Aus dem Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Mikrobiologie

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

# Massenspektrometrische Identifizierung und phylogenetische Klassifikation von Mykoplasmen aus Meeressäugern

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Laetitia Kranjec

Wien, November 2025

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

Institut für Mikrobiologie

Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin: Dr. med. vet. Anna Kübber-Heiss

Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie

Department für Interdisziplinäre Lebenswissenschaften

Veterinärmedizinische Universität Wien

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.



Graz, den 20.10.2025 Laetitia Kranjec

## INHALTSVERZEICHNIS


1. ZUSAMMENFASSUNG .....

1.1. ZUSAMMENFASSUNG .....

1.2. ABSTRACT .....

2. EINLEITUNG .....1

3. LITERATURÜBERSICHT .....2

3.1. MYKOPLASMEN .....2

3.1.1. Taxonomie .....2

3.1.2. Allgemeine Eigenschaften von Mykoplasmen .....2

3.1.3. Bedeutung bei Menschen und Tieren .....2

3.1.4. Pathogenität .....3

3.1.5. Epidemiologie .....3

3.1.6. Diagnostik .....3

3.1.7. Identifizierung und Differenzierung von Mykoplasmen .....4

3.1.8. Therapie .....4

3.2. MEERESSÄUGETIERE .....5

3.2.1. Taxonomie von Meeressäugetieren .....5

3.2.2. Gefahren für Meeressäugetiere .....5

3.2.3. Mykoplasmen bei Meeressäugetieren .....5

3.2.4. Seal Finger .....7

4. MATERIAL UND METHODIK .....8

4.1. MYKOPLASMEN-ISOLATE .....8

4.2. KULTIVIERUNG .....11

4.3. MALDI-TOF MASSENSPEKTROMETRIE .....12

4.4. DNA-EXTRAKTION .....13

4.5. PCR .....13

4.6. GELELEKTROPHORESE ..... 15
4.7. AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE ..... 16
4.8. PHYLOGENETISCHE VERWANDTSCHAFTSANALYSE ..... 16
5. ERGEBNISSE ..... 17
5.1. MALDI-TOF MASSENSPEKTROMETRIE ..... 17
5.2. PHYLOGENETISCHE VERWANDTSCHAFTSANALYSE ..... 21
6. DISKUSSION ..... 25
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... 28
8. LITERATURVERZEICHNIS ..... 29
9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS ..... 35

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Zusammenfassung

Da sich von Meeressäugetieren isolierte Mykoplasmen häufig keiner valide beschriebenen Mykoplasmen-Art zuordnen lassen, war es das Ziel dieser Arbeit, 119 Mykoplasmen-Stämme massenspektrometrisch zu gruppieren und, sofern möglich, einer Art zuzuordnen. Zusätzlich sollten die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate untereinander sowie mit bislang bekannten Mykoplasmen-Arten in phylogenetischen Stammbäumen dargestellt werden.

Von den aus Kalifornischen Seelöwen; Mähnenrobben; Nördlichen Seeelefanten; Nördlichen Seebären; Seehunden sowie Guadeloupe-Seebären isolierten Mykoplasmen-Stämmen wurden mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie Spektren generiert, die anschließend mit Referenzspektren in einer In-House Datenbank verglichen wurden. Die 26 Stämme, die keine Übereinstimmung mit Referenzspektren aufwiesen, konnten anhand von Distanzwerten in Gruppen eingeteilt werden, aus denen acht Stämme repräsentativ für die Sequenzierung ausgewählt wurden. Zusätzlich wurden noch 15 artdiagnostisch identifizierte Stämme für die Sequenzanalyse ausgewählt.

Zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den 23 ausgewählten Stämmen und bekannten Mykoplasmen-Arten wurden das 16S rRNA-Gen, die 16S-23S intergenische Spacer-Region sowie ein *rpoB*-Genfragment sequenziert. Die generierten Sequenzen wurden mit GenBank-Einträgen verglichen und dabei Sequenzähnlichkeitswerte zu den jeweils nächstverwandten Arten berechnet. Die auf dem *rpoB*-Genfragment basierenden Stammbäume ermöglichten die Zuordnung der Isolate zu definierten phylogenetischen Clustern innerhalb der Gattung *Mycoplasma*.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der MALDI-ToF Massenspektrometrie und der Sequenzanalysen, dass die untersuchten Mykoplasmen-Stämme acht bislang unbekannten Mykoplasmen-Arten sowie einer valide-beschriebenen Art, *Mycoplasma phocoeninasale*, angehören. Somit liefert die vorgelegte Arbeit eine solide Grundlage für zukünftige Speziesneubeschreibungen innerhalb der Gattung *Mycoplasma*.

## 1.2. Abstract

Since mycoplasmas isolated from marine mammals often cannot be assigned to any validly described *Mycoplasma* species, the aim of this study was to group 119 Mycoplasma strains using mass spectrometry and, if possible, to assign them to a species. In addition, the phylogenetic relationships between the isolates as well as to known *Mycoplasma* species were illustrated by phylogenetic trees.

Spectra were generated using MALDI-ToF mass spectrometry for *Mycoplasma* strains isolated from California sea lions; northern elephant seals; northern fur seals; harbor seals and Guadalupe fur seals. These spectra were then compared with reference spectra contained in an in-house database. The 26 strains that could not be assigned to any reference spectrum were grouped based on distance values, and eight representative strains were selected for sequencing. Additionally, 15 strains of identified isolates were included in the sequence analysis.

To determine the phylogenetic relationships between the 23 strains selected for sequencing as well as to known *Mycoplasma* species, the 16S rRNA gene, the 16S-23S intergenic spacer region and a fragment of the *rpoB* gene were sequenced. The obtained sequences were compared to entries in the GenBank database, thereby calculating sequence similarity values to the closest related species. Phylogenetic trees based on the *rpoB* gene fragment allowed assignment of the isolates to defined phylogenetic clusters within genus *Mycoplasma*.

In summary, the results of the MALDI-ToF mass spectrometry and sequence analyses revealed that the investigated strains belong to eight hitherto unknown *Mycoplasma* species and one validly described species, *Mycoplasma phocoeninasale*. Thus, the presented study provides a solid basis for future new species descriptions within genus *Mycoplasma*.

## 2. Einleitung

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien die als Kommensale, Opportunisten oder Krankheitserreger die Schleimhäute von Tier und Mensch besiedeln. Pathogene Mykoplasmen verursachen häufig respiratorische Erkrankungen und Genitalinfekte, aber auch entzündliche Veränderungen der Gelenke, der Bindehäute, der Milchdrüse und der serösen Häute werden nicht selten beobachtet (1, 2).

Vor allem im Wildtiersektor ist das Wissen über das Vorkommen von Mykoplasmen, im Vergleich zu dem bei Menschen und domestizierten Tieren, verhältnismäßig gering. Dabei kann eine Infektion mit Mykoplasmen nicht nur die Gesundheit der Wildtiere beeinträchtigen, sondern auch ein Gesundheitsrisiko für Haustiere und Menschen darstellen (1–3). So besitzen nämlich manche Mykoplasmen-Arten zoonotisches Potential, welche nach Übertragung beim Menschen Krankheiten auslösen können (4).

Mykoplasmen können bei Meeressäugetieren sowohl als harmlose Besiedler der Maulschleimhäute und der oberen Atemwege, als auch als Krankheitserreger auftreten. Da diese Erkrankungen meist multikausal bedingt sind und häufig polyfaktoriell ausgelöst werden, ist deren Beitrag am Krankheitsgeschehen jedoch nicht immer klar erkennbar (5–13).

Bei der in Kalifornischen Seelöwen nachgewiesenen, jedoch nicht valide beschriebenen Art „*Mycoplasma zalophi*“ wird pathogenes Potential vermutet (6). Am häufigsten wurde bislang *Mycoplasma phocicerebrale* bei verschiedenen erkrankten Meeressäugetieren nachgewiesen, wobei die Symptome - abhängig vom betroffenen Organsystem - von Wundinfektionen über respiratorische Erkrankungen bis hin zu Aborten und neurologischen Störungen reichen (8–10, 12).

Viele der von Meeressäugetieren isolierten Mykoplasmen-Stämme sind bis dato jedoch noch unbekannt und können somit keiner valide beschriebenen Art zugeordnet werden (10, 12, 13).

Ziel dieser Diplomarbeit war es, 119 Mykoplasmen-Isolate, die im Zeitraum 2012-2022 von diversen Meeressäugetierarten aus unterschiedlichen Ländern gewonnen werden konnten, massenspektrometrisch (MALDI-ToF) zu gruppieren und gegebenenfalls artdiagnostisch zu identifizieren und die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Isolaten und bekannten Mykoplasmen-Arten darzustellen.

# 3. Literaturübersicht

## 3.1. Mykoplasmen

### 3.1.1. Taxonomie

Mykoplasmen sind Vertreter der Gattung *Mycoplasma*, die zusammen mit der Gattung *Ureaplasma* taxonomisch zur Familie *Mycoplasmataceae*, zur Ordnung *Mycoplasmatales* und zur Klasse *Mollicutes* gehören (1). Die Gattungsbezeichnung *Mycoplasma* setzt sich aus den griechischen Wörtern „*mykes*“ für Pilz und „*plasma*“ für Geformtes zusammen. Die Namensgebung beruht dabei auf die gelegentlich zu beobachtende pilzartige Zellmorphologie der Gattungstypspezies *Mycoplasma mycoides* (14).

### 3.1.2. Allgemeine Eigenschaften von Mykoplasmen

Die früher fälschlicherweise für Viren gehaltenen Mykoplasmen (15) gehören mit einem Durchmesser von 0,2-0,8 µm zu den kleinsten sich selbstreplizierenden Bakterien (16). Durch vergleichende phylogenetische Analysen konnte die Abstammung von Gram-positiven Bakterien der *Lactobacillus*-Gruppe nachgewiesen werden (17, 18). Mykoplasmen zeichnen sich durch ihre Zellwandlosigkeit aus, die ihnen die Ausprägung von diversen Zellformen (Pleomorphismus) ermöglicht (16). Aufgrund ihres evolutionär bedingt reduzierten Genoms (19) verfügen sie nur über eingeschränkte Stoffwechselfähigkeiten und sind dadurch auf das Nährstoffangebot des Wirts oder des Kulturmediums angewiesen. Ihre Energie können sie entweder aus Kohlenhydraten (fermentative Mykoplasmen), durch die Hydrolyse von Arginin (viele nicht-fermentative Mykoplasmen) oder durch die Oxidation organischer Säuren (einige nicht-fermentative Mykoplasmen) gewinnen (1).

### 3.1.3. Bedeutung bei Menschen und Tieren

Mittlerweile sind in der Gattung *Mycoplasma* über 190 Arten bekannt (20), die als Kommensale, Opportunisten oder Pathogene in Menschen und Tieren vorkommen können. In der Regel zeigen Mykoplasmen eine ausgeprägte Wirtsspezifität und besiedeln vor allem die Schleimhäute des Urogenital- und Respirationstrakts, aber auch der Gelenke, der Augen und der Milchdrüsen. Mykoplasmen-Infektionen verlaufen in der Regel mild und neigen zur

Chronizität. Vor allem im Nutztiersektor können durch Mykoplasmen-assoziierte Erkrankungen erhebliche wirtschaftliche Schäden entstehen (1, 2).

