

3 Material und Methoden

3.1 Materialnachweis

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Bio Photometer 6131	Eppendorf AG, 22331 Hamburg
Einmalpipettenspitzen Safeseal- Tips®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland, USA
Elektrophoresekammer Horizon®11*14	LifetechnologiesTMGibco Brl, Galthersburg, USA
Heraeus B5060 EK - CO ₂	Heraeus, Hanau
iCycler iQ™	Biorad GmbH, Hilden
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau
Makrowellplatte	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Mikroliterpipetten	Abimed, Langenfeld
Minifuge GL	Heraeus, Hanau
Petrischale mit Nocken, 60,0 X 15 mm	Greiner bio- one, Frickenhausen
Pipettierhilfen	Integra Bioscience, Fernwald
Polyallomerröhrchen SW 28	Beckman Coulter, California, USA
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad, München
Power Supply Model 200/2.0	Bio-Rad, München
PP-Röhrchen, steril 5 ml	Greiner bio- one, Frickenhausen
Protran® Nitrozellulose-Transfer-Membran, 0,45µm	Schleicher & Schuell BioScience Inc., Keene, NH
Reaktionsgefäße Safe- Lock PCR- Clean 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Stereomikroskop Leica DMIL	Leica Mikroskope + Systeme GmbH, Wetzlar
Sterilfilter, Glasfiber Prefilter	Sartorius AG, Göttingen
Sterilfilter, Cellulose Nitrat Filter, 0,45 µm Porenweite	Sartorius AG, Göttingen
T3-Thermozykler	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifugen SW 28, SW 41	Beckman Coulter, California, USA
UV- Transilluminator Typ UVT 2053	Herolab, Wiesloch
Videodokumentationssystem Bioprint DS und Software BioCapt Vers. 97.05	LTF Labortechnik, Wasserburg
Vortex- Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zellkultur Testplatten 24	TPP, Schweiz
Zentrifugen Typ 5415C und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße Biopur (0,5ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße Safe- Lock 2ml	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2 Kits, Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
100 bp- DNS- Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
1kbp- DNS- Größenmarker	LifetechnologiesTMGibco Brl, Galthersburg, USA
Agar- Agar	LifetechnologiesTMGibco Brl, Galthersburg, USA
Agarose: MetaPhor® agarose (3 %ige Gele), Seakem® LE agarose (1,2 %ige Gele)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland, USA
Ampicillin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto - Agar	Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland, USA
Bovines Särumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Columbia - Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH, Wesel
Dextrose	Oxoid LTD., Hampshire, England
Ethidumbromid (1%)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hefeextrakt	Aus Bäckerhefe, Institutsherstellung
Invisorb Spin® DNS Extraction Kit	Invitek, Berlin
Kaninchen - Hyperimmunserum, 1:1000 Verdünnung (PBS)	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Hannover
L - Arginine	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Millipore Ultrafree® MC	Millipore Corporation, Bedford, USA
NAD	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer, Mannheim
Natriumhydroxyd- Plätzchen	Merck KgaA, Darmstadt
NH4 - Reaktionspuffer	Invitek, Berlin
Nukleasefreies Wasser	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Penicillin G	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenolrot	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pferdeserum	Oxoid, LTD., Hampshire, England
PPLO - Broth without Crystal Violet	Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland, USA
Primer	Carl Roth, Karlsruhe
QIAamp® DNS Mini Kit	Qiagen, Hilden
Ready-To-Go™ PCR Beads	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main und Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq PCR® Master Mix	Qiagen, Hilden
Titriplex III	Merck KgaA, Darmstadt
Ziege- anti- Kaninchen- Immunglobulin IgM + IgG (H+L chain specific), peroxidasegekoppelt, 1:1000 Verdünnung (PBS)	Southern Biotechnology Associates, Inc., Alabama, USA

Nicht aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden durch die Firma Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

3.2 Puffer, Kits, Zusätze und Medien

3.2.1 Lösungen, Puffer und Medien zur Mykoplasmen- Anzucht und Ernte

Ampicillin- Lösung (1 mg/ml)

Ampicillin		1,0 g
Aqua dest.	ad	100,0 ml

Die Lagerung erfolgte in 4 ml Portionen bei -20° C.

Phenolrot- Lösung

Phenolrot		0,5 g
NaOH 0,1m		14,1 ml
Aqua dest.	ad	500,0 ml

Die Lösung wurde 30 min im Dampftopf erhitzt und eine Sterilkontrolle auf Blutagar ausgestrichen und bebrütet.

Die Lagerung erfolgte in 8 ml Portionen bei -20 °C.

Penicillin- Lösung (100.000 U/ml)

Penicillin (1667 U/mg)		60, 0 mg
Aqua dest.	ad	1,0 ml

Die Lagerung erfolgte in 4 ml Portionen bei -20 °C.

NAD- Lösung 1 %ig

NAD		0,5 g
Aqua dest.	ad	50,0 ml

Die Lösung wurde mit 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert.
Die Lagerung erfolgte in 4 ml Portionen bei -20 °C.

Glucose- Lösung 10 %ig

Glucose		20,0 g
Aqua dest.	ad	200,0 ml

Die Lösung wurde auf pH 7,8 - 8,0 eingestellt und mit einer Porenweite von 0,2 µm sterilfiltriert.
Die Lagerung erfolgte in 4 ml Portionen bei -20 °C.

Arginin- Lösung 10 %ig

Arginin		20,0 g
Aqua dest.	ad	200,0 ml

Die Lösung wurde auf pH 7,0 eingestellt und mit 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert.
Die Lagerung erfolgte in 4 ml Portionen bei -20 °C.

Schweineserum

45 min bei 56 °C inaktivieren

Hefe- Extrakt aus Bäckerhefe

Frischhefe	500,0 g
Aqua dest.	500,0 ml

Die Frischhefe wurde in Aqua dest. vermischt und unter Rühren bis zum Siedepunkt erhitzt.

Die Suspension wurde bei 4000 U/min 20 min zentrifugiert und der Überstand mit NaOH auf einen pH von 8,0 eingestellt.

Es folgte eine Sterilfiltration mit einem Membranfilter von 0,8 µm als Vorfilter und einer folgenden Filtration mit einer Porenweite von 0,45 µm.

Die Lagerung erfolgte in 40 ml Portionen bei -20 °C.

SP4- Flüssigmedium nach BRADBURY (1998)

Teil A:

Difco PPLO		5,88 g
Aqua dest.	ad	280,00 ml

Die Lösung wurde autoklaviert.

Teil B:

Schweineserum	60 ml
Hefeextrakt	40 ml
NAD- Lösung 1%	4 ml
Glucose- Lösung 10 %	4 ml
Arginin- Lösung 10 %	4 ml
Ampicillin- Lösung 1 %	4 ml
Penicillin- Lösung (100.000 U)	4 ml
Phenolrot- Lösung 0,1 %	8 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Teil A und B wurden im Wasserbad auf 56 °C erwärmt und zusammengeführt.

Die Lagerung erfolgte in 2,3 ml Portionen bei -20 °C

SP4- Agar Medium nach BRADBURY (1998)

Teil A:

Bacto Agar		4,00 g
Difco PPLO		5,88 g
Aqua dest.	ad	280,00 ml

Teil B:

Schweineserum		60 ml
Hefeextrakt		40 ml
NAD- Lösung 1%		4 ml
Glucose- Lösung		4 ml
Arginin- Lösung 10 %		4 ml
Ampicillin- Lösung 1 %		4 ml
Penicillin- Lösung (100.000 U)		4 ml

Das Medium wurde autoklaviert.

Teil A und B wurden im Wasserbad auf 56 °C erwärmt, zusammengeführt und jeweils 4,5 ml auf Platten gegossen.

EDTA- Lösung (0,5 M)

NA ₂ EDTA x 2 H ₂ O		186,1 g
Natriumhydroxid- Plätzchen		20,0 g
Aqua dest.	ad	1000,0 ml

Die Einstellung des pH- Wertes auf 7,5 - 8,0 erfolgte mit NaOH.

Waschpuffer (0,1 M EDTA, 0,25 M NaCl)

NA ₂ EDTA x 2 H ₂ O		37,22 g
NaCl		14,61 g
Natriumhydroxid- Plätzchen		4,00 g
Aqua dest.	ad	1000,00 ml

Die Einstellung des pH-Wertes auf 8,0 erfolgte mit NaOH.

