

## 2 Schrifttum

### 2.1 Mykoplasmen allgemein

#### 2.1.1 Charakterisierung

Mykoplasmen sind die kleinsten und einfachsten, sich selbst replizierenden Prokaryonten. Während ihrer Entwicklung aus einer Gruppe der grampositiven Eubakterien, haben sie bedingt durch Anpassung an die parasitische Lebensweise verschiedene Zellstrukturen wie z. B. die Zellwand und bestimmte Zellfunktionen aufgegeben. Nach RAZIN (1992 b) und WOESE (1987) stehen sie daher dem Konzept von „Minimumzellen“ am Nächsten. Mit einer Plasmamembran, Ribosomen und einem doppelsträngigen Genom besitzen sie damit ein minimales Set an Zellorganellen für Vermehrung und Wachstum (RAZIN 1981). Die trilaminare Plasmamembran, bzw. das Fehlen einer Zellwand, bedingt die pleomorphe Zellgestalt, die von kokkoiden, ovoiden oder birnenförmigen Formen mit einem Durchmesser von 300 bis 850 nm bis zu verzweigten oder unverzweigten Filamenten mit einem Durchmesser von 200 bis 300 nm und einer Länge von bis zu 150 µm reicht (BOATMAN, 1979; RAZIN, 1981; RAZIN und FREUNDT, 1984). Das Fehlen der Zellwand ermöglicht es den Mykoplasmen, Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm zu passieren (MASOVER und HAYFLICK, 1985) und erklärt die Resistenz gegenüber zellwandangreifender Antibiotika. Für einige Spezies wurden terminale Strukturen zur Anheftung an eukaryotische Zellen, sowie Kapseln und extrazelluläre „fuzzy layers“ beschrieben (KIRCHHOFF et al., 1984; RAZIN, 1978). Die meisten Mykoplasmen sind unbeweglich, jedoch zeigten Untersuchungen, dass einige Vertreter verschiedener Familien zur Fortbewegung durch Gleiten (*Mycoplasmataceae*) oder durch Rotation und Undulation (*Spiroplasmataceae*) fähig sind (KIRCHHOFF et al., 1984, 1987, 1992). Die Replikation des Genoms erfolgt semikonservativ und geht zumeist von einigen membranassoziierten Startpunkten aus (RAZIN, 1978). Es ist nur eine DNS- Polymerase, die keine 3' - 5' Exonukleaseaktivität aufweist, vorhanden (RAZIN, 1978, 1985). Die Vermehrung der Mykoplasmen erfolgt über Zweiteilung, wobei die Teilung des Zytoplasmas oft hinter der Replikation des Genoms zurückbleibt. So entstehen multinukleare Filamente, die schließlich zu kokkoiden Zellen zerfallen (RAZIN, 1981). Der Proteinbiosyntheseapparat der Mykoplasmen entspricht dem anderer Prokaryonten (RAZIN, 1983). Die Energiegewinnung

erfolgt bei einem Teil der Mykoplasmen durch den Abbau von Glucose oder anderer Kohlenhydrate über die Glycolyse (Embden - Meyerhof - Weg), andere hydrolysieren Arginin oder besitzen beide Fähigkeiten. Einige Mykoplasmen gewinnen ihre Energie über die Oxidation von Laktat, Pyruvat oder 2 - Oxybutyrat (MILES, 1992; RAZIN, 1978). Wichtige energieliefernde Systeme, wie z.B. der Tricarbonsäurezyklus, fehlen bei Mykoplasmen (MILES, 1992; RAZIN, 1992 b). Alle bisher untersuchten Mykoplasmen besitzen eine verkürzte Flavin-terminierte Elektronentransportkette, die keine Quinone oder Cytochrome besitzt (RAZIN und FREUNDT, 1984; TULLY et al., 1993).

Die Mykoplasmen sind Kommensalen und Parasiten des Menschen und der Tiere (RAZIN und FREUNDT, 1984; TULLY et al., 1993).

Sie besiedeln vor allem die Schleimhautoberflächen des Respirationstraktes und Urogenitaltraktes, werden aber auch in anderen Organen gefunden (Augen, Milchdrüse, Gelenkflüssigkeit, Verdauungskanal) (RAZIN, 1981). Einige Spezies scheinen eine Wirts- und Gewebsspezifität aufzuweisen (z.B. *M. anseris*), andere wie z.B. MS und MI, wurden dagegen in verschiedenen Wirten nachgewiesen (RAZIN, 1992 a; RAZIN und FREUNDT, 1984; POVEDA et al., 1990 b; BENCINA et al., 1987 b, 1988 b; AMIN, 1977; BOZEMAN et al., 1984). Einige Mykoplasmenpezies können intrazellulär vorliegen (z.B. MG, *M. vulturii*) (OAKS et al., 2004 a; RAZIN, 1992 b). Wieder andere Spezies sind pathogen und verursachen eine Reihe von zur Chronizität tendierenden Krankheiten (RAZIN, 1981), die in der Regel von einer Vielzahl von Wirts- und Umweltfaktoren beeinflusst werden (SIMECKA et al., 1992). In der landwirtschaftlichen Tierhaltung spielen die durch Mykoplasmen hervorgerufenen Infektionskrankheiten meist eine große wirtschaftliche Rolle (SIMECKA et al., 1992).

### 2.1.2 Taxonomie

Die ursprüngliche Klassifikation der Mykoplasmen beruhte auf der Einteilung von EDWARD und FREUND (1956), die eine Ordnung der *Mycoplasmatales*, eine Familie der *Mycoplasmataceae*, sowie die Gattung *Mycoplasma* beinhaltete. Neue Familien und Gattungen erweiterten dieses taxonomische System, so dass eine eigene Klasse, nämlich die der *Mollicutes* (*molle* = weich, *cutes* = Haut), benannt wurde (EDWARD et al., 1967). Von den anderen Prokaryonten unterscheiden sich die *Mollicutes* aufgrund ihrer

charakteristischen Morphologie, Größe, osmotischen Labilität und Koloniemorphologie (MASOVER und HAYFLICK, 1985; RAZIN und FREUNDT, 1984). Sowohl neue molekularbiologische und physiologische Erkenntnisse, als auch auf Sequenzvergleichen der ribosomalen RNS basierenden phylogenetischen Studien führten zu einer Revision des taxonomischen Systems (TULLY et al., 1993; WEISBURG et al., 1989) (Tab. 1). Ein gemischtes System wurde eingeführt, das, wie bisher auch, sowohl phänotypische Eigenschaften als auch phylogenetische Verwandtschaften berücksichtigt. Entsprechend dieser Einteilung wird die Klasse *Mollicutes* in vier verschiedene Ordnungen eingeteilt. Die Ordnung I *Mycoplasmatales* beinhaltet die Familie der *Mycoplasmataceae*, welche in zwei Gattungen, die bei Vertebraten vorkommen und sterolabhängig sind, zusammengefasst werden. Gattung I, *Mycoplasma* mit über 120 Spezies, sowie Gattung II, *Ureaplasma*, die aufgrund ihrer Fähigkeit Urease zu hydrolysieren, von dem Genus *Mycoplasma* differenziert werden.

Ergänzend dazu wird für die Insekten - und Pflanzenparasiten eine Ordnung II, *Entomoplasmatales*, aufgeführt. Sie wird wiederum in zwei Familien, die der nicht helikalen *Entomoplasmataceae* und der helikalen *Spiroplasmataceae* eingeteilt. In der Familie der *Entomoplasmataceae* unterscheidet man weiterhin die Gattung der sterolabhängigen *Entomoplasma* und die Gattung der sterolunabhängigen *Mesoplasma*. Die Familie der *Spiroplasmataceae* beinhaltet nur die Gattung der Spiroplasma. In Ordnung III sind die *Acholeplasmatales* aufgeführt. Diese Ordnung beinhaltet die Familie *Acholeplasmataceae* mit der Gattung *Acholeplasma*. Sie sind sterolunabhängig und bei Wirbeltieren, Insekten und Pflanzen anzutreffen (RAZIN et al., 1998). Die Ordnung IV, die der *Anaeroplasmatales* beinhaltet die Familie *Anaeroplasmataceae*. Diese zeichnen sich durch eine strikte anaerobe Lebensweise aus und kommen im Pansen von Rind und Schaf vor. Die Familie *Anaeroplasmataceae* wird in die sterolabhängige Gattung *Anaeroplasma* und die sterolunabhängige Gattung *Asteroplasma* unterschieden (FREUNDT et al., 1984; ROBINSON und FREUNDT, 1987). Heute wird aufgrund von vergleichenden Untersuchungen der rRNS (WEISBURG et al., 1989; WOESE et al., 1980) angenommen, dass sich die *Mollicutes* durch eine degenerative Entwicklung aus der Gruppe der grampositiven Bakterien mit niedrigem G + C - Gehalt, der *Bacillus- Lactobacillus- Streptococcus-* Subgruppe, abgespalten haben. Innerhalb dieser Gruppe weisen sie eine besondere Verwandtschaft mit *Clostridium innocuum* und *Clostridium ramnosum* auf (RAZIN, 1992 a; WOESE, 1987). Die Entwicklung der *Mollicutes* verläuft nach WOESE et al. (1985) bedingt durch eine hohe Mutationsrate sehr schnell, was eine Erklärung für die große genotypische und phänotypische Vielfalt innerhalb der Klasse sein könnte. Die während der

Entwicklung zunehmende Reduktion der genetischen Information, wurde wahrscheinlich durch die parasitische Lebensweise bedingt (MUTO, 1987; RAZIN, 1992 b). Die früheren Serotypen- Benennungen der *Mollicutes*- Stämme (DIERKS et al., 1967; YAMAMOTO und ADLER, 1958; ADLER et al., 1958; YODER und HOFSTAD, 1964) wurden durch eine Spezies- Namengebung ersetzt.

**Tab. 1:**

Taxonomie und Charakteristika der Mitglieder der Klasse *Mollicutes* (TULLY et al., 1993)

Klassifikation	Cholesterolbedarf	Vorkommen	Besondere Merkmale	Anzahl der bekannten Spezies
Ordnung I <i>Mycoplasmales</i> Familie I <i>Mycoplasmataceae</i>				
Gattung I <i>Mycoplasma</i>	+	Vertebrat	opt. Temp. 37 °C	121
Gattung II <i>Ureaplasma</i>	+	Vertebrat	Harnstoffhydrolyse	7
Ordnung II <i>Entomoplasmatales</i> Familie I <i>Entomoplasmataceae</i>				
Gattung I <i>Entomoplasma</i>	+	Insekt/Pflanze	opt. Temp. 30 °C	6
Gattung II <i>Mesoplasma</i>	-	Insekt/Pflanze	opt. Temp. 30 °C, Wachstum in serumfreien Medium mit 0,04% Tween 80	12
Familie II <i>Spiroplasmataceae</i>				
Gattung I <i>Spiroplasma</i>	+	Insekt/Pflanze	helikale Filamente, opt. Wachstum 30 -37 °C	37
Ordnung III <i>Acholeplasmatales</i> Familie I <i>Acholeplasmataceae</i>				
Gattung I <i>Acholeplasma</i>	-	Wirbeltier/ Pflanze/Insekt	opt. Temp. 30- 37 °C	18
Ordnung IV <i>Anaeroplasmatales</i> Familie I <i>Anaeroplasmataceae</i>				
Gattung I <i>Anaeroplasma</i>	+	Pansen Rind/Schaf	anaerob, O <sub>2</sub> -empfindlich	4
Gattung II <i>Asteroplasma</i>	-	Pansen Rind/Schaf	anaerob, O <sub>2</sub> -empfindlich	1

### 2.1.3 Tenazität

Mykoplasmen besitzen eine geringe Tenazität in der natürlichen Umwelt und sind gegenüber den gebräuchlichen Desinfektionsmitteln empfindlich. Sonnenstrahlen töten Mykoplasmen innerhalb von 20 - 30 Minuten ab (STIPKOVITS et al., 1992 a).

Gegenüber Penicillin und geringen Konzentrationen (1:4000) von Thalliumacetat zeigen Mykoplasmen allgemein eine Resistenz.