### 3.1.4. Pathogenität

Obwohl Mykoplasmen keine Exotoxine produzieren (Ausnahme: CARDS-Toxin von *Mycoplasma pneumoniae*), können ihre Stoffwechselprodukte toxisch auf die Wirtszellen wirken und oxidative Schäden verursachen (1, 21). Die Grundvoraussetzung für eine Infektion mit Mykoplasmen ist die Bindung an die Wirtszellen über spezifische Oberflächenstrukturen, der Adhäsine. Typischerweise leben Mykoplasmen außerhalb von Wirtszellen (22), obwohl gewisse Arten auch fakultativ intrazellulär vorkommen können und dadurch einen besseren Schutz vor der Wirtsimmunantwort erhalten (23). Durch die Modifikation ihrer Oberflächenstrukturen sowie einer Reihe unspezifischer immunmodulatorischer Mechanismen können Mykoplasmen das Immunsystem umgehen und dadurch über längere Zeiträume im Wirten persistieren (1).

### 3.1.5. Epidemiologie

Die Übertragung von Mykoplasmen erfolgt entweder durch direkten Kontakt oder indirekt über kontaminiertes Futter oder Wasser, über Aerosole, über Milch oder durch belebte und unbelebte Vektoren (24).

### 3.1.6. Diagnostik

Die langsam wachsenden Mykoplasmen benötigen für die Kultivierung spezielle Nährmedien, die meist Serum, Hefeextrakt und Peptone enthalten. Zusätzlich werden häufig noch Antibiotika hinzugesetzt, die das Wachstum zellwandtragender Bakterien hemmen. Bei der Anzucht auf festen Nährböden kommt es zur Ausbildung von typischen spiegeleiförmigen Kolonien, die einen Durchmesser von <1 mm aufweisen (16). Eine weitere häufig eingesetzte Diagnostikmethode ist die PCR, die sich insbesondere zum spezifischen Nachweis von schwer oder nicht kultivierbaren Mykoplasmen-Arten anbietet (25).

### 3.1.7. Identifizierung und Differenzierung von Mykoplasmen

Die zur Identifizierung und Differenzierung von Mykoplasmen-Isolaten traditionell eingesetzten serologischen Verfahren werden mittlerweile durch massenspektrometrische und molekulargenetische Differenzierungsmethoden ersetzt (1, 16). Die MALDI-ToF Massenspektrometrie ist aufgrund ihrer Schnelligkeit, Präzision und einfachen Anwendung eine geeignete Methode zur Identifizierung von Mykoplasmen in der Veterinärmedizin (26).

Ein weiteres Verfahren zur Identifizierung und Differenzierung von Mykoplasmen stellt die Sequenzierung ausgewählter phylogenetischer Marker-Gene dar (16). Am häufigsten wird dabei das 16S rRNA-Gen verwendet (27), welches neben konservierten auch variable Regionen enthält, die in den meisten Fällen eine Unterscheidung zwischen Mykoplasmen-Arten ermöglichen (1, 28). Neben dem 16S rRNA-Gen kann auch die 16S-23S intergenische Spacer-Region, die häufig zwischenartliche Unterschiede hinsichtlich Länge und Basenabfolge aufweist, zur Unterscheidung von Mykoplasmen herangezogen werden (29). Ein weiterer Identifikationsmarker ist das *rpoB*-Gen, welches für die β-Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase kodiert. Aufgrund der deutlichen zwischenartlichen Sequenzunterschiede stellt dieses Gen insbesondere bei nahe-verwandten Arten, bei denen die 16S rRNA-Gensequenz keine ausreichende Differenzierung ermöglicht, eine besser auflösende Alternative dar (30).

### 3.1.8. Therapie

Aufgrund der Zellwandlosigkeit sind Antibiotika, die in die Zellwandsynthese eingreifen (z.B. Beta-Lactam-Antibiotika) gegen Mykoplasmen unwirksam. Für die Behandlung werden deshalb hauptsächlich Proteinsynthese-hemmende Antibiotika wie Makrolide und Tetrazykline eingesetzt. Durch die zunehmende Resistenzbildung gegenüber verschiedener Wirkstoffklassen wird die Auswahl an Therapieoptionen zusätzlich eingeschränkt (16), weshalb der Entwicklung von Impfstoffen gegen Mykoplasmen-Infektionen zunehmend Bedeutung zukommt (1).

## 3.2. Meeressäugetiere

### 3.2.1. Taxonomie von Meeressäugetieren

Zu den Meeressäugern zählen nicht näher verwandte Säugetiere, die an das Leben im Meer angepasst sind, wie Wale, Seekühe, Seeotter, Robben und Eisbären. Diese werden taxonomisch den Ordnungen der Raubtiere (*Carnivora)*, der Seekühe (*Sirenia*) sowie der Unterordnung der Wale (*Cetacea*) zugeordnet. Zu den Raubtieren gehören die Eisbären (Familie *Ursidae*), die Seeotter (*Mustelidae*), sowie die Robben inklusive Walrosse (*Odobenidae*), Ohrenrobben (*Otariidae*) und Hundsrobben (*Phocidae*). Die Ordnung der Seekühe umfasst die beiden Familien der Rundschwanzseekühe (*Trichechidae*) und der Gabelschwanzseekühe (*Dugongidae*). Die diversen Familien der Delfine und Wale bilden die Unterordnung der *Cetacea* (31, 32).

### 3.2.2. Gefahren für Meeressäugetiere

Meeressäugetiere spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Gesundheit des marinen Ökosystems (33). Laut der Roten Liste der *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) sind bereits 26 % der Arten der Unterordnung *Cetacea* inzwischen vom Aussterben bedroht, wobei die Tendenz über die letzten Jahrzehnte steigend ist (34). Insbesondere die Beeinträchtigung ihres Lebensraums durch den Klimawandel, die Verschmutzung der Meere und das Verfangen in Fischnetzen stellt eine Bedrohung für die Meeressäugetiere dar. Ein weiteres Problem ist die häufige Nähe zu besiedelten Küstenregionen und die damit verbundene Übertragung von neuen Krankheitserregern (33).

### 3.2.3. Mykoplasmen bei Meeressäugetieren

Obwohl der Wissensstand über das Vorkommen von Mykoplasmen bei Meeressäugetieren im Vergleich zu dem von domestizierten Tieren geringer ist, konnten mittlerweile einige Arten beschrieben werden (24).

*Mycoplasma phocicerebrale* wurde erstmalig zusammen mit *Mycoplasma phocirhinis* im Atmungstrakt, Herzmuskel und Gehirn von Seehunden nachgewiesen, die während eines vermehrten Auftretens von Krankheitsfällen in Nordeuropa verendet waren (8). Zudem konnte *M. phocicerebrale* aus Leber- und Lungengewebe gestrandeter Schweinswale an der schottischen Küste (12) sowie aus Lungengewebe, Lymphknoten und dem Thymus eines

abortierten Fetus isoliert werden (9). Häufig wurde diese Mykoplasmen-Art auf Zähnen gesunder Robben, aber auch in Ulzerationen im Maulbereich und in schweren Wundinfektionen nachgewiesen (10).

Die vorwiegend den Respirationstrakt besiedelnde Art *M. phocirhinis* (8) konnte zusätzlich auf den Zähnen gesunder Robben im Vereinigten Königreich gefunden werden (10).

Die bislang noch nicht valide beschriebene Art „*Mycoplasma zalophi*“ konnte erstmals bei Kalifornischen Seelöwen mit Abszessen nachgewiesen werden. Bei einigen Tieren wurde der Erreger auch als primäre Ursache für Pneumonien, Pleuritiden und septische Gelenksentzündungen vermutet (6). Darüber hinaus konnte diese Art auch als Kommensale in Nasenhöhlen sowie im Lymphknoten bei juvenilen Robben nachgewiesen werden (9).

*Mycoplasma phocidae* wurde erstmalig aus Lungengewebe von Seehunden isoliert, die während eines epidemischen Auftretens von Krankheitsfällen in Nordamerika verendet waren (7). Zudem konnte diese Art in Nasenabstrichen gesunder Robben (9), Bisswunden und im Lungengewebe nachgewiesen werden (10).

Im Rahmen einer jüngeren Studie konnten vier neue Mykoplasmen-Arten - *Mycoplasma miroungirhinis, Mycoplasma miroungigenitalium, Mycoplasma phocoenae und Mycoplasma phocoeninasale* - aus Genitalabstrichen und dem Nasopharynx von Nördlichen Seeelefanten, Schweinswalen und Kalifornischen Seelöwen isoliert werden (35).

In einer rezenten Studie konnten Mykoplasmen auch auf den Maul- und Genitalschleimhäuten gesunder Robben in der Antarktis nachgewiesen werden. Von den sechs isolierten Arten ließen sich zwei basierend auf Sequenzähnlichkeitswerten den bis dato noch nicht valide beschriebenen Arten *„M. zalophi*“ und „*M. zalophidermidis“* zuordnen. Die restlichen vier Arten deuteten aufgrund ihrer niedrigen Sequenzähnlichkeitswerte mit bekannten Mykoplasmen auf potenziell neue Mykoplasmen-Arten hin (13).

Eine bislang unbeschriebene Art, die zuvor in Kalifornischen Seelöwen nachgewiesen wurde, konnte ebenfalls in Nasenabstrichen gesunder Robben, mehreren Lungengewebsproben sowie einem Lymphknoten einer juvenilen Robbe in Australien gefunden werden. Zusätzlich konnte bei einem Fetus eine weitere noch nicht beschriebene Art festgestellt werden, welche zuvor von der Bindehaut eines Kalifornischen Seelöwen isoliert wurde (9).

In Schottland konnten bei einigen Schweinswalen neue Mykoplasmen-Arten aus Lungengewebe sowie bei einem Tier aus der Niere isoliert werden. Zusätzlich konnte eine bislang noch nicht beschriebene Art in der Niere eines Wales nachgewiesen werden (12).

Hämotrope Mykoplasmen (Hämoplasmen) konnten bisher in kalifornischen Seelöwen (11), Flussdelfinen im Amazonas (36) und in Walen und Robben in Brasilien nachgewiesen werden (37, 38).

### 3.2.4. Seal Finger

Obwohl Mykoplasmen in der Regel sehr wirtsspezifisch sind, besitzen einzelne Arten zoonotisches Potential (4). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Krankheit „Seal Finger“, die vor allem in nördlichen Ländern gelegentlich auftritt (39). Dabei handelt es sich um eine durch Mykoplasmen verursachte Infektion der Finger oder der gesamten Hand. Die Erreger werden typischerweise durch Bisse - hauptsächlich von Robben, aber auch von anderen Meeressäugetieren -, durch Kontakt mit erregerhaltigem Fleisch oder Fell sowie durch Verletzungen während des Fleischverarbeitungsprozesses übertragen (40). Bisher konnten insbesondere *Mycoplasma phocicerebrale* und die vor kurzem neubeschriebene Art *Mycoplasma phocimorsus* mit dem Krankheitsgeschehen in Verbindung gebracht werden (41, 42).

