

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis verschiedener aviären Mykoplasmen

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung bzw. Etablierung einer Multispezies- PCR- Methode zum Nachweis aller Mykoplasmen sowie der geflügelpathogenen Mykoplasmen, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) und *Mycoplasma iowae* (MI) und den bei Greifvögeln regelmäßig vorkommenden Spezies *Mycoplasma buteonis*, *Mycoplasma corogypsi*, *Mycoplasma gypis* und *Mycoplasma falconis* aus Greifvogelproben. Der Erregernachweis sollte direkt aus Trachealtupfern erfolgen. Mittels dieser Methoden wurden adulte Greifvögel sowie Greifvogelnestlinge auf das Vorkommen von Mykoplasmen insbesondere der geflügelpathogenen Mykoplasmen und bei Greifvögeln regelmäßig vorkommenden Mykoplasmen untersucht.

#### 4.1.1 Sequenzvergleich und Primerauswahl

Aufbauend auf dem Sequenzvergleich, der in der Genbank<sup>®</sup> (NCBI, USA) veröffentlichten Sequenzen des 16S rRNS - Gens der 24 verschiedenen aviären Mykoplasmen (Tab. 9) und dem PC- Programm ClustalW 1.8 (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany) (HIGGINS et al., 1996), konnten die eingesetzten Primerpaare konstruiert werden. In der nachfolgenden Abbildung 2 a - d sind die Bereiche, in denen die jeweiligen Primer liegen, mit allen bisher bekannten aviären Mykoplasmen verglichen. Die Bereiche der 16S rRNS, in denen sich keine Primeransatzstellen befinden, sind nicht dargestellt und durch Punkte (...) ersetzt worden.

Die genaue Position der Primer in der jeweiligen Sequenz sind den Tabellen 15 und 16 zu entnehmen.

Multispezies PCR		...	
		<u>GCTGGCTGTGTGCCTAATACA</u>	.....
<i>M. anseris</i>	4	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGGTCTTC-----GGAC...ACATTGGTTAATACCGGATACGCAGAGA---ATCG	141
<i>M. cloacale</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTCTTC-----GGAC...ACATTGGTTAATACCGGATACGCATGGA---ATCG	141
<i>M. falconis</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA... <u>CATGTCGAGCGGGGTTCCTC</u> GG-GAAC...ACATTTGCTAATGCCGGATACGCATGGA---ACCG	145
<i>M. gypis</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAACGAAGTAGCTT--G-CTAC... <u>ACGATTGCTAATACCGGATAGTG</u> ATTT---CTCG	143
<i>M. vulturii</i>	28	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAACGAAGTAGCTT--G-CTAC...ACAATTGCTAATACCGAATACTTAAATA--GAAGG	172
<i>M. anatis</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTT-CTTCGG--AAC...ATGATCGTAATGCCGGATACTTATATT--TATCG	144
<i>M. pullorum</i>	28	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTT-CTTCGG--AAC...ATGGTCGCTAATACCGGATACTTATGTT--AATCG	172
<i>M. buteonis</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTT-CTTCGG--AAC...ATTAGCGCTAA <u>TGCCGGATACTTATTAG</u> -- <u>TTTCG</u>	144
<i>M. gallopavonis</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTT-CTTCGG--AAC...ATTAGCGCTAATGCCGGATACTTATTA--TTTCG	144
<i>M. glycyphilum</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTT-CTTCGG--AAC...ATTAGCGCTAATGCCGGATACTTATATG--GTTTCG	144
<i>M. corogypsi</i>	28	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGAAGT--CTTCGG--A-C...ATTAGCGCTAATACCGGATACTTATATT--TATCG	170
<i>M. gallinaceum</i>	8	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTT-CTTCGG--AAC...ATTAGCGCTAATACCGGATACTTAAATA--TCTCG	152
<i>M. columborale</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAGTT-CTTTTA-GAAC...ATTAGCGCTAATGCCGGATACTTATTAT--TAACA	145
<i>M. sturni</i>	8	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGAAGTT-CTTC-G-GAAC...ATTAGCGCTAATGCCGGATACTTATTAA--GTTTCG	152
<i>M. synoviae</i>	8	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGGAATT-TAGCAATAAAT...ATTATCGCTAATGCCGGATATATAAAAA--AATCG	154
<i>M. columbinasale</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGAAGTT-CTTCGG--AAC...ACAACGATAAATATCAAATACGCATCTT--TGTCG	144
<i>M. columbinum</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGAAGTT-CTTCGG--AAC...ACAGCCGATAAATACCAAATATGCACATT--TTTCG	144
<i>M. iners</i>	8	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGAAGTTGCTTCGGT-AAC...ACATTTGATAAATACCAAATACGCATTAT--TTTCG	154
<i>M. gallinarum</i>	8	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGAAGTT-CTTCGG--AAC...ACAACATTAATAACAAATACGTATAAT--TTTCG	152
<i>M. meleagridis</i>	8	...GCTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGT <u>CGAGCGAAGTT-TTTCGG</u> -- <u>AAC</u> ...ACATTTGATAAATACCGAATATGTATATT--TTTCG	152
<i>M. lipofaciens</i>	1	...CTGGCTGTGTGCCTAATACA...CATGTCGAGCGAAGTT-CTTCGG--AAC...ACATTTGATAAATACCAAATACCTATCAT--TTTCG	144
<i>M. gallisepticum</i>	35	...GCTGGCGGCATGCCTAATACA...CAAGTCGATCGGATGTAGCAATA---CA...AGATTAGCTAATACCGCATAACAAGTTAACTATCG	181
<i>M. imitans</i>	35	...GCTGGCGGCATGCCTAATACA...CAAGTCGATCGGATGTAGCAATA---CA...AGATTAGCTAATACCGCATAACAAGTTACCTATCG	181
<i>M. iowae</i>	36	...GCTAGCGGGATGCCTAATACA...CA <u>AGTCGAACGGG-GTGCTTGCA</u> ---C...AATCTAGCTAATACCGCATAGGACATTG-TTATCG	180

### Abb. 2a:

Sequenzvergleich der 16S rRNS aller bekannten aviären Mykoplasmenspezies. Die Primer für die entsprechende Spezies sind fett dargestellt, die Richtung der Primer ist mit einem Pfeil angegeben. Die Bereiche der 16S rRNS, in denen sich keine Primeransatzstellen befinden, sind nicht dargestellt und durch Punkte (...) ersetzt worden.

## Multispezies PCR

<i>M. anseris</i>	142	CATGATTC	TTTTGTGAAAGGAGCCTT-AAAGCTCCACTAG...	CCAAGACTATGATGTTTAGCCGGGTCGAGAGACT...	GCTTTGAAGCT	436
<i>M. cloacale</i>	142	CATGATTC	CGTTGTGAAAGAAGCCTTTAAAGCTTCACTAA...	CCAAGGCTGTGATGTTTAGCCGGGTCGAGAGACT...	GCTTTGAAGCT	437
<i>M. falconis</i>	146	CAT	<b>GGTCCGTTGTGAAAGGAGCC</b> TTTAAAGCTCCGCTAA...	CCAAGACTATGATGTTTAGCCGGGTCGAGAGACT...	GACTTGAAGCT	441
<i>M. gypis</i>	144	CATGAGAAAA	CATGAAAGAAGCGTT---TGCTTCACTAG...	CCAAGACTATGATGTTTAGCCGGGTTGAGAACT...	GCTATCAAGCT	436
<i>M. vulturii</i>	173	CATCTTTT	TATTTATAAAAAGGAGCGTT---TGCTCCGCTTG...	CCAAGACAATGATGTTTAGCAGGGCTGAGAAGCT...	GACATTAGTTT	465
<i>M. anatis</i>	145	CATGAAAA	TATATAAAAAGGAGCGTTT---GCTTCGCTAG...	CCAAGGCTATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GACTTTATCTT	437
<i>M. pullorum</i>	173	CATGATTA	TATATAAAAAGAAGCGTTT---GCTTCGCTAG...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCTATGATCTT	463
<i>M. buteonis</i>	145	CATGAAAT	TATATAAAAAGAAGCGTTT---GCTTCACTAG...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCTTTTGCCTT	437
<i>M. gallopavonis</i>	145	CATGAAGT	TATATAAAAAGGAGCAATT---GCTTCACTAG...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCCTTTGTCTT	438
<i>M. glycyphilum</i>	145	CATGAAC	TATATAAAAAGRAGCTTTMAA-GCTTCACTAG...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCCATGATCTT	439
<i>M. corogypsi</i>	171	CATGATAG	TATATAAAA <b>AGGGGGGTTT--CCCTCACTGG</b> ...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GAACTTACCTT	464
<i>M. gallinaceum</i>	153	CATGAGGT	ATTTATAAAAAGGAGCCTTTAAAGCTTCAACAAG...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCCTTGACCTT	447
<i>M. columborale</i>	146	CATGTTG	ATAATATAAAAAGGAGCGTTT---GCTTCACTAG...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCTATTGCCTT	438
<i>M. sturni</i>	153	CATGAAC	TATATAAAAAGGAGCGTTT---GCTTCACTAA...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGAGTTGAGAGACT...	GCTATTGCCTT	445
<i>M. synoviae</i>	155	CATGATTT	TTTTAAGAAAGAAGCGTTT---GCTTCACTAA...	CCAAGGCAATTATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GATATTAGCTT	447
<i>M. columbinasale</i>	145	CATGAYG	CAGATGTAAAAGAACCTTCACG-GGTTGCTAA...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCTTTGGTCTT	440
<i>M. columbinum</i>	145	CATGAAAR	GTGTGAAAGGAGCA--ATT-GTTCCGCTAA...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCTTTTGCCTT	439
<i>M. iners</i>	155	CATGAAG	ATAATGTAAAAGGAGCTTTACG-GCTTCGCAA...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GATAGAACCTT	451
<i>M. gallinarum</i>	153	CATGAAG	ATTATATAAAAAGTAGCGTTT---GCTACACTAA...	CCAAGACGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GCCTTGGTCTT	446
<i>M. meleagridis</i>	153	CATGAAAT	TTTATATGAAAGAAGCCTTTAA-GCTTCGCTAA...	CCAAGGCAATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	<b>GCATTTATCCT</b>	448
<i>M. lipofaciens</i>	145	CATGAAG	ATGATACAAAAGGTCCGTTT---GGACCGCTAA...	CCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACT...	GATATTGTTCT	438
<i>M. gallisepticum</i>	182	CATGAGA	AATAACTTTAAAGAAGCAACT---GCTTCGCTAT...	<b>CCAAGGCGATGACGTGTAGTT</b> ATGCTGAGAGGTA...	GCTATTAATTT	478
<i>M. imitans</i>	182	CATGAGA	AATAACTTTAAAGAAGCAACT---GCTTCGCTAT...	CCAAGGCGATGACGTGTAGTTATGCTGAGAGGTA...	GCTATTAATTT	478
<i>M. iowae</i>	181	CATGAGAG	AATGTTTAAAGTTGCGTTT---GCAACGCTTT...	CCAAGTCAATGAT <b>GCATAGCTGTGCTGAGAGGCA</b> ...	GCTTTCTGTGT	476

## Abb. 2b:

Sequenzvergleich der 16S rRNS aller bekannten aviären Mykoplasmenspezies. Die Primer für die entsprechende Spezies sind fett dargestellt, die Richtung der Primer ist mit einem Pfeil angegeben. Die Bereiche der 16S rRNS, in denen sich keine Primeransatzstellen befinden, sind nicht dargestellt und durch Punkte (...) ersetzt worden.