Untersuchungen von *M. gallisepticum* (MG) zeigten, dass dieser Erreger außerhalb des Wirtes selten länger als einige Tage überlebensfähig ist. Bei Temperaturen von 20 °C blieb MG in Hühnerkot und in Baumwollkleidung bis zu drei Tagen lebensfähig, bei 37 °C jedoch nur bis zu einem Tag. Im Eigelb zeigte sich der Erreger bei 37 °C nach 18 bis 20 Wochen bzw. bei 20 °C nach 6 bis 7 Wochen noch als kultivierbar (CHANDIRAMANI et al., 1966). Nach CHRISTENSEN et al. (1994) ist MG in der menschlichen Nase für 24 Stunden, auf Stroh, Baumwolle, Gummi für 2 Tage, auf menschlichen Haaren für 3 Tage und auf Federn für 2 - 4 Tage überlebensfähig. Nach YODER und HOFSTAD (1964) beträgt die Lebensfähigkeit von Kulturen in Bouillon bei Lagerung von -30 °C zwei bis vier Jahre. Lyophilisierte Bouillon- Kulturen konnten bei Lagerung von 4 °C nach 7 Jahren noch angezüchtet werden. Bei einer Lagerung dieser Lyophilisate bei -60 °C waren diese noch nach 20 Jahren Lagerzeit lebensfähig. Lyophilisierte Bouillon- Kulturen von MG, MS und MM konnten bei Routineuntersuchungen nach zehn bis fünfzehn Jahren noch subkultiviert werden (LEY, 2003; LEY und YODER, 1997).

*Mycoplasma synoviae* (MS) ist labil bei einem pH- Wert unter 6,8, sowie sensitiv gegenüber Temperaturen über 39 °C. Bei Raumtemperatur überlebt der Erreger bis zu drei Tagen auf Federn und bis zu 12 Stunden in der menschlichen Nase. Auf den meisten anderen Materialien ist die Tenazität geringer als einen Tag (CHRISTENSEN et al., 1994). In Dotterflüssigkeit ist MS bei einer Lagerung von -63 °C über 7 Jahre, bei -20 °C über 2 Jahre lebensfähig. Kulturflüssigkeit bei -70 °C und lyophilisierte Kulturen bei 4 °C können noch nach mehreren Jahren erfolgreich angezüchtet werden (KLEVEN, 1997 a).

Nach den Untersuchungen von CHRISTENSEN et al. (1994) scheint *Mycoplasma iowae* (MI) widerstandsfähiger als MG oder MS zu sein. Hier blieb der Erreger unter experimentellen Bedingungen auf Federn 5 Tage, auf menschlichem Haar und einigen weiteren Materialien sogar 6 Tage lebensfähig.

In Kultur mit einem pH- Wert von 8,4 bis 8,7 ist *Mycoplasma meleagridis* (MM) bis zu einem Gehalt von 10<sup>7</sup> Koloniebildenden Einheiten/ml (KbE/ml) ca. 25 bis 30 Tage überlebensfähig (CURTIS und THORNTON, 1973). Auf frisch beimpften Agarplatten überlebt MM bei

Raumtemperatur bis zu 6 Tagen (IBRAHIM und YAMAMOTO, 1977), ohne Nährmedium beträgt die Überlebenszeit ca. 6 Stunden (BEARD und ANDERSON, 1967). In Kultur ist MM gefroren bei -30 °C ca. 2 Jahre (YODER und HOFSTAD, 1964) haltbar. FRERRIER et al. (1982) konnten bei der Kryokonservierung mit einem anschließenden Auftauen von Putensperma keinerlei maßgebende Abnahme des Erregers feststellen.

## 2.2 Aviäre Mykoplasmen

### 2.2.1 Pathogene aviäre Mykoplasmen

### 2.2.2 - *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis* -

Infektionen mit ***Mycoplasma gallisepticum*** (MG) führen zu der sog. Chronic Respiratory Disease der Hühner (CRD), bzw. Infektiöse Sinusitis der Puten, die durch rasselnde Atemgeräusche, Husten, Nasenausfluss, Konjunktivitis, mit, bei Puten oft zusätzlich auftretender Entzündung des Infraorbitalsinus, gekennzeichnet ist (LEY, 2003).

Eine ***Mycoplasma synoviae*** (MS) Infektion verläuft meist als eine subklinische Infektion der oberen Luftwege. Bei systemischer Infektion kommt es zu einer exudativen Synovitis, Tendovaginitis oder Entzündung der Bursa Sternalis, was dieser Erkrankung die Bezeichnung Infektiöse Synovitis gegeben hat (KLEVEN, 2003 b).

MG und MS sind sowohl pathogenetisch als auch wirtschaftlich einer der bedeutendsten Erreger für das Wirtschaftsgeflügel (YAMAMOTO, 1996). Die dadurch hervorgerufene Aerosacculitis bei Hühnern und Puten ist einer der häufigsten Gründe für einen Schlachtkörperverwurf sowie der Qualitätsminderung der Schlachtkörper (KING et al., 1973). Die zusätzlich verminderte Futtermittelverwertung mit folgender reduzierter Gewichtszunahme bei der Mast, sowie die Abnahme der Eiproduktion verbunden mit erheblichen Kosten für aufwendige Prophylaxe- und Bekämpfungsmaßnahmen, machen die Mykoplasmosen zu einer der kostspieligsten Erkrankungen, mit denen die Geflügelwirtschaft weltweit konfrontiert wird (HAFEZ et al., 2004, 2006; LEY, 2003).

Eine *Mycoplasma iowae* (MI) Infektion tritt bei Puten auf, wobei es bei murenen Tieren zu keinen klinischen Symptomen kommt, jedoch führt die Infektion bei Elterntierherden zu einer Abnahme der Schlupfrate um 2-5%.

*Mycoplasma meleagridis* (MM) ruft die so genannte Infektiöse Aerosacculitis der Puten hervor. Des Weiteren verursacht MM eine verminderte Schlupfrate von 5 - 6% (EDSON et al., 1979), Skelettdeformationen sowie Wachstumsdepression (CHIN et al., 2003). Wegen des massiven Schlachtkörperverwurfes aufgrund der Aerosacculitis (ANDERSON et al., 1968; KUMAR et al., 1966) sowie den Kosten für Behandlung und Kontrolle dieser Erkrankung (CARPENTER et al., 1981 a), stellt die MM-Infektion eine wirtschaftlich bedeutende Infektionserkrankung für die Putenindustrie dar.

### 2.2.2.1 Übertragung

#### ***Mycoplasma gallisepticum:***

Eine horizontale Übertragung sowohl durch direkten Kontakt, als auch durch indirekten Kontakt über belebte und unbelebte Vektoren (Wildvögel, Staub - und Tröpfcheninfektion, Transportbehälter, Fahrzeuge, Eiabfälle, Federteile und Betreuungspersonal) beschreiben LEY und YODER (1997). Dabei dienen der obere Respirationstrakt, sowie die Konjunktiven als Eintrittspforten für eine Infektion (BRADBURY und LEVISOHN, 1996).

Eine vertikale Übertragung (in ovo, transovariell) ist sowohl bei Hühnern als auch bei Puten beschrieben worden (GLISSON und KLEVEN, 1984 a und 1985; LIN und KLEVEN, 1982 b; ORTIZ et al., 1995).

#### ***Mycoplasma synoviae:***

Nach OLSON und KERR (1967) ist die Übertragung von MS vergleichbar mit der von MG, mit der Ausnahme, dass die Ausbreitung schneller verläuft. Es treten aber auch Stämme mit langsamer Ausbreitungsrate auf (WEINACK et al., 1983). Eine horizontale Infektion erfolgt über den Respirationstrakt und infiziert gewöhnlich 100% der Tiere des Bestandes. Die Tiere sind lebenslang Träger des Erregers. Vertikale Infektionen treten bei Hühnern und Puten auf, es wurde jedoch von Beständen berichtet, die von infizierten Elterntieren stammten und die frei von einer Infektion blieben (CARNAGHAN, 1961; HAFEZ et al., 2006).

***Mycoplasma iowae:***

Eine vertikale Übertragung von MI über das Ei bei Puten ist möglich (DIERKS et al., 1967; FABRICANT, 1970; GRANT, 1987; McCLENAGHAN et al., 1981; YODER und HOFSTAD, 1962, 1964). BAXTER-JONES (1991) berichtet, dass die Infektion der Eier die Folge einer Eileiterinfektion ist, dass nach JORDAN (1990) der Hauptinfektionsort bei adulten Putenhennen darstellt. Daneben kann es zu einer horizontalen Übertragung innerhalb der Brüterei kommen, da MI eine Vorliebe für den Digestionsapparat des Embryos aufweist und deshalb im Mekonium zu finden ist (MIRSALIMI et al., 1989). Auch wird eine venerische Infektion mit dem Erreger beschrieben, wobei neben dem infizierten Puter wahrscheinlich auch die vaginale Kontamination während der artifiziellen Insemination durch kontaminiertes Spermia in der Übertragung eine wichtige Rolle spielt (BAXTER-JONES, 1993; KEMPF et al., 1989; SHAH-MAJID und ROSENDAL, 1986).

***Mycoplasma meleagridis:***

Die Hauptübertragung von MM erfolgt über das Ei. Die Infektion des weiblichen Reproduktionstraktes findet als endogene Infektion während der Embryonalentwicklung in Folge einer aufsteigenden Infektion der Kloake oder Bursa fabricii (MATZER und YAMAMOTO, 1970), sowie durch Insemination von Hennen mit MM- infiziertem Spermia statt (KUMAR und POMEROY, 1969; MOHAMED und BOHL, 1967; MOHAMED et al., 1966; YAMAMOTO et al., 1966 b; YAMAMOTO und ORTMAYER, 1967 a). Wird der Erreger nur im oberen Respirationstrakt (Sinus) nachgewiesen, kommt es zu keiner Übertragung auf das Ei (KUMAR und POMEROY, 1969; MOHAMED und BOHL, 1967; YAMAMOTO und ORTMAYER, 1967 a). Eine vertikale Infektion eines Hahnes kann bis zum Erreichen der sexuellen Maturität persistieren, so dass das Spermia dann MM enthalten kann (YAMAMOTO und ORTMAYER 1967, YAMAMOTO et al. 1970). In natürlich infizierten männlichen Putenherden konnte MM zu 13-32% aus dem Phallus, sowie Spermia isoliert werden (CHIN et al., 2003).

Infektionen aufgrund einer aerogenen Übertragung wurden ebenfalls beschrieben (KUMAR und POMEROY, 1969; GHAZIKHANIAN et al., 1980; YAMAMOTO und ORTMAYER, 1967), wobei pathologische Veränderungen auf den Respirationstrakt beschränkt blieben.

Der indirekte Übertragungsweg durch Sexen, vaginale Palpation, Insemination, kontaminierte Hände, Kleidung und Ausrüstung ist ebenfalls möglich (GHAZIKHANIAN et al., 1980; MOHAMED und BOHL, 1967).



### 2.2.2.2 Wirtsspezifität

*M. gallisepticum* (MG) Infektionen kommen bei Hühnern und Puten vor. Natürlich auftretende Infektionen sind bei Fasan, Steinhuhn, Pfau und Wachtel (BENCINA et al., 2003; COOKSON und SHIVAPRASAD, 1994; GERLACH, 1978; McMARTIN et al., 1987; REECE et al., 1986 a) beschrieben. Isoliert wurde MG aus Enten und Gänsen (BENCINA et al., 1988 a, 1988 b; BUNTZ et al., 1986; IBRAHIM et al., 2000; JORDAN und AMIN, 1980; LIN et al., 1995; LO et al., 1994). Des Weiteren konnte MG aus Proben von Amazonen (BOZEMAN et al., 1984), Großflamingos, Pelikanen (EL SHATER, 1996), Tauben (BENCINA et al., 1987 b) und Sperlingen (STIPKOVITS 1992 b) isoliert werden. MG wurde ebenfalls bei Hausgimpeln (*Carpodacus mexicanus*), Goldzeisig (*Carduelis tristis*) und einem Purpurgimpel (*Carpodacus purpureus*) (DHONDT et al., 1998; FISCHER et al., 1997; HARTUP et al., 1998, 2000, 2001; HOCHACHKA und DHONDT, 2000; LEY et al., 1996; LUTTRELL et al., 1996, 1998, 2001; MIKAELIAN et al., 2001; ROBERTS et al., 2001 a und b; SYDENSTRICKER et al., 2006), die Schwellungen des Sinus infraorbitalis und Konjunktividen aufwiesen, isoliert. Ein einzelner Nachweis von MG ist bei einem Abendkernbeißer (*Coccothraustes vespertinus*) und einem Hakengimpel (*Pinicola enucleator*) (LEY et al., 1997; MIKAELIAN et al., 2001) gelungen. POVEDA et al. (1990 a und b) isolierten MG bei einem Wanderfalken (*Falco peregrinus*).