# 4. Material und Methodik

## 4.1. Mykoplasmen-Isolate

In dieser Diplomarbeit wurden 119 kryokonservierte Mykoplasmen-Isolate von Meeressäugetieren analysiert. Dabei stammten 83 Isolate von Kalifornischen Seelöwen aus den USA, sieben von nicht näher spezifizierten Robben aus Spanien, 17 von Mähnenrobben aus dem Tiergarten Schönbrunn in Österreich, sechs von Nördlichen Seeelefanten aus den USA, drei von Nördlichen Seebären aus den USA und jeweils ein Stamm von einem Seehund sowie einem Guadalupe-Seebären aus den USA und einem Nördlichen Seebären aus Spanien. Die Stämme wurden (falls bekannt) im Zeitraum zwischen 2012-2022 von folgenden anatomischen Lokalisationen isoliert: Auge; Bronchus; Lunge; Maul; Trachea; Tonsille; Wunde. Die Isolate wurden bei -80 °C asserviert.

**Tabelle 1:** Basisdaten der untersuchten Stammkohorte

| Stammbezeichnung | Isolierungsjahr | Tierart | Habitat | Land |
|---|---|---|---|---|
| Moneda Lunge | 2012 | Mähnenrobbe | Lungenabszess | Österreich |
| Moneda Trachea | 2012 | Mähnenrobbe | Trachea | Österreich |
| Carmen Auge | 2013 | Mähnenrobbe | Auge | Österreich |
| Carmen Lunge | 2013 | Mähnenrobbe | Lunge | Österreich |
| Carmen Trachea | 2013 | Mähnenrobbe | Trachea | Österreich |
| Kelo | 2013 | Mähnenrobbe | Tonsille | Österreich |
| Lunita | 2013 | Mähnenrobbe | Tonsille | Österreich |
| Stella 3 | 2013 | Mähnenrobbe | Auge | Österreich |
| Stella 9 | 2013 | Mähnenrobbe | Auge | Österreich |
| Stella Lunge | 2013 | Mähnenrobbe | Lunge | Österreich |
| Stella Trachea | 2013 | Mähnenrobbe | Trachea | Österreich |
| 3193 Kelo | 2016 | Mähnenrobbe | Bronchus | Österreich |
| 19-335A | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-335B | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-335C | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-340 (32) | 2019 | Nördlicher Seebär | Maul | USA |
| 19-342 (35) | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-343 (37A) | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-343 (37B) | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-348 | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 19-350A | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-350B | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-350D2 | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-350F | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-353B | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20B | 2019 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 19-364 (69) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-6 (84B) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-7 (85) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-15 (92AB) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-18 (96) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-33 (110) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-78 (136) | 2020 | Guadalupe-Seebär | Maul | USA |
| 20-91 (144) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-107 (170) | 2020 | Seehund | Maul | USA |
| 20-132 (186) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-134 (184) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-140 (198) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-142 (201) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-146 (208) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-147 (210B) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 233 | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-156 (238B) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 242A | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 242B | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-163 (252) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-168 (261) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-169 (263) | 2020 | Nördlicher Seebär | Maul | USA |
| 20-172 (266A) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-173 (270) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-176 (276) | 2020 | Nördlicher Seeelefant | Maul | USA |
| 20-178 (280) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-179 (282) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-180 (284) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-181 (286A) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-182 (288A) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-182 (288B) | 2020 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 20-186 (296B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 20-189 (302A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-2 (320) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-3 (322) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-4 (324) | 2021 | Nördlicher Seebär | Maul | USA |
| 21-5 (326) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-7 (336) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-14 (342A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-14 (342B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-16 (345A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-16 (345B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-18 (347A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-19 (349) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-19 (349A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-22 (354B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-22 (354C) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-24 (358) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-27 (363A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-28 (365) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-30 (369A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-30 (369B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-33 (373A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-34 (375A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-34 (375B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-35 (377) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-36 (379A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-36 (379B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-37 (381) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-39 (384A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-42 (390A) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-42 (390B) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-46 (397) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-48 (401) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-DOA1 (406) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-DOA1 (408) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Wunde | USA |
| 21-52 (413) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-53 (417) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 21-59 (426) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-67 (443A) Klon | 2021 | Nördlicher Seeelefant | Maul | USA |
| 21-67 (443D) Klon | 2021 | Nördlicher Seeelefant | Maul | USA |
| 21-79 (464A) | 2021 | Nördlicher Seeelefant | Maul | USA |
| 21-79 (464B) | 2021 | Nördlicher Seeelefant | Maul | USA |
| 21-83 (472neu) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 21-87 (480) | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 510 | 2021 | Nördlicher Seeelefant | Maul | USA |
| 562 | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 565A | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 571 | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 574 | 2021 | Kalifornischer Seelöwe | Maul | USA |
| 3920B | 2021 | Mähnenrobbe | Trachea | Österreich |
| AC216 | 2021 | Mähnenrobbe | Trachea | Österreich |
| Pablo Tr. A | 2022 | Mähnenrobbe | Trachea | Österreich |
| Pablo Tr. B | 2022 | Mähnenrobbe | Trachea | Österreich |
| 9307 | 2022 | Mähnenrobbe | Lunge | Österreich |
| G49 | k.A. | Robbe | k.A. | Spanien |
| G56 | k.A. | Robbe | k.A. | Spanien |
| G105 | k.A. | Robbe | k.A. | Spanien |
| G129 | k.A. | Robbe | k.A. | Spanien |
| Leo genital | k.A. | Robbe | k.A. | Spanien |
| Leo nasal | k.A. | Robbe | k.A. | Spanien |
| O44 | k.A. | Robbe | k.A. | Spanien |
| O129A | k.A. | Nördlicher Seebär | k.A. | Spanien |

k.A.=keine Angabe; USA=Vereinigte Staaten von Amerika

## 4.2. Kultivierung

Für die Kultivierung wurden ca. 200 µl von den tiefgefrorenen Isolaten entnommen und mithilfe einer Einwegöse auf einer SP4-Agarplatte (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) ausgestrichen. Die Platten wurden daraufhin bei 37 °C im $CO_2$-Brutschrank (7 %) für mindestens drei bis maximal sieben Tage bebrütet. Sobald Einzelkolonien sichtbar waren, konnten diese mithilfe steriler Pasteurpipetten unter stereomikroskopischer Kontrolle gepickt und in ein SP4-Flüssigmedium (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) überführt werden. Die Flüssigkulturen wurden aerob bei 37 °C bis zur

Wahrnehmung eines Farbumschlages inkubiert. Dieser entsteht bei Mykoplasmen-Wachstum durch den Phenolrot-Indikator, der bei Erhöhung des pH-Wertes (durch die Hydrolyse von Arginin) seine Farbe in ein kräftiges Rot ändert. Bei einer Ansäuerung, etwa durch die Fermentation von Glukose, kommt es zu einem Umschlag von Rot auf Gelb bzw. Orange (43).

Jeweils 1 ml der Mykoplasmen-Kulturen wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

### 4.3. MALDI-ToF Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der gewonnen Mykoplasmen-Kulturen wurde eine MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight*) Massenspektrometrie durchgeführt.

Dafür wurden jeweils 100 µl der eingefrorenen Einzelkolonie-Kulturen in 3 ml SP4-Medium (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) pipettiert und bei 37 °C bis zum Farbumschlag inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der Flüssigkeit in ein Eppendorf Röhrchen (Eppendorf SE, Deutschland) überführt und dieses für sieben Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und das sich am Boden befindliche Pellet mit 100 µl Wasser (HPLC-Grad, Sigma-Aldrich, Österreich) aufgelöst. Nach erneutem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 20.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 15 µl 70%iger Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Österreich) und 15 µl 100%igem Acetonitril (Sigma-Aldrich, Österreich) aufgelöst und erneut für zwei Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert.

Von dem so hergestellten Proteinextrakt wurde 1 µl auf eine MALDI-ToF Trägerplatte (Bruker Daltonik GmbH, Deutschland) pipettiert. Nach dem Lufttrocknen wurde die Probe mit 1 µl einer α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (HCCA) Matrixlösung (Bruker Daltonik GmbH, Deutschland) überschichtet. Nach dem vollständigen Lufttrocknen konnte die massenspektrometrische Analyse mit dem Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Deutschland) unter Anwendung der FlexControl 3.4 Software durchgeführt werden. Die dabei generierten Spektren wurden unter Einsatz des MBT Compass Explorer Programms mit Referenzspektren einer umfassenden In-House Mykoplasmen-Datenbank verglichen und die Artzugehörigkeit mithilfe eines logarithmischen Score-Wertes angegeben. Von Einzelkolonie-Kulturen, die durch die Analyse keiner Art zugeordnet werden konnten, wurden neue Referenzspektren erstellt und diese in die In-House Projektdatenbank aufgenommen. Anschließend wurden Distanzwerte basierend auf Unterschieden in der Lokalisation und Intensität der generierten

Peaks ermittelt und diese in Dendrogrammen dargestellt. Diese dienten als Grundlage für die Auswahl repräsentativer Stämme für die anschließende Sequenzanalyse.

### 4.4. DNA-Extraktion

Zur Gewinnung von DNA aus ausgewählten Einzelkolonie-Kulturen wurden 100 µl der eingefrorenen Kulturen in ein SP4-Kulturmedium (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) pipettiert und bei 37 °C bis zum Einsetzen eines Farbumschlages inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1 ml der SP4-Kulturen für zehn Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Für die DNA-Extraktion wurde das DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet. Zunächst wurde das Pellet mit 200 µl Resuspensionspuffer aufgelöst. Anschließend wurden 20 µl Proteinkinase K und 200 µl des Lyse-Puffers hinzugefügt. Nach gründlichem Vortexen wurde das Gemisch bei 70 °C für zehn Minuten im Thermomixer (5436, Eppendorf SE, Deutschland) erhitzt, bevor 200 µl 90%iges Ethanol hinzugefügt wurden.

Die gesamte Flüssigkeit wurde in ein Filterröhrchen pipettiert und für eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Auffanggefäß mit der Flüssigkeit verworfen und die Filtereinheit in ein neues 2 ml Gefäß überführt. Für den ersten Waschschritt wurden 500 µl Waschpuffer 1 hinzugefügt und für eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde erneut verworfen und es wurden 500 µl des Waschpuffers 2 dazu pipettiert, bevor das Gemisch für drei Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert wurde.

Nachdem die Filtereinheit in ein neues Röhrchen überführt wurde, wurden 200 µl der Elutionslösung auf die Membran pipettiert. Nach einer Standzeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde das Röhrchen für eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Die Filtereinheit wurde nun verworfen und die extrahierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 4.5. PCR

Von den folgenden 23 Einzelkolonie-Kulturen wurden PCRs zur Amplifikation des 16S rRNA-Gens, der 16S-23S intergenischen Spacer-Region und eines *rpoB*-Genfragments durchgeführt: Carmen Auge; Carmen Lunge; Stella 9 Auge; 19-350F; 20-33 (110); 20-107 (170); 20-147 (210B); 20-178 (280); 20-180 (284); 21-4 (324); 21-7 (336); 21-24 (358); 21-28

(365); 21-33 (373A); 21-34 (375A); 21-36 (379A); 21-42 (390A); 21-67 (443A); 21-79 (464B); 21-87 (480); 510; 3920B; 9307.