Multispezies PCR	.....	<b><u>GAGGTTAACGGAGTGACAGATGGTGCA</u></b> ..	
<i>M. anseris</i>	437 GACGGT... TGGCTCGCTTTGGATACTGGT... GGA----	GAATCACTGACGC---AGC... GAGGTTAACGGAGTGACAGATGGTGCA..	997
<i>M. cloacale</i>	438 GACGGT... TGGCTCGCTTTGGATACTGGT... GGA----	AAATCGCTGACGC---AGC... GAGGTTAACGGAGTGACAGATGGTGCA..	998
<i>M. falconis</i>	442 GACGGT... TGGCTCGCTTTGGATACTGGT... GGAAY--	RRTTCACTGACGC---AGC... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1004
<i>M. gypis</i>	437 GACGGT... <b><u>CAGCCCGCTTTAGATACTGGT</u></b> ... GGAG---	AATTCACCTGACGC---AGC... GAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCA..	998
<i>M. vulturii</i>	466 GACGGT... TGGCCCGCTTCAGATACTGGC... AGAG---	ATTTTACTAACGC---AGC... GAGGTTATCAAGGTGACAGATGGTGCA..	1032
<i>M. anatis</i>	438 GACGGT... CAAATTGCGTTGGATACTGGC... GGGG---	AATTCATCGGCAC---AGC... GAGGTCAACGGAATGACAGATGGTGCA..	1001
<i>M. pullorum</i>	464 GACGGT... CAAATTGCATTGGATACTGGC... GGGG---	AATTCATCGGCGC---N--... GAGGCTAACGGAATGACAGATGGTGCA..	1024
<i>M. buteonis</i>	438 GACGGT... CAAATAGCGTTGGATACTGGC... GGRA---	A--CCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCA..	999
<i>M. gallopavonis</i>	439 GACGGT... CAAATCGCGTTGGATACTGGC... GGRG---	A--CCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCA..	1000
<i>M. glycophilum</i>	440 GACGGT... CAAATCGCGTTGGATACTGGC... GGGG---	A--CCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCA..	1001
<i>M. corogypsi</i>	465 GACGGT... CAAATCGCGTTGGATACTGGC... <b><u>GGAA---</u></b>	<b><u>T--CCATTGGCGC---ACG</u></b> ... GAGGTCAACGGAATGACAGATGGTGCA..	1026
<i>M. gallinaceum</i>	448 GACGGT... CAAATTGCATTGGATACTGGC... GGGG---	AATTCATCGGCGC---ACG... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1011
<i>M. columborale</i>	439 GACGGT... CAAATCGCGTTGGATACTGGC... GGAC---	A--CCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCA..	1000
<i>M. sturni</i>	446 GACGGT... CAAATCGCGTTGGATACTGGC... GGTG---	A--CCATCGACGCG--AGC... GGGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1009
<i>M. synoviae</i>	448 GACGGT... CAAATTGCATTGGATACTGGC... AGAA---	A--CCATCGACGC---ACG... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1010
<i>M. columbinasale</i>	441 GACGGT... CAAATCGCGTTAGATACTGGC... GGAA---	AATTCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1004
<i>M. columbinum</i>	440 GACGGT... CAAACCGCGTTGGATACTGGC... GGAA---	AATTCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1003
<i>M. iners</i>	452 GACGGT... CAAATCGCGTTGGATACTGGC... GGAA---	AATTCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1015
<i>M. gallinarum</i>	447 GACGGT... CAACACGCATTGGATACTGGC... GGGG---	AATTCATCGGCGC---ACG... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1010
<i>M. meleagridis</i>	449 <b><u>GACGGT</u></b> ... CAAAGCGCGTTGGATACTGGC... GGAA---	AATTCGTCGGCGC---ACG... GAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCA..	1012
<i>M. lipofaciens</i>	439 GACGGT... CAAACCGCGTTGGATACTGGC... GGGG---	AATTCATCGGCGC---AGC... GAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCA..	1002
<i>M. gallisepticum</i>	479 GACTGT... TTGTATGCATTGGAAACTTCT... <b><u>GGAGCG-</u></b>	<b><u>AATACTTCGGTGCTGCAGT</u></b> ... GAGGTCAACCCAATGACAGGTGGTGCA..	1046
<i>M. imitans</i>	479 GACTGT... TTGTATGCATTGGAAACTTCT... GGAGCG-	AATACTTCGGTGCTGCAGT... GAGGTCAACCCAATGACAGGTGGTGCA..	1046
<i>M. iowae</i>	477 GACGGT... TTGTATGCATTGGAAACTGCA... GGCATGGAATATGTCGGCGTTGCAGT...	GAGGTTAACAGAGTGACAGGTGGTGCA..	1045

Abb. 2c:

Sequenzvergleich der 16S rRNS aller bekannten aviären Mykoplasmenspezies. Die Primer für die entsprechende Spezies sind fett dargestellt, die Richtung der Primer ist mit einem Pfeil angegeben. Die Bereiche der 16S rRNS, in denen sich keine Primeransatzstellen befinden, sind nicht dargestellt und durch Punkte (...) ersetzt worden.

Multispezies PCR		.....		.....		.....	
<i>M. anseris</i>	1195	GAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAATCTC	..	TT-GCTAACCTC	-----	GGAGGCGACTG	... 1405
<i>M. cloacale</i>	1196	GAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAATCTC	..	TT-GCTAACCTC	-----	GGAGGCGACTG	... 1406
<i>M. falconis</i>	1202	GAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAATCTC	..	TT-GCTAACCTC	-----	GGAGGCGACCG	... 1412
<i>M. gypis</i>	1196	GAGAAGCAATACGGTGACGTGGAGCAAATCTC	..	TA-GTTAACTTC	-----	GGAGACGACTG	... 1406
<i>M. vulturii</i>	1230	GAGAAGCAAACCTGGTGACAGGGAGCAAATCTC	..	TA-ACTAACCTGAAAAATTTATTTTAAAGGAAGAAACTG	...		1456
<i>M. anatis</i>	1183	GAGACGCAATACGGCGACGTGGAGCAAATCTC	..	TTTGTTAACTAC	-----	GGAGACAACCTG	... 1394
<i>M. pullorum</i>	1207	GAGAAGCAAGACAGCGATGTGGAGCAAATCTC	..	TTTGTTAACCAC	-----	GGAGACAATCG	... 1417
<i>M. buteonis</i>	1181	GAGAAGCAAGA <b>CAGCGATGTGGAGCAAATCTC</b>	..	TTTGTTAACTAC	-----	GGAAACAACCTG	... 1392
<i>M. gallopavonis</i>	1182	GAGAAGCAAACGGCGACGTCAAGCAAATCTC	..	TTTGTTAACTAC	-----	GGAAACAACCG	... 1393
<i>M. glycyphilum</i>	1183	GAGAAGCAAGACGGCGACGTGGAGCAAATCTC	..	TTTGTTAACTAC	-----	GGAAACAACCG	... 1394
<i>M. corogypsi</i>	1208	GAGACGCAATACGGCGACGTGGAGCAAATCTC	..	TTTGTTAACTAC	-----	GGAGACAACCTG	... 1419
<i>M. gallinaceum</i>	1193	GAGACGCAATACGGCGACGTGGAGCAAATCTC	..	TTTGTTAACTAC	-----	GGAGACAACCTG	... 1404
<i>M. columborale</i>	1182	GAGAAGCAATACGGCGACGTGGAGCAAATCTC	..	TTTGTTAACTAC	-----	GGAAACAACCG	... 1393
<i>M. sturni</i>	1190	GAGAAGCAATACGGCGACGTGGAGCAAATCTC	..	TTAGTTAACTAC	-----	GGAAACGACCG	... 1399
<i>M. synoviae</i>	1192	<b>GAGAAGCAAATAGTGATATCA</b> AGCAAATCTC	..	<b>TT-GTTAACTTC</b>	-----	<b>GGAGACGACTG</b>	... 1402
<i>M. columbinasale</i>	1200	GAGACGCAAACCTGGTGACAGGGAGCAAACCTC	..	TT-ATTAACA	-----	AACTG	... 1402
<i>M. columbinum</i>	1199	GAGAAGCAAACCTGGTGACAGGGAGCAAACCTC	..	TT-ATAACA	-----	AACTG	... 1401
<i>M. iners</i>	1210	GAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAACCTC	..	TT-ATAACA	-----	AACTG	... 1412
<i>M. gallinarum</i>	1206	GAGAAGCAAACCTGGTGACAGGGAGCAAACCTC	..	TT-ATAACA	-----	AACTG	... 1408
<i>M. meleagridis</i>	1208	GAGAAGCAAACCTGGTGACAGGGAGCAAACCTC	..	TT-AATTACA	-----	AACTG	... 1410
<i>M. lipofaciens</i>	1198	GAGAAGCGAAATGGCGACATGGAGCAAACCTC	..	TT-ATTAACA	-----	AACTG	... 1400
<i>M. gallisepticum</i>	1228	CAGTTGCAAATCCGTAAGGTGGAGCTAATCTG	..	GTTGCTAACCGCAA	-----	GGAAGCGCATG	... 1439
<i>M. imitans</i>	1228	CAGTTGCAAATCCGTAAGGTGGAGCTAATCTG	..	GTTGCTAACCGCAA	-----	GGAAGCGCATG	... 1439
<i>M. iowae</i>	1227	CTGTCGCAAACCAGTAATGGGAAGCCAATCAG	..	TAAGATAACCTCGT	-----	G-AGTCTTGCG	... 1438

**Abb. 2d:**

Sequenzvergleich der 16S rRNS aller bekannten aviären Mykoplasmenspezies. Die Primer für die entsprechende Spezies sind fett dargestellt, die Richtung der Primer ist mit einem Pfeil angegeben. Die Bereiche der 16S rRNS, in denen sich keine Primeransatzstellen befinden, sind nicht dargestellt und durch Punkte (...) ersetzt worden.

