraufhin erfolgte ein paarweiser Vergleich der ermittelten Zielgene des Referenzgenoms mit jenen der 15 Abfragegenome, wobei nur Gene die eine Sequenzidentität >90 % und eine Überlappung von 100 % aufwiesen, endgültig in das cgMLST Schema aufgenommen wurden. Nach Entwicklung des Typisierungsschemas wurden schließlich alle verfügbaren *M. ovipneumoniae*-Genome (inklusive der in der Diplomarbeit generierten Genomsequenzen) mittels neuetablierter cgMLST analysiert und hierbei individuelle Allel-Profile erstellt. Zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse wurden die ermittelten Allel-Profile einer Neighbour-Joining-Distanzanalyse unterzogen und darauf basierend ein phylogenetischer Stammbaum konstruiert.

Tabelle 2: Öffentlich verfügbare Genome (geschlossene und Entwurfsgenome) von *M. ovipneumoniae*

Stamm	Genomgröße (Basen)	Accession-Nummer	Wirt	Land	Jahr
Y-98 ^{Ta}	1.020.732	JOTL000000000	Schaf	Australien	<1972
ATCC 29419 ^T	1.021.088	AGRE000000000	Schaf	Australien	<1972
USP-BR2017	1.129.271	JAMWEX000000000	Schaf	Brasilien	2017

150^a	1.053.380	CP079200	Schaf	Bosnien & Herzegowina	2009
274^a	1.081.404	CP079199	Ziege	Bosnien & Herzegowina	2010
TC1	1.018.110	JOTE00000000	Ziege	China	2010
TC2	1.011.740	JOTF00000000	Ziege	China	2010
TC3	1.038.006	JOTG00000000	Ziege	China	2010
TC4	996.705	JOTH00000000	Ziege	China	2010
TC5	997.136	JOTI00000000	Ziege	China	2010
TC7	989.769	JOTJ00000000	Ziege	China	2010
TC8	1.000.118	JOTK00000000	Ziege	China	2010
NM2010	1.084.158	JAKV00000000	Schaf	China	2010
14811	1.071.502	JFAD00000000	Schaf	Frankreich	2007
SC01	1.020.200	AFHO00000000	Ziege	China	unbekannt

^TTypstamm, ^ageschlossenes Genom

4.2 Phylogenetische Analyse von *Mycoplasma ovipneumoniae* mittels Kerngenom-MLST

Der auf cgMLST-Ergebnissen beruhende phylogenetische Stammbaum zeigt eine eindeutige tierartsspezifische Gruppierung der Isolate. So gliedern sich die untersuchten *M. ovipneumoniae*-Stämme prinzipiell in Schaf- und Ziegenisolate. Das Schaf-Cluster teilt sich weiter in A) Stämme, die von Schafen aus Island stammten und B) Schafisolate aus Österreich und anderen Regionen der Welt (veröffentlichte Genome von Schafisolaten). Somit ergibt sich ein klar erkennbares geografisches Cluster für *M. ovipneumoniae*-Stämme, die aus isländischen Schafen isoliert werden konnten. Innerhalb der Ziegenisolate (C) fällt lediglich eine nahe Verwandtschaft der zwei aus dem Sudan stammenden Stämme MoZGL19L2000S und MoZF38L2000S auf. Innerhalb der anderen Ziegenisolate (inklusive der veröffentlichten Genome von Ziegenisolaten) zeigt sich keine klare geografische Gruppierung. Darüber hinaus gruppieren sich die epidemiologisch zusammenhängenden Isolate MoZ5N2001A und MoZ1N2001A, MoZ278N2007A und MoZ279L2007A, MoZ168T2008A, MoZ169N2008A und MoZ172N2008A, MoZ2167_1B2017A und MoZ2167_2B2017A, sowie MoS5342_1L2016I und MoS5345_2L2016I, welche vom selben Betrieb stammten.