Für die Durchführung der PCR wurde jeweils ein 25 µl Mastermix bestehend aus 9 µl $H_2O$, 12,5 µl OneTaq® Quick-Load® DNA-Polymerase (New England BioLabs®, USA) und je 0,5 µl der jeweilige Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Tab. 2) hergestellt. Anschließend wurden je 2,5 µl der extrahierten DNA zum Mastermix hinzugefügt und im Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf SE, Deutschland) amplifiziert. Nach Beendigung des Programms wurden die PCR-Produkte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C Grad gelagert.

**Tabelle 2:** Primer-Sequenzen

| **Zielsequenz** | **Primer ID** | **Primer-Sequenz** | **Referenz** |
|---|---|---|---|
| *rpoB*-Genfragment | MycrpoB1 | 5‘-AGTTATCACAATTTATGGATCAAA -3‘ | (44) |
| | MycrpoB2 | 5’-GCTCAHACTTCCATTTCHCCAAA -3‘ | |
| 16S-23S intergenische Spacer-Region | ITSAVIAN1 | 5’-CGTTCTCGGGTCTTGTACAC-3’ | (45) |
| | ITSAVIAN2 | 5’-CGCAGGTTTGCACGTCCTTCATCG-3’ | |
| 16S rRNA-Gen | 27f | 5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’ | (46) |
| | 1492r | 5’-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3’ | |

**Tabelle 3:** Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des 16S rRNA-Gens

| **Schritte** | **Temperatur in °C** | **Dauer in Minuten** | **Anzahl der Zyklen** |
|---|---|---|---|
| Denaturierung | 95 | 5 | 1 |
| Denaturierung | 94 | 2 | 30 |
| Annealing | 50 | 1,5 | |
| Elongation | 72 | 5 | |
| Finale Elongation | 72 | 1 | 1 |

**Tabelle 4:** Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation der 16S-23S intergenischen Spacer-Region

| **Schritte** | **Temperatur in °C** | **Dauer in Minuten** | **Anzahl der Zyklen** |
|---|---|---|---|
| Denaturierung | 94 | 0,25 | 1 |
| Denaturierung | 94 | 0,25 | 35 |
| Annealing | 60 | 0,5 | |
| Elongation | 72 | 2 | |
| Finale Elongation | 72 | 5 | 1 |

**Tabelle 5:** Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des *rpoB*-Genfragments

| **Schritte** | **Temperatur in °C** | **Dauer in Minuten** | **Anzahl an Zyklen** |
|---|---|---|---|
| Denaturierung | 95 | 6 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 1 | 45 |
| Annealing | 50 | 1 | |
| Elongation | 68 | 6 | |
| Finale Elongation | 68 | 5 | 1 |

### 4.6. Gelelektrophorese

Zur Sichtbarmachung der PCR-Produkte wurden diese in ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetragen. In die Taschen des Gels wurden jeweils 8 µl der Amplifikate pipettiert. Am Anfang und Ende eines Gels wurden je 4 µl des Molekulargewichtsmarkers (1 kb Plus DNA Ladder, New England BioLabs®, USA) aufgetragen. Anschließend wurde die Laufkammer des PowerPac Basics (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) unter 220 Volt Spannung gesetzt und für eine Stunde laufen gelassen. Nach Beendigung der Laufzeit wurden die Gele aus der Kammer entnommen und zum Färben für 15-20 Minuten in eine 2%ige Ethidiumbromid-Färbelösung (Sigma-Aldrich GmbH, Österreich) gelegt und anschließend in einem Wasserbad entfärbt. Mithilfe des Transilluminator Gel Doc2000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) konnten die unter UV-Licht sichtbaren Banden fotografiert und gespeichert werden.

### 4.7. Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde für jede Probe ein Reaktionsgemisch (7 µl) hergestellt, das aus 4 µl $H_2O$ sowie je 1,5 µl der Enzyme Exo-CIP A und Exo-CIP B (New England BioLabs®, USA) bestand. Zu diesem wurden jeweils 7,5 µl des PCR-Produktes hinzugefügt und im Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf SE, Deutschland) unter folgenden thermozyklischen Bedingungen inkubiert: vier Minuten bei 37 °C und einer Minute bei 80 °C. Anschließend wurden je 2,5 µl der entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer in ein neues Eppendorf Röhrchen (Eppendorf SE, Deutschland) pipettiert. Für die Sequenzanalyse der 16S-23S intergenischen Spacer-Region wurde ausschließlich der Vorwärtsprimer verwendet, da eine Sequenzierung mit dem Rückwärtsprimer aufgrund der Spacerlänge (< 1000 bp) nicht benötigt wurde. Anschließend wurde der gesamte Inhalt des aufgereinigten PCR-Produkts (10,5 µl) dazu pipettiert, bevor die Proben an das entsprechende Sequenzierungslabor (LGC Genomics, Berlin) versendet wurden.

### 4.8. Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse

Die ermittelten 16S rRNA-Gen-, 16S-23S intergenische Spacer- und *rpoB*-Genfragment-Sequenzen wurden mittels BLASTn-Algorithmus mit Einträgen in der GenBank-Datenbank verglichen und dabei Sequenzähnlichkeitswerte zu den nächstverwandten Mykoplasmen-Arten ermittelt. Schließlich wurden die *rpoB*-Sequenzen der Typstämme der nächstverwandten Mykoplasmen-Arten aus der Datenbank extrahiert und diese mit den generierten *rpoB*-Sequenzen der untersuchten Stämme mittels ClustalW-Alignment ausgerichtet. Zur graphischen Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse wurden anschließend mithilfe des MEGA 11 Software-Pakets Maximum-Likelihood-Distanzanalysen mit Bootstrapping (500 Replikate) unter Anwendung des Tamura-Nei-Substitutionsmodells durchgeführt und dabei phylogenetische Stammbäume erstellt.

# 5. Ergebnisse

## 5.1. MALDI-ToF Massenspektrometrie

Anhand des Vergleichs der durch die MALDI-ToF Massenspektrometrie erhaltenen Spektren mit den Einträgen in der Referenzdatenbank konnten 87 Isolate mit einem Score-Wert von > 2.000 sicher einer Art zugeordnet werden. Bei fünf Stämmen lag der Wert zwischen 1.700-2.000, was zumindest eine Identifikation auf Gattungsebene gewährleistet. Bei Stamm 3920B lag der errechnete Score-Wert deutlich unter 1.700, sodass nicht einmal eine Zuordnung auf Gattungsebene möglich ist. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen Fehlbeschuss. Nach Wiederholung der MALDI-ToF-Analyse konnte 3920B schließlich der Art *Mycoplasma phocoeninasale* zugeordnet werden.

Die untersuchten Stämme konnten folgenden vier Arten zugeordnet werden: 26 Stämme zur noch nicht validen beschriebenen Art *„Mycoplasma zalophi“,* 23 Stämme zu *Mycoplasma phocoeninasale*, 36 Stämme zu *Mycoplasma phocicerebrale*-like (eine mit *Mycoplasma phocicerebrale* engverwandte Art) und zwei Stämme zu *Mycoplasma miroungigenitalium*.

**Tabelle 6:** Ergebnisse der MALDI-ToF Analyse. Score-Werte ≥ 2.000 (grün, Identifikation auf Artebene), ≥ 1.700 bis 1.990 (gelb, Identifikation auf Gattungsebene); < 1.700 (rot, keine Identifikation)

| Stammbezeichnung | Art | Score |
|---|---|---|
| 19-335B | *"M. zalophi"* | 2.320 |
| 19-335C | *"M. zalophi"* | 2.280 |
| 19-340 (32) | *"M. zalophi"* | 2.230 |
| 19-343 (37A) | *"M. zalophi"* | 2.300 |
| 19-353B | *"M. zalophi"* | 2.200 |
| 20-15 (92AB) | *"M. zalophi"* | 2.210 |
| 20-132 (186) | *"M. zalophi"* | 2.100 |
| 20-142 (201) | *"M. zalophi"* | 2.200 |
| 242A | *"M. zalophi"* | 2.300 |
| 20-176 (276) | *"M. zalophi"* | 2.140 |
| 20-181 (286A) | *"M. zalophi"* | 2.060 |
| 20-186 (296B) | *"M. zalophi"* | 2.200 |
| 21-19 (349) | *"M. zalophi"* | 2.250 |
| 21-24 (358) * | *"M. zalophi"* | 2.210 |

| | | |
|---|---|---|
| 21-30 (369A) | *"M. zalophi"* | 2.150 |
| 21-34 (375A) * | *"M. zalophi"* | 2.240 |
| 21-35 (377) | *"M. zalophi"* | 2.230 |
| 21-36 (379A) * | *"M. zalophi"* | 2.140 |
| 21-67 (443D) Klon | *"M. zalophi"* | 2.280 |
| 21-87 (480) * | *"M. zalophi"* | 2.180 |
| 510* | *"M. zalophi"* | 2.060 |
| AC 216 | *"M. zalophi"* | 2.370 |
| G56 | *"M. zalophi"* | 2.640 |
| G105 | *"M. zalophi"* | 2.400 |
| O44 | *"M. zalophi"* | 2.290 |
| O129A | *"M. zalophi"* | 2.370 |
| 19-342 (35) | *M. phocicerebrale-like* | 2.270 |
| 19-343 (37B) | *M. phocicerebrale-like* | 2.410 |
| 19-350B | *M. phocicerebrale-like* | 2.350 |
| 19-364 (69) | *M. phocicerebrale-like* | 2.320 |
| 20B | *M. phocicerebrale-like* | 2.430 |
| 20-7 (85) | *M. phocicerebrale-like* | 2.400 |
| 20-33 (110) * | *M. phocicerebrale-like* | 2.220 |
| 20-91 (144) | *M. phocicerebrale-like* | 2.200 |
| 20-107 (170) * | *M. phocicerebrale-like* | 1.910 |
| 20-134 (184) | *M. phocicerebrale-like* | 2.070 |
| 20-140 (198) | *M. phocicerebrale-like* | 2.060 |
| 233 | *M. phocicerebrale-like* | 2.110 |
| 20-156 (238B) | *M. phocicerebrale-like* | 2.090 |
| 20-163 (252) | *M. phocicerebrale-like* | 2.440 |
| 20-168 (261) | *M. phocicerebrale-like* | 2.310 |
| 20-172 (266A) | *M. phocicerebrale-like* | 2.310 |
| 20-173 (270) | *M. phocicerebrale-like* | 2.360 |
| 20-178 (280) * | *M. phocicerebrale-like* | 2.460 |
| 20-182 (288B) | *M. phocicerebrale-like* | 2.360 |
| 21-3 (322) | *M. phocicerebrale-like* | 2.440 |
| 21-4 (324) * | *M. phocicerebrale-like* | 2.090 |
| 21-5 (326) | *M. phocicerebrale-like* | 2.290 |
| 21-14 (342A) | *M. phocicerebrale-like* | 2.380 |
| 21-19 (349A) | *M. phocicerebrale-like* | 2.440 |
| 21-34 (375B) | *M. phocicerebrale-like* | 2.250 |