**Tab. 15:**

Verwendete Primer der Multispezies- PCR sowie der PCRs zum Nachweis geflügelpathogener Mykoplasmen.

Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf die, in Tabelle 9 angegebenen, veröffentlichten Sequenzen der jeweiligen 16S rRNS.

Primer	Primerkonzentration	Sequenz (5' - 3')	Polarität	Nukleotidposition	Amplifikationsgröße
<b>Multispezies- PCR</b>					
GPF	25pmol/µl	GCTGGCTGTGTGCCTAAT ACA	Vorwärts	1-20*	1013*bp
MGSO	25pmol/µl	TGCACCATCTGTCACTCT GTTAACCTC <sup>1</sup>	Rückwärts	986-1013*	
<b><i>M. gallisepticum</i> / <i>M. imitans</i> - PCR</b>					
MGF	12,5pmol/µl	CCAAGGCGATGACGTGTA GTT	Vorwärts	884-904/ 239-259	591bp
MGR	12,5pmol/µl	CTGCAGCACCGAAGTATT CGCTC	Rückwärts	1451-1474/ 806-828	
<b><i>M. synoviae</i> - PCR</b>					
MSF	25pmol/µl	GAGAAGCAAATAGTGAT ATCA <sup>2</sup>	Vorwärts	1192-1213	211bp
MSR	25pmol/µl	CAGTCGTCTCCGAAGTTA ACAA <sup>2</sup>	Rückwärts	1381-1402	
<b><i>M. iowae</i> - PCR</b>					
MIF	12,5pmol/µl	AGTCGAACGGGGTGCTT GCAC	Vorwärts	62-82	237bp
MIR	12,5pmol/µl	TGCCTCTCAGCACAGCTA TGC	Rückwärts	277-298	
<b><i>M. meleagridis</i> - PCR</b>					
MMF	25pmol/µl	CGAGCGAAGTTTTTCGGA AC <sup>3</sup>	Vorwärts	36 - 55	422bp
MMR	25pmol/µl	GGTACCGTCAGGATAAAT GC <sup>3</sup>	Rückwärts	438-457	

\* variiert bei den verschiedenen aviären Spezies geringfügig

<sup>1</sup> nach VAN KUPPEVELD et al. (1992)

<sup>2</sup> nach MAROIS et al. (2000)

<sup>3</sup> nach BOYLE et al. (1995)

**Tab. 16:**

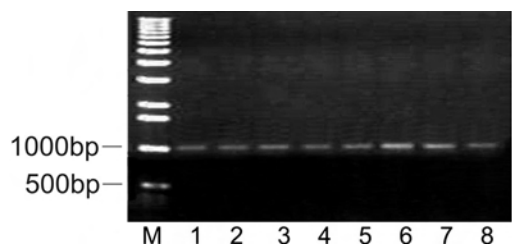
Verwendete Primer zum Nachweis von *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis*. Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf die, in Tabelle 9 angegebenen, veröffentlichten Sequenzen der jeweiligen 16S rRNS.

Primer	Primer-konzentration	Sequenz (5' - 3')	Polarität	Nukleotid-position	Amplifikat-größe
<i>M. buteonis</i> - PCR					
MBUTF	12,5pmol/µl	TGCCGGATACTTATT AGTTTCG	Vorwärts	123-144	1090bp
MBUTR	12,5pmol/µl	GAGATTTGCTCCACA TCGCTG	Rückwärts	1192-1212	
<i>M. corogypsi</i> - PCR					
MCOF	25pmol/µl	AGGGGGGGTTTCCCT CACTGG	Vorwärts	188-208	656bp
MCOR	25pmol/µl	CGTTACGTGCGCCAA TGGATTCC	Rückwärts	820-843	
<i>M. falconis</i> - PCR					
MFF	25pmol/µl	CATGTCGAGCGGGGT TCCCTC	Vorwärts	23-45	147bp
MFR	25pmol/µl	GGCTCCTTTCACAAC GGAACC	Rückwärts	149-169	
<i>M. gypis</i> - PCR					
MGYF	12,5pmol/µl	ACGATTGCTAATACC GGATAGGTG	Vorwärts	112-136	491bp
MGYR	12,5pmol/µl	ACCAAGTATCTAAAGC GGGCTG	Rückwärts	582-602	

#### 4.1.2 Bestimmung der optimalen Annealing- Temperatur

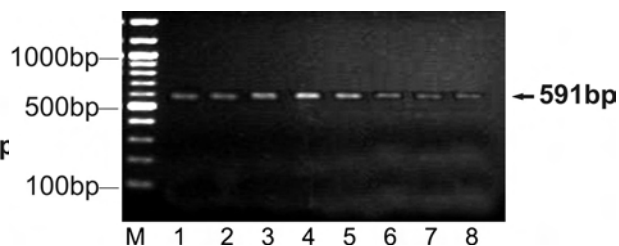
Die optimale Annealing- Temperatur wurde durch einen Annealing- Temperaturgradienten bestimmt. Dabei konnte innerhalb des jeweiligen gesamten Temperaturgradientenbereichs eine Amplifikation nachgewiesen werden.

Die Annealing- Temperatur, bei der das Amplifikat nach gelelektrophoretischer Auftrennung die stärkste Bande aufwies, wurde in das jeweilige Reaktionsprotokoll übernommen und ist in den Abbildungen 3 und 4 fett gekennzeichnet sowie in Tabelle 17 dargestellt.



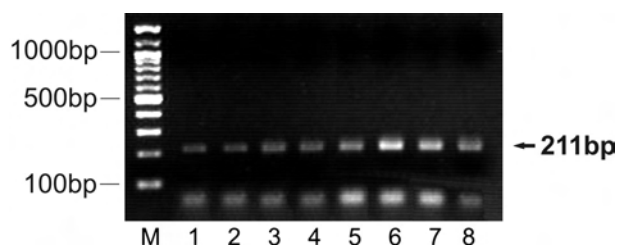
**Abb. 3a:**

Multispezies- PCR  
 Gradientenzykler 63 °C – 54 °C  
 M: 1kbp- DNS-Größenmarker,  
 1: 63 °C, 2: 62,5 °C, 3: 61,5 °C,  
 4: 59,8 °C, 5: 57,5 °C, 6: **55,9 °C**,  
 7: 54,8 °C, 8: 54 °C



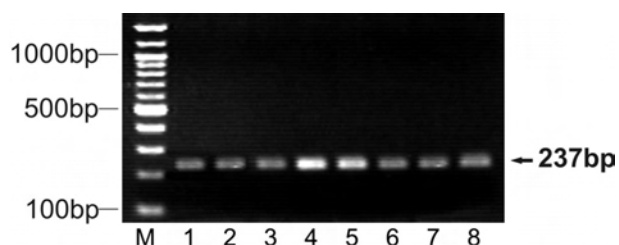
**Abb. 3b:**

MG/*M. imitans*- PCR  
 Gradientenzykler 63 °C – 54 °C  
 M: 100bp- DNS-Größenmarker,  
 1: 63 °C, 2: 62,5 °C, 3: 61,5 °C,  
 4: **59,8 °C**, 5: 57,5 °C, 6: 55,9 °C,  
 7: 54,8 °C, 8: 54 °C



**Abb. 3c:**

*M. synoviae*- PCR  
 Gradientenzykler 63 °C – 54 °C  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker,  
 1: 63 °C, 2: 62,5 °C, 3: 61,5 °C,  
 4: 59,8 °C, 5: 57,5 °C, 6: **55,9 °C**,  
 7: 54,8 °C, 8: 54 °C



**Abb. 3d:**

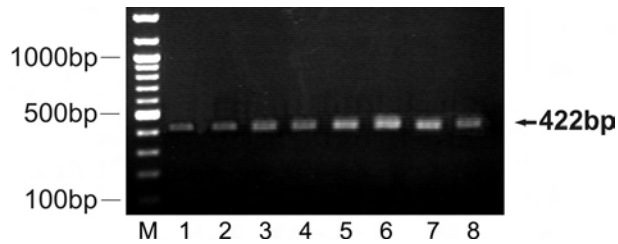
*M. iowae*- PCR  
 Gradientenzykler 63 °C – 54 °C  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker,  
 1: 63 °C, 2: 62,5 °C, 3: 61,5 °C,  
 4: **59,8 °C**, 5: 57,5 °C, 6: 55,9 °C,  
 7: 54,8 °C, 8: 54 °C

**Abb. 3a-3d:**

Ergebnisse der im Gradientenzykler durchgeführten PCR- Nachweismethoden zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur.

Die Reaktion wurde mit 35 Zyklen durchgeführt, vor diesen erfolgte eine initiale Denaturierung für 4 min bei 94 °C und danach eine finale Synthese bei 72 °C und 10 min. Die PCR- Amplifikate sind nach der Reaktion in einem nach Tabelle 10 entsprechenden Agarosegel durch elektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht worden. Die Temperatur, bei der die stärkste spezifische Amplifikationsbande auftrat ist fett dargestellt.



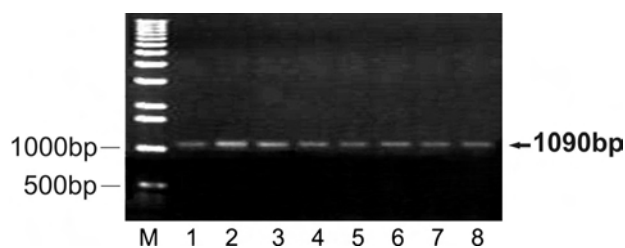


**Abb. 3e:**

*M. meleagridis*- PCR  
Gradientenzyklus 63 °C – 54 °C  
M: 100bp- DNS- Größenmarker,  
1: 63 °C, 2: 62,5 °C, 3: 61,5 °C,  
4: 59,8 °C, 5: 57,5 °C, 6: **55,9 °C**,  
7: 54,8 °C, 8: 54 °C

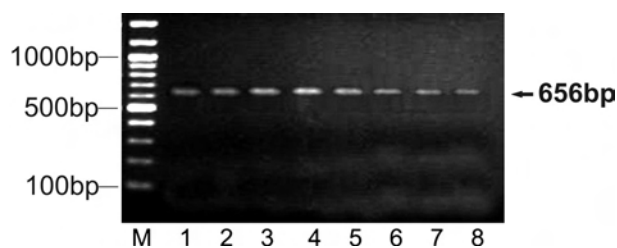
**Abb. 3e:**

Ergebnisse der im Gradientenzyklus durchgeführten PCR- Nachweismethoden zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur.  
Die Reaktion wurde mit 35 Zyklen durchgeführt, vor diesen erfolgte eine initiale Denaturierung für 4 min bei 94 °C und danach eine finale Synthese bei 72 °C und 10 min  
Die PCR- Amplifikate sind nach der Reaktion in einem nach Tabelle 10 entsprechenden Agarosegel durch elektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht worden. Die Temperatur, bei der die stärkste spezifische Amplifikationsbande auftrat ist fett dargestellt.