3.2.2 Lösungen, Puffer, Konjugate und Antiseren für den Immuno- Binding- Assay (IBA)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, Phosphate Buffered Saline)

NaCl		137,00 mM
KCl		1,47 mM
KH ₂ PO ₄		1,47 mM
Na ₂ HPO ₄		6,46 mM
Aqua dest.	ad	1000,00 ml

Der pH- Wert wurde auf pH 7,2 eingestellt.

Chlornaphtol- Lösung

4- Chlor- 1- naphtol		10,0 mg
Methanol (100%ig (v/v))		4,0 ml

Chlornaphtol- Substratlösung für Farbreaktion

Chlornaphtol- Lösung	4,0 ml
PBS	20,0 ml

Die Chlornaphtol- Lösung wurde unter Rühren vermischt und mit 20 µl 30%ige (v/v) H₂O₂- Lösung versetzt.

Konjugat

Ziege- anti- Kaninchen- IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, Fc und Fab), (H+L)PO

Antiseren

Für die Untersuchung wurden Kaninchen- Hyperimmunseren verwandt welche in Tabelle 8 aufgeführt sind. Die Seren wurden vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover sowie durch Prof. J. M. Bradbury von der Universität Liverpool U.K. zur Verfügung gestellt.

3.2.3 Puffer und Kits für die PCR- Durchführung

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, Phosphate Buffered Saline)

NaCl	137,00 mM
KCl	1,47 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
Na ₂ HPO ₄	6,46 mM

Der pH- Wert wurde auf pH 7,4 eingestellt.

QIAamp® DNS Mini Kit zur DNS- Extraktion

Proteinase K (20 mg/ml)
Lysispuffer ATL und AL
QIAamp® Filterröhrchen
Waschpuffer AW 1 und AW 2
Elutionspuffer AE

Taq PCR® Master Mix

In einem Endvolumen von 50 µl sind enthalten:

1,25 Einheiten Taq- DNS- Polymerase
1,5 mM MgCl₂
200 µM je dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

Ready- To- Go™ PCR Beads

PCR- Gefäße, die im vorgesehenen Endvolumen von 25 µl enthalten:

1,5 Einheiten Taq- DNS- Polymerase
10 mM Tris- HCl (pH 9,0)
50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
Stabilisatoren, einschließlich Bovines Serumalbumin (BSA)
200 µM je dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

3.2.4 Puffer und Zusätze für die Gelelektrophorese

Tris- Borat- Puffer (10x TBE-Puffer)

Tris- HCl	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA Dinatriumsalz	20 mM

Der pH- Wert wurde auf pH 8,0 eingestellt.

Probenladepuffer

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

30,0% Glycerin

Größenmarker 100 bp

30 µl 100 bp- DNS- Größenmarker (0,5 µg DNS/µl)

30 µl Probenladepuffer

185 µl ddH₂O

Größenmarker 1 kbp

30 µl 1 kbp- DNS- Größenmarker (1 µg DNS/µl)

50 µl Probenladepuffer

200 µl ddH₂O

3.2.5 Gel- Reinigung von PCR- Produkten

Invisorb Spin[®] DNS Extraction Kit zur Aufreinigung von PCR- Produkten

Gel- Lösungspuffer (Gel Solubiliser S)

Bindungspuffer (Binding Enhancer)

Filtersäulen

Waschpuffer

Elutionspuffer

3.3 Mykoplasmen und Bakterien

3.3.1 Bezeichnung und Herkunft

Zur Überprüfung der Spezifität der Polymerase- Kettenreaktion wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Spezies der Klasse *Mollicutes* und der zellwandtragenden Bakterien eingesetzt. Die Optimierung sowie die Sensitivitätsprüfungen der jeweiligen Polymerase- Kettenreaktionen wurden mit den in Tabelle 2 aufgeführten Referenzstämmen der jeweiligen Nachweismethode durchgeführt.

Tab. 2:

Mykoplasmen Referenzstämme und Bakterienstämme

Referenzstamm	Referenzstamm
<i>Mycoplasma anatis</i> 1340 ¹	<i>Mycoplasma arginini</i> NC 10129 ²
<i>Mycoplasma anseris</i> 1219 ¹	<i>Mycoplasma arthrididis</i> NC 10162 ²
<i>Mycoplasma buteonis</i> Bb/T2g ¹	<i>Mycoplasma canis</i> NC 10146 ²
<i>Mycoplasma corogypsi</i> BV1 ¹	<i>Mycoplasma equigenitalium</i> T37 ²
<i>Mycoplasma cloacale</i> 383 1 ¹	<i>Mycoplasma felis</i> CO ²
<i>Mycoplasma columborale</i> MMP-4 ¹	<i>Mycoplasma fermentans</i> NC 10117 ²
<i>Mycoplasma columbinasale</i> 694 ¹	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> ATC 23839 ²
<i>Mycoplasma columbinum</i> MMP-1 ¹	<i>Mycoplasma salivarium</i> NC 10113 ²
<i>Mycoplasma falconis</i> H/T1 ¹	<i>Mycoplasma spumans</i> PG 3 ²
<i>Mycoplasma gallopavonis</i> 1197 ¹	
<i>Mycoplasma gallinarum</i> 1504 ¹	<i>Acholeplasma laidlawii</i> NC 10116 ²
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> 75969 ¹	<i>Pasteurella avium</i> 1158 ²
<i>Mycoplasma gallinaceum</i> 887 ¹	<i>Pasteurella gallinarum</i> 1586 ²
<i>Mycoplasma glycyphilum</i> 486 ¹	<i>Pasteurella multocida</i> 338 ²
<i>Mycoplasma gypis</i> B1/T1 ¹	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9380 ²
<i>Mycoplasma iowae</i> DK-CPA ¹	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> FI ³
<i>Mycoplasma imitans</i> 4229 ¹	<i>Salmonella typhimurium</i> FI ³
<i>Mycoplasma iners</i> D1-E3 ¹	<i>Escherichia coli</i> FI ³
<i>Mycoplasma lipofaciens</i> R171 ¹	
<i>Mycoplasma meleagridis</i> 17529 ¹	
<i>Mycoplasma pullorum</i> 111R ¹	
<i>Mycoplasma sturni</i> ATCC 51945 ¹	
<i>Mycoplasma synoviae</i> NVU 1853 ¹	

¹ zur Verfügung gestellt durch IOM, International Organisation for Mycoplasmaology, Department of Veterinary Pathobiology, Purdue University, IN, USA

² zur Verfügung gestellt durch das Institut für Mikrobiologie, Freie Universität Berlin, Deutschland

³ Feldisolat aus dem Institut für Geflügelkrankheiten, Freie Universität Berlin, Deutschland

3.3.2 Herkunft des Probenmaterials

In der Zeit von Mai 2002 bis September 2004 wurden jeweils zwei Trachealtupferproben von insgesamt 60 Greifvögeln genommen. Dabei handelte es sich um Wildgreifvögel aus verschiedenen Auffangstationen sowie um Greifvögel aus falknerischer Haltung. Zusätzlich wurden im Zuge eines routinemäßigen Beringungsprogramms von Greifvogelnestlingen Proben gesammelt (Tab 3 - 7).