| | | |
|---|---|---|
| 21-42 (390A) * | *M. phocicerebrale-like* | 2.380 |
| 21-46 (397) | *M. phocicerebrale-like* | 2.330 |
| 21-48 (401) | *M. phocicerebrale-like* | 2.510 |
| 21-DOA1 (406) | *M. phocicerebrale-like* | 2.350 |
| 21-52 (413) | *M. phocicerebrale-like* | 2.290 |
| 21-53 (417) | *M. phocicerebrale-like* | 2.370 |
| 21-83 (472neu) | *M. phocicerebrale-like* | 1.810 |
| 562 | *M. phocicerebrale-like* | 2.540 |
| 565A | *M. phocicerebrale-like* | 2.250 |
| 571 | *M. phocicerebrale-like* | 2.290 |
| Lunita Tonsille | *M. phocicerebrale-like* | 2.310 |
| Stella Auge 3 | *M. phocicerebrale-like* | 2.280 |
| Stella Auge 9* | *M. phocicerebrale-like* | 2.490 |
| 19-335A | *M. phocoeninasale* | 2.360 |
| 19-348 | *M. phocoeninasale* | 2.370 |
| 20-6 (84B) | *M. phocoeninasale* | 2.220 |
| 20-18 (96) | *M. phocoeninasale* | 2.360 |
| 20-78 (136) | *M. phocoeninasale* | 1.990 |
| 20-146 (208) | *M. phocoeninasale* | 2.350 |
| 20-147 (210B) * | *M. phocoeninasale* | 2.430 |
| 20-169 (263) | *M. phocoeninasale* | 2.270 |
| 20-179 (282) | *M. phocoeninasale* | 2.350 |
| 20-180 (284) * | *M. phocoeninasale* | 2.050 |
| 20-182 (288A) | *M. phocoeninasale* | 2.360 |
| 21-2 (320) | *M. phocoeninasale* | 2.350 |
| 21-14 (342B) | *M. phocoeninasale* | 1.800 |
| 21-16 (345A) | *M. phocoeninasale* | 2.240 |
| 21-22 (354B) | *M. phocoeninasale* | 2.210 |
| 21-27 (363A) | *M. phocoeninasale* | 2.440 |
| 21-30 (369B) | *M. phocoeninasale* | 2.420 |
| 21-36 (379B) | *M. phocoeninasale* | 2.240 |
| 21-37 (381) | *M. phocoeninasale* | 2.260 |
| 21-39 (384A) | *M. phocoeninasale* | 2.270 |
| 21-42 (390B) | *M. phocoeninasale* | 2.210 |
| 21-DOA1 (408) | *M. phocoeninasale* | 2.140 |
| 21-59 (426) | *M. phocoeninasale* | 2.490 |
| 574 | *M. phocoeninasale* | 1.900 |

| | | |
|---|---|---|
| 3920B* | *M. phocoeninasale* | 1.320 |
| 9307* | *M. phocoeninasale* | 2.010 |
| Pablo Tr. B | *M. phocoeninasale* | 2.060 |
| G49 | *M. miroungigenitalium* | 2.460 |
| G129 | *M. miroungigenitalium* | 2.470 |

*ausgewählte Stämme für die Sequenzanalyse

Sechsundzwanzig Stämme konnten keiner in der Datenbank hinterlegten Art zugeordnet werden. Nichtsdestotrotz konnten diese anhand berechneter Distanzwerte in vier Gruppen und drei Einzelisolate eingeteilt werden. Aus diesen vier Gruppen wurden schließlich fünf repräsentative Stämme ausgewählt und zusammen mit den drei Einzelisolaten der Sequenzanalyse zugeführt (Tab. 7). Außerdem wurden bei 15 artdiagnostisch identifizierten Stämmen (siehe Tab. 6) zur Bestätigung der MALDI-ToF-Ergebnisse eine Sequenzanalyse durchgeführt.

**Tabelle 7:** Gruppierung der 26 mittels MALDI-ToF Analyse nicht identifizierbaren Stämme

| **Artdiagnose durch MALDI-ToF MS** | **Stammbezeichnung** |
|---|---|
| *Mycoplasma* sp. nov. A | 19-350A; 21-22 (354C); 21-33 (373A)*; 3193 Kelo; Carmen Lunge*; Carmen Trachea; Kelo Tonsille; Leo genital; Leo nasal; Moneda Lunge; Moneda Trachea; Pablo Tr. A; Stella Lunge; Stella Trachea |
| *Mycoplasma* sp. nov. B | 19-350D2; 20-189 (302A); 21-28 (365)* |
| *Mycoplasma* sp. nov. C | 19-350F*; 21-16 (345B); 21-18 (347A) |
| *Mycoplasma* sp. nov. D | 242B; 21-7 (336)*; 21-79 (464A) |
| *Mycoplasma* sp. nov. E | 21-67 (443A) Klon* |
| *Mycoplasma* sp. nov. F | 21-79 (464B)* |
| *Mycoplasma* sp. nov. G | Carmen Auge* |

*ausgewählte Stämme für die Sequenzanalyse

## 5.2. Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse

Zur Bestimmung der Verwandtschaftsgrade zwischen den untersuchten Stämmen und bekannten Mykoplasmen-Arten wurden vorerst die ermittelten Sequenzen (16S rRNA-Gen, 16S-23S intergenische Spacer-Sequenz, *rpoB*-Genfragment) mittels BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*) mit GenBank-Einträgen verglichen und dabei eine Hit-Liste mit Sequenzähnlichkeitswerten generiert. Anhand dieser Liste konnten die Stämme jeweils der Mykoplasmen-Art mit dem höchsten ermittelten Sequenzähnlichkeitswert zugeordnet werden, wobei die für Mykoplasmen allgemein gültigen Sequenzähnlichkeitsgrenzwerte zur Bestimmung der Artzugehörigkeit mitberücksichtigt wurden: ≥ 98 % (16S rRNA-Gen), ≥ 93 % (16S-23S intergenische Spacer-Sequenz) und ≥ 92 % (*rpoB*-Genfragment). Für Stämme, deren ermittelten Sequenzähnlichkeitswerte eine Grenzüberschreitung bei mindestens zwei Identifikationsmarkern aufwiesen, wurden anschließend die Verwandtschaftsverhältnisse mithilfe phylogenetischer Stammbäume auf Basis des *rpoB*-Genfragments graphisch dargestellt.

**Tabelle 8:** Ergebnisse der Sequenzanalyse (Sequenzähnlichkeitswerte)

| **Stammbezeichnung** | **MALDI-ToF Ergebnis** | **16S rRNA-Gen Sequenzähnlichkeit in % (nächstverwandte Art)** | **16S-23S intergenische Spacer-Region Sequenzähnlichkeit in % (nächstverwandte Art)** | ***rpoB*-Genfragment Sequenzähnlichkeit in % (nächstverwandte Art)** |
|---|---|---|---|---|
| 21-24 (358) | *„M. zalophi“* | 99 % (*„M. zalophi“)* | 99 % (*„M. zalophi“*) | 99 % (*„M. zalophi“*) |
| 21-34 (375A) | *„M. zalophi“* | 99 % (*„M. zalophi“)* | 100 % (*„M. zalophi“*) | 99 % (*„M. zalophi“*) |
| 21-36 (379A) | *„M. zalophi“* | 99 % (*„M. zalophi“*) | 100 % (*„M. zalophi“*) | 99 % (*„M. zalophi“*) |
| 21-87 (480) | *„M. zalophi“* | 99 % (*„M. zalophi“*) | 99 % (*„M. zalophi“*) | 99 % (*„M. zalophi“*) |
| 510 | *„M. zalophi“* | 99 % (*„M. zalophi“*) | 99 % (*„M. zalophi“*) | 99 % (*„M. zalophi“*) |
| 20-33 (110) | *M. phocicerebrale*-like | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 88 % (*M. phocicerebrale*) |
| 20-107 (170) | *M. phocicerebrale*-like | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 98 % (*M. phocicerebrale*) | 88 % (*M. phocicerebrale*) |
| 20-178 (280) | *M. phocicerebrale*-like | 100 % (*M. phocicerebrale)* | 100 % (*M. phocicerebrale)* | 88 % (*M. phocicerebrale*) |
| 21-4 (324) | *M. phocicerebrale*-like | 100 % (*M. phocicerebrale*) | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 88 % (*M. phocicerebrale*) |
| 21-42 (390A) | *M. phocicerebrale*-like | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 88 % (*M. phocicerebrale*) |
| Stella Auge 9 | *M. phocicerebrale*-like | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 88 % (*M. phocicerebrale*) |
| 20-147 (210B) | *M. phocoeninasale* | 99 % (*M. phocoeninasale*) | 100 % (*M. phocoeninasale*) | 94 % (*M. phocoeninasale*) |
| 20-180 (284) | *M. phocoeninasale* | 100 % (*M. phocoeninasale)* | 99 % (*M. phocoeninasale*) | 99 % (*M. phocoeninasale*) |
| 3920B | *M. phocoeninasale* | 100 % (*M. phocoeninasale*) | 99 % (*M. phocoeninasale*) | 96 % (*M. phocoeninasale*) |
| 9307 | *M. phocoeninasale* | 100 % (*M. phocoeninasale)* | 99 % (*M. phocoeninasale*) | 96 % (*M. phocoeninasale*) |
| 21-33 (373A) | *M.* sp. nov. A | 97 % (*M. edwardii*) | 99 % (*M. edwardii*) | 82 % (*M. edwardii*) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Carmen Lunge | *M.* sp. nov. A | 97 % (*M. edwardii*) | 99 % (*M. edwardii*) | 82 % (*M. edwardii*) |
| 21-28 (365) | *M.* sp. nov. B | 99 % *M. (phocoeninasale)* | 95 % (*M. phocoeninasale)* | 87 % (*M. phocoeninasale)* |
| 19-350F | *M.* sp. nov. C | 99 % (*M. phocirhinis*) | 99 % (*M. phocirhinis*) | 87 % (*M. phocirhinis*) |
| 21-7 (336) | *M.* sp. nov. D | 100 % (*M. phocicerebrale)* | 99 % (*M. phocicerebrale)* | 88 % (*M. phocicerebrale*) |
| 21-67 (443A) | *M.* sp. nov. E | 98 % („*M. zalophi*“) | 93 % („*M. zalophi*“) | 89 % („*M. zalophi*“) |
| 21-79 (464B) | *M.* sp. nov. F | 94 % (*M. salivarium*) | 89 % (*M. salivarium*) | 81 % (*M. salivarium*) |
| Carmen Auge | *M.* sp. nov. G | 99 % (*M. phocicerebrale)* | 99 % (*M. phocicerebrale*) | 88 % (*M. phocicerebrale*) |

Nach MALDI-ToF massenspektrometrischer Gruppierung und der Sequenzanalyse ausgewählter Stämme konnte die untersuchte Stammkohorte acht neuen Arten und einer valide beschriebenen Mykoplasmen-Spezies (*M. phocoeninasale*) zugeordnet werden.