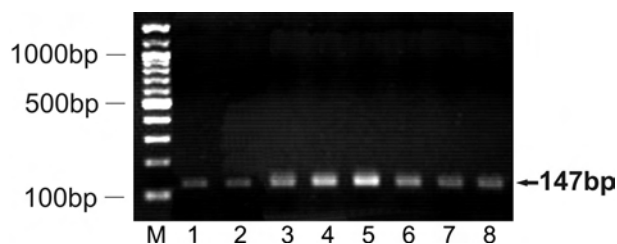
**Abb. 4a:**

*M. buteonis*- PCR  
 Gradientenzyklusler 63 °C – 54 °C  
 M: 1kbp- DNS- Größenmarker,  
 1: 63 °C, 2: **62,5 °C**, 3: 61,5 °C,  
 4: 59,8 °C, 5: 57,5 °C, 6: 55,9 °C,  
 7: 54,8 °C, 8: 54 °C



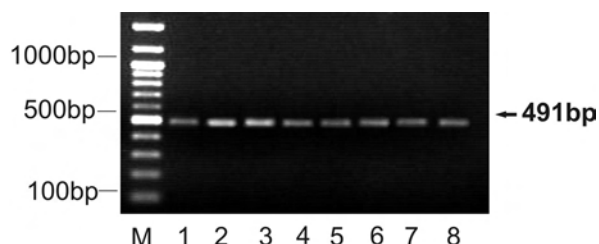
**Abb. 4b:**

*M. corogypsi*- PCR  
 Gradientenzyklusler 63 °C – 54 °C  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker,  
 1: 63 °C, 2: 62,5 °C, 3: 61,5 °C,  
 4: **59,8 °C**, 5: 57,5 °C, 6: 55,9 °C,  
 7: 54,8 °C, 8: 54 °C



**Abb. 4c:**

*M. falconis*- PCR  
 Gradientenzyklusler 57 °C – 50 °C  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker,  
 1: 57 °C, 2: 56,7 °C, 3: 55,8 °C,  
 4: 54,4 °C, 5: **52, 8 °C**, 6: 51, 5 °C,  
 7: 50, 6 °C, 8: 50 °C



**Abb. 4d:**

*M. gypis*- PCR  
 Gradientenzyklusler 63 °C – 54 °C  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker,  
 1: 63 °C, 2: **62,5 °C**, 3: 61,5 °C,  
 4: 59,8 °C, 5: 57,5 °C, 6: 55, 9 °C,  
 7: 54, 8 °C, 8: 54 °C

**Abb. 4a-d:**

Ergebnisse der im Gradientenzyklusler durchgeführten PCR- Nachweismethoden zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur. Die Reaktion wurde mit 35 Zyklen durchgeführt, vor diesen erfolgte eine initiale Denaturierung für 4 min bei 94 °C und danach eine finale Synthese bei 72 °C und 10 min. Die PCR- Amplifikate sind nach der Reaktion in einem nach Tabelle 10 entsprechenden Agarosegel durch elektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht worden. Die Temperatur, bei der die stärkste spezifische Amplifikationsbande auftrat ist fett dargestellt.

**Tab. 17:**

Temperaturprofile der durchgeführten PCR- Verfahren

PCR	Temperaturprofil			
MG/ <i>M. imitans</i> <i>M. iowae</i> <i>M. corogypsi</i>	Initiale Denaturierung: 4 min 94 °C			
	35 Zyklen	Denaturierung 30 sec 94 °C	Annealing 30 sec 60 °C	Synthese 30 sec 72 °C
	Finale Synthese: 10 min 72 °C			
Multispezies- PCR <i>M. synoviae</i> <i>M. meleagridis</i>	Initiale Denaturierung: 4 min 94 °C			
	35 Zyklen	Denaturierung 30 sec 94 °C	Annealing 30 sec 56 °C	Synthese 30 sec 72 °C
	Finale Synthese: 10 min 72 °C			
<i>M. buteonis</i> <i>M. gypis</i>	Initiale Denaturierung: 4 min 94 °C			
	35 Zyklen	Denaturierung 30 sec 94 °C	Annealing 30 sec 62 °C	Synthese 30 sec 72 °C
	Finale Synthese: 10 min 72 °C			
<i>M. falconis</i>	Initiale Denaturierung: 4 min 94 °C			
	35 Zyklen	Denaturierung 30 sec 94 °C	Annealing 30 sec 53 °C	Synthese 30 sec 72 °C
	Finale Synthese: 10 min 72 °C			

### 4.1.3 Spezifität der Primer

#### 4.1.3.1 Spezifität des Primerpaares der Multispezies- PCR

Mit dem Primerpaar GPF und MGSO der modifizierten PCR nach VAN KUPPEVELD (1992) konnte die DNS aller, in Tabelle 2 aufgeführten *Mollicutes* detektiert werden. Das Amplifikat lag bei allen untersuchten Mykoplasmenspezies auf der errechneten Höhe von ca. 1013 bp. Die DNS, der in Tabelle 2 aufgeführten, zellwandtragenden Bakterien, wurde von diesem Primerpaar nicht amplifiziert (Abb. 5a und 7a).

#### **4.1.3.2 Spezifität der speziesspezifischen Primerpaare zum Nachweis der geflügelpathogenen Mykoplasmenspezies MG/ *M. imitans*, MS, MI und MM**

Bei der Durchführung der speziesspezifischen PCR- Nachweismethoden wurde jeweils nur die für das Primerpaar spezifische DNS nachgewiesen (Abb. 5b - e und 7b - e). Das Primerpaar MGF/MGR amplifizierte sowohl DNS von MG als auch die DNS von *M. imitans* (Abb. 5b). Das Amplifikat lag sowohl bei der DNS von MG als auch der DNS von *M. imitans* auf der Höhe von 591 bp.

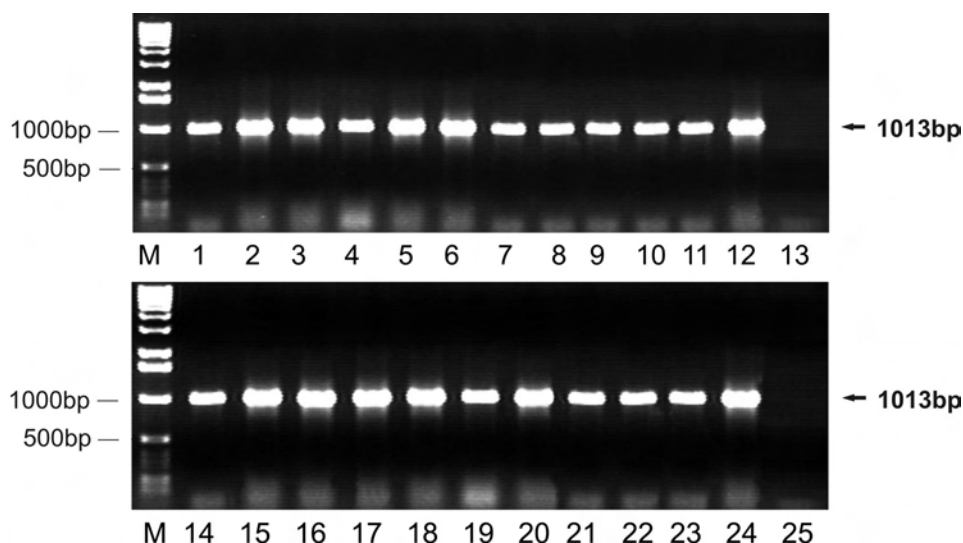
#### **4.1.3.3 Spezifität der speziesspezifischen Primerpaare zum Nachweis der Mykoplasmenspezies *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. gypis* und *M. falconis***

Bei der Durchführung der speziesspezifischen PCR- Nachweismethoden wurde nur die für die Nachweismethode spezifische DNS amplifiziert. Alle Amplifikate hatten die in Tabelle 16 dargestellten, auf der Grundlage der in Tabelle 9 angegebenen jeweiligen Sequenz errechneten Fragmentgrößen.

Sowohl die DNS der in Tabelle 2 angegebenen 22 anderen aviären Referenzstämme als auch die DNS der nicht aviären *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasma laidlawii* und zellwandtragender Bakterien, wurden von der jeweiligen Nachweismethode nicht amplifiziert (Abb. 6a - d und 8a - d).

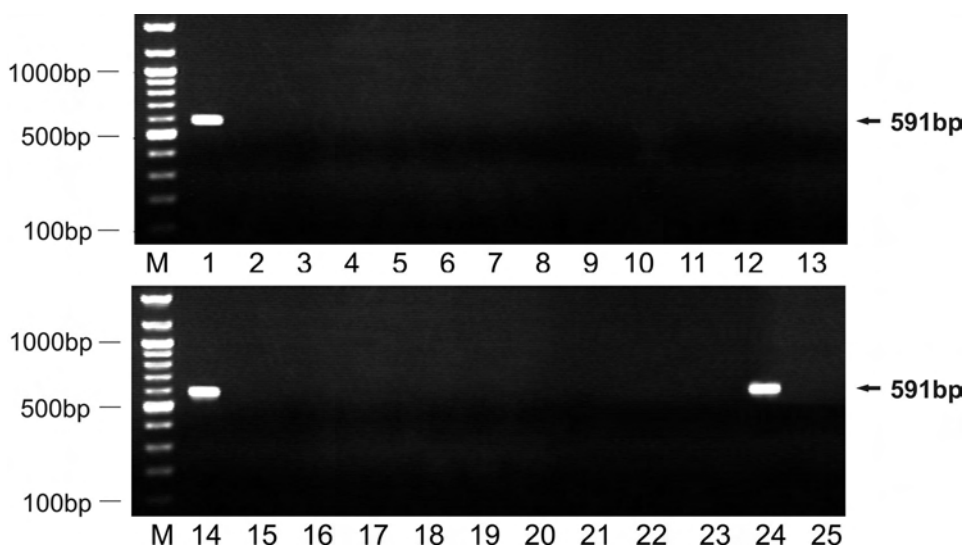
**Abb. 5a:**

Spezifität Multispezies- PCR



**Abb. 5b:**

Spezifität MG/ *M. imitans*- PCR



**Abb. 5a-b:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS aviärer Mykoplasmenspezies

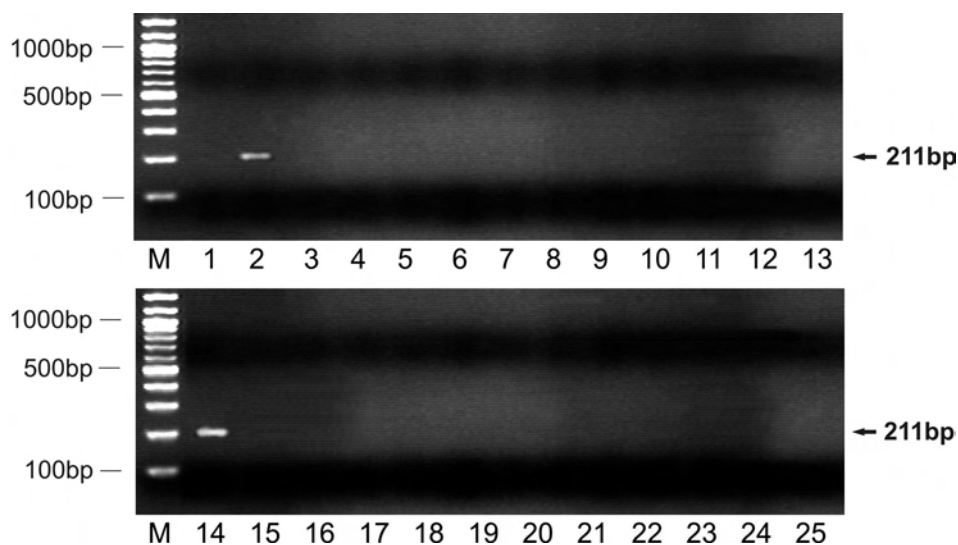
Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS- Größenmarker (Multispezies- PCR: 1kbp- DNS- Größenmarker)