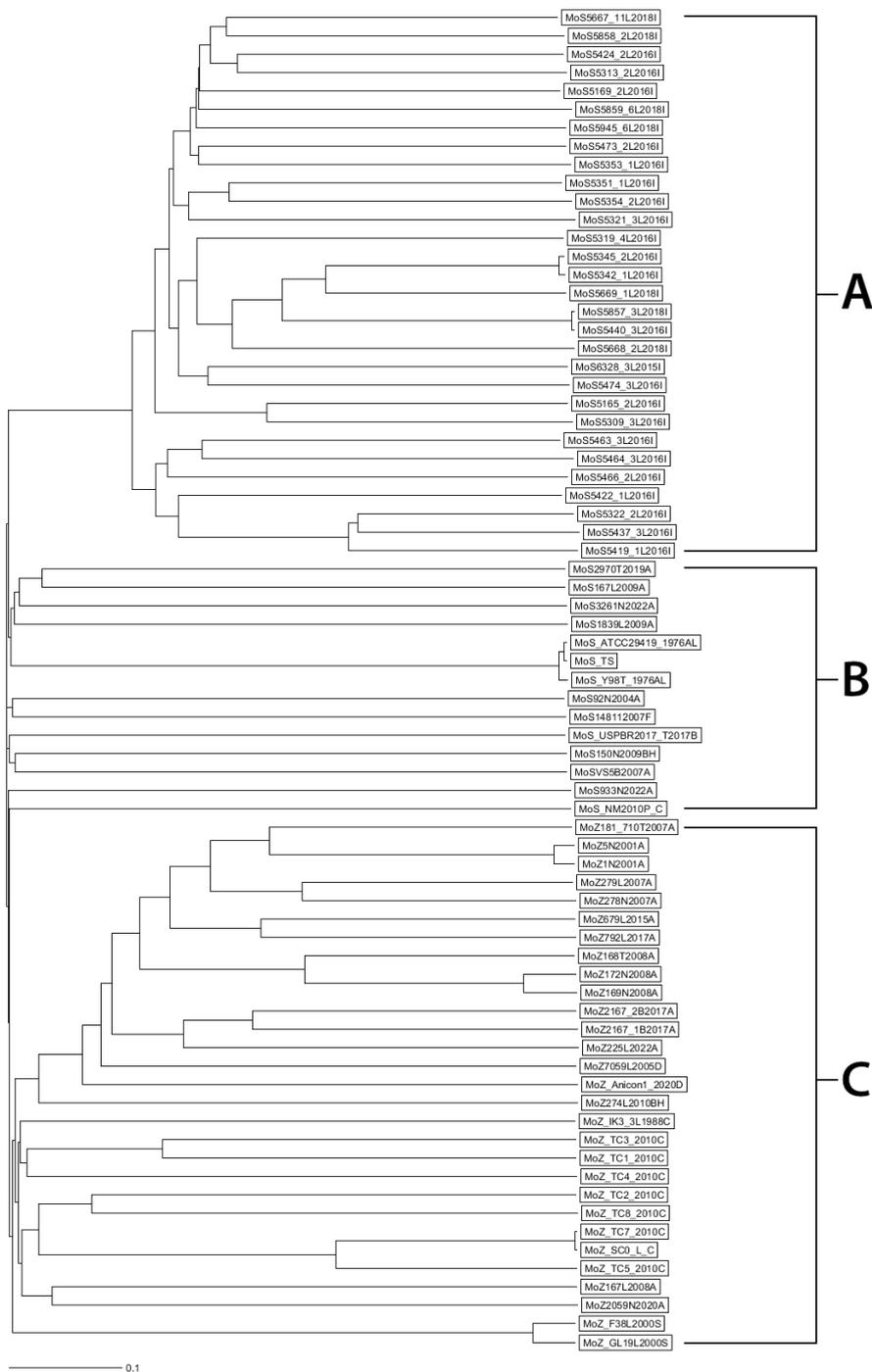


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der mittels cgMLST untersuchten *M. ovipneumoniae*-Stämme: A) Stämme von isländischen Schafen, B) Stämme von österreichischen Schafen und öffentlich verfügbare Genome von Schafisolaten aus anderen Regionen der Welt, C) Ziegenisolat (inklusive veröffentlichte Genome von Ziegenisolaten)

5 Diskussion

Die Infektion kleiner Wiederkäuer mit *M. ovipneumoniae* führt aufgrund der Therapieresistenz des Erregers, des Fehlens kommerziell erhältlicher Impfstoffe und der Schwierigkeit der Elimination aus Beständen weltweit zu erheblichen finanziellen Verlusten. Somit sind genaue Kenntnisse über die Epidemiologie des Erregers und die Verbreitung einzelner Stämme unerlässlich für die Prävention von *M. ovipneumoniae* bedingten Lungenerkrankungen. Ziel der Diplomarbeit war es daher, 56 ausgewählte *M. ovipneumoniae*-Stämme, die im Zeitraum von 2000 bis 2022 aus Schafen und Ziegen aus Österreich, Island, Deutschland und dem Sudan isoliert werden konnten, phänotypisch mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie und genotypisch mittels neuetablierter cgMLST zu charakterisieren, um dabei die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten *M. ovipneumoniae*-Isolate zu ermitteln.

Für die Aufarbeitung infektionsepidemiologischer Fragestellungen eignen sich für Mykoplasmen molekulargenetische Typisierungsverfahren, wobei sich vorrangig die MLST durchgesetzt hat. Während sich die konventionelle MLST standardmäßig auf die Analyse von sechs bis sieben Gen-Loci stützt, werden bei der cgMLST hunderte Zielgene des Kerngenoms analysiert. Für die cgMLST ist allerdings eine Isolierung der Erreger erforderlich, da diese nur an reinen Isolaten durchgeführt werden kann, während der Einsatz der konventionellen MLST auch mit klinischen Proben möglich ist (Ghanem und El-Gazzar 2019). Die cgMLST bietet gegenüber der konventionellen MLST jedoch eine höhere Trennschärfe. Darüber hinaus wird angestrebt, einen alternativen Sequenzierungsansatz zu entwickeln, welcher direkt an klinischen Proben durchgeführt werden kann, wodurch die anspruchsvolle Isolation und Kultivierung der Mykoplasmen entfällt (Ghanem und El-Gazzar 2018)

In zahlreichen Studien konnten die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb veterinärmedizinisch bedeutsamer Mykoplasmen-Arten und deren Unterteilung in Cluster mittels MLST dargestellt werden. Kamath et al. (2019) gelang es etwa, domestizierte Schafe als Infektionsquelle für *M. ovipneumoniae*-Infektionen bei wildlebenden Dickhornschafen zu identifizieren. Für die genotypische Charakterisierung der untersuchten *M. ovipneumoniae*-Stämme wurde in dieser Studie ein ungewöhnliches MLST-Schema, welches auf der Analyse von Sequenzunterschieden in den 16S rRNA-Genen, der 16S-23S intergenischen Spacer-Region und den Haushaltsgenen *rpoB* und *gyrB* basierte, eingesetzt. Unter Anwendung dieses