#### ***Mycoplasma synoviae*:**

Hühner, Puten und Perlhühner (PASUCCI et al., 1976) zählen zu den natürlichen Wirten von MS. Nach FABRICANT (1969) sind Huhn und Pute gegenüber MS - Infektionen am empfindlichsten. Bei Enten (BENCINA et al., 1988 a; TIONG, 1990), Gänsen (BENCINA et al., 1988 b), Tauben (BENCINA et al., 1987 b; REECE et al., 1986 b), Japanischer Wachtel (*Coturnix japonica*) (BENCINA et al., 1987 b) Rothuhn (*Alectoris rufa*) (POVEDA et al., 1990 b) und Dreizehenmöwe (*Rissa tridactyla*) (KEMPF et al., 2000) die respiratorische Symptome aufwiesen, konnten ebenfalls natürliche Infektionen nachgewiesen werden. Eine künstliche Infektion gelang bei Fasan und Gans (SEVOIAN et al., 1958 a und b), Wellensittich (BOZEMAN et al., 1984) und Ente (YAMADA und MATUSO, 1983) wobei bei den untersuchten Enten die Infektion subklinisch ohne wahrnehmbare Symptomatik verlief. Bei Wildvögeln konnte MS bei einem Haussperling (*Passer domesticus*) in Spanien (POVEDA et al., 1990 b) isoliert werden und KLEVEN und FLETCHER (1983) berichten über die künstliche Infektion von Sperlingen (*Passer domesticus*). ANDERSON et al. (1956)

berichten, dass sich nach experimenteller Inokulation, weder Hase, noch Ratte, Meerschweinchen, Mäuse, Schweine oder Schafe als empfänglich für MS zeigten.

***Mycoplasma iowae:***

Der natürliche Hauptwirt von MI ist die Pute, bei der die Infektion weit verbreitet ist. MI konnte jedoch in vielen Ländern auch bei Hühnern mit Tenosynovitis und Arthritis isoliert werden (BENCINA et al., 1987 a und b; BRADBURY et al., 1990; SHIMIZU et al., 1979; YODER und HOFSTAD, 1962). AMIN (1977) isolierte MI bei einem Star (*Sturnus vulgaris*), Kormoran (*Phalacrocorax carbo*), Reiher (*Ardea cinerea*), Waldtaube (*Columba palumbus*), Eiderente (*Somateria mollissima*), Rothalsbühl (*Rubigula dispar*) und Rotohr-Yuhina (*Yuhina castaniceps*). BOZEMAN et al. (1984) berichten über den Nachweis von MI bei einer Gelbnackenamazone (*Amazona ochrocephala auropalliata*). LIN et al. (1995) konnten MI bei Gänsen nachweisen. 1982 wurde in Frankreich von VIGNAULT et al. (1982) ein Organismus aus einem Apfelsamen isoliert, den GRAU et al. (1991) als MI identifizieren konnten.

***Mycoplasma meleagridis:***

MM gilt als ein Pathogen der Puten und tritt in jedem Alter auf. Künstliche Infektionen von Hühnerembryonen wurden von YAMAMOTO und ORTMAYER (1966 a) sowie YODER (1970) beschrieben. Adulte Hühner scheinen jedoch nach ADLER (1958) und ADLER et al. (1958 b) sowie YAMAMOTO und BIGLAND (1964) unempfindlich für eine MM - Infektion zu sein. Eine MM- Infektion wurde bei Japanischen Wachteln, Tauben, Fasanen und Pfauen nachgewiesen (SIMECKA et al., 1992; STIPKOVITS, 1992 b). LIERZ (1999) und LIERZ et al. (2000, 2002) konnten MM bei Bussarden (*Buteo buteo*), Schwarzmilanen (*Milvus migrans*), Turmfalken (*Falco tinnunculus*), Wanderfalken (*Falco peregrinus*) und Ger- Saker-Hybridfalken isolieren und mittels Immuno- Binding- Assay identifizieren.

**2.2.2.3 Pathogenität und Virulenzfaktoren**

Hinsichtlich der Pathogenität gibt es innerhalb der Mykoplasmenstämme Unterschiede.

So sind atypische oder variante Stämme von MG bekannt (AVAKIAN et al., 1991; BROWN et al., 1997; CZIFRA et al., 1995; LEVISOHN et al., 1995; MAY et al., 1994; PANANGALA et al., 1992; ROSENGARTEN und YOGEV, 1996; YODER, 1986). Diese Variation der Pathogenität ist dabei nach LEY (2003) abhängig von der genotypischen und

phänotypischen Erregereigenschaft, Art der Ausbreitung, Anzahl der durchgeführten Passagen zur Erhaltung des Stammes, sowie Infektionsweg und -dosis. So galt infiziertes Dottermaterial infektiöser, als in Bouillon passagierte Mykoplasmen (LEY, 2003). MG-Varianten mit geringer Pathogenität, geringer Übertragbarkeit sowie geringer Immunogenität sind sowohl bei Hühnern (YODER 1986) als auch bei Puten (DINGFELDER et al., 1991, LEY et al., 1989) beschrieben worden. Im Zusammenhang damit wurden zwei Genfamilien, die für major Oberflächenantigene kodieren nachgewiesen, die diese pathogenen, antigenen und immunabwehrumgehenden Eigenschaften modulieren. pMGA vom Stamm S6 kodiert abweichende Kopien des major Oberflächenantigens Hämagglutinin von 67 kDa (p67) (BASEGGIO et al., 1996; GLEW et al., 1995; JAN et al., 1996; MARKHAM et al., 1998) und beinhaltet einen Mechanismus für eine schnelle und reversible Umschaltung der Expression von Proteinen (antigenetic switching) als Reaktion auf Antikörper oder andere Umwelteinflüsse (GLEW et al., 1998, 2000; MARKHAM et al., 1998). PvpA ist ein größenvariables, integriertes Membranprotein, das eine hohe Variation hinsichtlich seiner Expression aufweist, was die Komplexität der antigenetischen Variation verstärkt (YOGEV et al., 1994). In vivo Studien von LEVISON et al. (1995) weisen darauf hin, dass die Immunmodulation eine Schlüsselrolle in der Erzeugung dieser Oberflächenvielfalt spielt.

Ebenfalls eine hohe Variabilität hinsichtlich der Pathogenität verschiedener MS Stämme stellten LOCKABY et al. (1998) und MORROW et al. (1997) fest und auch bei MM berichten GHAZIKHANIAN und YAMAMOTO (1974 a und b) über das Vorkommen von sowohl pathogenen als auch nicht pathogenen MM- Stämmen. ZHAO et al. (1988) konnten bei diesen MM-Stämmen unterschiedliche Zellproteinprofile nachweisen, die nach EL-EBEEDY et al. (1982) eine Erklärung für die unterschiedlichen klinischen Manifestationen sind.

Auch bei MI kommt es bei einigen Feldstämmen zu einer ausgeprägteren Letalität für Embryonen als bei Anderen (KEMPF et al., 1994; RHOADES, 1981; YODER und HOFSTAD, 1962). Die Gründe hierfür sind noch unklar, werden aber in der unterschiedlichen Virulenz der verschiedenen Stämme, den Inkubationsverhältnissen, sowie der Empfänglichkeit der verschiedenen Putenlinien für eine Infektion vermutet. Jedoch sind Virulenzfaktoren bei MI noch wenig erforscht (BRADBURY und KLEVEN, 2003).

Weiterhin werden Adhärenzmechanismen beschrieben, welche bei MG als integrierte Plasmaproteine vorliegen und in der Lage sind Rezeptorstellen auf der Wirtszelloberfläche zu erreichen. Somit ermöglichen sie eine Anheftung, Kolonisation, Infektion, sowie die Pathogenese (DALLO und BASEMAN, 1990; LEVISOHN, 1984; RAZIN und JAKOBS, 1992) der Mykoplasmen. Hierbei werden für MG immunodominante Adhäsine bzw. Hämagglutinine beschrieben, die als Lipoproteine oder Proteine mit einem Molekulargewicht von 60 - 75 kDa

vorliegen (AVAKIAN und LEY, 1993 a, 1993 b; BARBOUR et al., 1989; BRADLEY et al., 1988; FORSYTH et al., 1992; KHEYAR et al., 1995; MARKHAM et al., 1992).

Über Hämagglutination und Hämadsorption, die Anhaftung an die Wirtszelle sowie die Ciliostase bei MS berichtet KLEVEN (2003 b) und eine Hämagglutination bei einigen MM-Isolaten wurde von RHOADES (1969), THORNTON et al. (1975) sowie YAMAMOTO et al. (1965a) beschrieben.

Jedoch stellt nach YAMAMOTO et al. (1965 a) die Hämagglutination bei MM kein Virulenzfaktor dar, da es hochpathogene Stämme gibt, die keine Hämagglutinationsaktivität aufweisen.

Wirksame Toxine konnten mit Mykoplasmen nicht in Verbindung gebracht werden (RAZIN et al., 1998), jedoch beschreiben CURTIS und THORNTON (1973) ein hitzestabiles Lipid- oder Polysaccharid- Toxin, das bei intravenöser Applikation zu einer Erhöhung der Ceruloplasminaktivität bei Hühnern führte. In der Literatur wird die Schädigung der Wirtszellen sowohl durch den engen Kontakt, der zu einem Entzug von Nährstoffen führt, als auch durch die Alteration von Wirtszellbestandteilen durch Mykoplasmenenzyme und die Produktion von toxischen Stoffwechselprodukten ( $H_2O_2$ ,  $NH_3$ ) erklärt (CASSELL et al., 1978; MILES, 1992; RAZIN, 1978; SIMECKA et al., 1992; TRYON und BASEMAN, 1992).

#### **2.2.2.4 Klinische Erscheinungen und Pathologie**

##### ***Mycoplasma gallisepticum:***

Typische Anzeichen einer MG- Infektion sind Sinusitis, Trachealgeräusche, Nasenausfluss und Husten sowie verminderte Futteraufnahme und Gewichtsverlust. In Legehennenhaltung kommt es zu einer Abnahme der Legeleistung, die auf einem geringen Niveau erhalten bleibt ((MOHAMMED et al., 1987))

Die Tiere können eine Schwellung der Gesichtshaut und Augenlider, erhöhten Tränenfluss und Blutstauung der Konjunktivalgefäße aufweisen (NUNOYA et al., 1995; LEY et al., 1996, 1997; McMARTIN et al., 1996; MIKAELIAN et al., 2001). In schweren Fällen kann dies dazu führen, dass die Tiere nicht mehr in der Lage sind Wasser- und Futterplätze zu finden. Die Tiere zeigen Mattigkeit, gestäubtes Gefieder, Bewegungsunlust und Schnabelatmung. Die Futter- und Wasseraufnahme sind vermindert (GERLACH, 1985; HAFEZ et al. 1994; LEY und YODER, 1997).

Der Mykoplasmenstamm, der Immunstatus, das Alter der Tiere, sowie Faktoren wie Management, Stress, Luftumsatzrate, Besatzdichte und verkomplizierende Begleiterkrankungen sind von großer Bedeutung für den Krankheitsverlauf (YODER, 1991). Puten erscheinen anfälliger für eine MG- Infektion als Hühner und entwickeln im Allgemeinen schwerere klinische Erscheinungsformen.