1: *M. gallisepticum*, 2: *M. synoviae*, 3: *M. iowae*, 4: *M. meleagridis*, 5: *M. buteonis*, 6: *M. corogypsi*, 7: *M. falconis*, 8: *M. gypis*, 9: *M. anatis*, 10: *M. anseris*, 11: *M. cloacale*, 12: *M. columborale*, 13: Negativkontrolle, 14: Positivkontrolle der jeweiligen PCR-Methode (MG/*M. imitans*- PCR: MG- DNS), 15: *M. columbinasale*, 16: *M. columbinum*, 17: *M. gallopavonis*, 18: *M. gallinarum*, 19: *M. gallinaceum*, 20: *M. glycyphilum*, 21: *M. iners*, 22: *M. lipofaciens*, 23: *M. sturni*, 24: *M. imitans*, 25: Präparationskontrolle

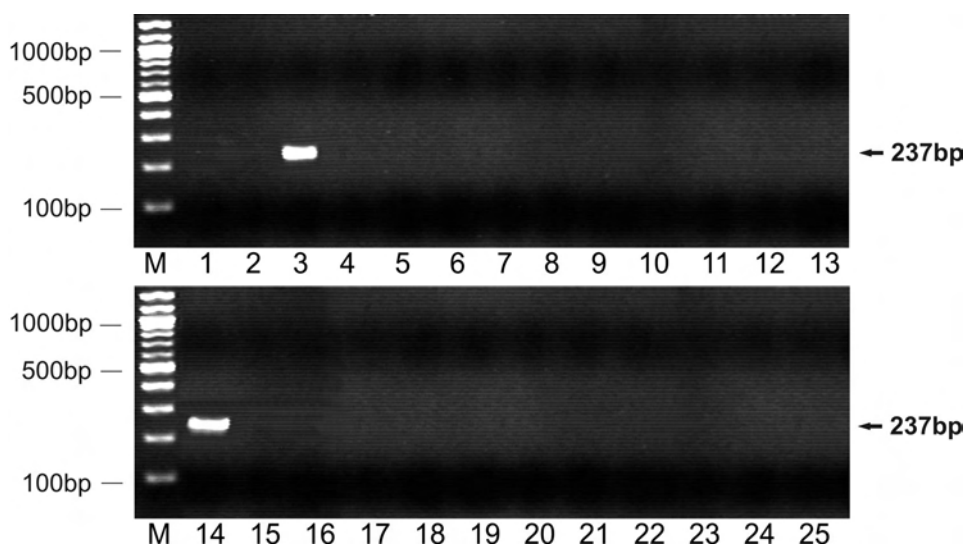
**Abb. 5c:**

Spezifität *M. synoviae*-PCR



**Abb. 5d:**

Spezifität *M. iowae*-PCR



**Abb. 5c-d:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS aviärer Mykoplasmenspezies

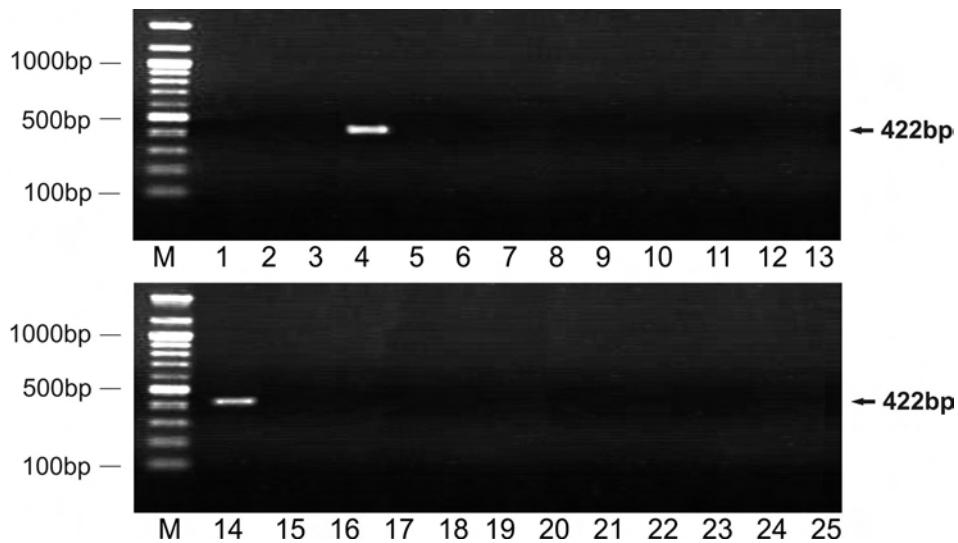
Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS- Größenmarker

1: *M. gallisepticum*, 2: *M. synoviae*, 3: *M. iowae*, 4: *M. meleagridis*, 5: *M. buteonis*,  
 6: *M. corogypsi*, 7: *M. falconis*, 8: *M. gypis*, 9: *M. anatis*, 10: *M. anseris*, 11: *M. cloacale*,  
 12: *M. columborale*, 13: Negativkontrolle, 14: Positivkontrolle der jeweiligen PCR-  
 Methode 15: *M. columbinasale*, 16: *M. columbinum*, 17: *M. gallopavonis*,  
 18: *M. gallinarum*, 19: *M. gallinaceum*, 20: *M. glycyphilum*, 21: *M. iners*,  
 22: *M. lipofaciens*, 23: *M. sturni*, 24: *M. imitans*, 25: Präparationskontrolle

**Abb. 5e:**

Spezifität *M. meleagridis* -PCR



**Abb. 5e:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS aviärer Mykoplasmenspezies

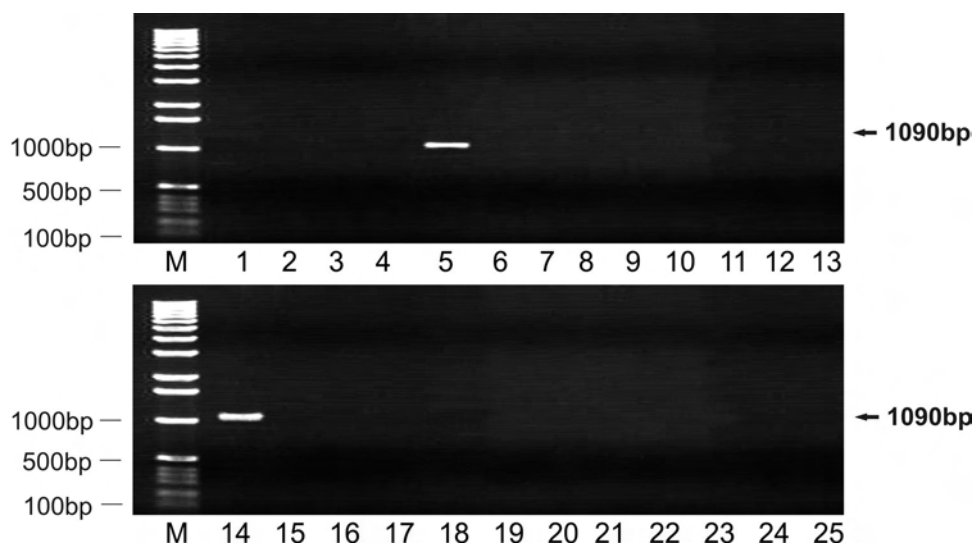
Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR-Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS- Größenmarker

1: *M. gallisepticum*, 2: *M. synoviae*, 3: *M. iowae*, 4: *M. meleagridis*, 5: *M. buteonis*,  
 6: *M. corogypsi*, 7: *M. falconis*, 8: *M. gypis*, 9: *M. anatis*, 10: *M. anseris*, 11: *M. cloacale*,  
 12: *M. columborale*, 13: Negativkontrolle, 14: Positivkontrolle der jeweiligen PCR-  
 Methode 15: *M. columbinasale*, 16: *M. columbinum*, 17: *M. gallopavonis*,  
 18: *M. gallinarum*, 19: *M. gallinaceum*, 20: *M. glycyphilum*, 21: *M. iners*,  
 22: *M. lipofaciens*, 23: *M. sturni*, 24: *M. imitans*, 25: Präparationskontrolle

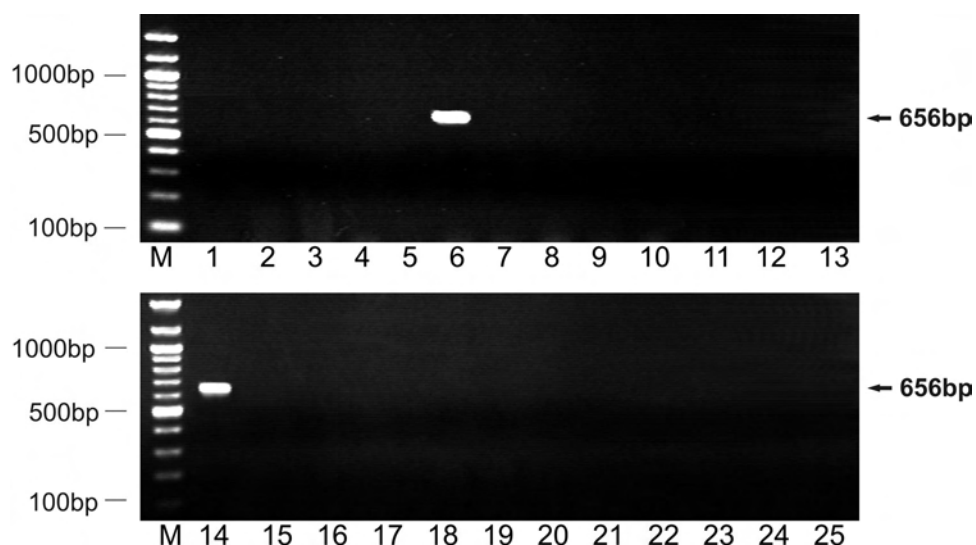
**Abb. 6a:**

Spezifität *M. buteonis*- PCR



**Abb. 6b:**

Spezifität *M. corogypsi*- PCR



**Abb. 6a-b:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS aviärer Mykoplasmenspezies

Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR-Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS-Größenmarker (*M. buteonis*- PCR: 1kbp- DNS- Größenmarker)