auf vier Gen-Loci beschränkten Typisierungsverfahrens konnte eine ausgesprochene Wirtsspezifität der untersuchten Isolate im Sinne des Auftretens von Schaf- und Ziegenstämmen ebenfalls eindeutig festgestellt werden. Allerdings treten bei jener Vorgehensweise auch einige Einschränkungen auf. So wurde angenommen, dass jene vier Gen-Loci die genomische Variation der untersuchten *M. ovipneumoniae*-Stämme genau repräsentieren. Da dies nicht der Fall sein muss ging man davon aus, dass durch das Miteinbeziehen weiterer Gen-Loci (wie z.B. bei der cgMLST) eine bessere topologische und phylogenetische Auflösung erzielt werden kann. Weiters nahm man an, dass die generierten Sequenzen der vier Gen-Loci von ein und demselben Stamm stammten. Somit konnten Mischinfektionen mit mehreren *M. ovipneumoniae*-Stämmen nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Diplomarbeit konnten auch die von isländischen Schafen stammenden Stämme in ein klar abgrenzbares geografisches Cluster gruppiert werden. Jene geografische Gruppierung trat auch bei anderen mittels MLST charakterisierten Mykoplasmen-Arten auf. Tatay Dualde et al. (2017) konnte unter Anwendung eines konventionellen MLST-Schemas für *M. capricolum* ssp. *capricolum* geografische Unterschiede zwischen italienischen und spanischen Isolaten feststellen. Des Weiteren konnte Mayor et al. (2008) mithilfe der MLST aufzeigen, dass *M. hyopneumoniae*-Stämme in Farmen, die sich in geografischer Nähe zueinander befanden, phylogenetisch näher verwandt waren als jene von entfernt gelegenen Betrieben.

Die phänotypische Analyse der in der Arbeit untersuchten Isolate mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie (MALDI-ToF-MS) zeigte ebenfalls, mit wenigen Ausnahmen, eine Gruppierung in schaf- und ziegenassoziierte *M. ovipneumoniae*-Stämme. Auch in vorangegangenen Studien konnte die MALDI-ToF-Massenspektrometrie als Methode zur Differenzierung von Stämmen innerhalb einer Mykoplasmen-Art erfolgreich angewendet werden. Peyrere et al. (2013) etwa gelang es, die untersuchten human- (*M. pneumoniae*) und wiederkäuerpathogenen Mykoplasmen (*M. bovis*, *M. agalactiae*) in Clustern zu gruppieren. Xiao et al. (2014) konnten unter Anwendung des speziell für MALDI-ToF-Daten entwickelten Software-Programms ClinProTools (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) den massenspektrometrischen Differenzierungsgrad für *M. pneumoniae*-Isolate mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 % deutlich erhöhen. Becker et al. (2015) wiederum konnten *M. bovis*-Isolate mittels MALDI-ToF MS, abhängig von deren Isolierungsjahr in Subtypen einteilen, welche durch die genotypische Analyse mittels MLST und MLVA bestätigt wurden.

Barbosa et al. (2022) zeigten mithilfe der massenspektrometrischen Analyse, dass sich die untersuchten *M. agalactiae*-Isolate in geografische Cluster einteilen lassen und sich die MALDI-ToF MS zur Subtypisierung von *M. agalactiae* als geeignet erweist.

Durch die Kombination aus genotypischer und phänotypischer Analyse mittels cgMLST und MALDI-ToF-MS konnte insgesamt eine genauere Charakterisierung der untersuchten *M. ovipneumoniae*-Isolate erzielt und Rückschlüsse auf die Infektionsepidemiologie des Erregers gezogen werden.

6 Zusammenfassung

Mycoplasma (M.) ovipneumoniae ist ein weltweit auftretender, respiratorischer Infektionserreger bei kleinen Wiederkäuern. Als Auslöser von atypischen Pneumonien und als Wegbereiter für Sekundärinfektionen ist der Erreger, auch aufgrund seiner Therapieresistenz, von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Über die Infektionsepidemiologie des Erregers ist wenig bekannt. Ziel dieser Studie war es daher, 56 *M. ovipneumoniae*-Stämme, welche aus Schafen und Ziegen im Zeitraum 2000 bis 2022 in unterschiedlichen Ländern (Island, Österreich, Deutschland, Sudan) isoliert werden konnten, mittels molekularer Typisierungsverfahren zu analysieren, um dabei ihre Verwandtschaftsverhältnisse aufzuzeigen.

Die phänotypische Charakterisierung erfolgte mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie, wobei aus den generierten Spektren, basierend auf Distanzwerten, ein Dendrogramm erstellt wurde. Zur genotypischen Charakterisierung wurde ein neuetabliertes, hochauflösendes Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierungs-Schema (cgMLST) basierend auf Gesamtgenomsequenzdaten eingesetzt. Die grafische Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse erfolgte durch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums basierend auf den ermittelten Allel-Profilen. Sowohl der phylogenetische Stammbaum der cgMLST-Analyse als auch das MALDI-ToF-Dendrogramm zeigte eine eindeutige wirtsspezifische Unterteilung der untersuchten *M. ovipneumoniae*-Stämme in Schaf- und Ziegen-Isolate. Zusätzlich ermöglichte die cgMLST eine Gruppierung von Stämmen, die von isländischen Schafen stammten, in ein eigenes geografisches Cluster. Somit zeigte sich, dass sich die eingesetzten molekularen Typisierungsverfahren, insbesondere aber die cgMLST hervorragend dazu eignen, Einblicke in die Infektionsepidemiologie von *M. ovipneumoniae* zu gewinnen.

7 Summary

Mycoplasma (M.) ovipneumoniae is a global respiratory pathogen of small ruminants. It is the causative agent of therapy-resistant atypical pneumonia which often occurs with secondary bacterial infection. Despite its great economic importance, the epidemiology of *M. ovipneumoniae* infections is largely unknown. This study therefore aimed at investigating 56 *M. ovipneumoniae* strains isolated from sheep and goats between 2000 and 2022 in different countries (Austria, Iceland, Germany, Sudan) by employing molecular typing methods to determine their overall relatedness.

Phenotypic characterization was performed by MALDI-ToF mass spectrometry, and a dendrogram was generated from the spectra based on distance values. For genotypic characterization, a newly established high-resolution core genome multi-locus sequence typing (cgMLST) scheme based on whole genome sequence data was used. Relatedness between strains was illustrated by a phylogenetic tree constructed from allelic profile data. Both the cgMLST phylogenetic tree and the MALDI-ToF dendrogram showed a clear host-specific separation of *M. ovipneumoniae* strains into sheep and goat isolates. In addition, cgMLST allowed grouping of strains derived from Icelandic sheep into a distinct geographic cluster. Altogether, the applied molecular typing techniques, and, in particular the cgMLST, were shown to be excellent tools for gaining insights into the epidemiology of *M. ovipneumoniae* infections.