In Broilerhaltungen kann die Mortalität in kalten Monaten bis zu 30% betragen. In Putenhaltungen sind bei einer MG- Infektion fast alle Tiere des Bestandes betroffen, auch wenn bei einigen Tieren keine Sinusitis zu erkennen ist und die respiratorische Form vorherrscht (DINGFELDER et al., 1991). Eine Sinusschwellung mit Nasenausfluss kann bei 1% bis 70% des Bestandes auftreten (HAFEZ et al., 2004; LEY, 2003). Eine enzephalische Form der MG- Infektion bei 12 - 16 Wochen alten Puten mit Ophistonus und Torticollis ist beschrieben (CHIN et al., 1991 a).

Pathologisch tritt bei einer MG- Infektion primär ein katarrhalisches Exsudat der Nasen- und Nasennebenhöhlen, der Trachea, Bronchien und der Luftsäcke auf. Eine Sinusitis kommt in erster Linie bei Puten vor, ist aber auch bei Hühnern und anderen aviären Wirten beobachtet worden. Bei längerem Krankheitsverlauf finden sich ausgeprägte Luftsack- und Lungenentzündungen, bei denen die Luftsäcke mit käsigem Exsudat gefüllt sein können (LEY 2003). Konjunktivitiden wurden neben Legehühnern (NUNOYA et al., 1995) ebenfalls bei Hausgimpeln (*Carpodacus mexicanus*) (LEY et al., 1996, 1997) und weiteren Singvögeln wie Abendkernbeißer (*Coccothraustes vespertinus*) und Hakengimpel (*Pinicola enucleator*) (MIKAELIAN et al., 2001), sowie einem Chukarhuhn (*Alectoris graeca*) (McMARTIN et al., 1996) festgestellt.

Bei einer vertikalen Übertragung (in ovo, transovariell), die bei Hühnern als auch bei Puten beschrieben ist, kommt es zu einer Abnahme der Eiproduktion aufgrund einer Salpingitis infolge von einer Infektion des Oviduktes (DOMERMUTH et al., 1967, NUNOYA et al., 1997). Fälle mit enzephaler MG- Infektion die durch Ophistonus, Tremor und Torticollis beschrieben wurden, wiesen eine schwere Encephalitis, fibrinöse Vasculitis, fokale Parenchymnekrosen sowie Meningitis auf (CHIN et al., 1991 a; CORDY und ADLER, 1965).

### ***Mycoplasma synoviae:***

Anzeichen einer MS- Infektion sind ein blasser Kamm, Lahmheit und vermindertes Wachstum. Im weiteren Verlauf zeigen die Tiere gestäubtes Gefieder und eine Verkleinerung des Kammes, in einigen Fällen eine blau- rot Färbung. Schwellungen der Gelenke sowie Entzündungen der Bursa Sternalis treten auf. Es kommt zu Depression, Dehydratation und Gewichtsverlust. Oft tritt eine grüne Verfärbung des Kots aufgrund Erythrozytenzerfalls mit

daraus resultierender Biliverdinbildung auf (GERLACH, 1985). Bei der typischen Verlaufsform mit Gelenksveränderungen spricht man von Infektiöser Synovitis (GERLACH, 1985). Bei akuter Verlaufsform kommt es nur sehr langsam zu einer Besserung und die Synovitis kann bis zum Aufstallungsende in dem Bestand verbleiben. Unter anderen Umständen kommt es nicht zu einer akuten Phase und es treten nur wenige chronisch infizierte Tiere in dem Bestand auf (KLEVEN, 2003 b).

Bei Legehennen kann ein geringer Rückgang der Eiproduktion und -qualität beobachtet werden (OPITZ, 1983; MOHAMMED et al., 1987). Puten zeigen die gleiche Klinik wie Hühner, wobei hier Lahmheiten im Vordergrund stehen.

Bei Puten kann zusätzlich eine Schwellung der Brustblase auftreten. Diese sind mit einem cremig- grauen Exsudat angefüllt. Auch werden Hepatho- und Splenomegalie, sowie geschwollene, blass marmorierte Nieren beobachtet. Im weiteren Verlauf der Infektion treten käsige Exsudate in den Sehnenscheiden und Gelenken auf. Bei der respiratorischen Form der MS- Infektion kommt es zu einer Aerosacculitis (KLEVEN, 1997 a). CHIN et al. (1991 b) beschreiben mikroskopisch sichtbare Veränderungen des Gehirns bei infizierten Mastputen, die Ataxie, Ophistotonus und Torticollis zeigten.

Die Morbidität beträgt bei Hühnern mit klinischer Synovitis zwischen 2% und 75%. Die respiratorische Form verläuft generell asymptomatisch, jedoch sind 90% bis 100% des Bestandes infiziert. Die Mortalität beträgt meist unter 1%, kann jedoch bis 10% ansteigen. Bei Puten beträgt die Morbidität zwischen 1% bis 20%, die Mortalität kann jedoch infolge von Tottrampeln und Kannibalismus beträchtlich sein (KLEVEN 2003 b).

### ***Mycoplasma iowae:***

Infizierte Puten- Elterntiere zeigen in der Regel keine Klinik, jedoch kommt es zu einer um 2- 5% verminderten Schlupfrate. Die infizierten Embryonen sterben dabei innerhalb der letzten 10 Bruttage, typischerweise zwischen Tag 18 und 24 ab (BAXTER- JONES, 1991; BRADBURY und KLEVEN, 2003). Oft erreicht die Schlupfrate nach ein bis zwei Monaten wieder normale Werte (KLEVEN, 1991).

Dabei zeigen sich bei den infizierten Embryonen Zwergenwuchs, Ödembildung, Hämorrhagien, Uratanschoppung in den Nieren sowie Federveränderungen (BAXTER- JONES, 1993). Bei experimentellen Infektionen von Putenembryonen traten Blutstauung, Verkrüppelungen und Ödeme im Kopfbereich sowie eine Anschoppung von Uraten auf (KEMPF et al., 1994; McCLENAGHAN et al., 1981).

TRAMPEL und GOLL (1994) berichten über Beinschwäche bei jungen Puten in Verbindung mit einer MI Infektion nach einer vertikalen Übertragung.

***Mycoplasma meleagridis*:**

Bei einer vertikalen Infektion mit MM kommt es zum Absterben der Embryonen zwischen dem 25. bis 28. Tag (CARPENTER et al., 1981 a; EDSON, 1980; YAMAMOTO und ORTMAYER, 1967), was zu einer Verminderung der Schlupfrate um 5% - 6% führen kann. Infektionen aufgrund einer aerogenen Übertragung sind ebenfalls beschrieben worden (KUMAR und POMEROY, 1969; GHAZIKHANIAN et al., 1980; YAMAMOTO und ORTMAYER, 1967). Abgesehen von einer hohen Rate an Aerosacculitis bei Puten, die durch Elterntiere infiziert wurden, werden respiratorische Symptome selten beobachtet. Bei lateraler, direkter oder indirekter Infektion von erwachsenen Tieren kommt es zwar zu einer hohen Durchseuchung, aber nur selten zu klinischen Erkrankungen. MM- Infektionen bei adulten Tieren treten in der Regel als stille Infektion auf.

Pathologische Veränderungen bleiben dabei in der Regel auf die Luftsäcke beschränkt, jedoch können Skelettdeformationen sowie Wachstumsdepression die Infektion begleiten (CHIN et al., 2003) und der Erreger kann in vielen Geweben wie Federn, Haut, Sinus, Trachea, Lungen, Bursa fabricii, Darm, Kloake und den Luftsäcken (BIGLAND, 1972; REIS und YAMAMOTO, 1971; RHOADES, 1971 b) sowie im Sprunggelenk (YAMAMOTO, 1991) nachwiesen werden. Luftsackveränderungen treten in Form einer Verdickung der Luftsackwand mit aufgelagertem, gelblichem Exsudat und gelegentlich auch frei im Lumen befindlichem, käsigem Material auf (ADLER et al., 1958). Mature Tiere zeigen eine Infektionsrate bis zu 100% (KUMAR und POMEROY, 1969; MOHAMED und BOHL, 1967). Bei 1 bis 6 Wochen alten, infizierten Tieren können bei 5% bis 10% Skelettdeformationen (TS-65 Syndrom) auftreten (WISE et al., 1973).

### **2.2.3 Andere aviäre Mykoplasmen**

***M. anatis*** wurde erstmals von ROBERTS (1964) aus Enten mit einer Sinusitis isoliert. Studien an wildlebenden Entenpopulationen zeigten, dass *M. anatis* auch bei klinisch unauffälligen Enten (*Anas platyrhynchos*, *A. rubripes*, *A. strepera*) weit verbreitet ist (GOLDBERG et al., 1995; SAMUEL et al., 1996). Dennoch wiesen SAMUEL et al. (1995) bei einer experimentellen Infektion von embryonierten Enteneiern einen reduzierten Schlupf, eine geringere Schlupfgröße der Entenküken sowie im weiteren Verlauf auch reduzierte Gewichtszunahmen nach. Hingegen war die Infektion von Eintagsentenküken mit dem

auftreten einer Aerosacculitis ohne klinische Symptomatik verbunden (AMIN und JORDAN, 1978). Ebenfalls isoliert wurde *M. anatis* aus Gänsen (GAILLARD-PERRIN et al., 1983) und Puten (El SAYED et al., 1981). MORISHITA et al. (1997) isolierten den Erreger aus Greifvögeln mit einer Sinusitis, wobei keine Angaben auf die Greifvogelspezies gemacht wurden.

***M. anseris*** wurde aus dem Phallus von Gänsen isoliert, die eine Entzündung der Kloake und des Phallus aufwiesen (STIPKOVITS et al., 1986) und von BRADBURY et al. (1988 a) beschrieben. STIPKOVITS und KEMPF (1996) berichten, dass eine Infektion bei Gänsen zur Ausbildung einer Aerosacculitis, Peritonitis sowie erhöhter Embryonalsterblichkeit führt.

Eine weitere, bei Gänsen (STIPKOVITS et al., 1986) isolierte, Mykoplasmenspezies ist ***M. cloacale***, die auch bei Puten (BRADBURY und FORREST, 1984 a), bei Wildenten (*Anas platyrhynchos*, *A. rubripes*, *Aythya valisineria*, *A. fuligula*) sowie Singvögeln (*Alauda arvensis*, *Sturnus vulgaris*) aus der Kloake isoliert werden konnte (BRADBURY und FORREST, 1984 a; BRADBURY et al., 1987; GOLDBERG et al., 1995). BRADBURY und FORREST (1984), berichten, dass *M. cloacale* eine Mortalität bei Putenembryonen hervorrufen kann. STIPKOVITS et al. (1986) isolierten neben *M. anseris* ebenfalls *M. cloacale* aus Gänsen, die eine Entzündung von Phallus und Kloake aufwiesen. Daneben konnten ebenfalls bei diesen Gänsen weitere Mykoplasmen isoliert werden, die als *Strain 1220* bezeichnet wurden. Dieser *Strain 1220* wird mit einem Rückgang der Eiproduktion, Infertilität, Entzündung des Phallus und der Kloake sowie verminderter Gewichtszunahme von Gänseküken in Verbindung gebracht (STIPKOVITS et al., 1984, 1986 a, 1987). Nach Untersuchungen von HINZ et al. (1994) bei Gänse- Elterntierherden, konnten *M. cloacale*, *M. anseris* und Mykoplasma **Strain 1220** zum Teil auch als Mischinfektion nachgewiesen werden, wobei die Herden weder klinische Krankheitserscheinungen, noch erhöhte Mortalität oder einen Rückgang der Eiproduktion zeigten.

***M. columbinasale*** wurde von JORDAN et al. (1982), ***M. columborale***, sowie ***M. columbinum*** von SHIMIZU et al. (1978) ursprünglich aus Tauben isoliert und es gelangen immer wieder Nachweise bei Felsentauben (*Columba livia*) die sowohl respiratorische Symptomatik zeigten als auch klinisch unauffällig waren (BENCINA et al., 1987 b; JORDAN et al., 1981; KEYMER et al., 1984; McOWAN et al., 1981; NAGAMOTO et al., 1997; REECE et al., 1986; TURCSANYI et al., 2005). McOWAN et al. (1981) konnten mit einem der *M. columborale*- Isolate bei einer künstlicher Infektion von Hühnern eine



Aerosacculitis hervorrufen, jedoch ist nicht geklärt, ob *M. columborale* für das natürliche Auftreten von respiratorischen Erkrankungen verantwortlich ist. MORISHITA et al. (1997) isolierten *M. columborale* bei Greifvögeln mit Pneumonien aus dem Luftsack. Um welche Greifvogelarten es sich hierbei handelte gibt der Autor leider nicht an.