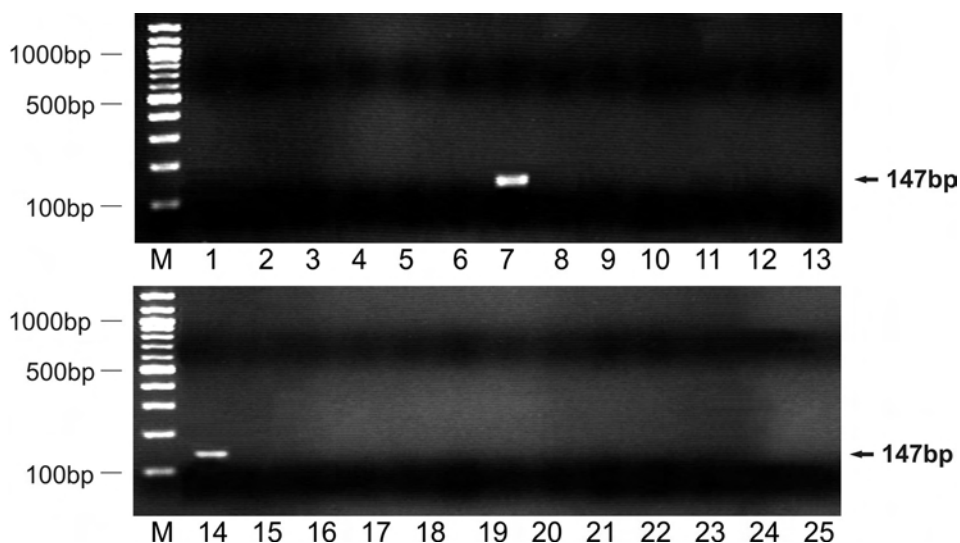
1: *M. gallisepticum*, 2: *M. synoviae*, 3: *M. iowae*, 4: *M. meleagridis*, 5: *M. buteonis*,  
 6: *M. corogypsi*, 7: *M. falconis*, 8: *M. gypis*, 9: *M. anatis*, 10: *M. anseris*, 11: *M. cloacale*,  
 12: *M. columborale*, 13: Negativkontrolle, 14: Positivkontrolle der jeweiligen PCR-  
 Methode,

15: *M. columbinasale*, 16: *M. columbinum*, 17: *M. gallopavonis*, 18: *M. gallinarum*,  
 19: *M. gallinaceum*, 20: *M. glycyphilum*, 21: *M. iners*, 22: *M. lipofaciens*, 23: *M. sturni*,  
 24: *M. imitans*, 25: Präparationskontrolle



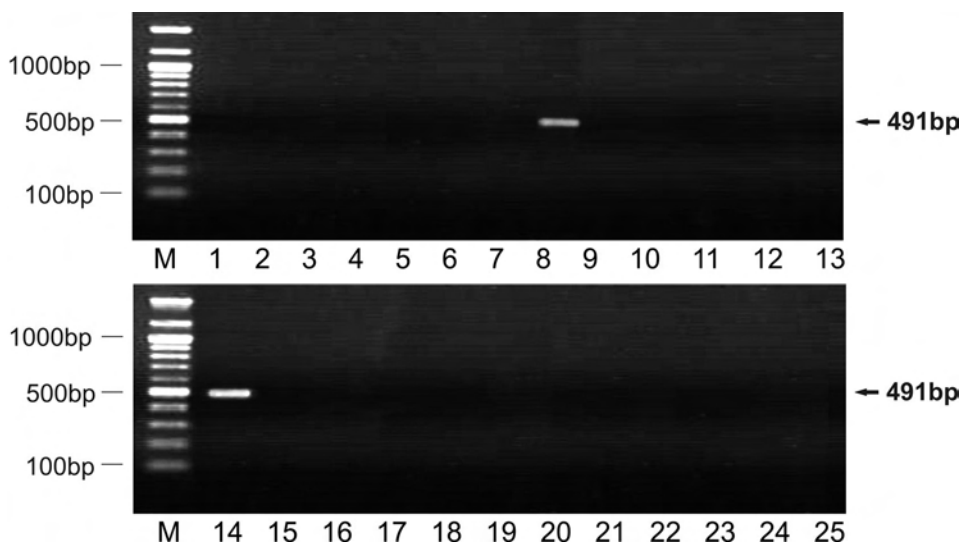
**Abb. 6c:**

Spezifität *M. falconis*- PCR



**Abb. 6d:**

Spezifität *M. gypis*- PCR



**Abb. 6c-d:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS aviärer Mykoplasmenspezies

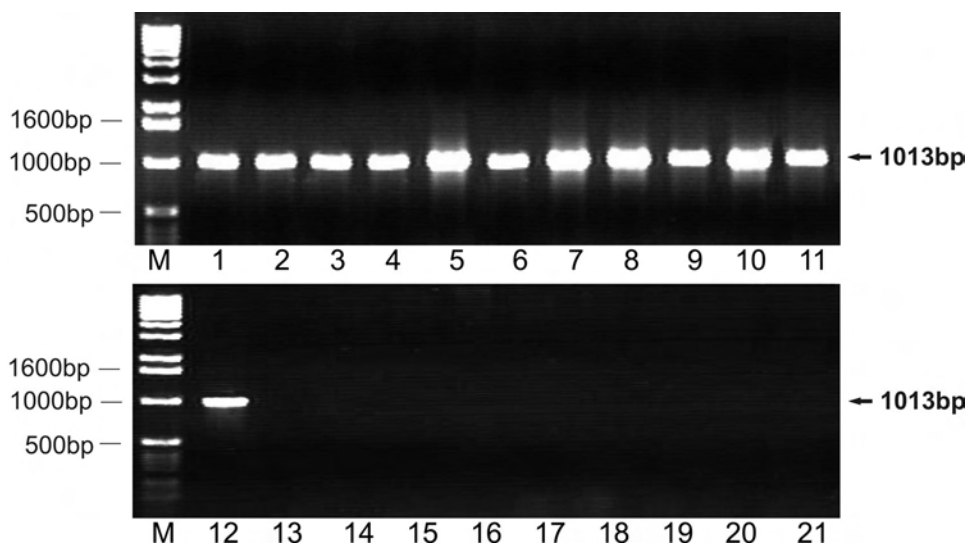
Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR-Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS-Größenmarker

1: *M. gallisepticum*, 2: *M. synoviae*, 3: *M. iowae*, 4: *M. meleagridis*, 5: *M. buteonis*,  
 6: *M. corogypsi*, 7: *M. falconis*, 8: *M. gypis*, 9: *M. anatis*, 10: *M. anseris*, 11: *M. cloacale*,  
 12: *M. columborale*, 13: Negativkontrolle, 14: Positivkontrolle der jeweiligen PCR-  
 Methode, 15: *M. columbinasale*, 16: *M. columbinum*, 17: *M. gallopavonis*,  
 18: *M. gallinarum*, 19: *M. gallinaceum*, 20: *M. glycyphilum*, 21: *M. iners*,  
 22: *M. lipofaciens*, 23: *M. sturni*, 24: *M. imitans*, 25: Präparationskontrolle

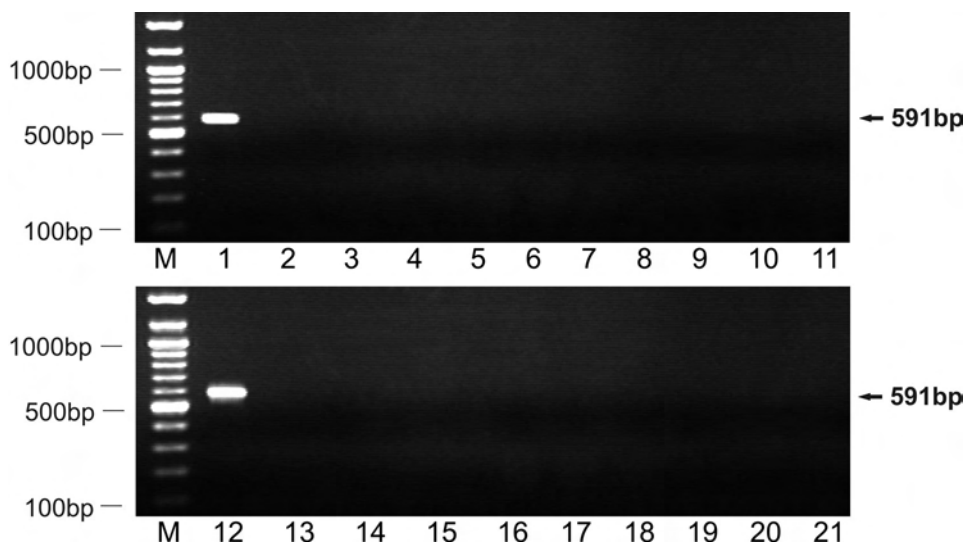
**Abb. 7a:**

Spezifität Multispezies- PCR



**Abb. 7b:**

Spezifität MG/*M. imitans*- PCR



**Abb. 7a-b:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS nicht aviärer *Mycoplasmataceae*, *A. laidlawii* sowie der DNS zellwandtragender Bakterienspezies

Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR- Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS- Größenmarker (Multispezies- PCR: 1kbp- DNS- Größenmarker)

1 und 12: DNS des entsprechenden Referenzstammes (MG/*M. imitans*- PCR: MG-DNS),

2: *M. arginini*, 3: *M. arthrididis*, 4: *M. canis*, 5: *M. equigenitalium*, 6: *M. felis*,

7: *M. fermentans*, 8: *M. hyorhinae*, 9: *M. salivarium*, 10: *M. spumans*, 11: *A. laidlawii*,