8 Abkürzungsverzeichnis

M.	<i>Mycoplasma</i>
MALDI-ToF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
cgMLST	Kerngenom (<i>core genome</i>) Multilokus-Sequenztypisierung
%	Prozent
pH	potentia hydrogenii
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Aassay
°C	Grad Celsius
ml	Milliliter
g	Gravitationskonstante
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
H ₂ O	Wasser
kDa	Kilodalton
rpm	Umdrehungen pro Minute
ng	Nanogramm
UV	ultraviolett
Mb	Megabasen

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Isolierungsjahr, Wirt, Probenart und Herkunftsland der untersuchten Isolate.....	15
Tabelle 2: Öffentlich verfügbare Genome (geschlossene und Entwurfsgenome) von <i>M. ovipneumoniae</i>	22

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dendrogramm der generierten MALDI-ToF Massenspektren von <i>M. ovipneumoniae</i> -Isolaten, basierend auf deren Distanzwerten (x-Achse). Deutlich erkennbar ist die tierartsspezifische Gruppierung der untersuchten Stämme.....	24
Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der mittels cgMLST untersuchten <i>M. ovipneumoniae</i> -Stämme: A) Stämme von isländischen Schafen, B) Stämme von österreichischen Schafen und öffentlich verfügbare Genome von Schafisolaten aus anderen Regionen der Welt, C) Ziegenisolate (inklusive veröffentlichte Genome von Ziegenisolaten)	26

11 Literaturverzeichnis

- Ackerman M.G.; Schneider D.A.; Baker K.N.K.; Besser T.E.; 2019: comparison of three methods of enumeration for *Mycoplasma ovipneumoniae*. Journal of Microbiological Methods, 165, 105700
- Alley M.R.; Clarke J.K.; Ionas G.; 1999: Chronic non-progressive pneumonia of sheep in New Zealand- a review of the role of *Mycoplasma ovipneumoniae*. New Zealand Veterinary Journal 47, 155-160
- Arachambault M.; Cullinane A.; Leonard F.; Maguire D.; Markey B.; 2013: The Mycoplasmas (class *Mollicutes*), Laboratory Diagnosis, In: Markey B.K.; Hrsg. Clinical Veterinary Microbiology, 2nd Edition, Edinburgh, Mosby Elsevier, 423-431
- Ayling R.D.; Nicholas R.A.J.; 2007: Mycoplasma respiratory infections. In: Atiken I.D., Hrsg. Diseases of Sheep, 4th edition, Oxford, UK, Blackwell Publishing, 231-235
- Baird H.J.; Clarke S.M.; Johnson P.L.; 2012: Development of a visual scoring system for ovine pneumonia at the processing plant. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production 1176-5283, 72, 169-171
- Balish M.; Bertaccini A.; Blanchard A.; Brown D.; Browning G.; Chalker V.J.; Frey J.; Gasparich G.; Hoelzle L.; Knight T.; Knox C.; Kuo C.H.; Manso-Silvan L.; May M.; Pollack J.; Ramirez A.; Spergser J.; Taylor-Robinson D.; Volokhov D.; Zhao Y.; 2019: Recommended rejection of the names *Malacoplasma* gen. nov., *Mesomycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasmataceae* fam. nov., *Mycoplasmoidaceae* fam. nov., *Mycoplasmoidales* ord. nov., *Mycoplasmoides* gen. nov., *Mycoplasmaopsis* gen. nov. [Gupta, Sawnani, Adeolu, Alnajjar and Oren 2018] and all proposed species comb. nov. placed therein. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 69, 10.1099
- Barbosa M.S.; Spergser J.; Marques L.M.; Timenetsky J.; Rosengarten R.; Chopra-Dewasthaly R.; 2022: Predominant single stable VpmaV expression in strain GM139 and major differences with *Mycoplasma agalactiae* type strain PG2. Animals (Basel), 12, 265
- Belén A.; Pavón I.; Maiden M.C.J.; 2009: Multilocus sequence typing. Methods in molecular biology, 551, 129-140

- Bébéar C.M; Pereyre S.; 2005: Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. Current drug targets. Infectious Disorders, 5, 263-271
- Becker C.A.M.; Thibault F.M.; Arcangioli M.A.; Tardy F.; 2015: Loss of diversity within *Mycoplasma bovis* isolates collected in France from bovines with respiratory diseases over the last 35 years. Infection, Genetics and Evolution, 33, 118-126
- Besser T.E.; Cassirer E.F.; Potter K.E.; VanderSchalie J.; Fischer A.; Knowles D.P.; Herndon D.R.; Rurangirwa F.R.; Weiser G.C.; Srikumaran S.; 2008: Association of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection with population-limiting respiratory disease in Free-ranging Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). Journal of Clinical Microbiology 46, 423-430
- Besser T.E.; Cassirer E.F. ; Highland M.A.; Wolff P.; Justice-Allen A.; Mansfield K.; Davis M.A.; Foreyt W.; 2013: Bighorn sheep pneumonia: Sorting out the cause of a polymicrobial disease. Preventive Veterinary Medicine, 108, 85-93
- Besser T.E.; Cassirer E.F. ; Potter K.A.; Lahmers K.; Oaks J.L.; Shanthalingam S.; Srikumaran S.; Foreyt W.J.; 2014: Epizootic pneumonia of bighorn sheep following experimental exposure to *Mycoplasma ovipneumoniae*. PLoS ONE, 9, e110039
- Besser T.E.; Casebolt D.; Hill N.; 2018: Use of intra-nasal antibiotics as an aid to cleaning *Mycoplasma ovipneumoniae* carriage by domestic sheep. Biennial Northern Wild Sheep and Goat Council Symposium, 21, 118
- Besser T.E.; Levy J.; Ackerman M.; Nelson D.; Manlove K.; Potter K.A.; Busboom J.; Benson M.; 2019: A pilot study of the effects of *Mycoplasma ovipneumoniae* exposure on domestic lamb growth and performance. PloS ONE,14, e0207420
- Black S.R.; Barker I.K.; Mehren K.G.; Crawshaw G.J.; Rosendal S.; Ruhnke L.; Thorsen J.; Carman P.S.; 1988: An epizootic of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection in captive dall sheep (*Ovis dalli dalli*). Journal of Wildlife Diseases, 24, 627-635
- Bünger M.; Posch M.; Wiesauer J.; Loncaric I.; Cabal Rosel A.; Ruppitsch W.; Ladinig A.; Spergser J.; 2021: A core genome multilocus sequence typing scheme for *Mycoplasma hyorhinis*. Veterinary Microbiology, 262, 109249