***M. gallinarum*** wird gewöhnlich aus Hühnern isoliert (FREUNDT, 1955), ist aber auch bei Puten (BENCINA et al., 1987 b; JORDAN und AMIN, 1980), Enten (EI-EBEEDY et al., 1987), Gänsen (JORDAN und AMIN, 1980) und Tauben (REECE et al., 1986; SHAH-MAJID, 1987) nachgewiesen worden. *M. gallinarum* galt bisher nicht zu den pathogenen aviären Mykoplasmen, jedoch gibt es nach KLEVEN (2003 c) Berichte über Broilerbestände mit erhöhtem Schlachtkörperverwurf aufgrund einer Aerosacculitis, bei denen aus Trachea und Luftsack *M. gallinarum* isoliert werden konnte. KLEVEN et al. (1978) konnten mit einem *M. gallinarum*- Isolat in Verbindung mit einer ND- IB- Impfung das Auftreten einer Aerosacculitis bei Masthühnern hervorrufen. Bei *M. gallinarum* wurde durch DOVC et al. (1991) eine genetische Heterogenität innerhalb der verschiedenen Isolate festgestellt. Ebenfalls konnte *M. gallinarum* aus der Trachea eines Wanderfalken (*Falco peregrinus*) (POVEDA et al., 1990 b) sowie weiteren Greifvögeln (MORISHITA et al., 1997; POVEDA et al., 1990 b). isoliert werden. Der Nachweis von *M. gallinarum* in Hühnerembryonen (BENCINA et al., 1987 b) sowie in Ovidukten von Legehennen (De LAS MULAS et al., 1990; WANG et al., 1990) lässt die Schlussfolgerung einer transovariellen Infektion dieser Mykoplasmenspezies zu.

***M. gallinaceum*** wurde, wie auch *M. gallinarum*, aus der Trachea von Hühnern isoliert und gilt im Allgemeinen als normaler Schleimhautkommensale (JORDAN et al., 1982). CHIN und GOSHGARIAN (2001) konnten *M. gallinaceum* aus dem Sinus von Fasanen isolieren. POVEDA et al. (1990 b) gelang die Isolierung bei einem Wanderfalken, MORISHITA et al. (1997) bei weiteren Greifvögeln, deren Art nicht weiter angegeben wird. Bei dem Versuch, pathogene Mykoplasmen nachzuweisen, werden die beiden Mykoplasmenspezies *M. gallinaceum* und *M. gallinarum* in Hühnerbeständen regelmäßig isoliert, da sie durch ihr schnelles Wachstum oft die langsam wachsenden, pathogenen Mykoplasmen überwuchern (KLEVEN, 2003 c).

***M. gallopavonis*** wurde erstmals von ROBERTS (1963) aus Luftsackläsionen adulter Puten isoliert und von JORDAN et al. (1982) beschrieben. Zahlreiche Nachweise in wildlebenden Putenpopulationen ohne jegliche klinische Veränderungen lassen jedoch den Schluss zu,

dass es sich bei *M. gallopavonis* um einen apathogenen Schleimhautkommensalen handelt (FRITZ et al., 1992; HOFFMAN et al., 1997; LUTTRELL et al., 1991, 1992). CHIN und GOSHGARIAN (2001) isolierten diesen Erreger aus dem Sinus von Fasanen.

*M. glycyphilum* konnte aus dem Ovidukt von adulten Hühnern (FORREST und BRADBURY, 1984) isoliert werden, eine weitere Isolierung gelang CHIN und GOSHGARIAN (2001) aus dem Sinus eines Fasans mit infraorbitaler Sinusitis. Die Bedeutung des Erregers ist jedoch unklar, da auch *Pasteurella multocida* und *Escherichia coli* isoliert wurden.

*M. imitans* wurde in Frankreich aus Enten (DUPIELLET, 1984) und Gänsen (BUNTZ et al., 1986) sowie in England aus Rebhühnern (BRADBURY et al., 1993) isoliert. *M. imitans* wurde zunächst durch Immunfluoreszenz und Wachstumshemmtests als

*M. gallisepticum* identifiziert, in anschließenden serologischen und molekularbiologischen Studien zeigte sich jedoch, dass diese Spezies nur partiell mit *M. gallisepticum* verwandt ist. Eine DNS- Hybridisierung mit Stämmen von *M. gallisepticum* wies eine DNS - Homologie von lediglich 40 - 46 % auf (BRADBURY et al., 1993; DUPIELLET et al., 1990). Untersuchungen ergaben, dass *M. imitans* ebenso wie *M. gallisepticum*, eine Ciliostase in Huhn- und Entenembryo- Trachea- Organkulturen herbeiführt, sowie eine Adhärenzstruktur besitzt (ABDULWAHAB et al., 1996). BUNTZ (1987), DUPIELLET (1988) sowie SAED et al. (1990) beschreiben das Absterben von embryonierten Hühner-, Enten- und Gänseeiern nach Infektion mit *M. imitans*. Klinische Symptome oder Läsionen bei einer künstlichen Infektion mit *M. imitans* konnten bei Hühnern nicht festgestellt werden, jedoch wurde ein synergistischer Effekt bei einer Mischinfektion mit IB- Viren beobachtet (GANAPATHY und BRADBURY, 1998). Hingegen konnte nach einer experimentellen Infektion von zwei Tage alten Putenküken nach 22 Tagen in der Sektion das Auftreten von Sinusitis, Coryza, Konjunktivitis sowie Aerosacculitis nachgewiesen werden (DUPIELETT, 1988). Bei Rotfußhühnern (*Alectoris rufa*) kommt es bei einer *M. imitans*- Infektion zu einer respiratorischen Erkrankung, die jedoch milder verläuft, als bei einer Infektion mit *M. gallisepticum* (GANAPATHY und BRADBURY, 1998). Nach KLEVEN (2003 c) ist das Auftreten von *M. imitans* in kommerziellen Wirtschaftsgeflügelbeständen der U.S.A. bisher noch nicht beschrieben, jedoch räumt er die Gefahr ein, dass Isolate fälschlich als *M. gallisepticum* identifiziert wurden und serologische Kreuzreaktionen bei Felduntersuchungen nicht auszuschließen sind.

***M. iners*** wurde bei einem Huhn (EDWARD und KANAREK, 1960; TIONG et al., 1979) isoliert. WAKENELL et al. (1995) zeigten, dass nach Inokulation embryonierter Hühnereier der Referenzstamm von *M. iners* (PG30) apathogen, der Stamm Oz von *M. iners* jedoch zu Gelenksschwellungen mit Füllung von käsigem Exsudat und punktuellen käsigen Veränderungen der Leber führt. POVEDA et al. (1990 b) gelang die Isolation von *M. iners* bei einem Wanderfalken und MORISHITA et al. (1997) berichtet über den Nachweis bei weiteren Greifvögeln mit respiratorischen Erkrankungen ohne auf die Greifvogelarten weiter einzugehen.

***M. lipofaciens*** wurde durch BRADBURY et al. (1983) aus dem infraorbitalen Sinus von Hühnern, die keinerlei klinische Symptome aufwiesen, isoliert. Dabei zeigte *M. lipofaciens* die gleichen biochemischen Eigenschaften wie *M. iowae*, konnte jedoch durch serologische Untersuchungen davon abgegrenzt werden. BENCINA et al. (1987 b) beschreiben das Vorkommen von *M. lipofaciens* bei Hühnern, Puten und Enten. Die Pathogenität bei natürlich auftretenden Infektionen ist noch ungeklärt, jedoch konnte in experimentell durchgeführten Infektionen von embryonierten Hühner- und Puteneiern, ein Absterben der Embryonen beobachtet werden (BRADBURY et al., 1983).

***M. pullorum*** wurde erstmals von Jordan et al. (1982) beschrieben und konnte aus der Trachea von Hühnern, Wachteln, Rebhühnern, Fasanen und Puten isoliert werden (MOALIC et al., 1997). Isolate von *M. pullorum* aus Putenembryonen eines Putenbestandes mit verminderter Schlupfrate zeigten sich ebenfalls pathogen für Hühnerembryonen (MOALIC et al., 1997).

***M. sturni*** konnte von einem europäischen Star (*Sturnus vulgaris*), der eine Konjunktivitis aufwies, isoliert werden (FORSYTH et al., 1996; FRASCA et al., 1997). Ebenfalls isoliert wurde der Erreger bei Amerikanerkrähen (*Corvus brachyrhynchos*) und Wanderdrosseln (*Turdus migratorius*) (WELLEHAN et al., 2001), Blauhäher (*Cyanocitta cristata*), Spottdrossel (*Mimus polyglottos*) mit Konjunktivitis (LEY et al., 1998) sowie Amseln (*Turdus merula*), Saatkrähen (*Corvus frugilegus*), Aaskrähen (*Corvus corone corone*) und Elstern (*Pica pica*) (PENNYCOTT et al., 2005).

Neben den aufgeführten Mykoplasmenspezies existieren eine Vielzahl von *Mycoplasma*-Isolaten von weiteren verschiedensten Vogelarten, wie z.B. Isolate verschiedener Laufvögel

aber auch Isolate des Wirtschaftsgeflügels, die bislang jedoch noch nicht genauer beschrieben wurden (KLEVEN 2003 a).

#### **2.2.4 Mykoplasmenachweise bei Greifvögeln**

Über das Auftreten, die Pathogenität und die Verbreitung von Mykoplasmen bei Greifvögeln ist bisher wenig bekannt, obwohl schon FURR et al. (1977) *Mycoplasma ssp.* bei in Gefangenschaft gehaltenen Sakerfalken (*Falco cherrug*) und Wanderfalken (*Falco peregrinus*) nachweisen konnten. COOPER (1979) berichtet ebenfalls über den Nachweis von *Mycoplasma ssp.* bei Greifvögeln ohne genauere Angaben zu machen. Als klinische Symptome für eine Mykoplasmeninfektion bei Greifvögeln werden Atembeschwerden, Luftsackentzündung, serofibrinöse Pneumonie sowie katarrhalische Tracheitis angegeben wobei auch hier genauere Angaben über die Mykoplasmenart fehlen (FURR et al., 1977; GERLACH, 1994; GYLSTORFF und GRIMM, 1987; HEIDENREICH, 1997). BÖLSKE und MÖRNER (1982) isolierten *Mycoplasma ssp.* aus dem Respirationstrakt eines Mäusebussards (*Buteo buteo*) sowie Rauhußbussards (*Buteo lagopus*), die unter Anzeichen einer respiratorischen Erkrankung verendeten. Diese konnten jedoch mittels Serologie nicht weiter identifiziert werden. Eine Aussage über die Bedeutung der Mykoplasmen konnte nicht erfolgen, da gleichzeitig weitere bakterielle Erreger in verschiedenen Organen oder Schimmelpilze im Respirationstrakt der Vögel nachgewiesen wurden. KOHLER (1982) konnte *Mycoplasma ssp.* aus dem Respirationstrakt von Turmfalken (*Falco tinnunculus*) und Sperbern (*Accipiter nisus*) nachweisen, eine weitere Identifizierung der Isolate erfolgte jedoch nicht. Eine mögliche pathogene Bedeutung dieser Isolate wurde von der Autorin nicht ausgeschlossen. GLÜNDER et al. (1986) untersuchten 159 Greife und 92 Eulen. Sie konnten bei 14 Vögeln *Mykoplasma ssp.* isolieren, ließen aber deren Bedeutung für Greifvögel und Eulen offen. Eine Speziesbestimmung erfolgte in dieser Untersuchung nicht. POVEDA (1988) konnte bei einem in Gefangenschaft lebenden Wanderfalken, der mit Hühnerfleisch gefüttert wurde *M. gallisepticum*, *M. gallinaceum*, *M. gallinarum* und *M. iners* nachweisen. Ebenfalls wurden bei der Untersuchung von einem Mäusebussard, einem Wanderfalken, zwei Sakerfalken (*Falco cherrug*), zwei Gänsegeiern (*Gyps fulvus*) und einem Mönchsgeier (*Aegyptius monachus*) *Mycoplasma ssp.* isoliert (POVEDA et al, 1990 a). Der Wanderfalke sowie der Sakerfalke zeigten respiratorische Symptome und es wurden