Tab. 3:

Trachealtupferproben Falken

Probennr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung
Wanderfalke (<i>Falco peregrinus</i>)				
GD8	adult	♂	Berlin	Bestand
GD12	adult	♀	Berlin	Bestand
GD13	adult	♂	Berlin	Bestand
M15	adult	♀	Berlin	Bestand
M24	adult	♂	Berlin	Bestand
M25	adult	♀	Mönchengladbach	Bestand
M26	adult	♀	Ennepetal	Bestand
M42	adult	♂	Brandenburg	Bestand
Turmfalke (<i>Falco tinnunculus</i>)				
M14	juvenil	♀	Berlin	Fundtier
M73	adult	♀	Berlin	Fundtier
M81	adult	♂	Berlin	Fundtier
M82	adult	♂	Berlin	Fundtier
M129	juvenil	♂	Berlin	Fundtier
Baumfalke (<i>Falco subbuteo</i>)				
M130	adult	♀	Brandenburg	Fundtier
Berberfalke (<i>Falco pelegrinoides pelegrinoides</i>)				
GD9	adult	♀	Berlin	Bestand
GD10	adult	♂	Berlin	Bestand
Sakerfalke (<i>Falco cherrug</i>)				
M17	adult	♂	Nordrhein-Westfalen	Bestand
M31	adult	♀	Nordrhein-Westfalen	Bestand
Gerfalke (<i>Falco rusticolus</i>)				
M146	adult	♀	Hamburg	Bestand
Ger- Sakerfalke Hybridfalke				
M27	adult	♀	Nordrhein-Westfalen	Bestand
M28	adult	♀	Nordrhein-Westfalen	Bestand

Tab. 4:

Trachealtupferproben Habicht (*Accipiter gentilis*)

Probennr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung
Habicht (<i>Accipiter gentilis</i>)				
M5	juvenil	♀	Berlin	Fundtier
M48	adult	♀	Brandenburg	Bestand
M55	adult	♀	Berlin	Bestand
M57	adult	♀	Berlin	Fundtier
M59	adult	♂	Berlin	Bestand
M60	adult	♂	Berlin	Bestand
M62	adult	♀	Berlin	Bestand
M111	juvenil	♀	Brandenburg	Beringung
M112	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung
M113	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung
M114	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung
M115	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung
M116	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung
M117	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung
M138	adult	♀	Berlin	Bestand
M150	adult	♀	Brandenburg	Fundtier
M151	adult	♂	Berlin	Fundtier
M152	adult	♀	Brandenburg	Fundtier

Tab. 5:

Trachealtupferproben Mäusebussard (*Buteo buteo*)

Probennr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung
Mäusebussard (<i>Buteo buteo</i>)				
M45	adult	♂	Berlin	Fundtier
M65	adult	♀	Brandenburg	Fundtier
M66	adult	♂	Brandenburg	Fundtier
M118	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung
M119	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung
M120	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung
M121	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung

¹aufgrund des Alters konnte keine Geschlechtsbestimmung durchgeführt werden

Tab. 6:

Trachealtupferproben Rotmilan (*Milvus milvus*)

Probennr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung
Rotmilan (<i>Milvus milvus</i>)				
M122	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung
M123	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung
M124	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung
M125	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung
M126	juvenil	? ¹	Brandenburg	Beringung

¹ aufgrund des Alters konnte keine Geschlechtsbestimmung durchgeführt werden

Tab. 7:

Trachealtupferproben anderer Greifvögel und Eulen

Probennr.	Art	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung
M19	Rohrweihe (<i>Circus aeroginosus</i>)	adult	♀	Berlin	Fundtier
M72	Schleiereule (<i>Tyto alba</i>)	adult	♀	Berlin	Fundtier
M110	Steinadler (<i>Aquila chrysaetos</i>)	adult	♂	Nordrhein- Westfalen	Bestand
M137	Mönchsgeier (<i>Aegypius monachus</i>)	adult	♂	Mecklenburg- Vorpommern	Bestand
M141	Gänsegeier (<i>Gyps fulvus</i>)	adult	♂	Bayern	Bestand
M142	Gänsegeier (<i>Gyps fulvus</i>)	adult	♂	Mecklenburg- Vorpommern	Bestand
M143	Kauz (<i>Strix aluco</i>)	adult	♂	Berlin	Fundtier
M144	Gänsegeier (<i>Gyps fulvus</i>)	adult	♂	Bayern	Bestand
M145	Uhu (<i>Bubo bubo</i>)	adult	♂	Brandenburg	Bestand

3.3.3 Kultivierung der Referenzstämmе

Die Mykoplasmenreferenzstämmе wurden in dem unter 3.2.1 aufgeführten SP4-Flüssignährmedium vermehrt. Lyophilisate wurden hierzu in 2 ml Flüssigmedium gelöst und bei 37 °C in einer 5%igen CO₂- Atmosphäre bebrütet, bis es zu einem Farbumschlag von rot auf gelb kam oder sich auf den Festmedien ein Wachstum von Mykoplasmen nachweisen ließ, da nicht alle Mykoplasmenspezies diesen pH- bedingten Farbumschlag aufweisen. Parallel dazu erfolgte der Ausstrich dieser gelösten Lyophilisate auf SP4- Agar- Platten als Wachstumskontrolle, die unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Nach positiver Wachstumskontrolle oder nach dem Farbumschlag des Mediums wurden die Kulturen im Verhältnis 1:10 in Flüssigmedium subkultiviert. Jeweils 0,1 ml der Kulturen wurden als Wachstumskontrolle auf den entsprechenden festen SP4- Nährboden sowie, um eine bakterielle Kontamination auszuschließen, auf Blutagar ausgestrichen. Nach Ausschluss einer bakteriellen Kontamination und dicht gewachsener Wachstumskontrolle wurde der restliche Teil bei -80 °C eingefroren und/oder für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.3.4 Bakterienstämmе

Von den entsprechenden dicht bewachsenen festen Nährböden, die die jeweiligen Institute zur Verfügung gestellt hatten (Tab. 2), wurden die Bakterienkolonien der Reinkulturen mit einem Tupfer aufgenommen und für die DNS-Extraktion in 180 µl ATL- Lysispuffer suspendiert und sofort, wie unter 3.4.3 beschrieben, die DNS extrahiert.

3.3.5 Probennahme bei den Tieren

Von jedem Tier wurden zwei Trachealtupferproben genommen. Dazu wurden die zu untersuchenden Tiere an dem Kopf und an den Ständern fixiert. Durch Einführen von Daumen und Zeigefinger der fixierenden Hand in die Schnabelwinkel wurde der Schnabel geöffnet und offen gehalten. Die Zunge wurde mit zwei Fingern herausgezogen, um die am

Zungengrund befindliche Trachealöffnung vorzulagern. Bei der Inspiration der Tiere und der damit verbunden Öffnung der Trachea konnte der Tupfer in die Trachea eingeführt werden, ohne dass die Schleimhaut der Schnabelhöhle berührt wurde. Der Tupfer wurde dann mehrmals an der Trachealwand entlang auf und ab bewegt, um auch Schleimhautzellen der Trachealwand zu gewinnen. Der zur Kultivierung bestimmte Trachealtupfer wurde zuvor mit zimmerwarmen SP4- Medium angefeuchtet und nach Probennahme zur Kultivierung, wie unter 3.3.6. beschrieben, weiter verwendet.

Die Tupferprobe für die PCR-Untersuchung erfolgte analog zu der oben beschriebenen Methode, mit dem Unterschied, dass der Tupfer vorher nicht mit Medium befeuchtet wurde. Diese Tupferproben wurden, wie unter 3.4.3 beschrieben, für die PCR- Untersuchung weiterbearbeitet.

3.3.6 Kultivierung der Trachealtupferproben

Nach der Entnahme der Trachealtupfer wurden diese direkt in 2,3 ml auf Zimmertemperatur aufgewärmtes SP4- Flüssigmedium überführt, sorgfältig darin ausgedrückt und das Medium anschließend gut durchgemischt.

200 µl dieses Flüssigmediums wurden in ein weiteres Röhrchen mit 2,3 ml SP4- Flüssigmedium überführt und gemischt. Aus dieser Verdünnung 1 wurden wiederum 200 µl für eine Verdünnung 2 in ein weiteres Röhrchen mit SP4- Flüssigmedium überführt. Von dem Originalmedium wurden sofort 100 µl und von der Verdünnung 1 und 2 jeweils 50 µl auf einer Petrischale mit SP4- Agar ausgestrichen und bei 37 °C und einem CO₂- Gehalt von 5 % inkubiert (Abb. 1).

Auch die Flüssigmedien wurden solange unter gleichen Bedingungen inkubiert, bis es zu einem Farbumschlag von rot auf gelb kam oder sich auf den Festmedien ein Wachstum von Mykoplasmen nachweisen ließ, da nicht alle Mykoplasmenpezies diesen pH- bedingten Farbumschlag aufweisen. Im Falle eines Farbumschlages erfolgte erneut eine Kultivierung auf SP4- Agarplatten.

Da es zu Adaptationsschwierigkeiten von Feldstämmen auf die Medien kommen kann und dadurch eventuell kein Wachstum auf den Festmedien erfolgt, wurden die Flüssigmedien ohne einen Farbumschlag nach 5 bis 7 Tagen nochmals auf SP4 - Agarplatten subkultiviert und unter gleichen Bedingungen für 7 Tage inkubiert.

