
Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
2	Schrifttum	12
2.1	MYKOPLASMEN ALLGEMEIN	12
2.1.1	CHARAKTERISIERUNG	12
2.1.2	TAXONOMIE	13
2.1.3	TENAZITÄT	16
2.2	AVIÄRE MYKOPLASMEN	17
2.2.1	PATHOGENE AVIÄRE MYKOPLASMEN	17
2.2.2	- <i>M. GALLISEPTICUM</i> , <i>M. SYNOVIAE</i> , <i>M. IOWAE</i> , <i>M. MELEAGRIDIS</i> -	17
2.2.2.1	Übertragung	18
2.2.2.2	Wirtsspezifität	20
2.2.2.3	Pathogenität und Virulenzfaktoren	21
2.2.2.4	Klinische Erscheinungen und Pathologie	23
2.2.3	ANDERE AVIÄRE MYKOPLASMEN	26
2.2.4	MYKOPLASMENNACHWEISE BEI GREIFVÖGELN	31
2.3	DIAGNOSTIK	35
2.3.1	DIREKTER NACHWEIS	36
2.3.1.1	Kultivierung	36
2.3.1.2	Differenzierung aufgrund biochemischer Eigenschaften	37
2.3.1.3	Differenzierung aufgrund antigenetischer Eigenschaften	38
2.3.1.4	Differenzierung aufgrund genetischer Eigenschaften	39
2.3.2	INDIREKTER NACHWEIS	44
3	Material und Methoden	45
3.1	MATERIALNACHWEIS	45
3.1.1	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	45
3.1.2	KITS, REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	46
3.2	PUFFER, KITS, ZUSÄTZE UND MEDIEN	47
3.2.1	LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN ZUR MYKOPLASMEN- ANZUCHT UND ERNTE	47

3.2.2	LÖSUNGEN, PUFFER, KONJUGATE UND ANTISEREN FÜR DEN IMMUNO-- BINDING- ASSAY (IBA)	51
3.2.3	PUFFER UND KITS FÜR DIE PCR- DURCHFÜHRUNG	52
3.2.4	PUFFER UND ZUSÄTZE FÜR DIE GELELEKTROPHORESE	54
3.2.5	GEL- REINIGUNG VON PCR- PRODUKTEN	55
3.3	MYKOPLASMEN UND BAKTERIEN	55
3.3.1	BEZEICHNUNG UND HERKUNFT	55
3.3.2	HERKUNFT DES PROBENMATERIALS	57
3.3.3	KULTIVIERUNG DER REFERENZSTÄMME	60
3.3.4	BAKTERIENSTÄMME	60
3.3.5	PROBENNAHME BEI DEN TIEREN	60
3.3.6	KULTIVIERUNG DER TRACHEALTUPFERPROBEN	61
3.3.7	DIFFERENZIERUNG DER ISOLIERTEN FELDSTÄMME MITTELS IMMUNO- BINDING- ASSAY (IBA) NACH KOTANY UND MCGARRITY (1985)	62
3.3.8	BESTIMMUNG DER KEIMZAHL	64
3.4	ERNTE DER MYKOPLASMENZELLEN UND DNS- AUFBEREITUNG	64
3.4.1	ERNTE DER MYKOPLASMENZELLEN NACH PFLITSCH (1994)	64
3.4.2	AUFBEREITUNG DER KULTURMEDIEN UND TRACHEALTUPFER	65
3.4.3	DNS- EXTRAKTION	65
3.4.4	DNS- KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	66
3.5	ETABLIERUNG DER POLYMERASEKETTENREAKTIONEN (PCR) ZUM NACHWEIS VON VERSCHIEDENEN AVIÄREN MYKOPLASMEN BEI GREIFVÖGELN	67
3.5.1	PRIMERAUSWAHL	67
3.5.1.1	Bereits in der Literatur beschriebene Primerpaare	68
3.5.1.2	Selbstentwickelte Primerpaare zum Nachweis aviärer Mykoplasmen	68
3.5.1.2.1	Multispezies- PCR	69
3.5.1.2.2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> / <i>Mycoplasma imitans</i> - PCR	70
3.5.1.2.3	<i>Mycoplasma iowae</i> - PCR	70
3.5.1.2.4	<i>M. buteonis</i> -, <i>M. corogypsi</i> -, <i>M. gypis</i> - und <i>M. falconis</i> - PCR	70
3.5.2	DURCHFÜHRUNG DER VERSCHIEDENEN PCRS	71
3.5.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Ready-To-Go™ PCR Beads-Kit	71
3.5.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit dem Taq PCR® Master Mix Kit	71
3.5.2.3	Qualitätssicherung der PCR	72
3.5.2.4	PCR- Produktanalyse	72
3.5.3	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN ANNEALING- TEMPERATUR	73