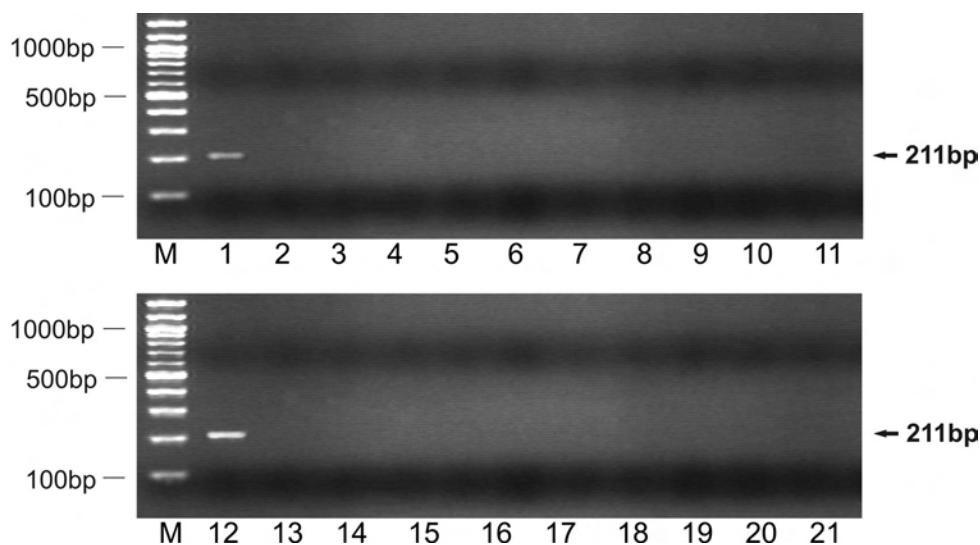
13: *P. avium*, 14: *P. gallinarum*, 15: *P. multocida*, 16: *Ps. aeruginosa*,

17: *O. rhinotracheale*, 18: *S. typhimurium*, 19: *E. coli*, 20: Negativkontrolle,

21: Präparationskontrolle

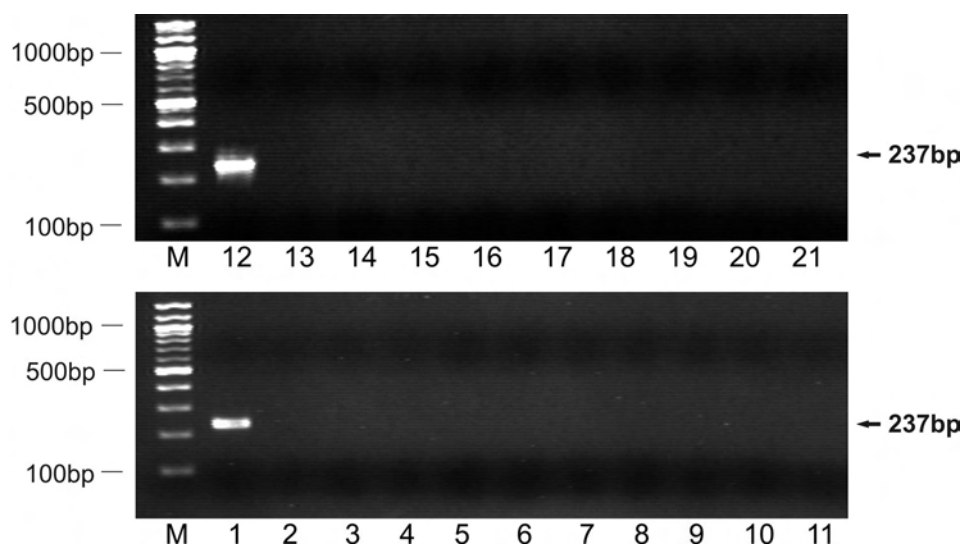
**Abb. 7c:**

Spezifität *M. synoviae*-PCR



**Abb. 7d:**

Spezifität *M. iowae*-PCR



**Abb. 7c-d:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS nicht aviärer *Mycoplasmataceae*, *A. laidlawii* sowie der DNS zellwandtragender Bakterienspezies

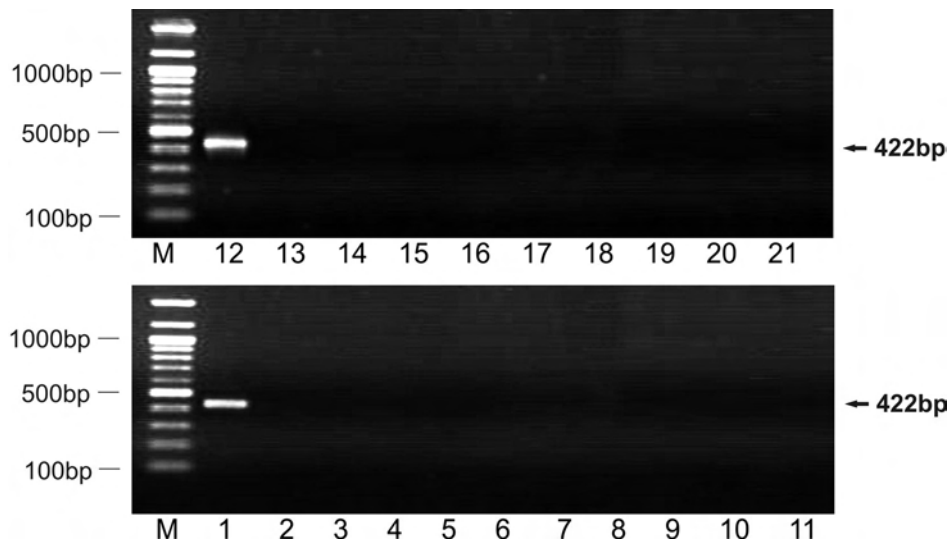
Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR-Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS- Größenmarker

1 und 12: DNS des entsprechenden Referenzstammes 2: *M. arginini*, 3: *M. arthrididis*, 4: *M. canis*, 5: *M. equigenitalium*, 6: *M. felis*, 7: *M. fermentans*, 8: *M. hyorhinis*, 9: *M. salivarium*, 10: *M. spumans*, 11: *A. laidlawii*, 13: *P. avium*, 14: *P. gallinarum*, 15: *P. multocida*, 16: *Ps. aeruginosa*, 17: *O. rhinotracheale*, 18: *S. typhimurium*, 19: *E. coli*, 20: Negativkontrolle, 21: Präparationskontrolle

**Abb. 7e:**

Spezifität *M. meleagridis*- PCR



**Abb. 7e:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS nicht aviärer *Mycoplasmataceae*, *A. laidlawii* sowie der DNS zellwandtragender Bakterienspezies

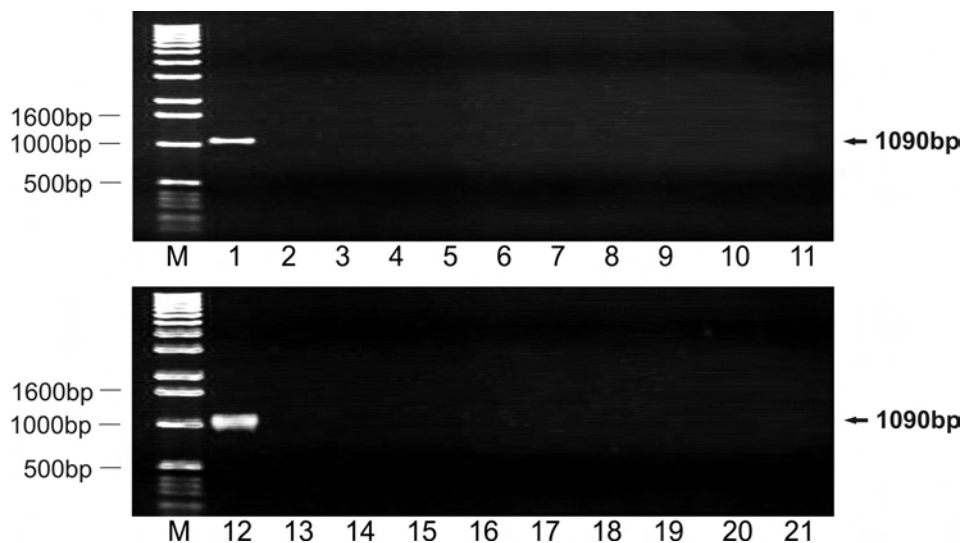
Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR- Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS- Größenmarker

1 und 12: DNS des entsprechenden Referenzstammes, 2: *M. arginini*, 3: *M. arthrididis*, 4: *M. canis*, 5: *M. equigenitalium*, 6: *M. felis*, 7: *M. fermentans*, 8: *M. hyorhinis*, 9: *M. salivarium*, 10: *M. spumans*, 11: *A. laidlawii*, 13: *P. avium*, 14: *P. gallinarum*, 15: *P. multocida*, 16: *Ps. aeruginosa*, 17: *O. rhinotracheale*, 18: *S. typhimurium*, 19: *E. coli*, 20: Negativkontrolle, 21: Präparationskontrolle

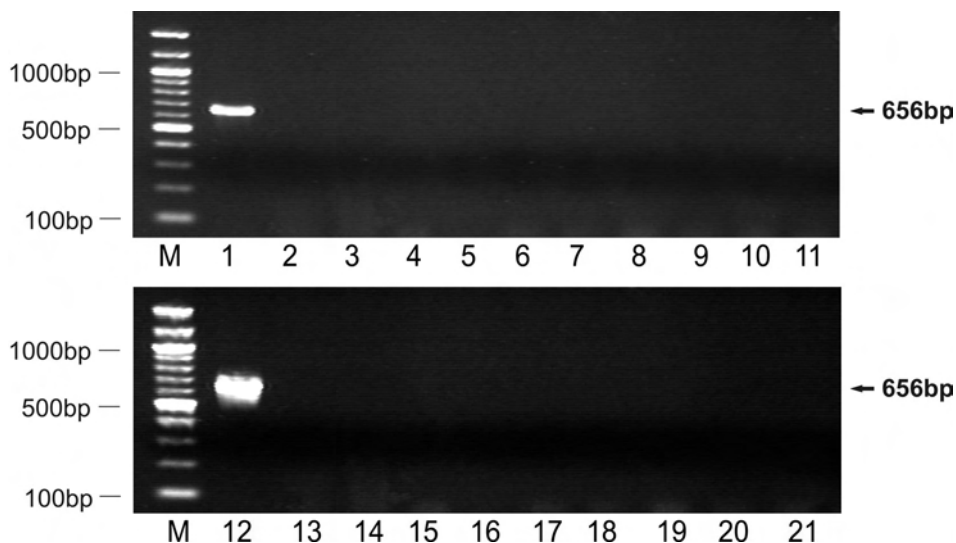
**Abb. 8a:**

Spezifität *M. buteonis*- PCR



**Abb. 8b:**

Spezifität *M. corogypsi*- PCR



**Abb. 8a-b:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS nicht aviärer *Mycoplasmataceae*, *A. laidlawii* sowie der DNS zellwandtragender Bakterienspezies