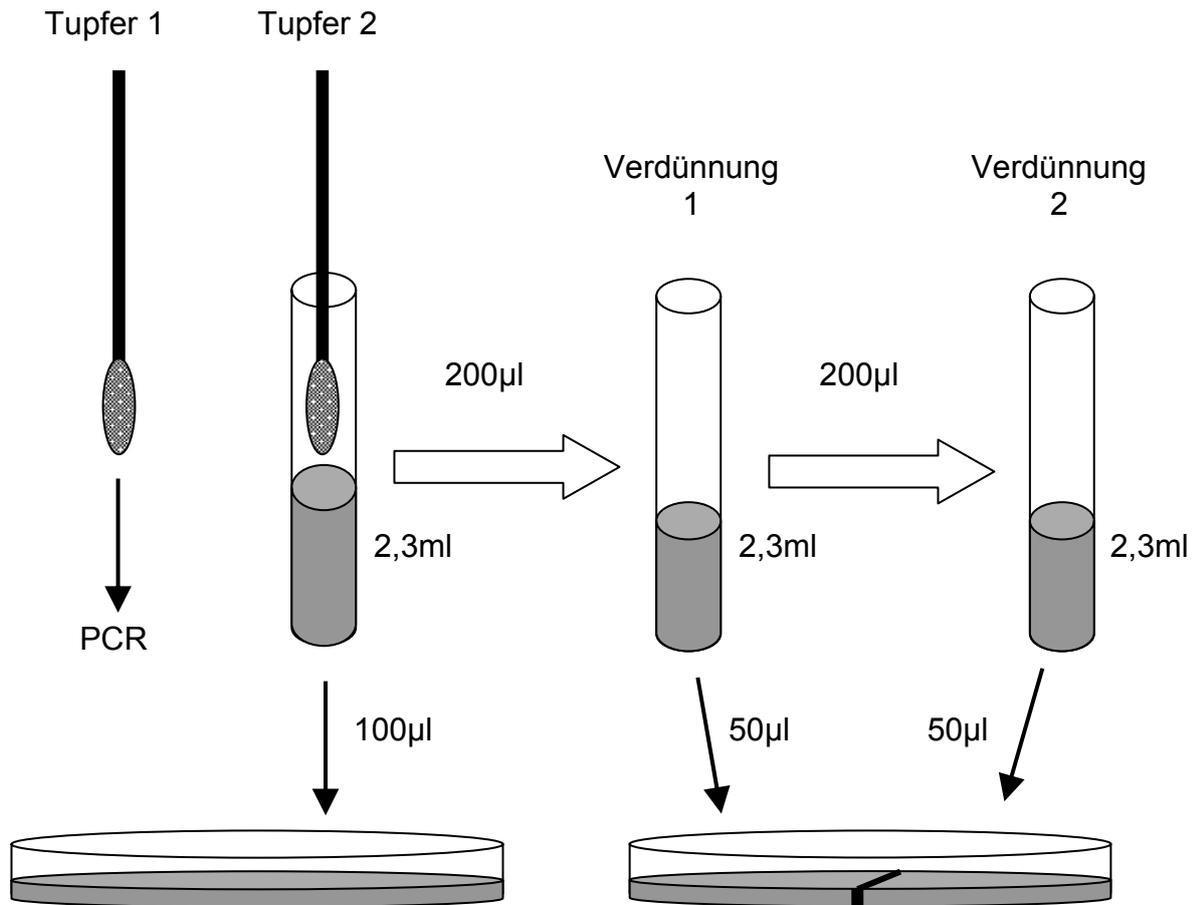


Abb. 1:

Trachealtupferentnahme. Es wurden jeweils 2 Trachealtupfer entnommen. Einer diente dem direkten PCR- Nachweis, der andere wurde für die Anzucht in SP4- Flüssigmedium überführt und gemischt. Von diesem Medium wurden wiederum 200 µl in SP4- Flüssigmedium überführt und ebenfalls gemischt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Von der originalen Flüssigkultur wurden 100 µl auf eine SP4- Festmediumplatte und von den entstandenen Verdünnungen 1 und 2 jeweils 50 µl auf eine geteilte SP4- Festmediumplatte ausgestrichen.

3.3.7 Differenzierung der isolierten Feldstämme mittels Immuno- Binding- Assay (IBA) nach KOTANY und McGARRITY (1985)

Die isolierten Feldstämme wurden mittels des IBA nach KOTANY und McGARRITY (1985) differenziert. Zur Transferierung der Mykoplasmen auf Nitrocelluloseplättchen wurden 8 Nitrocellulose (NC)- Filter auf eine gut bewachsene Agarplatte gelegt, die nach 10 min mit

der koloniebedeckten Seite nach oben in die Vertiefungen einer Makrowellplatte überführt wurden. Die NC- Filter wurden daraufhin eine Stunde mit 100 µl der jeweils verschiedenen 1:1000 verdünnten Kaninchenhyperimmunseren (Tab. 8) inkubiert und anschließend dreimal für je 5 min mit 3 ml PBS gewaschen. Mittels 100 µl eines zweiten Peroxidase- konjugierten Antikörpers (Ziege- anti- Kaninchen- IgG in einer Verdünnung von 1:1000), der gegen den ersten Antikörper gerichtet war, kommt es in einem einstündigen Inkubationsschritt zu einer Bindung des Peroxidase- konjugierten Antikörpers an den Antigen- Antikörperkomplex. Reste des eingesetzten Hyperimmunserums wurden durch dreimaliges waschen mit 3 ml PBS entfernt. Die Sichtbarmachung des immunologischen Komplexes erfolgte durch die Oxidation des 4- Chlor- 1- Naphtol der Substratlösung durch die Peroxidase, wobei im positiven Fall ein blauer Farbkomplex entstand. Nach 5 bis 10 min wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Die Inkubations- und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler durchgeführt. Nach dem Trocknen der Nitrocellulose erfolgte die Auswertung unter dem Stereomikroskop bei 32 - 50facher Vergrößerung. Positive Kolonien stellten sich dabei blauviolett dar, während negative weiß (ungefärbt) erschienen.

Tab. 8:

In der IBA eingesetzte Antiseren

Kaninchenhyperimmunserum gegen	Verdünnung
<i>Mycoplasma buteonis</i> Bb/T2g ¹	1:1000 (PBS)
<i>Mycoplasma corogypsi</i> BV ¹	1:1000 (PBS)
<i>Mycoplasma falconis</i> H/T1 ¹	1:1000 (PBS)
<i>Mycoplasma gypis</i> ¹	1:1000 (PBS)
<i>Mycoplasma synoviae</i> WVU 1853 ¹	1:1000 (PBS)
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> PG 31 ²	1:1000 (PBS)
<i>Mycoplasma iowae</i> 695 ²	1:1000 (PBS)
<i>Mycoplasma meleagridis</i> 17529 ²	1:1000 (PBS)

¹ zur Verfügung gestellt durch das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover

² zur Verfügung gestellt durch Prof. J. M. Bradbury, University of Liverpool, U.K.

3.3.8 Bestimmung der Keimzahl

Zur Sensitivitätsbestimmung der verschiedenen PCR- Nachweismethoden wurden Verdünnungsreihen der entsprechenden Mykoplasmenkulturen in der PCR eingesetzt. Die Anzahl der vermehrungsfähigen Keime in Flüssigkulturen (Koloniebildende Einheiten, KbE) wurde nach einer modifizierten Methode von ALBERS und FLETCHER (1982) bestimmt. Hierfür wurden für einen Doppelansatz je 150 µl SP4- Medium in zwei Reihen einer 12 Well - Mikrotiterplatte vorgelegt. Durch Zugabe von je 50 µl der zu untersuchenden Kultur in die erste Vertiefung der beiden Reihen, Mischen und Weiterüberführen von je 50 µl von einer Vertiefung in die Nächste, wurden zwei 1:4 Verdünnungsreihen hergestellt. Die Verdünnungen in den einzelnen Wells betragen somit 1: 4, 1: 16, 1: 64, 1: 256, 1: 1024, 1: 4096, 1: 16384, 1: 65536, 1: 262144, 1: 1048576, 1: 4194304, 1: 1677216.

Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 10 µl auf eine SP4- Agarplatte getropft und bis zu einem deutlichen Wachstum der Kolonien (mind. 4, max. 10 Tage), bei 37 °C und 5% CO₂- Gehalt bebrütet. Die Ausgangskultur wurde während der Bebrütungszeit bei -80 °C aufbewahrt. Die Auszählung der Kolonien erfolgte unter einem Stereomikroskop bei 20 - 50facher Vergrößerung, wobei nur diejenigen Verdünnungsstufen berücksichtigt wurden, die 10 - 50 Kolonien pro Inokulum aufwiesen. Aus dem Mittelwert des Doppelansatzes wurde nach folgender Formel die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Volumen Flüssigkultur errechnet:

$\text{KbE/ml} = \text{Durchschnittlich gezählte Kolonien} \times 100 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

3.4 Ernte der Mykoplasmenzellen und DNS- Aufbereitung

3.4.1 Ernte der Mykoplasmenzellen nach PFLITSCH (1994)

Für den Einsatz der Mykoplasmenreferenzstämme bzw. ihrer Mykoplasmen- DNS in der PCR Etablierung sowie als Positivkontrollen erfolgte die Ernte der kultivierten Mykoplasmenstämme nach PFLITSCH (1994).

Hierzu wurden die Referenzstämme wie unter 3.3.3. beschrieben kultiviert. Parallel dazu erfolgte ein Ausstrich der Referenzstammlösung auf eine SP4- Agar Platte, die als

Wachstumskontrolle diente und unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Nach Farbumschlag des Flüssigmediums, bzw. dichtem Wachstum auf dem SP4- Festmedium, wurde die Flüssigkultur in ein Eisbad gestellt und mit 0,5 ml EDTA (0,5 mol/l, pH 8,0) vermengt. Dadurch wurde die Aktivität freier Nukleasen gesenkt. Durch Zentrifugation bei 25000 g, 4 °C über 45 min wurden die Mykoplasmen anschließend sedimentiert. Zur Entfernung der restlichen Serumproteine des Mediums wurde das Zellpellet mit 1 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut bei 34000 g, 4 °C über 30 min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das gewaschene Pellet wurde nun entweder mit 100 µl Waschpuffer überschichtet und bei -80 °C gelagert oder sofort in die DNS- Präparation (3.4.2) eingesetzt.

3.4.2 Aufbereitung der Kulturmedien und Trachealtupfer

Zur Präparation der DNS aus den Kulturmedien und den Trachealtupfern für den Einsatz in der PCR erfolgte eine DNS- Extraktion. Diese wurde mittels des QIAamp® DNS Mini Kit durchgeführt. Die Bezeichnungen der Puffer stammen vom Hersteller. Zur Zentrifugation wurde eine Eppendorfzentrifuge (5415C) und zum Mischen der Proben das Vortex- Genie™ auf Stufe 6 eingesetzt. Die Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4.3 DNS- Extraktion

Zur DNS-Extraktion wurde das aus der Anzucht der Referenzstämme erhaltene Zellpellets (3.4.1) in 20 µl Proteinase K und 180 µl Lysispuffer ATL gelöst. Wurde das Zellpellet zur Lagerung wie unter 3.4.1 beschrieben in 100 µl Waschpuffer gelöst, erfolgte zur Gewinnung des Pellets zuvor eine Zentrifugation bei 34000 g, 4 °C über 30 min. Die Trachealtupferproben der untersuchten Greifvögel wurden direkt in 180 µl Lysispuffer ATL und 20 µl Proteinase K gelöst. Nach sorgfältigem Mischen mittels des Vortex- Genies™ wurde das Gemisch 1 h im Wasserbad bei 56 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 180 µl

Lysispuffer AL wurde das Gemisch für 10 min in einem Wasserbad von 70 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 210 µl eiskaltem, absoluten Ethanol und gründliches Mischen. Diese Suspension wurde auf das mitgelieferte Filtrerröhrchen überführt und für 1 min bei 8.000 rpm (5200 x g) zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und 500 µl Waschpuffer AW 1 auf den Filter gegeben. Nach erneuter, gleichzeitiger Zentrifugation für 1 min wurde das Filtrat wieder verworfen, und es erfolgte ein zweiter Waschschrift durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW 2 und eine hochtourige Zentrifugation für 3 min bei 14.000 rpm (15800 x g). Das Filtrat wurde verworfen. Nach Zugabe von 100 µl des bei 70 °C vorgewärmten Elutionspuffers AE erfolgte eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die DNS durch Zentrifugation für 1 min bei 8.000 rpm (5200 x g) aus dem Filter eluiert.

Die bereitgestellten Bakterienspezies wurden direkt mit einem Tupfer von den dicht bewachsenen Agarplatten genommen und zur DNS- Extraktion analog wie die Trachealtupferproben der Greifvögel behandelt.

3.4.4 DNS- Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung und Abschätzung der Reinheit der DNS wurde anhand der optischen Dichte (OD) mittels einer Absorptionsmessung mit dem Spektralphotometer (Bio Photometer 6131, Eppendorf AG) durchgeführt. Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der in ihnen enthaltenen Basen ultraviolettes Licht zwischen 250 nm und 270 nm Wellenlänge und zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt dagegen bei 280 nm und beruht vor allen Dingen auf dem Gehalt von Tyrosin- und Tryptophan- Resten. Bei 260 nm Wellenlänge und 1 cm Schichtdicke der Quarzküvette entspricht eine OD von 1 ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS, 40 µg/ml einzelsträngiger DNS oder RNS oder 20 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Unter gleichen Bedingungen enthalten reine Proteinlösungen bei 280 nm 1,8 mg Protein pro ml (SAMBROOK et al. 1989).

3.5 Etablierung der Polymerasekettenreaktionen (PCR) zum Nachweis von verschiedenen aviären Mykoplasmen bei Greifvögeln

Für die bei Greifvögeln beschriebenen Mykoplasmen sind bislang, mit Ausnahme von *M. vulturii* bei Mönchsgeiern (OAKS et al., 2004 a), noch keine Nachweismethoden auf der Grundlage der PCR entwickelt worden.

Aus diesem Grund war es Ziel, eine PCR zum Nachweis der Mykoplasmenspezies *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. gypis* und *M. falconis* zu entwickeln.

Darüber hinaus sollte eine PCR zum Nachweis der DNS aller Mykoplasmen entwickelt werden, um mögliche noch nicht beschriebene Mykoplasmen bei Greifvögeln zu erfassen.

Letztlich sollten die entnommenen Greifvogelproben auch auf die geflügelpathogenen Mykoplasmenspezies MG, MS, MI und MM untersucht werden. Bei der Untersuchung zum Nachweis von DNS der Mykoplasmenspezies MS und MM wurde hierbei auf ein Primerpaar aus der Literatur zurückgegriffen. Da diese jedoch nicht gegen alle bekannten Mykoplasmenspezies, insbesondere derer, die bei Greifvögeln beschrieben worden sind, getestet wurden, erfolgte hier ebenfalls eine Evaluierung der Spezifität und Sensitivität.

Die Polymerasekettenreaktion für den zum Nachweis der DNS aller aviären Mykoplasmen (Multispezies- PCR) erfolgte unter Verwendung des Kits Ready- To- Go™ PCR Beads.

Die Durchführungen der speziesspezifischen Polymerasekettenreaktionen erfolgten unter Verwendung des Kits Taq PCR Master Mix.

3.5.1 Primerauswahl

Die für die zu etablierenden PCR- Methoden eingesetzten Primerpaare wurden so gewählt, dass von ihnen ein Bereich der 16S rRNS der jeweiligen Mykoplasmenspezies amplifiziert wurde, da dieser Bereich für alle bekannten Mykoplasmen als Gensequenz in der Genbank® zur Einsicht zu Verfügung steht und somit ein Vergleich der 16S rRNS- Sequenzen aller bekannten aviären Mykoplasmen ermöglichte.

Die jeweiligen Primerpaare wurden bei der Firma C. Roth, Karlsruhe, synthetisiert und sind in den Tabellen 15 und 16 wiedergegeben.

3.5.1.1 Bereits in der Literatur beschriebene Primerpaare

Zum Nachweis von MS wurde das Primerpaar aus der Veröffentlichung von MAROIS et al. (2000) und nach LAUERMAN et al. (1993) ausgewählt (Tab. 15). Diese basieren auf der Gensequenz des 16S rRNS- Gens von *Mycoplasma synoviae*. Das durch die PCR zu erwartende Amplifikat besitzt eine Größe von 211 bp.