Cassirer E.F.; Manlove K.R.; Plowright R.K.; Besser T.E.; 2017: Evidence for strain-specific immunity to pneumonia in bighorn sheep. *The Journal of Wildlife Management*, 81, 133-143

Cassirer E.F.; Manlove K.R.; Almberg E.S.; Kamath P.L. Cox M.; Wolff P.; Roug A.; Shannon J.; Robinson R.; Harris R.B.; Gonzales B.J.; Plowright R.K.; Hudson P.J.; Cross P.C.; Dobson A.; Besser T.E.; 2018: Pneumonia in bighorn sheep: Risk and resilience. *Journal of Wildlife Management*, 82, 32-45

Cheng C.; Jun Q.; Qingling M.; Zhengxiang H.; Yu M.; Xuepeng C.; Zibing C.; Jinsheng Z.; Zaichao Z.; Kuojun C.; Chuangfu C.; 2015: Serological and molecular survey of sheep infected with *Mycoplasma ovipneumoniae* in Xingjiang, China. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 1641-1647

Clarke J.K.; Brown V.G.; Alley M.R.; 1974: Isolation and identification of *Mycoplasmas* from the respiratory tract of sheep in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 22, 117-121

Cook B.S.; Beddow J.G.; Manso-Silvan L.; Maglennon G.A.; Rycroft A.N.; 2016: Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 195, 158-164

Dae A.A.; Khodakaram-Tafti A.; Derakhshandeh A.; Seyedin M.; 2020: Identification of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in sheep with pneumonia in North East of Iran. *Iran Journal of Veterinary Research*; 21, 15-19

DaMassa A.J.; Wakenell P.S.; Brooks D.L.; 1992: *Mycoplasmas* of goats and sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4, 101-113

Deeney A.S.; Collins R.; Ridley A.M.; 2021: Identification of *Mycoplasma* species and related organisms from ruminants in England and Wales during 2005-2019. *BMC Veterinary Research*, 17, 325

Di Provvido A.; Averaimo D.; Zilli K.; Marruchella G.; Scacchia M.; 2017: *Mycoplasma pneumoniae* in small ruminants: A ten-year long retrospective survey. *Small Ruminant Research*, 153, 103-106

- Du Z.; Sun Y.; Wang J.; Liu H. ; Yang Y. ; Zhao N.; 2020: Comprehensive RNA-Seq profiling of the lung transcriptome of bashbay sheep in response to experimental *Mycoplasma ovipneumoniae* infection. PLoS ONE, 15, e0214497
- Dudek K.; Sevimili U.; Migliore S.; Jafarizadeh A.; Loria G.R.; Nicholas R.A.J.; 2022: Vaccines for *Mycoplasma* diseases of small ruminants: A neglected area of research. Pathogens, 11, 75
- Fernandez S.; Galapero J.; Rey J.; Pérez C.J.; Ramos A.; Rosales R.; Ayling R.; Alonso J.M.; Gomez L.; 2016: Investigations into the seasonal presence of *Mycoplasma* species in fattening lambs. The Veterinary Journal, 212, 80-82
- Garwood T.J.; Lehman C.P.; Walsh D.P.; Cassirer E.F.; Besser T.E.; Jenks J.A.; 2020: Removal of chronic *Mycoplasma ovipneumoniae* carrier ewes eliminates pneumonia in a bighorn sheep population. Ecology and Evolution, 10, 3491-3502
- Gautier-Bouchardon A.V.; 2018: Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. Microbiology Spectrum, 6, 6.4.07
- Ghanem M.; El-Gazzar M.; 2018: Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. Veterinary Microbiology, 218, 84-89
- Ghanem M.; Wang L.; Zhang Y.; Edwards S.; Lu A.; Ley D.; El-Gazzar M.; 2018: Core genome multilocus sequence typing: a standardized approach for molecular typing of *Mycoplasma gallisepticum*. Journal of Clinical Microbiology, 56, 1-11
- Ghanem M.; El-Gazzar M.; 2019: Development of a multilocus sequence typing assay for *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases, 63, 693-702
- Giangaspero M. ; Nicholas R.A.J. ; Hlusek M. ; Bonfini B. ; Osawa T. ; Orusa R. ; Tatami S. ; Takagi E. ; Moriya H. ; Okura N. ; Kato K. ; Atsushi K. ; Harasawa R. ; Ayling R.D. ; 2012 : Seroepidemiological survey of sheep flocks from Northern Japan for *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma agalactiae* . Tropical Animal Health and Production, 44, 395-398