Ausgewählte Gruppenmitglieder von *Mycoplasma* sp. nov. A (14 Stämme) sowie das Einzelisolat 21-79 (464B) (*M.* sp. nov. F) konnten bereits anhand der ermittelten Sequenzähnlichkeitswerte (Tab. 8, Unterschreitung der Grenzwerte bei zwei bzw. drei phylogenetischen Markern) als Vertreter zweier neuer Mykoplasmen-Arten identifiziert werden. Durch die ermittelten Sequenzähnlichkeitswerte waren die beiden neuen Arten eindeutig dem phylogenetischen *M. synoviae* Cluster *(Mycoplasma* sp. nov. A) bzw. dem phylogenetischen *M. hominis* Cluster (*Mycoplasma* sp. nov. F.) innerhalb der Gattung *Mycoplasma* zuordenbar.

Vertreter der mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie als „*M. zalophi*“ identifizierten Stammgruppe konnten anhand der ermittelten Sequenzähnlichkeitswerte ebenfalls eindeutig dieser neuen Mykoplasmen-Art, deren Namensgebung noch nicht valide veröffentlicht wurde, zugeordnet werden (Tab. 8). Der konstruierte Stammbaum (Abb. 1) bestätigt die phylogenetische Nähe dieser Stämme mit dem vorgeschlagenen Typstamm von *„M. zalophi“* CSL9976. Der Stamm 21-67 (443A) (*Mycoplasma* sp. nov. E) zeigte bei der Sequenzvergleichsanalyse ebenfalls ein näheres Verwandtschaftsverhältnis zu „*M. zalophi*“ (Sequenzähnlichkeitswerte: 98 % – 16S rRNA-Gen, 93 % - 16S-23S intergenische Spacer-Region und 89 % - *rpoB*-Genfragment) (Tab. 8). Im phylogenetischen Stammbaum (Abb. 1) nimmt der Stamm 21-67 (443A) jedoch eine klar abgetrennte Position gegenüber den „*M. zalophi*“-Stämmen ein, was seinen eigenständigen Artstatus untermauert. Beide Mykoplasmen-Arten positionieren sich innerhalb des phylogenetischen *M. gypis* Clusters der Gattung *Mycoplasma*.

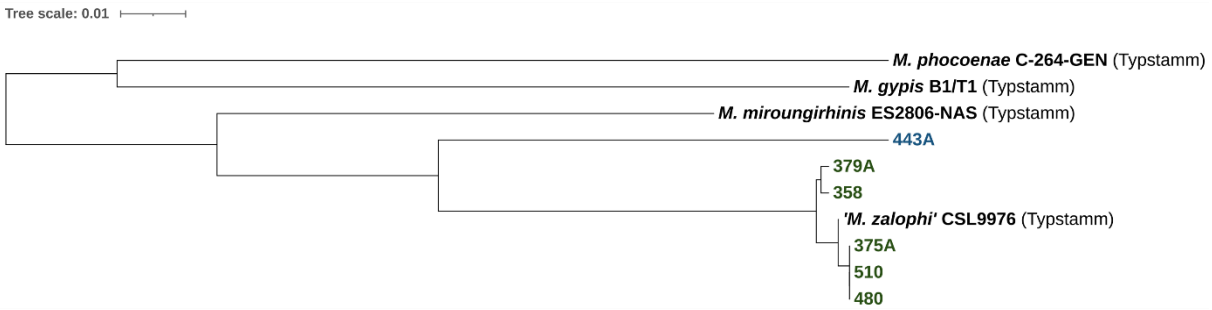



**Abbildung 1:** Phylogenetische Position von ausgewählten massenspektrometrisch als „*Mycoplasma zalophi*“ identifizierten Stämmen (379A, 358, 375A, 510, 480) und dem Einzelisolat 21-67 (443A) (*Mycoplasma* sp. nov. E) innerhalb des phylogenetischen *M. gypis* Clusters der Gattung *Mycoplasma*, basierend auf Analyse des *rpoB*-Genfragments.

Der massenspektrometrisch der Gruppe *Mycoplasma* sp. nov. C (drei Stämme) zugeordnete Stamm 19-350F wies bei der Sequenzanalyse einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *M. phocirhinis* (Sequenzgrenzunterschreitung nur beim *rpoB*-Gen) auf. Die phylogenetische Nähe konnte auch durch die Positionierung von 19-350F nächst dem Typstamm von *M. phocirhinis* (852) im konstruierten Stammbaum bestätigt werden, wobei auch hier die Astverzweigung auf einen eigenständigen Artstatuts von 19-350F innerhalb des phylogenetischen *M. bovis* Clusters hinweist.

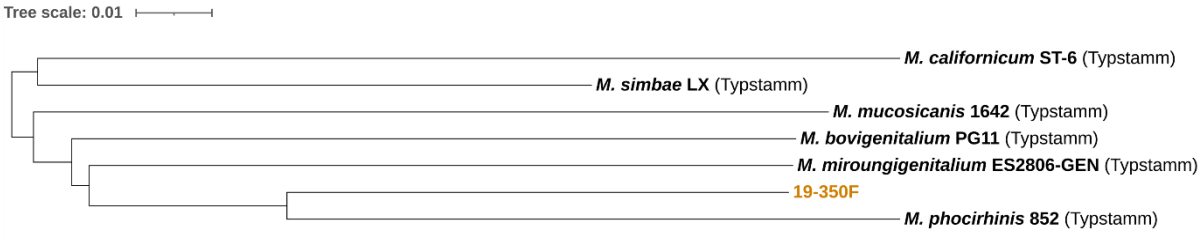



**Abbildung 2:** Phylogenetische Position von 19-350F der Gruppe *Mycoplasma* sp. nov. C (3 Stämme) innerhalb des phylogenetischen *M. bovis* Clusters der Gattung *Mycoplasma,* basierend auf Analyse des *rpoB*-Genfragments.

Mitglieder der massenspektrometrisch als *M. phocoeninasale* identifizierten Stammgruppe konnten sowohl anhand der ermittelten Sequenzähnlichkeitswerte als auch durch ihre Position im phylogenetischen Stammbaum eindeutig dieser kürzlich neubeschriebenen Mykoplasmen-Art zugeordnet werden. Der Stamm 21-28 (365) (Gruppe *Mycoplasma* sp. nov. B, bestehend

aus drei Stämmen) wiederum zeigte bei der Sequenzvergleichsanalyse ebenfalls ein näheres Verwandtschaftsverhältnis zu *M. phocoeninasale* (Sequenzähnlichkeitswerte: 99 % – 16S rRNA-Gen, 95 % - 16S-23S intergenische Spacer-Region und 87 % - *rpoB*-Genfragment) (Tab. 8). Im phylogenetischen Stammbaum (Abb. 3) positioniert sich der Stamm 21-28 (365) jedoch tief anzestral zu den *M. phocoeninasale* Stämmen, wodurch sein eigenständiger Artstatus verdeutlicht wird.

Ausgewählte Stämme der mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie als *M. phocicerebrale*-like identifizierten Stammgruppe, Stamm 21-7 (336) aus der *Mycoplasma* sp. nov. D-Gruppe (bestehend aus drei Stämmen), sowie das Einzelisolat Carmen Auge (*Mycoplasma* sp. nov. G) zeigen sowohl in den Sequenzvergleichsanalysen als auch im phylogenetischen Stammbaum ein Naheverhältnis zu *M. phocicerebrale* 1049 (Typstamm) (Abb. 3). Ihre phylogenetische Positionierung, sowie Astverzweigungen und Asttiefen deuten darauf hin, dass die untersuchten Stämme drei unterschiedliche Mykoplasmen-Arten repräsentieren. *Mycoplasma phocoeninasale* und die vier neuen Mykoplasmen-Arten positionieren sich innerhalb des phylogenetischen *M. hominis* Clusters der Gattung *Mycoplasma*.

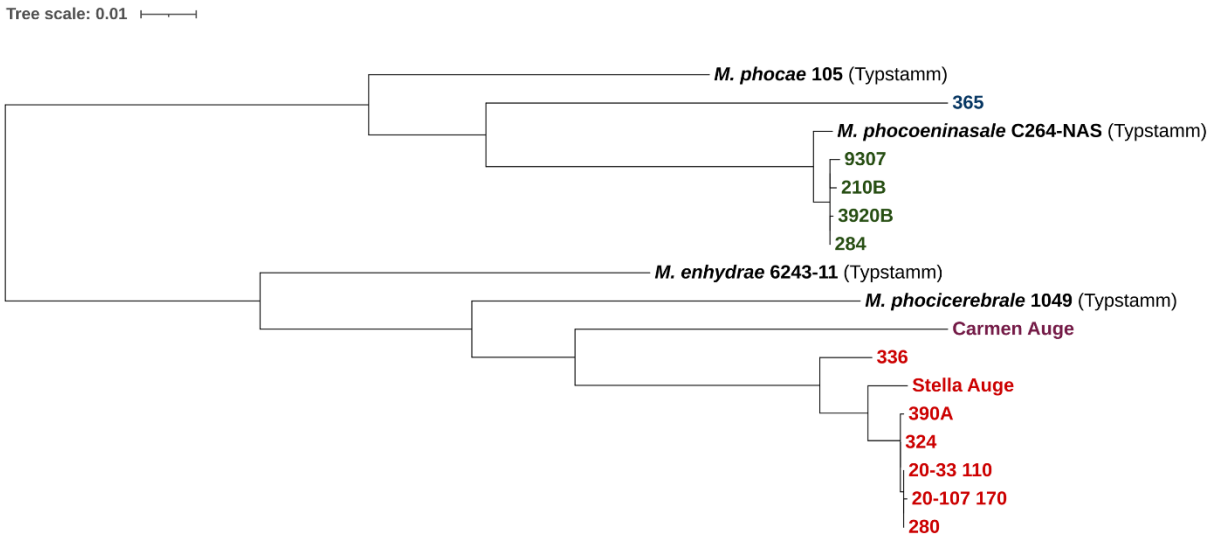



**Abbildung 3:** Phylogenetische Position von ausgewählten massenspektrometrisch als *Mycoplasma phocoeninasale* (9307, 210B, 3920B, 284) und *Mycoplasma phocicerebrale*-like (Stella Auge, 390A, 324, 20-33 110, 20-107 170, 280) identifizierten Stämme, sowie von ausgewählten Stämmen aus *Mycoplasma* sp. nov. B (365) und *Mycoplasma* sp. nov. D (336) und dem Einzelisolat Carmen Auge (*Mycoplasma* sp. nov. G) innerhalb des phylogenetischen *M. hominis* Clusters der Gattung *Mycoplasma*, basierend auf Analyse des *rpoB*-Genfragments.

## 6. Diskussion

Obwohl mittlerweile Mykoplasmen immer häufiger bei verschiedenen Meeressäugetieren nachgewiesen werden, ist der Wissensstand über deren Vorkommen und Bedeutung als Krankheitserreger gering (2, 24). Dies liegt zum einen daran, dass Mykoplasmen-assoziierte Erkrankungen bei Meeressäugern oftmals multifaktoriellen Ursprungs sind und sich somit das Ausmaß der Beteiligung von Mykoplasmen am Krankheitsgeschehen und -verlauf nur schwer bestimmen lässt (7, 8). Zum anderen lassen sich bislang nachgewiesene Mykoplasmen häufig keiner valide beschriebenen Art zuordnen, wodurch die Bestimmung von Zusammenhängen zwischen Mykoplasmen-Arten und deren Bedeutung als Infektionserreger bei Meeressäugern unterbunden wird (10, 12, 13).