3.5.4	SPEZIFITÄT DER PCR	74
3.5.4.1	Spezifitätsnachweis anhand Mykoplasmen- DNS und DNS zellwandtragender Bakterien	74
3.5.4.2	Restriktionsenzymanalyse (REA) der PCR- Produkte	74
3.5.4.3	Sequenzierung	75
3.5.5	SENSITIVITÄTSBESTIMMUNG DER PCR- VERFAHREN	76
3.5.5.1	Erstellen einer Mykoplasmen- DNS- Verdünnungsreihe	77
3.5.5.2	Erstellen einer Mykoplasmen- KbE- Verdünnungsreihe	77
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUR EPIDEMIOLOGIE VON MYKOPLASMEN	78
3.7	PCR ZUR ÜBERPRÜFUNG DER QUALITÄT DER EXTRAHIERTEN DNS DER IN DER MULTISPEZIES- PCR NEGATIVEN PROBEN	79
4	Ergebnisse	80
4.1	ETABLIERUNG EINER POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) ZUM NACHWEIS VERSCHIEDENER AVIÄREN MYKOPLASMEN	80
4.1.1	SEQUENZVERGLEICH UND PRIMERAUSWAHL	80
4.1.2	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN ANNEALING- TEMPERATUR	86
4.1.3	SPEZIFITÄT DER PRIMER	90
4.1.3.1	Spezifität des Primerpaares der Multispezies- PCR	90
4.1.3.2	Spezifität der speziesspezifischen Primerpaare zum Nachweis der geflügelpathogenen Mykoplasmenspezies MG/ <i>M. imitans</i> , MS, MI und MM	91
4.1.3.3	Spezifität der speziesspezifischen Primerpaare zum Nachweis der Mykoplasmenspezies <i>M. buteonis</i> , <i>M. corogypsi</i> , <i>M. gypis</i> und <i>M. falconis</i>	91
4.1.4	RESTRIKTIONSENZYMANALYSE (REA)	102
4.2	UNTERSUCHUNG DER SENSITIVITÄT DER VERSCHIEDENEN PCR- NACHWEISMETHODEN	106
4.3	NACHWEIS VON MYKOPLASMEN AUS TRACHEALTUPFERN VON GREIFVÖGELN	112
4.3.1	KULTURELLE UNTERSUCHUNG DER TRACHEALTUPFER	112
4.3.2	UNTERSUCHUNG DER TRACHEALTUPFER MITTELS DER MULTISPEZIES- PCR	113
4.4	DIFFERENZIERUNG DER NACHGEWIESENEN MYKOPLASMEN	115
4.4.1	DIFFERENZIERUNG DER ISOLIERTEN MYKOPLASMEN MITTELS IBA	115
4.4.2	DIFFERENZIERUNG DER MYKOPLASMENSPEZIES MITTELS SPEZIESSPEZIFISCHER PCR	116
4.5	SPEZIFITÄTSNACHWEIS DER FELDPROBEN	122

4.5.1	SPEZIFITÄTSNACHWEIS ANHAND DER RESTRIKTIONSENZYMANALYSE (REA)	123
4.5.2	SEQUENZVERGLEICH DER AMPLIFIKATE MIT DER JEWEILIGEN GENBANK- SEQUENZ	126
4.5.2.1	Sequenzvergleich der <i>M. buteonis</i> - PCR positiven Feldproben	126
4.5.2.2	Sequenzvergleich der <i>M. falconis</i> - PCR positiven Feldproben	126
4.5.2.3	Sequenzvergleich der <i>M. gypis</i> - PCR positiven Feldproben	127
4.5.2.4	Sequenzvergleich der MM- PCR positiven Feldproben	127
5	Diskussion	130
5.1	ETABLIERUNG DER PCR- VERFAHREN	130
5.2	ERGEBNISSE DER EPIDEMIOLOGISCHEN STUDIE ÜBER DAS AUFTRETEN VON MYKOPLASMEN BEI GREIFVÖGELN	139
5.3	SCHLUSSFOLGERUNG	147
6	Zusammenfassung	149
7	Summary	152
8	Literaturverzeichnis	155
9	Abkürzungsverzeichnis	188