- Gilmour J.S.; Jones G.E.; Rae A.G.; 1979: Experimental studies of chronic pneumonia of sheep. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 1, 285-293
- Goltz J.P.; Rosendal S.; McCraw B.M.; Ruhnke H.L.; 1986: Experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50, 59-67
- Handeland K.; Tengs T.; Kokotovic B.; Vikoren T.; Ayling R.D.; Bergsjø B.; Sigurðardóttir Ó.G.; Bretten T.; 2014: *Mycoplasma ovipneumoniae*- A primary cause of severe pneumonia epizootics in the Norwegian muskox (*Ovibos moschatus*) population. *PLoS ONE*, 9, e106116
- Harvey M.E.; Morrill D.G.; Rosenbusch R.F.; 2007: Sheep flock infections with *Mycoplasma ovipneumoniae* involve multiple strains. *Small Ruminant Research*, 73, 287-290
- Hervás J.; Méndez A.; Gómez-Villamandos J.C.; Villalba E.; Díaz E.; Cano T.; Carrasco L.; Padró J.M.; Fernández A.; Sierra M.A.; 1996: Etiologic and pathologic study of respiratory disease in lambs from intensive breeding facilities in southern Spain. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 43, 221-231
- Highland M.; Herndon D.; Bender S.; Hansen L.; Gerlach R.; Beckmen K.; 2018: *Mycoplasma ovipneumoniae* in wildlife species beyond subfamily *Caprinae*. *Emerging Infectious Diseases*, 24, 2384-2386
- Ionas G.; Mew A.J.; Alley M.R.; Clarke J.K.; Robinson A.J.; Marshall R.B.; 1985: Colonisation of the respiratory tract of lambs by strains of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 10, 533-539
- Ionas G.; Clarke J.K.; Marshall R.B.; 1991a: The isolation of multiple strains of *Mycoplasma ovipneumoniae* from individual pneumonic sheep lungs. *Veterinary Microbiology*, 29, 349-360
- Ionas G.; Norman N. G.; Clarke J.K.; Marshall R.B.; 1991b: A study of the heterogeneity of isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* from sheep in New Zealand. *Veterinary Microbiology*, 29, 339-347

Jaÿ M.; Ambroset C.; Tricot A.; Colin A.; Tardy F.; 2020: Population structure and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma ovipneumoniae* isolates in France. *Veterinary Microbiology*, 248, 108828

Jennings-Gaines J.E.; Edwards W.H.; Wood M.E.; Fox K.A.; Wolfe L.L.; Miller M.W.; Killion H.J.; 2016: An improved method for culturing *Mycoplasma ovipneumoniae* from field samples. *Biennial Symposium of the Northern Wild Sheep and Goat Council*, 20, 83-88

Jiang Z.; Song F.; Li Y.; Xue D.; Deng G.; Li M.; Liu X.; Wang Y.; 2017a: Capsular polysaccharide is a main component of *Mycoplasma ovipneumoniae* in the pathogen-induced toll-like receptor-mediated inflammatory responses in sheep airway epithelial cells. *Mediators of Inflammation*, 9891673

Jiang Z.; Song F.; Li Y.; Xue D.; Zhao N.; Zhang J.; Deng G.; Li M.; Liu X.; Wang Y.; 2017b: Capsular polysaccharide of *Mycoplasma ovipneumoniae* induces sheep airway epithelial cell apoptosis via ROS-dependent JNK/P38 MAPK pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6175841

Johnson T.; Jones K.; Jacobson B.T.; Schearer J.; Adams N.; Thornton I.; Mosdal C.; Jones S.; Jutila M.; Rydna-Apple A.; Besser T.; Bimczok D.; 2022: Experimental infection of specific-pathogen-free domestic lambs with *Mycoplasma ovipneumoniae* causes asymptomatic colonization of the upper airways that is resistant to antibiotic treatment. *Veterinary Microbiology*, 265, 109334

Jones G.E.; Gilmour J.S.; Rae A.; 1978: Endobronchial inoculation of sheep with pneumonic lung-tissue suspensions and with the bacteria and *Mycoplasmas* isolated from them. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 85-96

Jones G.E.; Gilmour J.S.; Rae A.; 1982: The effect of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica* on specific pathogen-free lambs. *Journal of Comparative Pathology*, 92, 261-266

Kamath P.L.; Cross P.C.; Cassirer E.F.; Besser T.E.; 2016: Genetic linkages among *Mycoplasma ovipneumoniae* strains in wild and domestic sheep and goats. *Biennial Symposium of the Northern Wild Sheep and Goat Council*, 20, 113

- Kamath P.L.; Manlove K.; Cassirer E.F.; Cross P.C.; Besser T.E.; 2019: Genetic structure of *Mycoplasma ovipneumoniae* informs pathogen spillover dynamics between domestic and wild caprinae in the Western United States. *Scientific Reports*, 9, 15318
- Kobisch M.; Friis N.F.; 1996: Swine mycoplasmoses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 15, 1569-1605
- Kundmachung zu §20 Abs. 3 Tierärztegesetz: BGBl. 1975/16: Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln
- Lin Y.C.; Miles R.J.; Nicholas R.A.J.; Kelly D.P.; Wood A.P.; 2008: Isolation and immunological detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in sheep with atypical pneumonia, and lack of a role for *Mycoplasma arginine*. *Research in Veterinary Science*, 84, 367-373
- Lindström L.; Tauni F.A.; Vargmar K.; 2018: Bronchopneumonia in Swedish lambs: a study of pathological changes and bacteriological agents. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60, 54
- Mackay J.; Nisbert D.; Foggie A.; 1963: Isolation of pleuropneumonia-like organisms (genus *Mycoplasma*) from cases of sheep pulmonary adenomatosis (SPA). *The Veterinary Record*, 75, 550-551
- Maksimovic Z.; De la Fe C.; Amores J.; Gómez-Martín Á.; Rifatbegovic M.; 2017: Comparison of phenotypic and genotypic profiles among caprine and ovine *Mycoplasma ovipneumoniae* strains. *The Veterinary Record*, 180, 180
- Maksimovic Z.; Bacic A.; Rifatbegovic M.; 2020: Antimicrobial susceptibility of caprine and ovine *Mycoplasma ovipneumoniae* isolates. *Microbiological Drug Resistance*, 26, 1271-1274
- Maksimovic Z.; Rifatbegovic M.; Loria G.R.; Nicholas R.A.J.; 2022: *Mycoplasma ovipneumoniae*: A most variable pathogen. *Pathogens*, 11, 1477
- Manlove K.; Branan M.; Baker K.; Bradway D.; Cassirer E.F.; Marshall K.L.; Miller R.S.; Sweeney S.; Cross P.C.; Besser T.E.; 2019: Risk factors and productivity losses associated with *Mycoplasma ovipneumoniae* infection in United States domestic sheep operations. *Preventive Veterinary Medicine*, 168, 30-38