Ebenfalls aus der Literatur entnommen wurde das Primerpaar zur Detektion von MM- DNS. Die Primer dieser, von BOYLE et al. (1995) entwickelten, PCR sind in Tabelle 15 angegeben. Das zu erwartende Amplifikat dieser PCR besitzt eine Größe von 422 bp.

3.5.1.2 Selbstentwickelte Primerpaare zum Nachweis aviärer Mykoplasmen

Grundlage für den Nachweis aller Mykoplasmen (Multispezies- PCR) stellt die PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992) dar. Für die Modifikation dieser PCR- Nachweismethode sowie die Konstruktion von Primerpaaren zum Nachweis von MG und MI und den bei Greifvögeln häufig nachgewiesenen Mykoplasmenspezies *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis* wurde anhand der veröffentlichten Genbank®-Sequenzen (NCBI, USA) des 16S rRNS- Gens der 24 verschiedenen aviären Mykoplasmen (Tab. 9) unter Verwendung des PC- Programms ClustalW 1.8 (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany) (HIGGINS et al., 1996) ein Sequenzvergleich der 16S rRNS- Sequenzen durchgeführt.

Aufbauend auf spezifischen Nukleotidaustauschen innerhalb dieses Sequenzabschnittes konnte die Konstruktion spezifischer Oligonukleotide für die jeweils nachzuweisende Mykoplasmenspezies erfolgen. Diese sind in Tabelle 15 und 16 des Ergebnisteils dargestellt. Die ausgewählten Oligonukleotidsequenzen wurden anschließend auf ihre Spezifität mittels des Online- Programms Blast (NCBI, USA) (ALTSCHUL et al., 1990) mit den in der Genbank® (NCBI, USA) gespeicherten DNS- Sequenzen verglichen.

Tab. 9:

16S rRNS Gen- Sequenzen mit den dazugehörigen GenBank® accession numbers, die für die Primerkonstruktion zu einem Sequenzvergleich verwendet wurden.

16S rRNS - Sequenz von	GenBank® accession numbers
<i>Mycoplasma anatis</i>	AF412970
<i>Mycoplasma anseris</i>	AF125584
<i>Mycoplasma buteonis</i>	AF412971
<i>Mycoplasma cloacale</i>	AF125592
<i>Mycoplasma columbinum</i>	AF221113
<i>Mycoplasma columbinasale</i>	AF221112
<i>Mycoplasma columborale</i>	AF412975
<i>Mycoplasma corogypsi</i>	L08054
<i>Mycoplasma falconis</i>	AF125591
<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	L24104
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	L24105
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	L08897
<i>Mycoplasma gallopavonis</i>	AF412980
<i>Mycoplasma glycyphilum</i>	AF412981
<i>Mycoplasma gypis</i>	AF125589
<i>Mycoplasma imitans</i>	L24103
<i>Mycoplasma iners</i>	AF221114
<i>Mycoplasma iowae</i>	M24293
<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	AF221115
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	L24106
<i>Mycoplasma pullorum</i>	U58504
<i>Mycoplasma sturni</i>	U22013
<i>Mycoplasma synoviae</i>	X52083
<i>Mycoplasma vulturii</i>	AY191226

3.5.1.2.1 Multispezies- PCR

Zur Überprüfung der Tupferproben der Greifvögel auf DNS von Mykoplasmen wurde eine Multispezies- PCR auf der Grundlage der Primer von VAN KUPPEVELD et al. (1992) verwendet.

Der Sequenzvergleich der 16S rRNS zeigte, dass der dort beschriebene rückwärtsgerichtete Primer (MGSO) derjenige ist, der spezifisch für Vertreter der Klasse *Mollicutes* ist. Der von VAN KUPPEVELD et al. (1992) beschriebene vorwärtsgerichtete Primer bindet in einem, für Mykoplasmen, unspezifischen Sequenzbereich und wurde in dieser Arbeit ausgetauscht.

Der selbstentwickelte, vorwärtsgerichtete Primer GPF wurde so gewählt, dass die Größe von ursprünglich 270 bp nun, je nach Mykoplasmenspezies, ca. 1013 bp aufweist und somit einen möglichst großen Teil des ribosomalen 16S rRNS- Gens amplifiziert. Dadurch kann

eventuell eine Differenzierung der nachgewiesenen DNS durch eine Sequenzierung des PCR- Produktes möglich werden.

Die Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 15 angegeben.

3.5.1.2.2 *Mycoplasma gallisepticum* / *Mycoplasma imitans*- PCR

Nach der Sequenzanalyse von BOYLE (1993) besteht der Unterschied von MG und *M. imitans* innerhalb des 16S rRNS- Gens in 3 von 1439 untersuchten Nukleotidpositionen. Aufgrund dieser Tatsache wurden mittels der hier durchgeführten Sequenzanalyse die Primer zur Amplifizierung von MG und *M. imitans* so gewählt, dass sich diese Austauschstellen innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz befinden und durch den Einsatz geeigneter Restriktionsenzyme eine Differenzierung ermöglicht wurde. Somit konnte eine Unterscheidung der beiden Mykoplasmenpezies erfolgen (Tab. 15). Das zu erwartende Amplifikat der PCR besitzt eine Größe von 591 bp.

3.5.1.2.3 *Mycoplasma iowae*- PCR

Die konstruierten Primer zum spezifischen Nachweis von MI- DNS sind aus der Tabelle 15 zu entnehmen. Das entstehende PCR- Produkt besitzt eine Größe von 237 bp.

3.5.1.2.4 *M. buteonis*-, *M. corogypsi*-, *M. gypis*- und *M. falconis* - PCR

Wie unter 3.5.1.2. angegeben, wurde ebenfalls jeweils bei der Konstruktion der Oligonukleotide für den Nachweis von *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. gypis*, und *M. falconis* vorgegangen. Die jeweiligen Oligonukleotide sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Durch die PCR zum Nachweis von *Mycoplasma buteonis*- DNS entsteht ein PCR- Produkt von 1090 bp, zum DNS-Nachweis von *Mycoplasma corogypsi* ein PCR- Produkt von 656 bp. Das zu erwartende Amplifikat der *M. falconis*- PCR ist 147 bp und das der *M. gypis*- PCR ist 491 bp groß.

3.5.2 Durchführung der verschiedenen PCRs

3.5.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Ready-To-Go™ PCR Beads-Kit

Die Untersuchung der Trachealtupfer auf mykoplasmale DNS mittels der Multispezies- PCR sowie die unter 3.7 beschriebene α - Aktin PCR wurden unter Verwendung der Ready-To-Go™ PCR Beads durchgeführt.

In die PCR- Gefäße des Kits wurden 1,5 μ l des jeweiligen Primerpaarmixes pipettiert und die Differenz vom Gesamtvolumen (25 μ l) abzüglich der einzusetzenden DNS- Menge (50 ng) mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem T3- Thermozykler (Biometra, Göttingen). Die Annealingtemperaturen wurden in Gradienten PCRs mit einem iCycler iQ™ (Biorad GmbH, Hilden) ermittelt und sind in Tabelle 17 dargestellt.

3.5.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit dem Taq PCR® Master Mix Kit

Die Durchführung der speziesspezifischen PCR- Nachweismethoden erfolgte unter Verwendung des Taq PCR® Master Mix Kits. Hierbei erhält man ein Endvolumen von 50 μ l und somit steht eine größere Menge an PCR- Produkt für eine anschließende Restriktionsenzymanalyse zur Verfügung.

In die PCR- Gefäße wurden 25 μ l Taq PCR® Master Mix sowie 1,5 μ l des jeweiligen Primerpaarmixes pipettiert. Danach wurde die Differenz vom Gesamtvolumen (50 μ l) abzüglich der einzusetzenden DNS- Menge mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Es wurden immer 50 ng DNS in der PCR eingesetzt. Die Zugabe der DNS erfolgte, zur Vermeidung von Kontaminationen, räumlich getrennt. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem T3- Thermozykler (Biometra, Göttingen). Die Annealingtemperaturen wurden in Gradienten PCRs mit einem iCycler iQ™ (Biorad GmbH, Hilden) ermittelt und sind in Tabelle 17 dargestellt.