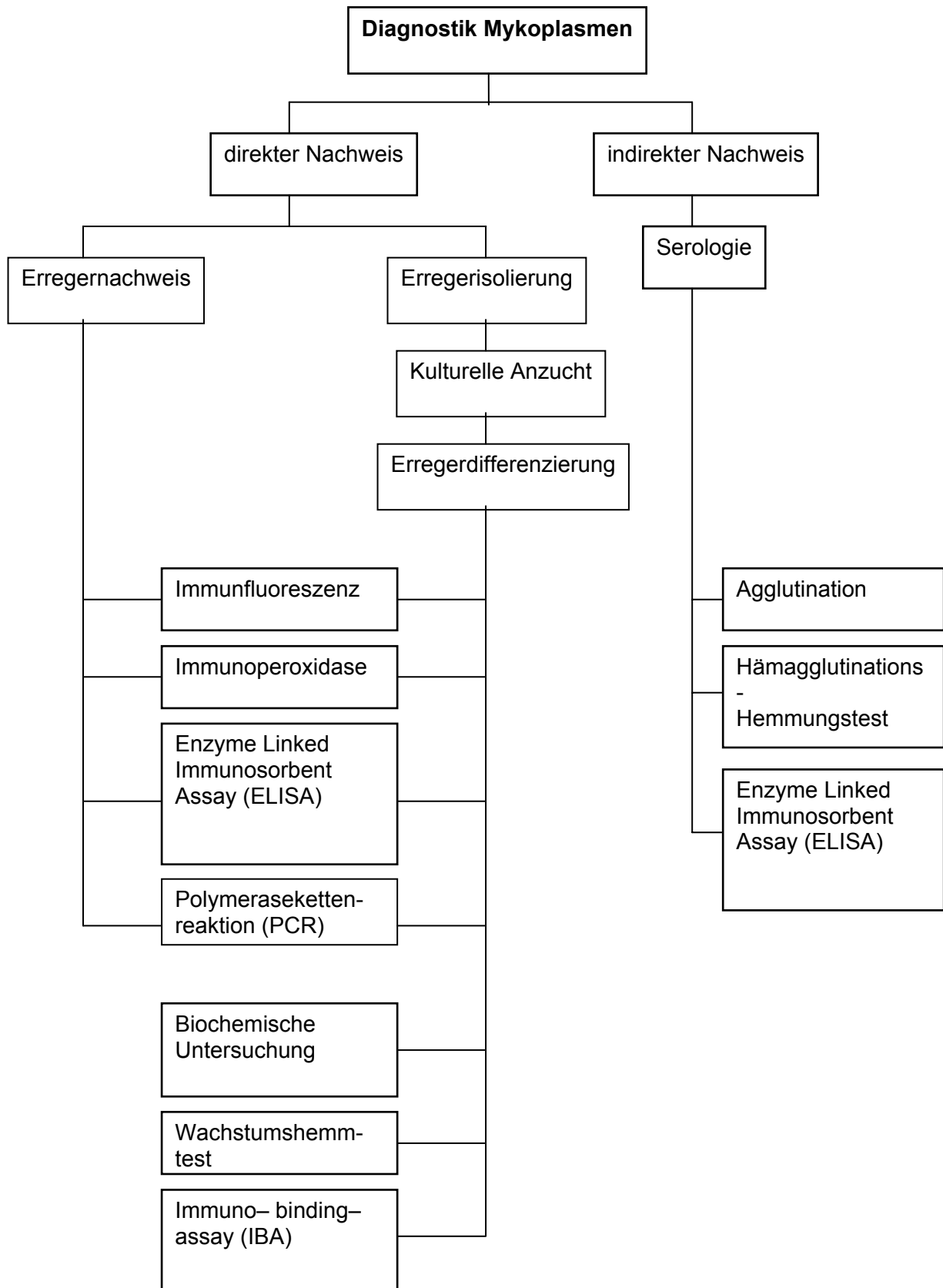
Tupferproben aus dem Luftsack entnommen. Bei den Sakerfalken trat zusätzlich eine Sinusitis auf, von dem ebenfalls Tupfer genommen wurden. Die Gänsegeier fielen durch unspezifische respiratorische Symptome, wie unregelmäßige Atmung, pfeifende Atemgeräusche sowie mukösen Ausfluss aus Nase und Schnabel auf. Die Tiere zeigten hierbei eine Anorexie. Auch hier wurden Tupfer aus Trachea und Sinus genommen. Der untersuchte Mäusebussard sowie der Mönchsgeier stammten aus einer Wildvogelauffangstation, in der es Ausbrüche von respiratorischen Erkrankungen gab. Aus den genommenen Proben konnten durch Anzucht 13 Mykoplasmenisolate gewonnen werden. Die Isolate des Mönchsgeiers wurden als *M. gallinarum*, diejenigen des Wanderfalken als *M. columborale* und das Isolat des Sakerfalken als *M. anatis* typisiert. Die restlichen Isolate reagierten nicht mit den eingesetzten Antiseren. Aufgrund weiterführender Untersuchungen konnte POVEDA et al. (1994) die nicht zu differenzierenden Isolate als neue Mykoplasmenpezies *M. buteonis* (Mäusebussard- Isolat), *M. gypis* (Gänsegeier- Isolat) und *M. falconis* (Sakerfalken- Isolat) beschreiben.

Aus dem Exsudat des Fußballenabszesses eines Rabengeiers (*Coragyps atratus*) isolierte PANANGALA et al. (1993) auf Blutagar *Mycoplasma* ssp., die alpha- haemolytische Zonen um die Kolonien auf dem Agar bildeten. Aufgrund morphologischer und biophysikalisch-biochemischer Tests sowie der Sequenzierung der 16S rRNS, wurde das Isolat von den bisher bekannten Mykoplasmenpezies differenziert und als *M. corogypsi* beschrieben. MORISHITA et al. (1997) untersuchten in der Zeit von 1980 bis 1994 insgesamt 2975 Greifvögel der Ordnung *Falconiformes* und der Ordnung *Strigiformes*, die in dem California Raptor Center (USA) vorgestellt wurden. Dabei konnte ebenfalls *Mycoplasma corogypsi* aus Fußballenabszessen isoliert und differenziert werden. Des Weiteren gelang die Anzucht und Differenzierung von *M. buteonis*, *M. falconis* und *M. gypis* aus dem Respirationstrakt einiger Greifvögel, ohne dass diese jedoch in Zusammenhang mit einer Erkrankung gebracht werden konnten. *M. anatis* konnte aus dem infraorbitalen Sinus und der Trachea von Greifvögeln, die eine Sinusitis aufwiesen nachgewiesen werden. Aus der Trachea und dem Pharynx von Tieren, die respiratorische Symptomatik sowie Sinusitiden zeigten, gelang die Anzucht und Identifikation von *M. gallisepticum*, *M. gallinaceum*, *M. gallinarum* und *M. iners*. Der Nachweis von *M. columborale* gelang bei diesen Untersuchungen aus dem Luftsackmaterial eines Greifvogels mit einer Pneumonie. Weitere, nicht zu differenzierende Mykoplasmen, wurden bei diesen Untersuchungen aus dem Respirationstrakt von Greifvögeln mit respiratorischer Symptomatik, sowie aus Gelenken von Tieren mit Gelenkentzündungen isoliert. Angaben zu den Greifvogelpezies, der Prävalenz sowie den Isolations- und Differenzierungsmethoden fehlen. LIERZ (1999) untersuchte 68 Greifvögel,

die verletzt oder geschwächt in Berlin und Brandenburg aufgefunden wurden, auf Mykoplasmen und konnte diese bei 32 Tieren nachweisen. Die Probennahme erfolgte mittels Trachealtupfer und Luftsackbiopsie. Nach erfolgreicher Anzucht wurden die Isolate mittels Immuno- Binding- Assay (IBA) identifiziert. Dabei konnten *M. falconis* bei Turm- und Wanderfalken, *M. buteonis* und *M. gypis* bei Mäusebussarden und Turmfalken sowie *M. meleagridis* bei Mäusebussarden und Schwarzmilanen (*Milvus migrans*) nachgewiesen werden. Bei vier Tieren wurden ebenfalls Mykoplasmen isoliert, die jedoch mit den eingesetzten Antiseren nicht identifiziert werden konnten. In den Fällen, in denen *M. gypis* und *M. falconis* mittels der Luftsackbiopsie nachgewiesen wurden, konnte mittels histologischer Untersuchungen auch stets eine perivaskuläre Infiltration von Lymphozyten und/ oder Plasmazellen im Luftsack festgestellt werden. In den Fällen, wo nur der Trachealtupfer für *M. falconis*, *M. gypis* oder *M. buteonis* positiv war, konnte dieser Befund nicht immer erhoben werden. Histopathologische Veränderungen der Luftsackbiopate konnten bei den Tieren mit einem *M. meleagridis*- Nachweis nicht festgestellt werden. LIERZ (1999) vermutet, dass die in dieser Studie nachgewiesenen Mykoplasmenspezies nicht primär pathogen für die Greifvögel waren, da diese weder respiratorische noch Gelenksveränderungen aufwiesen. Der Autor hält es aber für möglich, dass sie den Vogel schwächen oder andere Erkrankungen begünstigen. Bei der Untersuchung von 30 klinisch gesunden Greifvögeln, die nach dem Zufallsprinzip aus einem Bestand von 300 Tieren in den Vereinigten Arabischen Emiraten ausgesucht wurden, konnten LIERZ et al. (2002) aus den Trachealtupferproben aller Tiere *Mycoplasma ssp.* isolieren. Die weitere Identifizierung der Isolate erfolgte mittels des IBA. Dabei konnten *M. meleagridis* und *M. corogypsi* bei Wanderfalken, *M. meleagridis*, *M. buteonis*, *M. corogypsi* bei Sakerfalken, *M. meleagridis* bei einem Lannerfalken (*Falco biarmicus*), *M. meleagridis*, *M. buteonis*, *M. falconis* und *M. corogypsi* bei Ger- Saker- Hybridfalken und *M. meleagridis* bei Ger-Wander-Hybridfalken nachgewiesen werden. Mischkulturen von *M. meleagridis* und *M. falconis* traten bei Ger-Saker- Hybridfalken, außerdem von *M. meleagridis* und *M. corogypsi* bei Wanderfalken auf. Die Isolate der Gerfalken (*Falco rusticolus*) und Berberfalken (*Falco peregrinoides*) konnten nicht identifiziert werden. OAKS et al. (2004 a) gelang die Isolierung von Mykoplasmen bei einem Bengalgeier (*Gyps bengalensis*) aus Pakistan. Das Tier wurde aufgrund einer Diclofenac- Intoxikation aufgefunden. Bei der Sektion des Vogels zeigten sich die typischen Veränderungen dieser Vergiftung, wie Nieren- und Eingeweidegicht sowie milde Entzündungsherde mit Heterophilie in der Trachea und den Bronchien (OAKS et al., 2004 b). Der Erreger wurde aus einem Gewebepool, bestehend aus Lungen- und Milzmaterial, auf primären CEF Kulturen angezüchtet. Hierbei wurde ein intrazellulärer vakuolisierender

zytopathogener Effekt beobachtet. Aufgrund biochemischer Eigenschaften, ultrastrukturellen Merkmalen, sowie der Sequenzierung der 16S rRNS, konnte das Isolat als eine neue Mykoplasmenspezies, *Mycoplasma vulturii*, identifiziert werden. PCR Untersuchungen ergaben eine Prävalenz dieses Erregers in der Wildpopulation der Bengalgeier von 24%. Durch die Tatsache, dass der Erreger nur in geringem Umfang bei den infizierten Tieren nachgewiesen wurde, kommen OAKS et al. (2004 a) zu dem Schluss, dass *M. vulturii* nur unter bestimmten Umständen (z.B. Immunsuppression, Vergiftungen) eine pathogene Wirkung hat.