- Martenchar A.; Bouchel D.; Zoyem N.; 1995: Isolation and experimental studies of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma ovipneumoniae* in goats in Northern Cameroon. *Small Ruminant Research*, 16, 179-184
- Mayor D.; Jores J.; Korczak B.M.; Kuhnert P.; 2008: Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality, *Veterinary Microbiology*, 127, 63-72
- McAuliffe L.; Hatchell F.M.; Ayling R.D.; King A.I.M.; Nicholas R.A.J.; 2003a: Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in *Pasteurella*-vaccinated sheep flocks with respiratory disease in England. *The Veterinary Record*, 153, 687-688
- McAuliffe L.; Ellis R.J.; Ayling R.D.; Nicholas R.A.J.; 2003b: Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4844-4847
- McAuliffe L.; Ellis R.J.; Lawes J.R.; Ayling R.D.; Nicholas R.A.J.; 2005: 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single genetic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 731-739
- Miles R.J.; Taylor R.R.; Varsani H.; 1991: Oxygen uptake and H₂O₂ production by fermentative *Mycoplasma* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 34, 219-223
- Mohan K.; Obwolo M.J.; Hill F.W.G.; 1992: *Mycoplasma ovipneumoniae* infection in Zimbabwean goats and sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 107, 73-79
- Mousel M.R.; White S.N.; Herndon M.K.; Herndon D.R.; Taylor J.B.; Becker G.M.; Murdoch B.M.; 2021: Genes involved in immune, gene translation and chromatin organization pathways associated with *Mycoplasma ovipneumoniae* presence in nasal secretions of domestic sheep. *PLoS ONE*, 16, e0247209
- Niang M.; Rosenbusch R.F.; Lopez-Virella J.; Kaeberle M.L.; 1997: Expression of functions by normal sheep alveolar macrophages and their alteration by interaction with *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 58, 31-43

- Niang M.; Rosenbusch R.F.; Debey M.C.; Niyo Y.; Andrews J.J.; Kaeberle M.L.; 1998a: Field isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* exhibit distinct cytopathic effects in ovine tracheal organ cultures. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 45, 29-40
- Niang M.; Rosenbusch R.F.; Andrews J.J.; Lopez-Virella J.; Kaeberle M.L.; 1998b: Occurrence of autoantibodies to cilia in lambs with a “coughing syndrome”. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64, 191-205
- Niang M.; Rosenbusch R.F.; Andrews J.J.; Kaeberle M.L.; 1998c: Demonstration of a capsule on *Mycoplasma ovipneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 557-562
- Niang M.; Rosenbusch R.F.; Lopez-Virella J.; Kaeberle M.L.; 1999 : Differential serologic response to *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in lambs affected with chronic respiratory disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 34-40
- Nicholas R.; Baker S.; 1998: Recovery of *Mycoplasmas* from animals. In: Miles R.J.; Nicholas R.A.J.; Eds.; *Methods in Molecular Biology, Mycoplasmas Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, USA, Vol. 104, pp. 37-43
- Nicholas R.A.J.; 2002: Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by *Mycoplasmas*. *Small Ruminant Research*, 45, 145-149
- Nicholas R.A.J.; Ayling R.D.; Loria G.R.; 2008: Ovine mycoplasmal infections. *Small Ruminant Research*, 76, 92-98
- Nicholas R.; 2008: Respiratory Disease of Small Ruminants. In: Nicholas R.; Ayling R.; McAuliffe L.; Hrsg. *Mycoplasma diseases of ruminants*. Wallingford, UK, Cambridge, MA: CABI, 169-171
- Nicholas R.A.J.; Ayling R.D.; Rosales R.S.; Myerscough C.; 2015: Investigation of severe coughing and ill thrift in adult hill sheep associated with *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Record Case Reports*, 3, e000255
- Ongor H.; Kalin R.; Acik M.N.; 2011: Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* from goats with nasal discharge by culture and polymerase chain reaction. *Pakistan Veterinary Journal*, 8318, 2074-7764

Parham K.; Churchward C.P.; McAuliffe L.; Nicholas R.A.J.; Ayling R.D.; 2006: A high level of strain variation within the *Mycoplasma ovipneumoniae* population of the UK has implications for disease diagnosis and management. *Veterinary Microbiology*, 118, 83-90

Patel H.; Mackintosh D.; Ayling R.D.; Nicholas R.A.J.; Fielder M.D.; 2008: A novel medium devoid of ruminant peptone for high yield growth of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 127, 309-314

Petterson B.; Uhlén M.; Johansson K.E.; 1996: Phylogeny of some *Mycoplasmas* from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the Hominis group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 1093-1098

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, 3314-3323

Pitcher D.G.; Nicholas R.A.J.; 2005: *Mycoplasma* host specificity: Fact or fiction? *The Veterinary Journal*, 170, 300-306

Rahman S.; Hussain I.; Muhammad G.; Awan M.; Ahmad Z.; Ullah M.; Kakar M.; 2016: Biomolecular identification of *M. ovipneumoniae* from nasal swab samples of sheep from various districts of Balochistan, Pakistan. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 4, 32-39

Razin S.; Hrsg. 1983: *Methods in Mycoplasmaology Vol. 1, Mycoplasma characterization*. Burlington: Elsevier Science, 526