3.5.2.3 Qualitätssicherung der PCR

Die routinemäßige Durchführung der PCR birgt durch die hohe Sensitivität ein Risiko der Kontamination. Diese kommt zum Teil durch Übertragung von Matrizen- DNS von Probe zu Probe zustande. Schwerwiegend ist auch die Kontamination durch Amplifikationsprodukte vorheriger Reaktionen, da diese durch Aerosole leicht in der gesamten Laborumgebung verteilt werden können (KWOK und HIGUCHI, 1989). Um das Risiko von Kontaminationen zu verringern, wurden folgende Maßnahmen durchgeführt:

- Verwendung von Einmallyabormaterial
- separierte Arbeitsräume für die DNS- Extraktion, für den Reagenzienzusatz, für das Zuführen der DNS sowie für die PCR- Produktanalyse
- Herstellung der Reagenzien und Lösungen in nur dafür vorgesehenen Räumen und Gefäßen
- getrennte Reagenzien und Lösungen für jeden Untersucher sowie Aliquotierung aller PCR- Reagenzien
- Tragen spezieller arbeitsraumabhängiger Laborkleidung
- Pipettierarbeiten ausschließlich mit Pipettenspitzen mit Aerosolsperre
- Nachweis von möglichen Kontaminationen durch Mitführen von zwei Negativkontrollen bei jeder Untersuchung: eine Präparationskontrolle, die von Beginn der DNS- Extraktion mitgeführt wurde und eine zusätzliche PCR- Reagenzienkontrolle, die alle Bestandteile außer der DNS enthielt.

3.5.2.4 PCR- Produktanalyse

Zur Analyse der PCR- Produkte wurde die Agarosegelelektrophorese angewendet. Die Elektrophorese stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld genutzt wird. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker- Phosphat- Rückgrades bei allen pH- Werten negativ geladen und wandern daher generell zur Anode und zwar umso langsamer, je größer sie sind. Der Prozentgehalt des Gels an Agarose ist abhängig von der zu erwartenden Fragmentgröße des PCR- Produktes. Der jeweilige Agarosegehalt für die entsprechenden Amplifikate der verschiedenen Nachweismethoden ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

Die Agarose wurde in 100 ml Tris- Borat- Elektrophoresepuffer (1 x TBE) aufgekocht und mit 1µl Ethidiumbromid (1%) versetzt und zu horizontalen, etwa 5mm starken Gelen (etwa 11 cm x 14cm) gegossen. Zur Auftrennung wurden jeweils 10 µl des PCR- Produktes mit 1 µl Probenladepuffer vermischt und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Als molekularer Größenstandard wurden 8 µl der 100 bp- DNS- Größenmarkers bzw. 1 kb- DNS- Größenmarkers aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE- Puffer. Die Elektrophorese fand bei 60 bis 65 Volt über 2 bis 2,5h statt. Die Auswertung erfolgte mittels Videodokumentationssystem Bioprint DS und der Software BioCapt Version 97.05.

Tab. 10:

Agarosegehalt in % für die jeweiligen Fragmentgrößen der verschiedenen PCR- Nachweismethoden

Agarosegele		
Fragmentgröße in bp	Agarosegehalt in %	PCR
>1000	0,5	Multispezies- PCR <i>M. buteonis</i>
500 - 1000	0,8	MG/ <i>M. imitans</i> , <i>M. gypis</i> <i>M. corogypsi</i> <i>M. meleagridis</i>
150 - 400	2,0	<i>M. synoviae</i> <i>M. iowae</i> <i>M. falconis</i> α - Aktin

3.5.3 Bestimmung der optimalen Annealing- Temperatur

Für das optimale Ablaufen einer Polymerase- Kettenreaktion ist die Bestimmung der richtigen Annealingtemperatur (Hybridisierungstemperatur) wichtig. Als Richtwert für die optimale Annealingtemperatur kann der Temperaturbereich von etwa 5 – 10 °C unterhalb der Schmelztemperatur T_m der Primer genommen werden. Der ungefähre Bereich dieser Schmelztemperatur kann durch die 2 + 4 Regel nach THEIN und WALLACE (1986) ermittelt werden. Danach berechnet sich die Schmelztemperatur der Primer nach folgender Formel:
 $T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$.

Durch eine Gradienten- PCR in einem iCycler iQ™ (Biorad GmbH, Hilden) im Temperaturbereich von 50-65 °C wurde die optimale Annealing- Temperatur für die jeweilige PCR- Nachweismethode bestimmt. Die PCR- Reaktion erfolgte in 35 Zyklen mit einer initialen Denaturierung (94 °C, 4 min) und einer finalen, verlängerten Polymerisation (72 °C, 10 min). Die optimale Annealingtemperatur, bei der das Amplifikat nach gelelektrophoretischer Auftrennung die stärkste spezifische Bande aufwies, wurde in das jeweilige Reaktionsprotokoll übernommen (Tab. 17).

3.5.4 Spezifität der PCR

3.5.4.1 Spezifitätsnachweis anhand Mykoplasmen- DNS und DNS zellwandtragender Bakterien

Die Überprüfung der Spezifität erfolgte anhand der DNS von Reinkulturen der in Tabelle 2 aufgeführten 23 aviären Mykoplasmen- Referenzstämme sowie nicht aviärer *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasma laidlawii* und verschiedener zellwandtragender Bakterienspezies. Dabei wurde die PCR unter den optimierten Bedingungen mit 0,1 µg DNS durchgeführt.

3.5.4.2 Restriktionsenzymanalyse (REA) der PCR- Produkte

Zur Überprüfung der Spezifität der gewonnenen Amplifikate der verschiedenen PCR- Nachweismethoden wurde anschließend an die PCR eine Restriktionsenzymanalyse mit dem jeweiligen PCR- Produkt durchgeführt.

Für die Restriktionsenzymanalyse (REA) der jeweiligen PCR- Produkte wurden geeignete Endonukleasen anhand der jeweils bekannten 16S rRNS Gensequenzen (Tab. 9) ausgewählt. Die verwendeten Enzyme mit ihren entsprechenden Spaltstellen sind in der Tabelle 18 zusammengefasst.

Zur Differenzierung der Mykoplasmenstämme *M. gallisepticum* und *M. imitans*, deren beider DNS von der entwickelten MG/ *M. imitans*- PCR amplifiziert wird, wurden zusätzlich zwei

geeignete Endonukleasen gewählt, die eine Differenzierung aufgrund unterschiedlicher Spaltstellen und somit Restriktionsfragmentmuster ermöglichen. Die Enzyme mit den entsprechenden zu erwartenden Fragmentgrößen sind in der Tabelle 19 angegeben.

Pro 20 µl Ansatz wurden etwa 500 - 1000 ng des jeweiligen PCR- Produktes mit 20 Einheiten des entsprechenden Enzyms und 2 µl des vom Hersteller empfohlenen enzymabhängigen Reaktionspuffers versetzt. Je nach Enzym wurden den Herstellerangaben entsprechend zusätzlich Bovines Serumalbumin (BSA, 10 fach) hinzugefügt. Der durch dH₂O auf insgesamt 20 µl aufgefüllte Ansatz wurde für 1,5 - 2h in einem Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen DNS- Fragmente wurden gelelektrophoretisch auf einem 3%igen Agarosegel mit 5µl Ethidiumbromid, wie unter 3.5.2.4 beschrieben, aufgetrennt.

3.5.4.3 Sequenzierung

Zusätzlich zur Restriktionsenzymanalyse erfolgte anhand einzelner Feldprobenamplifikate die Überprüfung der Spezifität mittels einer Sequenzierung.

Zur Vorbereitung für die Sequenzierung wurde das entsprechende PCR- Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden jedoch, abweichend zu der unter 3.5.2.4 beschriebenen PCR- Produktanalyse, 25 µl des PCR- Produktes mit 2,5 µl DNS- Probenladepuffer vermischt und aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Bande auf einem UV- Transilluminator aus dem Ethidiumbromid- gefärbten Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mittels des Invisorb Spin[®] DNS Extraction Kit weiterbearbeitet.