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine beträchtliche Anzahl von Mykoplasmen-Isolaten, die von verschiedenen Meeressäugetieren gewonnenen werden konnten, massenspektrometrisch zu identifizieren oder ggf. zu gruppieren und ihre phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse mit bekannten Mykoplasmen-Arten darzustellen.

Da die Differenzierung von Mykoplasmen-Isolaten durch zeit- und arbeitsintensive Verfahren, wie der Serologie, nicht immer eine eindeutige Unterscheidung ermöglicht (47), wird zunehmend auf schnellere und einfachere Identifizierungsmethoden – wie der MALDI-ToF Massenspektrometrie - gesetzt (48). Diese Methode hat sich als geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Artzugehörigkeit verschiedener Mykoplasmen erwiesen. Zudem kann sie als Ergänzung bei der taxonomischen Einordnung und somit im Rahmen der Beschreibung neuer Arten eingesetzt werden (26, 49–51). Die Zuverlässigkeit der Artidentifikation mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Auffällig war hierbei, dass eine Bestimmung der Art auch bei den Stämmen möglich war, bei denen laut dem errechneten Score-Wert lediglich eine aussagekräftige Zuordnung auf Gattungsebene zu erwarten gewesen wäre. Dies spiegelt die Erkenntnis mehrerer Studien wider, dass eine Senkung des Score-Werts auf 1.800 für die Artidentifikation von Mykoplasmen ausreichend ist (26).

Das 16S rRNA-Gen gilt sowohl bei der Identifikation als auch bei taxonomischen Einordnung von Bakterien als Goldstandard und stellt eine Mindestanforderung bei der Neubeschreibung von Arten innerhalb der Klasse *Mollicutes* dar (1, 52). Für die Bestimmung der Artzugehörigkeit wird hierbei eine Sequenzähnlichkeit von 98 % als Grenzwert herangezogen. Ähnlichkeitswerten unterhalb dieser Grenze gelten als gesicherter Beweis für die

Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Arten, wohingegen Werte über dieser Marke auf ein enges phylogenetisches Verwandtschaftsverhältnis hindeuten (53). Die alleinige Analyse des 16S rRNA-Gens ist jedoch nicht immer für die Bestimmung der Artzugehörigkeit und der taxonomischen Abgrenzung ausreichend. Insbesondere bei nahe verwandten Arten wird die Verwendung zusätzlicher phylogenetischer Marker wie die 16S-23S intergenische Spacer-Region oder das *rpoB*-Gen empfohlen (1, 30, 47). Auch in der vorliegenden Studie konnte die Relevanz des Einsatzes zusätzlicher Marker für eine präzisere Klassifikation verdeutlicht werden. Mit Ausnahme dreier Stämme lagen die Sequenzähnlichkeitswerte der 16S rRNA-Gene der sequenzanalysierten Stämme zu bekannten Mykoplasmen-Arten zwischen 98 und 100 %, während die des *rpoB*-Gens zwischen 81 und 99 % variierten. Dadurch konnten selbst geringe Sequenzunterschiede erkannt und naheverwandte Arten voneinander abgegrenzt werden, die bei ausschließlicher Analyse des 16S rRNA-Gens unentdeckt geblieben wären.

Mit Ausnahme der Arten *Mycoplasma* sp. nov. F (nächstverwandte Art *M. salivarium*) und der Vertreter der Art *Mycoplasma* sp. nov. A (nächstverwandte Art *M. edwardii*), stehen die übrigen neuen Arten in engem Verwandtschaftsverhältnis zu bereits bekannten Mykoplasmen-Arten, die von Meeressäugetieren isoliert wurden. Das nahe Verwandtschaftsverhältnis der Art *Mycoplasma* sp. nov. A zu der caninen Mykoplasmen-Art *M. edwardii* (54) ist anhand der Zugehörigkeit der Robben zur Unterordnung der hundeartigen Fleischfresser zu erklären.

Die durch die MALDI-ToF Massenspektrometrie und der anschließenden Sequenzanalyse identifizierten neuen Mykoplasmen-Arten scheinen unterschiedliche Wirtsspezifität vorzuweisen. Die massenspektrometrisch den Gruppen *Mycoplasma* sp. nov. B (19-350D2, 302A, 365) und *Mycoplasma* sp. nov. C (19-350F, 345B, 347A) zugeordneten Stämmen zeigen in dieser Studie eine ausgeprägte Wirtsspezifität gegenüber Kalifornischen Seelöwen. Die Mykoplasmen-Stämme der neuen Art *Mycoplasma* sp. nov. D (242B, 336, 464A) konnten hingegen sowohl in Kalifornischen Seelöwen als auch in Nördlichen Seeelefanten nachgewiesen werden. Die neue Mykoplasmen-Art, welche mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie als *M. phocicerebrale*-like Stammgruppe identifiziert wurde, weist eine deutliche Wirtspräferenz zu Kalifornischen Seelöwen auf. Diese Art konnte aber auch in Mähnenrobben, einem Seehund und einem Nördlichen Seebären nachgewiesen werden. Die noch nicht valide beschriebene Art „*Mycoplasma zalophi*“ zeigt in dieser Studie ein vermehrtes Auftreten in Kalifornischen Seelöwen, konnte aber auch aus Robben in Spanien, Nördlichen Seeelefanten und Seebären isoliert werden. Die anhand der MALDI-ToF Massenspektrometrie und der Sequenzanalyse identifizierte neue Mykoplasmen-Art *Mycoplasma* sp. nov. A. (14

Stämme) zeigt ein vermehrtes Auftreten in Mähnenrobben aus dem Tiergarten Schönbrunn. Zusätzlich konnte diese neue Art auch in Kalifornischen Seelöwen und in Robben aus Spanien nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit zeigen, dass die untersuchten Stämme acht bislang unbeschriebenen Arten und einer valide-beschriebenen Mykoplasmen-Art (*M. phocoeninasale*) zuzuordnen sind. Somit liefert diese Arbeit eine solide Grundlage für zukünftige Speziesneubeschreibungen innerhalb der Gattung *Mycoplasma*.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 16S rRNA | 16S ribosomale Ribonukleinsäure |
| Abb. | Abbildung |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| g | Gravitationskonstante |
| IUCN | International Union for Conservation of Nature |
| k.A. | keine Angaben |
| M. | Mycoplasma |
| MALDI-ToF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Massenspektrometrie |
| ml | Milliliter |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| rpoB | RNA-Polymerase β-Subunit-Gen |
| SP4 | Spiroplasma 4-Medium |
| Tab. | Tabelle |
| µl | Mikroliter |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |

## 8. Literaturverzeichnis


1. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS 1998; 62(4):1094–156. doi: 10.1128/mmbr.62.4.1094-1156.1998.
2. Simecka JW, Davis JK, Davidson MK, Ross SE, Städtlander CTK-H, Cassell GH. Mycoplasma Diseases of Animals. In: Maniloff J, Hrsg. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Washington, D.C.: American Soc. for Microbiology; 1992. S. 391–415.
3. Burbick CR, Lawhon SD, Munson E, Thelen E, Zapp A, Wilson A. An update on novel taxa and revised taxonomic status of bacteria isolated from non-domestic animals described in 2022. J Clin Microbiol 2023; 61(12):1-13. doi: 10.1128/jcm.00840-23.
4. Pitcher DG, Nicholas RAJ. Mycoplasma host specificity: Fact or fiction? The Veterinary Journal 2005; 170(3):300–6. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.08.011.
5. Sarzosa MS, Duignan P, DeRango EJ, Field C, Ríos C, Sanchez S et al. Occurrence of Mycoplasmas in Galapagos Sea Lions (Zalophus wollebaeki) and their Association with Other Respiratory Pathogens. J Wildl Dis 2021; 57(3):623–7. doi: 10.7589/JWD-D-20-00081.
6. Haulena M, Gulland FMD, Lawrence JA, Fauquier DA, Jang S, Aldridge B et al. Lesions associated with a novel Mycoplasma sp. in California sea lions (Zalophus californianus) undergoing rehabilitation. J Wildl Dis 2006; 42(1):40–5. doi: 10.7589/0090-3558-42.1.40.
7. Ruhnke HL, Madoff S. Mycoplasma phocidae sp. nov., isolated from harbor seals (Phoca vitulina L.). Int J Syst Bacteriol 1992; 42(2):211–4. doi: 10.1099/00207713-42-2-211.
8. Giebel J, Meier J, Binder A, Flossdorf J, Poveda JB, Schmidt R et al. Mycoplasma phocarhinis sp. nov. and Mycoplasma phocacerebrale sp. nov., Two New Species from Harbor Seals (Phoca vitulina L.). Int J Syst Bacteriol 1991; 41(1):39–44. doi: 10.1099/00207713-41-1-39.
9. Lynch M, Taylor TK, Duignan PJ, Swingler J, Marenda M, Arnould JPY et al. Mycoplasmas in Australian fur seals (Arctocephalus pusillus doriferus): identification and association with abortion. J Vet Diagn Invest 2011; 23(6):1123–30. doi: 10.1177/1040638711425699.

10. Ayling RD, Bashiruddin S, Davison NJ, Foster G, Dagleish MP, Nicholas RAJ. The Occurrence of Mycoplasma phocicerebrale, Mycoplasma phocidae, and Mycoplasma phocirhinis in Grey and Common Seals (Halichoerus grypus and Phoca vitulina) in the United Kingdom. J Wildl Dis 2011; 47(2):471–5. doi: 10.7589/0090-3558-47.2.471.

11. Volokhov DV, Norris T, Rios C, Davidson MK, Messick JB, Gulland FM et al. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (Zalophus californianus). Vet Microbiol 2011; 149(1-2):262–8. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.10.026.

12. Foster G, McAuliffe L, Dagleish MP, Barley J, Howie F, Nicholas RAJ et al. Mycoplasma Species Isolated from Harbor Porpoises (Phocoena phocoena) and a Sowerby's Beaked Whale (Mesoplodon bidens) Stranded in Scottish Waters. J Wildl Dis 2011; 47(1):206–11. doi: 10.7589/0090-3558-47.1.206.

13. Vega-Orellana OM, Rosales RS, Poveda JB, García-Peña FJ, García-Párraga D, Pedraza-Díaz S et al. The First Report of Mycoplasmas in Antarctic Pinnipeds: The Results of a Survey. Animals (Basel) 2025; 15(7):1–11. doi: 10.3390/ani15070937.

14. Waites KB, Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and Its Role as a Human Pathogen. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4):697-728. doi: 10.1128/CMR.17.4.697-728.2004.

15. Razin S. Mycoplasma Taxonomy and Ecology. In: Maniloff J, Hrsg. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Washington, D.C.: American Soc. for Microbiology; 1992. S. 3–22.

16. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 11., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2023.

17. Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D et al. A Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas: Basis for Their Classification. J Bacteriol 1989; 171(12):6455–67. doi: 10.1128/jb.171.12.6455-6467.1989.

18. Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proc Natl Acad Sci U S A 1980; 77(1):494–8. doi: 10.1073/pnas.77.1.494.

19. Sirand-Pugnet P, Citti C, Barré A, Blanchard A. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. Res Microbiol 2007; 158(10):754–66. doi: 10.1016/j.resmic.2007.09.007.

20. Rottem S. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. Physiological reviews 2003; 83(2):417–32. doi: 10.1152/physrev.00030.2002.

21. Medina JL, Coalson JJ, Brooks EG, Winter VT, Chaparro A, Principe MFR et al. Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol 2012; 46(6):815–22. doi: 10.1165/rcmb.2011-0135OC.

22. Razin S, Jacobs E. Mycoplasma adhesion. J Gen Microbiol 1992; 138(3):407–22. doi: 10.1099/00221287-138-3-407.

23. Razin S. Molecular Properties of Mollicutes: a Synopsis. In: Razin S, Tully JG, Hrsg. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology: Volume 1 Molecular Characterization. San Diego: Academic Press, INC.; 1995. S. 1–25.

24. Tully JG. Mollicute-Host Interrelationships: current concepts and Diagnostic Implications. In: Tully JG, Razin S, Hrsg. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology: Volume 2 Diagnostic Procedures. San Diego: Academic Press; 1996. S. 1–21.

25. Razin S. Diagnostic Genetic Probes: Introductory Remarks. In: Tully JG, Razin S, Hrsg. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology: Volume 2 Diagnostic Procedures. San Diego: Academic Press; 1996. S. 25–8.

26. Spergser J, Hess C, Loncaric 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. J Clin Microbiol 2019; 57(9):1–14. doi: 10.1128/JCM.00316-19.

27. Maniloff J. Phylogeny of Mycoplasmas. In: Maniloff J, Hrsg. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Washington, D.C.: American Soc. for Microbiology; 1992. S. 549–59.

28. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4):840-62. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.

29. Sachse K. Specificity and Performance of PCR Detection Assays for Microbial Pathogens. Mol Biotechnol 2004; 26(1):61–80. doi: 10.1385/MB:26:1:61.

30. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol 2009; 17(1):37–45. doi: 10.1016/j.tim.2008.09.008.

31. Berta A, Sumich JL, Kovacs KM. Marine mammals: Evolutionary biology. 2. ed. Burlington, MA: Academic Press; 2006.

32. Committee on Taxonomy. List of Marine Mammal Species and Subspecies. Society for Marine Mammalogy 2024 [Stand: 08.02.2025]. Verfügbar unter: https://marinemammalscience.org/science-and-publications/list-marine-mammal-species-subspecies/.

33. Nelms SE, Alfaro-Shigueto J, Arnould JP, Avila IC, Bengtson Nash S, Campbell E et al. Marine mammal conservation: over the horizon. Endang. Species. Res. 2021; 44:291–325. doi: 10.3354/esr01115.

34. Braulik GT, Taylor BL, Minton G, Di Notarbartolo Sciara G, Collins T, Rojas-Bracho L et al. Red-list status and extinction risk of the world's whales, dolphins, and porpoises. Conserv Biol 2023; 37(5):e14090. doi: 10.1111/cobi.14090.

35. Volokhov DV, Furtak VA, Blom J, Zagorodnyaya TA, Gao Y, Gulland FM. Mycoplasma miroungirhinis sp. nov. and Mycoplasma miroungigenitalium sp. nov., isolated from northern elephant seals (Mirounga angustirostris), Mycoplasma phocoenae sp. nov., isolated from harbour porpoise (Phocoena phocoena), and Mycoplasma phocoeninasale sp. nov., isolated from harbour porpoise and California sea lions (Zalophus californianus). Int J Syst Evol Microbiol 2022; 72(1):1–11. doi: 10.1099/ijsem.0.005224.

36. Duarte-Benvenuto A, Sacristán C, Ewbank AC, Sacristán I, Zamana-Ramblas R, Gravena W et al. Hemotropic Mycoplasma spp. in Aquatic Mammals, Amazon Basin, Brazil. Emerg Infect Dis 2022; 28(12):2556–9. doi: 10.3201/eid2812.220971.

37. Duarte-Benvenuto A, Sacristán C, Ewbank AC, Zamana-Ramblas R, Lial HC, Silva SC et al. Molecular Detection and Characterization of Mycoplasma spp. in Marine Mammals, Brazil. Emerg Infect Dis 2023; 29(12):2471–81. doi: 10.3201/eid2912.230903.

38. Oliveira Battisti L de, Mongruel ACB, Fagundes-Moreira R, Baggio-Souza V, Souza VK de, Amorim DB de et al. Post-mortem detection of hemoplasmas (hemotropic Mycoplasma spp.) in South American fur seal (Arctocephalus australis) sampled in Rio Grande do Sul State, southern Brazil. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2024; 109:1–7. doi: 10.1016/j.cimid.2024.102187.

39. Hartley JW, Pitcher D. Seal Finger-Tetracycline is First Line. J Infect 2002; 45(2):71–5. doi: 10.1053/jinf.2002.1027.

40. White CP, Jewer DD. Seal finger: A case report and review of the literature. Can J Plast Surg 2009; 17(4):133–5. doi: 10.1177/229255030901700415.

41. Baker AS, Ruoff KL, Madoff S. Isolation of Mycoplasma species from a patient with seal finger. Clin Infect Dis 1998; 27(5):1168–70. doi: 10.1086/514980.

42. Skafte-Holm A, Pedersen TR, Frølund M, Stegger M, Qvortrup K, Michaels DL et al. Mycoplasma phocimorsus sp. nov., isolated from Scandinavian patients with seal finger or septic arthritis after contact with seals. Int J Syst Evol Microbiol 2023; 73(11):1–10. doi: 10.1099/ijsem.0.006163.

43. Masover GK, Becker FA. Detection of Mycoplasmas in Cell Cultures by Cultural Methods. In: Miles R, Nicholas R, Hrsg. Mycoplasma Protocols: Methods in Molecular Biology. Vol 104. Totowa, NJ: Humana Press; 1998. S. 207–15.

44. Volokhov DV, Neverov AA, George J, Kong H, Liu SX, Anderson C et al. Genetic analysis of housekeeping genes of members of the genus Acholeplasma: phylogeny and complementary molecular markers to the 16S rRNA gene. Mol Phylogenet Evol 2007; 44(2):699–710. doi: 10.1016/j.ympev.2006.12.001.

45. Ramírez AS, Naylor CJ, Pitcher DG, Bradbury JM. High inter-species and low intra-species variation in 16S-23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. Vet Microbiol 2008; 128(3-4):279–87. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.10.023.

46. Lane D. 16S/23SrRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, Hrsg. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. New York: John Wiley & Sons Ltd.; 1991. S. 115–75.

47. Volokhov DV, Simonyan V, Davidson MK, Chizhikov VE. RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmataceae. Mol Phylogenet Evol 2012; 62(1):515–28. doi: 10.1016/j.ympev.2011.11.002.

48. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev 2013; 26(3):547–603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.

49. Ramírez AS, Poveda JB, Dijkman R, Poveda C, Suárez-Pérez A, Rosales RS et al. Mycoplasma bradburyae sp. nov. isolated from the trachea of sea birds. Syst Appl Microbiol 2023; 46(6):126472. doi: 10.1016/j.syapm.2023.126472.

50. Spergser J, Botes A, Nel T, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Langer S et al. Mycoplasma nasistruthionis sp. nov. and Mycoplasma struthionis sp. nov. isolated from ostriches with respiratory disease. Syst Appl Microbiol 2020; 43(1):126047. doi: 10.1016/j.syapm.2019.126047.

51. Spergser J, DeSoye P, Ruppitsch W, Cabal Rosel A, Dinhopl N, Szostak MP et al. Mycoplasma tauri sp. nov. isolated from the bovine genital tract. Syst Appl Microbiol 2022; 45(1):126292. doi: 10.1016/j.syapm.2021.126292.

52. Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57(Pt 11):2703–19. doi: 10.1099/ijs.0.64722-0.

53. Pettersson B, Tully JG, Bölske G, Johansson KE. Updated phylogenetic description of the Mycoplasma hominis cluster (Weisburg et al. 1989) based on 16S rDNA sequences. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50 Pt 1:291–301. doi: 10.1099/00207713-50-1-291.

54. Lalan SP, Warady BA, Blowey D, Waites KB, Selvarangan R. Mycoplasma edwardii peritonitis in a patient on maintenance peritoneal dialysis. Clin Nephrol 2015; 83(1):45–8. doi: 10.5414/CN107976.

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

**Abbildung 1:** Phylogenetische Position von ausgewählten massenspektrometrisch als „*Mycoplasma zalophi*“ identifizierten Stämmen (379A, 358, 375A, 510, 480) und dem Einzelisolat 21-67 (443A) (*Mycoplasma* sp. nov. E) innerhalb des phylogenetischen *M. gypis* Clusters der Gattung *Mycoplasma,* basierend auf Analyse des *rpoB*-Genfragments.…….....**23**

**Abbildung 2:** Phylogenetische Position von 19-350F der Gruppe *Mycoplasma* sp. nov. C (3 Stämme) innerhalb des phylogenetischen *M. bovis* Clusters der Gattung *Mycoplasma,* basierend auf Analyse des *rpoB*-Genfragments…… .**23**

**Abbildung 3:** Phylogenetische Position von ausgewählten massenspektrometrisch als *Mycoplasma phocoeninasale* (9307, 210B, 3920B, 284) und *Mycoplasma phocicerebrale*-like (Stella Auge, 390A, 324, 20-33 110, 20-107 170, 280) identifizierten Stämme, sowie von ausgewählten Stämmen aus *Mycoplasma* sp. nov. B (365) und *Mycoplasma* sp. nov. D (336) und dem Einzelisolat Carmen Auge (*Mycoplasma* sp. nov. G) innerhalb des phylogenetischen *M. hominis* Clusters der Gattung Mycoplasma, basierend auf Analyse des *rpoB*-Genfragments……..……..….**24**

**Tabelle 1:** Basisdaten der untersuchten Stammkohorte…….**8**

**Tabelle 2:** Primer-Sequenzen……...**14**

**Tabelle 3:** Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des 16S rRNA-Gens……**14**

**Tabelle 4:** Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation der 16S-23S intergenischen Spacer-Region…….**15**

**Tabelle 5:** Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des *rpoB*-Genfragments……..……...**15**

**Tabelle 6:** Ergebnisse der MALDI-ToF Analyse. Score-Werte ≥ 2.000 (grün, Identifikation auf Artebene), ≥ 1.700 bis 1.990 (gelb, Identifikation auf Gattungsebene); < 1.700 (rot, keine Identifikation)……..**17**

**Tabelle 7:** Gruppierung der 26 mittels MALDI-ToF Analyse nicht identifizierbaren Stämme.**20**

**Tabelle 8:** Ergebnisse der Sequenzanalyse (Sequenzähnlichkeitswerte)……..…..**21**