Razin S.; Yogev D.; Naot Y.; 1998: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1094-1156

Rifatbegovic M.; Maksimovic Z.; Hulaj B.; 2011: *Mycoplasma ovipneumoniae* associated with severe respiratory disease in goats. *The Veterinary Record*, 168, 565

Rong G.; Zhao J.-M.; Hou G.-Y.; Zhou H.L.; 2014: Seroprevalence and molecular detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in goats in tropical China. *Tropical Animal Health and Production*, 46, 1491-1495

Rovani E.R.; Beckmen K.B.; Highland M.A.; 2019: *Mycoplasma ovipneumoniae* associated with polymicrobial pneumonia in a free- ranging yearling barren ground caribou (*Rangifer tarandus granti*) from Alaska, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 55, 733-736

Shahzad W.; Ajuwape A.T.P.; Rosenbusch R.F.; 2010: Global suppression of mitogen-activated ovine peripheral blood mononuclear cells by surface protein activity from *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136, 116-121

Sheehan M.; Cassidy J.P.; Brady J.; Ball H.; Doherty M.L.; Quinn P.J.; Nicholas R.A.J.; Markey B.K.; 2007: An aetiopathological study of chronic bronchopneumonia in lambs in Ireland. *The Veterinary Journal*, 173, 630-637

Shirkey N.; Roug A.; Besser T.E.; Bleich V.C.; Darby N.; Dekelaita D.; Galloway N.L.; Gonzales B.; Houghson D.B.; Konde L.; Monello R.J.; Prentice P.R.; Abella Vu R.K.; Wehausen J.; Munk B.A.; Powers J.G.; Epps C.W.; 2021: Previously unrecognized exposure of desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni*) to *Mycoplasma ovipneumoniae* in the California Mojave Desert. *Journal of Wildlife Diseases*, 57, 447-452

Tatay-Dualde J.; Prats-van der Ham M.; de la Fe C.; Paterna A.; Sánchez A.; Corrales J.C.; Contreras A.; Tola S.; Gómez-Martin Á.; 2017: Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. *PLoS ONE*, 12, e0174700

Thirkell D.; Spooner R.K.; Jones G.E.; Russell W.C.; 1990a: Polypeptide and antigenic variability among strains of *Mycoplasma ovipneumoniae* demonstrated by SDS-PAGE and immunoblotting. *Veterinary Microbiology*, 21, 241-254

Thirkell D.; Spooner R.K.; Jones G.E.; Russell W.C.; 1990b: The humoral immune response of lambs experimentally infected with *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 24, 143-153

Thirkell D.; Spooner R.K.; Jones G.E.; Russell W.C.; Voice M.W.; 1991: Cross-reacting antigens between *Mycoplasma ovipneumoniae* and other species of *Mycoplasma* of animal

origin, shown by ELISA and immunoblotting with reference antisera. *Veterinary Microbiology*, 26, 249-261

Tully J.G.; 1995: Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of *Mollicutes*, In: Razin S.; Tully J.G.; Eds., *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, Vol. 1, Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 33-39

Wang X.; Zhang W.; Hao Y.; 2020: Improving *Mycoplasma ovipneumoniae* culture medium by a comparative transcriptome method. *Journal of Veterinary Science*, 21, e30

Weiser G.C.; Drew M.L.; Cassirer E.F.; Ward A.C.S.; 2012: Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *M. arginini* in bighorn sheep using enrichment culture coupled with genus- and species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Wildlife Diseases*, 48, 449-453

Weyand L.K.; Cassirer E.F.; Kaufmann G.E.; Besser T.E.; 2016: *Mycoplasma ovipneumoniae* strains associated with pneumonia outbreaks in North American Bighorn sheep. *Biennial Symposium of the Northern Wild Sheep and Goat Council*, 20, 89-97

Wolff P.L.; Blanchong J.A.; Nelson D.D.; Plummer P.J.; McAdoo C.; Cox M.; Besser T.E.; Muñoz-Gutiérrez J.; Anderson C.A.; 2019: Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in pneumonic mountain goat (*Oreamnos americanus*) kids. *Journal of Wildlife Diseases*, 55, 206-212

Xiao J.; Liu Y.; Wang M.; Jiang C.; You X.; Zhu C.; 2014: Detection of *Mycoplasma pneumoniae* P1 subtype variations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78, 24-28

Xu J.; Chu Y.; Gao P.; Zhao P.; He Y.; Yan G.; Lu Z.; 2011: Molecular typing and immunoblotting of 17 *Mycoplasma ovipneumoniae* isolates from China. *Acta Microbiologica Sinica*, 51, 1421-1426

Yang F.; Tang C.; Wang Y.; Zhang H.; Yue H.; 2011: Genome sequence of *Mycoplasma ovipneumoniae* strain SC01. *Journal of Bacteriology*, 193, 5018

Yang F.; Han X.; Tang C.; Yue H.; 2013: A Hsp70 gene-based PCR for detection of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 12, 1495-1497

Yang F.; Dao X.; Rodriguez-Palacios A.; Feng X.; Tang C.; Yang X.; Yue H.; 2014: A real-time PCR for detection and quantification of *Mycoplasma ovipneumoniae*. Journal of Veterinary Medical Science, 76, 1631-1634

Zhao J.Y.; Du Y.Z.; Song Y.P.; Zhou P.; Chu Y.F.; Wu J.Y.; 2021: Investigation of the prevalence of *Mycoplasma ovipneumoniae* in Southern Xinjiang, China. Journal of Veterinary Research, 65, 155-160

Ziegler J.C.; Lahmers K.K.; Barrington G.M.; Parish S.M.; Kilzer K.; Baker K.; Besser T.E.; 2014: Safety and immunogenicity of a *Mycoplasma ovipneumoniae* bacterin for domestic sheep (*Ovis aries*). PLoS ONE, 9, e95698