## 2.3 Diagnostik





### **2.3.1 Direkter Nachweis**

#### **2.3.1.1 Kultivierung**

Nach RAZIN (1981) und SELBITZ (1992) stellen Mykoplasmen, bedingt durch den geringen Genomumfang, sowie der durch die parasitische Lebensweise limitierten biosynthetischen Möglichkeiten, hohe Anforderungen an ihre Kultivierungsbedingungen. Die anabolen Aktivitäten sind in hohem Maße von der Aufnahme von Vitaminen, Aminosäuren, Nukleinsäurevorläufern, Lipiden und Sterolen des Wirtsorganismus abhängig (MILES, 1992; RAZIN, 1992 b). Für das in vitro Wachstum benötigen Mykoplasmen daher komplexe Nährmedien, die Fettsäuren und Cholesterin in Form einer Serumkomponente, Glukose oder andere zur Energiegewinnung geeignete Kohlenhydrate, Pepton, Hefeextrakt und Rinderherzbouillon enthalten (FREUNDT, 1983; RAZIN, 1981). Von EDWARD (1947) wurde ein komplexes Nährmedium beschrieben, das den Mykoplasmen die essentiellen Komponenten zur Membran- und Nukleinsäuresynthese zur Verfügung stellt. Peptone und Tryptone dienen als Aminosäuren- und Proteinlieferanten. Über Hefeextrakt werden Vitamine und Wachstumsfaktoren zugeführt. Als Energiequelle für die fermentativen Mykoplasmen wird Glukose, für die nichtfermentativen Mykoplasmen Arginin und für die Ureaplasmen Harnstoff zugegeben. Das zugesetzte Serum liefert neben anderen Nährstoffen, die für die Membransynthese notwendigen Fettsäuren, Phospholipide und Cholesterin. Konventionelle Nährböden sind meistens Modifikationen dieses Mediums und enthalten noch besondere Zusätze, wie Nicotinamidadeninukleotid (NAD) für MS (CHALQUEST und FABRICANT, 1960) zur Unterstützung des Wachstums der Mykoplasmen oder Penicillin und Thalliumacetat zur Hemmung der bakteriellen und fungoiden Begleitflora. Der pH - Wert des Mediums für fermentative Mykoplasmen sollte 7,8 bis 8,0 und für nicht fermentative Mykoplasmen und Ureaplasmen 6,0 bis 6,5 betragen (RAZIN, 1992 a). Verschiedene Autoren haben Medien entwickelt, die sich in ihrer Grundzusammensetzung ähnlich sind und auf dem von EDWARD (1947) entwickelten und von HAYFLICK (1965) modifizierten Medium basieren. Das so genannte „Standardmedium“ (ALUOTTO et al., 1970) enthält nur die drei notwendigen Bestandteile: Rinderherzbouillon, Hefeextrakt und Pferdeserum. Einen Überblick über Medien geben FREUNDT (1983), SHEPARD (1983), WHITCOMP (1983), ROBINSON (1983) und RODWELL (1983). Am Gebräuchlichsten für die Kultivierung aviärer Mykoplasmen sind die von FREY et al. (1968) und BRADBURY (1977) beschriebenen Medien (KLEVEN, 2003 a; KLEVEN und YODER, 1989). Auch in den unterschiedlichen Temperaturoptima spiegelt sich die Anpassung der Mykoplasmen an den Wirtsorganismus

wieder, wobei die Mehrzahl der Mykoplasmen in der Regel recht langsam wachsen und die optimale Umgebungstemperatur bei 37-38 °C liegt. Vertreter der Klasse der *Mollicutes* der Insekten, Pflanzen oder poikilothermen Vertebraten können hingegen eine Temperatur von 25 – 30 °C bevorzugen (KIRCHHOFF et al., 1987; TULLY, 1989). Einige Mykoplasmen, wie z.B. *M. gallinarum* und *M. gallinaceum*, bilden schon nach einem Tag Kolonien aus, während die meisten anderen Mykoplasmen 3 bis 10 Tage benötigen (KLEVEN, 2003 a). Da die meisten Mykoplasmen fakultativ anaerob sind, hat sich die Kultivierung in einer 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre als günstig erwiesen (BRADBURY, 1998). Auf festen Nährböden wachsen Mykoplasmen in sehr kleinen (< 1 mm) Kolonien, die meist eine typische Spiegeleiform aufweisen. Das dunkle Koloniezentrum entsteht durch Penetration der Zellen in den Agar, während die helle Außenzone von nur auf der Medienoberfläche wachsenden Mykoplasmen gebildet wird (HAYFLICK, 1965).

Die Kultivierung von Mykoplasmen ist sehr arbeitsaufwendig, langsam und benötigt sterile Arbeitsbedingungen (KEMPF, 1998). Probleme die hierbei immer wieder auftreten sind das Überwuchern von schnell wachsenden Mykoplasmenarten oder anderer Organismen sowie der Verlust einer Spezies in der Subkultur (KEMPF, 1998).

### **2.3.1.2 Differenzierung aufgrund biochemischer Eigenschaften**

Eine Differenzierung der Isolate kann durch die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der Mykoplasmen erfolgen. Dabei werden unter anderem Analysemethoden wie z.B. Sterolabhängigkeit (RAZIN und TULLY, 1970), Glucoseverwertung (EDWARD und MOORE, 1975), Hydrolyse von Urease und Arginin, die Bildung von Film und Spots, Phosphataseaktivität, Tetrazoliumreduktion und die Verflüssigung von koaguliertem Pferdeserum (ALUOTTO et al., 1970) eingesetzt. Diese Methoden haben den Vorteil, dass zu ihrer Durchführung kein Antiserum erforderlich ist und den Nachteil, dass sie nur in Reinkulturen durchgeführt werden können. Reinigungsprozeduren sind zeitaufwendig und führen leicht zu dem Verlust eines Erregers oder zu der Weiterkultivierung eines Opportunisten (FREY et al., 1973). FREY et al. (1973) berichtet, dass Feldstämme, die im Gegensatz zu Referenzstämmen nicht häufig passagiert wurden, unterschiedliche Ergebnisse in den biochemischen Tests aufweisen können.

### 2.3.1.3 Differenzierung aufgrund antigenetischer Eigenschaften

Mit der Methode der Immunfluoreszenz (ROSENDAL und BLACK, 1972; GARDELLA et al., 1983) können Mykoplasmenkolonien anhand von markierten Antikörpern identifiziert werden. Der Einsatz der direkten Immunfluoreszenz (IFT) gilt nach TALKINGTON und KLEVEN (1983) als sehr geeignet zum Nachweis von MG in Mischkulturen. Auch für Gefrierschnitte der Schleimhäute eignet sich diese Nachweismethode (STIPKOVITS, 1992 b). Die Anwendung von direkter Immunfluoreszenz unter Gebrauch von Fluoreszein- Isothiocyanat markierten Antikörpern zu einer bestimmten Mykoplasmenspezies und als Kontrast dazu, Tetramethylrhodamin- Isothiocyanat markierte Antikörper gegen eine andere Mykoplasmenspezies (Doppelte Fluoreszenzmarkierung), erlaubt die Differenzierung von zwei Spezies in einem Schritt (STIPKOVITS und KEMPF, 1996).

Ebenfalls ist die indirekte Immunfluoreszenz unter Einsatz von IgG- Antiserum gegen *Mycoplasma ssp.* möglich.

Nach dem gleichen Prinzip wie die indirekte Immunfluoreszenz arbeitet der indirekte Immunoperoxidasetest. Hierbei ist das eingesetzte Anti- Kaninchen- Immunoglobulin- Serum nicht mit Fluorochrom, sondern mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Der Immuno- Binding-Assay (IBA) nach KOTANY und McGARRITY (1985) sowie TerLAAK und NOODERGRAAF (1987) arbeitet auf die selbe Art und Weise wie der indirekte Immunoperoxidasetest, jedoch werden hier zuvor die zu untersuchenden Kolonien auf Nitrocelluloseplättchen transferiert.

Die Kombination von direkter Immunfluoreszenz und Immunoperoxidasefärbung mittels Peroxidase markierter Antikörper gegen eine dritte Spezies, ermöglicht die Differenzierung von drei Spezies zur gleichen Zeit (BENCINA und BRADBURY, 1992).

Sowohl der Immunfluoreszenztest, als auch der Immunoperoxidasetest sind einfach, sensitiv und spezifisch sowie schnell in der Durchführung. Der Vorteil des Immunoperoxidasetestes gegenüber der Immunfluoreszenz liegt darin, dass für den Immunoperoxidasetest die Notwendigkeit eines Fluoreszenzmikroskopes entfällt.

Eine weitere Differenzierungsmöglichkeit von Mykoplasmenkolonien aufgrund ihrer antigenetischen Eigenschaften stellt der Wachstumshemmtest (BLACK, 1973; CLYDE, 1964; 1983) dar. Hierbei werden die zu identifizierenden Mykoplasmenkolonien durch das Auftragen von Filterpapier, welches mit spezifischen Antiseren getränkt wurde, in ihrem Wachstum gehindert. In einem positiven Falle kommt es zu einer 2-10 mm großen Wachstumshemmzone. Dieser Test setzt jedoch den Einsatz von Reinkulturen voraus.

Der direkte Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient ebenfalls zum Nachweis von Mykoplasmen- Antigen. Hierbei wird dem, an eine feste Phase gebundenen,

spezifischen Mykoplasmen - Antiserum eine Suspension des zu untersuchenden Materials zugesetzt. Durch die Bindung mit dem spezifischen Konjugat erfolgt der Mykoplasmenachweis. Der Einsatz monoklonaler statt polyklonaler Antikörper erhöht die Sensitivität und die Spezifität (STIPKOVITS, 1992 b) dieser Nachweismethode.

#### **2.3.1.4 Differenzierung aufgrund genetischer Eigenschaften**

##### *Nachweis mittels Multispezies- PCR*

VAN KUPPEVELD et al. (1992) entwickelten ein Primerpaar, welches ein Fragment der Sequenz des mykoplasmaalen 16S rRNS- Gens amplifizierte. Durch einen Sequenzvergleich der 16S rRNS- Gene von verschiedenen Mikroorganismen, Chloroplasten und Eukaryoten konnte VAN KUPPEVELD et al. (1992) multiple Basenaustausche im Bereich des 3'- Endes des rückwärtsgerichteten Primers aufzeigen. Die Spezifität dieser PCR wurde anhand von Mykoplasmenspezies, die Vertreter der verschiedenen Subgruppen innerhalb der phylogenetischen Klassifikation der Mykoplasmen darstellten, überprüft. Das Primerpaar reagierte mit allen untersuchten Mykoplasmenspezies. Vertreter der Genera *Ureaplasma*, *Spiroplasma* und *Acholeplasma* konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Aviäre Mykoplasmenspezies wurden nicht getestet. Es konnten keine Kreuzreaktionen mit Vertretern der nahen verwandten Genera *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* und *Clostridium* festgestellt werden. Eine Auflistung der eingesetzten Mykoplasmenspezies und Bakterienspezies findet sich im Anhang Tabelle 1. Die Sensitivität dieser PCR Nachweismethode gibt MAROIS et al. (2000) mit 1 pg chromosomaler DNS an, was annähernd 1-10 Kolonie bildenden Einheiten (KbE) entspricht. Obwohl VAN KUPPEVELD et al. (1992) von einem genuspezifischen Primerpaar sprechen, wird nicht nur die DNS des Genus, bzw. der Gattung *Mycoplasma* synthetisiert, sondern aller Vertreter der Klasse der *Mollicutes*.

Das Primerpaar eignet sich zum generellen Screening von Proben auf das Vorhandensein von DNS der Klasse der *Mollicutes*, bevor weiterführende spezifischere PCR Untersuchungen auf Mykoplasmen eingeleitet werden.