Der ausgeschnittene Gelblock wurde in ein 2ml- Zentrifugengefäß überführt. Zu dem Gelblock wurden 500 µl Gel- Lösungspuffer (Gel Solubiliser S) gegeben und gemischt. Anschließend wurde die Agarose 10 min bei 50 °C auf einem Thermoblock bei 300 rpm geschüttelt, bis eine vollständige Verflüssigung der Agarose eingetreten war. Nach Zugabe von 250 µl Bindungspuffer (Binding Enhancer) wurde das gesamte Reaktionsvolumen auf die im Kit enthaltene Filtersäule überführt und bei 10.000 rpm (10600 xg) 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und es folgten zwei Waschschriffe. Hierbei wurden jeweils 500 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben, diese anschließend für 30 s bei 12.000 rpm (15300 xg) zentrifugiert und das jeweilige Filtrat verworfen. Nach Entfernung der Waschpufferreste aus dem Filter durch hochtourige Zentrifugation (4 min, 14.000 rpm (20800 xg)) wurde der Filter

5 min bei Raumtemperatur mit 20 µl Elutionspuffer equilibriert. Durch abschließende Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm (15300 xg) wurde die DNS eluiert.

Zur Konzentrationsermittlung der eluierten DNS wurde 1 µl gelgereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl Probenladepuffer vermischt und in die Taschen eines der Amplifikatsgröße entsprechenden, konzentrierten Agarosegels (Tab. 10) pipettiert. In eine weitere Tasche des Gels wurden 8 µl eines molekularen Größenstandards (100 bp- DNS- Größenmarker) mit bekanntem DNS-Gehalt der Banden gegeben. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung, wie unter 3.5.2.4 beschrieben, wurde durch visuellen Vergleich der Bandenstärken die ungefähre DNS- Konzentration des gereinigten PCR- Produktes ermittelt.

Die Sequenzierungen der Amplifikate erfolgte unter Verwendung der jeweiligen vorwärtigen und rückwärtigen Primer in einem kommerziellen Sequenzierungslabor (AGOWA, Berlin).

3.5.5 Sensitivitätsbestimmung der PCR- Verfahren

Die Nachweisgrenze der verschiedenen Polymerase- Kettenreaktionen wurde sowohl anhand des DNS- Gehaltes als auch der ermittelten KbE der jeweilig nachzuweisenden Mykoplasmaspezies ermittelt. Es wurden für jede Nachweismethode Verdünnungsreihen der jeweiligen Mykoplasmaspezies in Aqua dest. hergestellt und in der PCR untersucht. Als Sensitivitätsgrenze wurde die höchste Verdünnungsstufe festgelegt, bei der noch ein spezifisches Amplifikationssignal zu erkennen war.

Für die Sensitivitätsbestimmung der Multispezies- PCR wurde die DNS- Menge, bzw. die KbE der Mykoplasmaspezies *M. synoviae* und *M. gypis* eingesetzt.

3.5.5.1 Erstellen einer Mykoplasmen- DNS- Verdünnungsreihe

Aus der, wie unter 3.4.3 beschrieben, und nach 3.4.4 extrahierten Mykoplasmen- DNS mit einer spektrophotometrisch bestimmten Konzentration, wurde mit nukleasefreiem Wasser eine DNS- Ausgangskonzentration von 1µg/ 100µl hergestellt. Die weitere Verdünnung erfolgte in 1:10 Schritten. Ab der Stufe 7 (1 pg DNS / 100 µl) erfolgte die Verdünnung in 1:2 Schritten bis 62,5 fg DNS / 100 µl (Tab. 11).

3.5.5.2 Erstellen einer Mykoplasmen- KbE- Verdünnungsreihe

Aus der SP4- Flüssigkultur der entsprechenden nachzuweisenden Mykoplasmenspezies wurde, wie unter 3.3.8 beschrieben, die Lebendkeimzahl/ ml bestimmt und, wie unter 3.5.5.1 beschrieben, eine dezimale Verdünnungsreihe von 10^6 - 10^0 KbE angelegt. Ab 100 KbE erfolgte die Verdünnung in 1:2 Schritten bis zu einer Verdünnungsstufe von 0,062 KbE/ 100 µl (Tab. 12).

Tab. 11:

Verdünnungsreihe: DNS- Konzentrationen

Stufe	DNS /100µl	DNS in PCR-Reaktionsansatz (10µl)
1	1 µg	100 ng
2	100 ng	10 ng
3	10 ng	1 ng
4	1 ng	100 pg
5	100 pg	10 pg
6	10 pg	1 pg
7	1 pg	100 fg
8	500 fg	50 fg
9	250 fg	25 fg
10	125 fg	12,5 fg
11	62,5 fg	6,25 fg

Tab. 12:

Verdünnungsreihe: KbE

Stufe	KbE/100 µl	KbE in PCR- Reaktionsansatz (10µl)
1	10 ⁶ KbE	10 ⁵ KbE
2	10 ⁵ KbE	10 ⁴ KbE
3	10 ⁴ KbE	10 ³ KbE
4	10 ³ KbE	10 ² KbE
5	10 ² KbE	10 KbE
6	10 KbE	1 KbE
7	1,000 KbE	0,100 KbE
8	0,500 KbE	0,050 KbE
9	0,250 KbE	0,025 KbE
10	0,125 KbE	0,0125 KbE
11	0,062 KbE	0,0062 KbE

3.6 Untersuchungen zur Epidemiologie von Mykoplasmen

Von den untersuchten Vögeln wurden, wie unter 3.3.5 beschrieben, jeweils 2 Trachealtupfer entnommen, von denen einer direkt in SP4- Flüssigmedium zur Anzucht von Mykoplasmen überführt wurde und der zweite Tupfer für den direkten Einsatz in der PCR bestimmt war (Abb.1). Die Kultivierung der Mykoplasmen erfolgte wie unter 3.3.6 beschrieben. Die Probenaufbereitung erfolgte analog zu 3.4.2. Die DNS wurde, wie unter 3.4.3 beschrieben, extrahiert und deren Konzentration analog zu 3.4.4 bestimmt. Dabei wurden die Tupferproben zuerst auf das Vorkommen von Mykoplasmen mit der Multispezies- PCR untersucht. Eine weitere Untersuchung mit den speziesspezifischen PCR- Methoden erfolgte im Anschluss bei positivem Ergebnis der Multispezies- PCR. Bei den in der Multispezies-PCR negativen Trachealtupferproben wurde die Qualität der extrahierten DNS mittels einer PCR zum Nachweis von α - Aktin, einem Strukturprotein eukariotischer Zellen (siehe 3.7), untersucht, um auszuschließen, dass die DNS bei der Extraktion degradiert war.

Zur Überprüfung der Spezifität der in den speziesspezifischen PCR- Verfahren amplifizierten PCR- Produkte wurde, analog zu 3.5.4.2, die Restriktionsenzymanalyse (REA) durchgeführt.

3.7 PCR zur Überprüfung der Qualität der extrahierten DNS der in der Multispezies- PCR negativen Proben

Um auszuschließen, dass bei den in der Multispezies- PCR negativen Proben eine Inhibition der PCR oder eine fehlerhafte DNS Präparation vorlag und somit falsch negative Ergebnisse entstanden sein könnten, wurden diese Proben nochmals mit einer PCR zum Nachweis von α - Aktin, wie bei HAUCK et al. (2006) beschrieben, untersucht. Das dabei eingesetzte Primerpaar nach ZIMMERMANN et al. 1994 amplifiziert ein Fragment von 360 bp des α -Aktin- Gens (HAUCK et al., 2006), welches Bestandteil des Zytoskeletts ist und eines der häufigsten Proteine in Eukaryontenzellen darstellt. Nur wenn die PCR für α - Aktin positiv verläuft, kann davon ausgegangen werden, dass ein negatives PCR- Ergebnis nicht auf eine fehlerhafte DNS- Extraktion oder das Vorhandensein von PCR- Inhibitoren zurückzuführen ist. Die Primer ActinA und ActinB sowie das durchgeführte Temperaturprofil sind in Tabelle 13 und 14 angegeben.

Tab. 13:

Verwendete Primer zur Überprüfung der Qualität der extrahierten DNS

Primer	Primer-konzentration	Sequenz (5' - 3')	Polarität	Amplifikat-größe
α - Aktin - PCR				
ActinA	25 pmol/ μ l	GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC ¹	Vorwärts	360 bp ²
ActinB	25 pmol/ μ l	GCGCTCGTCGTCGACAACGG ¹	Rückwärts	

¹ nach ZIMMERMANN et al. (1994)

² nach HAUCK et al. (2006)

Tab. 14:

Temperaturprofil der α - Aktin PCR

α - Aktin - PCR	Initiale Denaturierung: 2 min 94 °C			
	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Synthese
	30	60 sec 94 °C	60 sec 60 °C	60 sec 72 °C
Finale Synthese: 2 min 72 °C				