FAN et al. (1995) beschreiben eine PCR-Methode zum Nachweis der 16S rRNA-Gensequenz. Mit diesem Primerpaar konnte die DNS von 14 untersuchten aviären Mykoplasmenspezies sowie *Acholeplasma laidlawii* amplifiziert werden (Anhang 1, Tabelle 1). Mittels einer folgenden Restriktionsenzymanalyse mit bis zu sechs verschiedenen Restriktionsenzymen wurden diese dann durch ihre spezifischen Restriktionsmuster identifiziert, wobei jedoch eine Differenzierung von MG und *M. imitans* nicht möglich war. Da das Primerpaar nicht nur mykoplasmale DNS, sondern auch DNS anderer Bakterienspezies wie z.B. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella enteritidis* amplifizierte, eignet sich diese Nachweis- und Differenzierungsmethode nur für Reinkulturen aviärer Mykoplasmen (GARCIA et al., 1995).

LAUERMAN et al. (1995) arbeiteten mit einem Primerpaar von HARASAWA et al. (1986, 1993) zum Nachweis von neun aviären Mykoplasmen (Anhang 1, Tabelle 1). Das Primerpaar synthetisiert das Ende des 16S rRNS Gens über die Spacer Region bis Anfang der 23S rRNS. Das PCR Amplifikat war dabei unterschiedlich für zwei Mykoplasmenspezies (MI, MG). Die anderen Mykoplasmenspezies konnten anhand der Amplifikatsgröße in drei Gruppen eingeteilt werden. Durch den Einsatz von vier verschiedenen Restriktionsenzymen konnten dann die einzelnen PCR-Produkte weiter differenziert werden. Bei diesen Untersuchungen wurden ausschließlich diese neun ausgesuchten Mykoplasmenspezies eingesetzt. Angaben zu anderen aviären Mykoplasmenspezies werden nicht gemacht, so dass sich diese Methode nur zur Identifizierung von Reinkulturen dieser neun Mykoplasmenspezies eignet.

GARCIA et al. (1995) entwickelten ein Primerpaar für die 16S rRNS- Gensequenzen von MG, MS und MI. Damit konnte für diese drei Mykoplasmenspezies ein 780 bp großes DNS Fragment amplifiziert werden. Die DNS von neun untersuchten aviären Mykoplasmenspezies sowie *Acholeplasma laidlawii* sowie die DNS der Bakterien *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.* und *Bacillus cereus* wurden mit diesem Primerpaar nicht amplifiziert (Anhang 1, Tabelle 1). Durch den Einsatz von drei Restriktionsenzymen konnte durch Restriktionsenzymanalyse eine Differenzierung der drei Mykoplasmenspezies erfolgen. Voraussetzung hierfür ist wiederum das Vorhandensein einer Reinkultur damit ein spezifisches Restriktionsmuster entstehen kann. Eine Validierung anhand von Feldproben erfolgte nicht.

#### *Nachweis mittels speziesspezifischer PCR*

Der Schwerpunkt der speziesspezifischen PCR-Diagnostik beim Wirtschaftsgeflügel liegt bei MG und MS, aber auch für MM und MI sind PCR-Nachweismethoden beschrieben worden.

### *PCR Nachweise für MG*

Ein speziesspezifisches Primerpaar zum Nachweis von MG beschreiben NASCIMENTO et al. (1991). Das Primerpaar amplifizierte ein PCR-Produkt innerhalb der Region des *seq* Lipoprotein - Gens von MG. Weder die DNS von 16 weiteren untersuchten Mykoplasmenspezies, noch die DNS von *Escherichia coli* wurde durch diese PCR erfasst. Auf der Grundlage dieses Primerpaares veröffentlichten CARLI und EYIGOR (2003) eine Real- Time PCR zum Nachweis von MG.

KISS et al. (1997) entwickelten auf der Grundlage von computergestützten 16S rRNS-Sequenzvergleichen der Mykoplasmenspezies MS, MI, MM und MG ein Primerpaar zum Nachweis von MG - DNS. Das Amplifikat zeigte eine Größe von 530 bp. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität wurden nicht gemacht.

KHAN et al. (1987) entwickelten ein stammspezifisches Primerpaar, mit dem der MG- F-Impfstamm (F2F10) von MG-Feldstämmen sowie von MS, MI und *M. gallinarum* differenziert werden konnte.

GARCIA et al. (2005) evaluierten eine von LAUERMAN (1998) entwickelte PCR zum Nachweis der 16S rRNS von MG. Dabei wurden mit Ausnahme von *M. vulturii* alle bekannten 23 aviären Mykoplasmenspezies sowie weitere bakterielle Erreger zum Spezifitätsnachweis eingesetzt. Das verwendete Primerpaar zeigte hierbei eine Spezifität für MG und *M. imitans*. Eine weitere Differenzierung dieser beiden Mykoplasmenspezies ist jedoch nicht möglich, da die Sequenz des von diesem Primerpaar amplifizierten PCR Produktes für beide Mykoplasmenspezies zu 100% identisch ist.

MEKKES und FEBERWEE (2005) entwickelten mit diesem Primerpaar von LAUERMAN (1998) eine Real- Time PCR. Hierbei wurden in der Untersuchung die Mykoplasmenspezies *M. imitans* und MI sowie verschiedene Stämme der Mykoplasmenspezies MG, MS und MM überprüft. Dabei konnte ebenfalls keine Differenzierung zwischen *M. imitans* und MG erfolgen.

Eine Auflistung der speziesspezifischen PCRs für den Nachweis von MG mit für den Spezifitätsnachweis eingesetzten Mikroorganismen findet sich im Anhang Tabelle 2.

### *PCR Nachweise für MS*

Für den direkten Nachweis von MS entwickelten LAUERMAN et al. (1993) ein Primerpaar auf der Grundlage der Sequenz des 16S rRNS- Gens, das in der Veröffentlichung von MAROIS et al. (2000) durch die Verlängerung von zwei Nukleotiden am 5'- Ende modifiziert wurde. Die Überprüfung der Spezifität erfolgte anhand der DNS von neun verschiedenen aviären Mykoplasmenspezies.

ZHAO und YAMAMOTO (1993 a) beschreiben ein Primerpaar zum Nachweis von MS, wobei die Lage der Zielsequenz, an der die Primer ansetzen, nicht angegeben ist. Die Spezifität der PCR wurde mittels 17 verschiedener aviärer Mykoplasmenpezies bestätigt.

Eine Auflistung der speziesspezifischen PCRs für den Nachweis von MS mit für den Spezifitätsnachweis eingesetzten Mikroorganismen findet sich im Anhang Tabelle 3.

#### *PCR Nachweise für MM*

BOYLE et al. (1995) entwickelten ein Primerpaar zum speziesspezifischen Nachweis von MM. Mit diesem konnte die DNS von vier verschiedenen MM- Feldstämmen nachgewiesen werden. Der Nachweis der DNS von zehn anderen aviären Mykoplasmenpezies gelang jedoch nicht.

ZHAO und YAMAMOTO (1993 c) veröffentlichten ein Primerpaar, dessen Lage der Zielsequenz nicht bekannt ist. Anhand der DNS von 16 weiteren aviären Mykoplasmenpezies konnte die Spezifität dieses Primerpaares für MM bestätigt werden.

Eine Auflistung der speziesspezifischen PCRs für den Nachweis von MM mit für den Spezifitätsnachweis eingesetzten Mikroorganismen findet sich im Anhang Tabelle 3.

#### *PCR Nachweise für MI*

Zum Nachweis von MI wurden von KEMPF et al. (1994) zwei Primerpaare zur 16S rRNS-Gen Amplifikation entwickelt. Die Spezifitätsstudien wurden anhand der DNS von MI, MG, MS sowie weiterer nicht aviärer Mykoplasmen und Bakterienpezies durchgeführt. Hierbei traten jedoch bei der Untersuchung der DNS von MG, MS, *M. pneumoniae*, *A. laidlawii*, *B. subtilis*, *S. citri* und *E. coli* unspezifische Banden auf.

LAIGRET et al. (1996) entwickelten ein Primerpaar, das eine Gensequenz außerhalb der 16S rRNS, unmittelbar 5' des ribosomalen Genoperons von MI gelegen, amplifizierte. Die Spezifität der PCR konnte anhand der DNS von 18 verschiedenen aviären Mykoplasmen sowie *M. muris*, *A. laidlawii*, *Spiroplasma citri* und *E. coli* nachgewiesen werden.

Für den DNS-Nachweis von MI entwickelten ZHAO und YAMAMOTO (1993 b) ein Primerpaar, deren Lage der Zielsequenz nicht angegeben ist. Die Spezifität dieses Primerpaares wurde anhand der DNS von 16 weiteren aviären Mykoplasmenpezies festgestellt.

Aufgrund einer Sequenzanalyse der 16S rRNS entwickelten BOYLE et al. (1995) ein speziesspezifisches Primerpaar zum Nachweis von MI. Der Spezifitätsnachweis dieses Primerpaares erfolgte durch den Einsatz der DNS von elf verschiedenen aviären Mykoplasmenpezies.

Eine Auflistung der speziesspezifischen PCRs für den Nachweis von MI mit für den Spezifitätsnachweis eingesetzten Mikroorganismen findet sich im Anhang Tabelle 4.

WANG et al. (1997) beschrieben eine Multiplex- PCR für den Nachweis der pathogenen Mykoplasmenspezies MG, MS, MI und MM. Die verwendeten Primerpaare stammten für den MG- DNS Nachweis aus der Veröffentlichung von NASCIMENTO et al. (1991), für den MS- DNS Nachweis aus der Veröffentlichung von LAUERMAN et al. (1993) und für den Nachweis von MM und MI aus den Veröffentlichungen von ZHAO und YAMAMOTO (1993 a und b). Jedoch erfolgte die Testung der Spezifität dieser Multiplex- PCR nur mit diesen vier Vertretern der aviären Mykoplasmen.

Alle diese speziesspezifischen PCR-Nachweismethoden wurden für die Diagnose von Mykoplasmen bei Wirtschaftsgeflügel entwickelt. Deshalb erfolgte die Testung der Spezifität anhand von Mykoplasmenspezies, die vorwiegend bei dem Wirtschaftsgeflügel nachgewiesen werden. Eine Testung der Spezifität gegen alle bekannten aviären Mykoplasmen, einschließlich derjenigen, die bei Greifvögeln isoliert wurden, erfolgte mit Ausnahme der durch GARCIA et al. (2005) evaluierten MG- PCR, nicht.

Nach der verfügbaren Literatur sind keine spezifischen PCR- Nachweismethoden für Mykoplasmenspezies entwickelt worden, die gewöhnlich bei Greifvögeln isoliert werden (*M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis*, *M. gypis*).

OAKS et al. (2004 a) entwickelten einen seminested PCR- Nachweis auf der Grundlage der 16S rRNS von *Mycoplasma vulturii*, welcher bei Mönchsgeiern isoliert wurde. Dabei lagen das Primerpaar (160 und 529) des ersten PCR-Durchgangs auf konservierten Regionen der 16S rRNS- Sequenz, während in einem zweiten Durchlauf der Primer 160 mit dem Primer 455 eingesetzt wurde, der an einer Region der 16S rRNS ansetzte, die spezifisch für *Mycoplasma vulturii* war. Mittels dieser PCR konnte der Erreger direkt aus dem klinischen Untersuchungsmaterial nachgewiesen werden. Angaben über Sensitivität und Untersuchungen bezüglich der Spezifität liegen nicht vor (Anhang Tabelle 4).



### **2.3.2 Indirekter Nachweis**

#### *Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen Mykoplasmen*

Zahlreiche serologische Tests werden in der Literatur erwähnt. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden, eignet sich die Serologie vornehmlich für die Herdenuntersuchung des Wirtschaftsgeflügels. Zudem sind die kommerziell erhältlichen Untersuchungskits für das Wirtschaftsgeflügel entwickelt worden und Erfahrungen hinsichtlich anderer Vogelspezies liegen nicht vor. Der Vorteil der Serologie liegt im Vergleich zur Kultivierung in ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit.

Die gebräuchlichsten serologischen Untersuchungsmethoden stellen hierbei die Agglutination nach ADLER (1954), die Hämagglutinations- Hemmungsreaktion nach CRAWLEY und FAHEY (1957) sowie der Enzyme- Linked- Immunosorbent- Assay (ELISA) dar.