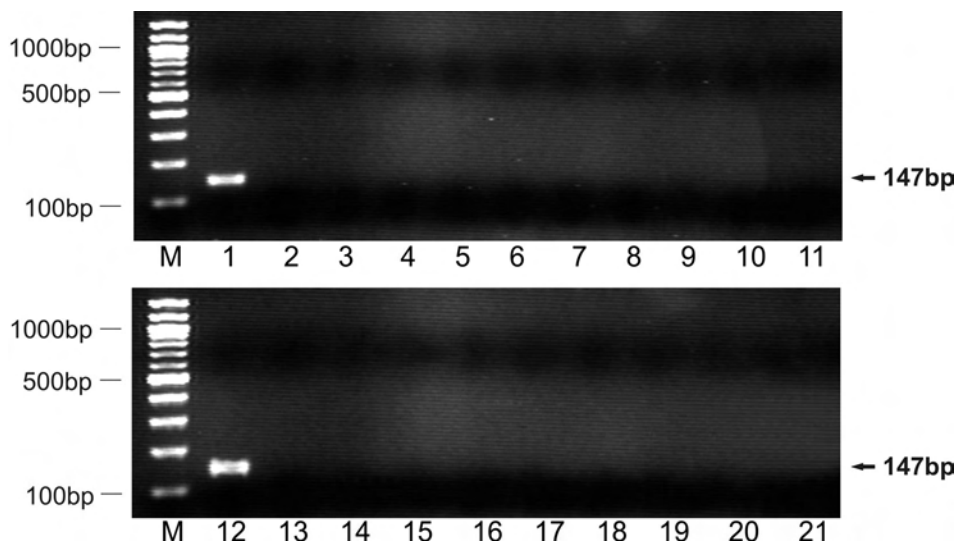
Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR-Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS-Größenmarker (*M. buteonis*- PCR: 1kbp- DNS- Größenmarker)

1 und 12: DNS des entsprechenden Referenzstammes, 2: *M. arginini*, 3: *M. arthrididis*, 4: *M. canis*, 5: *M. equigenitalium*, 6: *M. felis*, 7: *M. fermentans*, 8: *M. hyorhinis*, 9: *M. salivarium*, 10: *M. spumans*, 11: *A. laidlawii*, 13: *P. avium*, 14: *P. gallinarum*, 15: *P. multocida*, 16: *Ps. aeruginosa*, 17: *O. rhinotracheale*, 18: *S. typhimurium*, 19: *E. coli*, 20: Negativkontrolle, 21: Präparationskontrolle

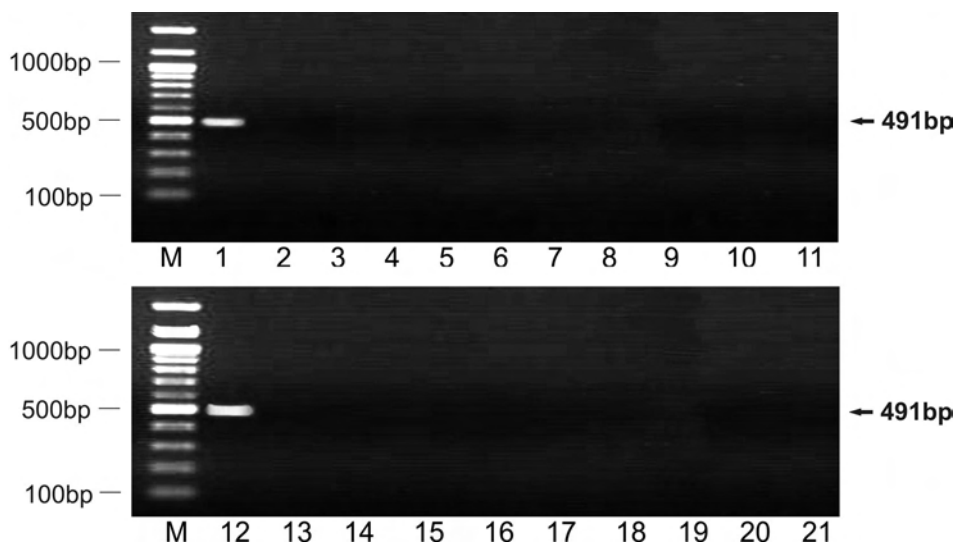
**Abb. 8c:**

Spezifität *M. falconis*- PCR



**Abb. 8d:**

Spezifität *M. gypis*- PCR



**Abb. 8c-d:**

Spezifitätsnachweis anhand der DNS nicht aviärer *Mycoplasmataceae*, *A. laidlawii* sowie der DNS zellwandtragender Bakterienspezies

Nach Durchführung der jeweiligen PCR wurden die PCR- Produkte auf ein der jeweiligen Fragmentgröße entsprechendes Agarosegel aufgetragen und durch gelelektrophoretische Auftrennung mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS-Größenmarker

1 und 12: DNS des entsprechenden Referenzstammes, 2: *M. arginini*, 3: *M. arthrididis*, 4: *M. canis*, 5: *M. equigenitalium*, 6: *M. felis*, 7: *M. fermentans*, 8: *M. hyorhinis*, 9: *M. salivarium*, 10: *M. spumans*, 11: *A. laidlawii*, 13: *P. avium*, 14: *P. gallinarum*, 15: *P. multocida*, 16: *Ps. aeruginosa*, 17: *O. rhinotracheale*, 18: *S. typhimurium*, 19: *E. coli*, 20: Negativkontrolle, 21: Präparationskontrolle

#### 4.1.4 Restriktionsenzymanalyse (REA)

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität des jeweiligen amplifizierten PCR- Produktes wurde das jeweilige PCR- Produkt unter der Verwendung der in Tabelle 18 angegebenen Restriktionsenzyme gespalten. Nach der erfolgten Restriktion wurden die entstandenen Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Die dabei erhaltenen Fragmente entsprachen in allen Fällen der durch die jeweils spezifischen Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme errechneten Fragmentgrößen (Abb. 9a - g).

Zur Differenzierung von MG und *M. imitans* wurden die Restriktionsenzyme *MseI* und *AseI* (Tab. 19) eingesetzt, die aufgrund ihrer spezifischen Spaltstellen eine Differenzierung der beiden Mykoplasmenspezies ermöglicht. Dabei spaltet *MseI* das MG- Amplifikat in die Fragmente 14, 19, 33, 131, 188, 206, während sich aus dem *M. imitans*- Amplifikat Fragmente von 14, 33, 206 und 338 bp ergaben (Abb. 9h). Das Restriktionsenzym *AseI* bildete aus dem MG- Amplifikat ein Restriktionsfragmentmuster von 206 und 385 bp, während das *M. imitans*- Amplifikat keine Spaltstelle aufwies und ungespalten blieb (Abb. 9i).

## Ergebnisse

**Tab. 18:**

Verwendete Restriktionsenzyme für die Restriktion des jeweiligen PCR- Amplifikats unter Angabe der Erkennungssequenz und der zu erwartenden Fragmentgröße

Enzym	Herkunft	Erkennungssequenz	errechnete Fragmentgröße
<b><i>M. synoviae</i> - Amplifikat 211 bp</b>			
Hinf I	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>f</sub>	5'- G/ANTC -3' 3'- CTNA/G -5'	86,125
<b><i>M. iowae</i> - Amplifikat 237 bp</b>			
Mse I	<i>Micrococcus species</i>	5'- T/TAA -3' 3'- AAT/T -5'	104,133
<b><i>M. meleagridis</i> - Amplifikat 422 bp</b>			
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>d</sub>	5'- A/AGCTT -3' 3'- TCGA/A -5'	145,277
<b><i>M. buteonis</i> - Amplifikat 1090 bp</b>			
Sst I	<i>Streptomyces stanford</i>	5'- GAGCT/C -3' 3'- C/TCGAG -5'	454,636
<b><i>M. corogypsi</i> - Amplifikat 656 bp</b>			
Kpn I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5'- GGTAC/C -3' 3'- C/CATGG -5'	285,371
<b><i>M. falconis</i> - Amplifikat 147 bp</b>			
Mse I	<i>Micrococcus species</i>	5'- T/TAA -3' 3'- AAT/T -5'	57,90
<b><i>M. gypis</i> - Amplifikat 491 bp</b>			
Dpn II	<i>Diplococcus pneumoniae</i> G41	5'- /GATC -3' 3'- CTAG/ -5'	156,335

**Tab. 19:**

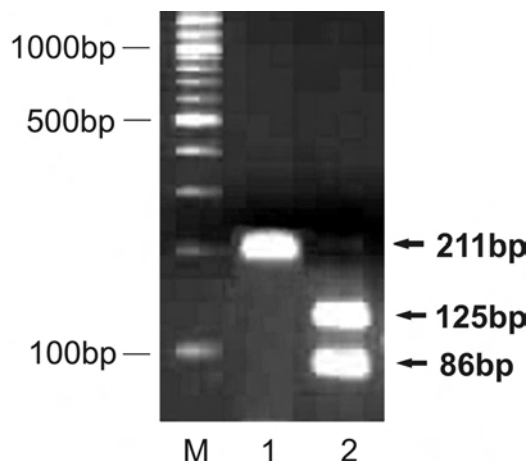
Verwendete Restriktionsenzyme zur Differenzierung der Mykoplasmenpezies

*M. gallisepticum* und *M. imitans*

Enzym	Herkunft	Erkennungssequenz	errechnete Fragmentgröße	
			MG	<i>M. imitans</i>
Mse I	<i>Micrococcus species</i>	5'- T/TAA - 3' 3'- AAT/T -5'	(14),(19),(33), 131,188,206	(14),(33), 206,338
Ase I	<i>Asquaspirillum serpens</i>	5'- AT/TAAT - 3' 3'- TAAT/TA -5'	206,385	591

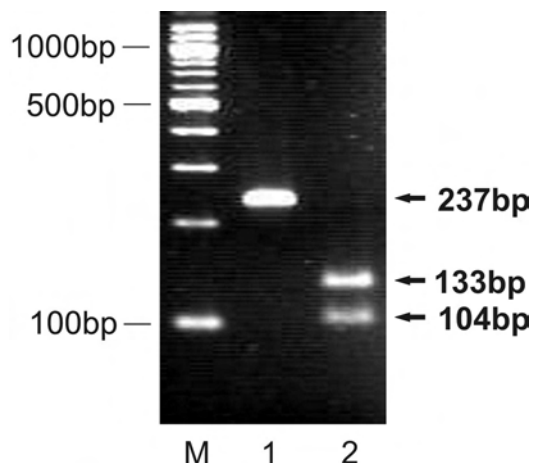
( ) Die in Klammern angegebenen Fragmentgrößen waren mittels Gelelektrophorese nicht darstellbar





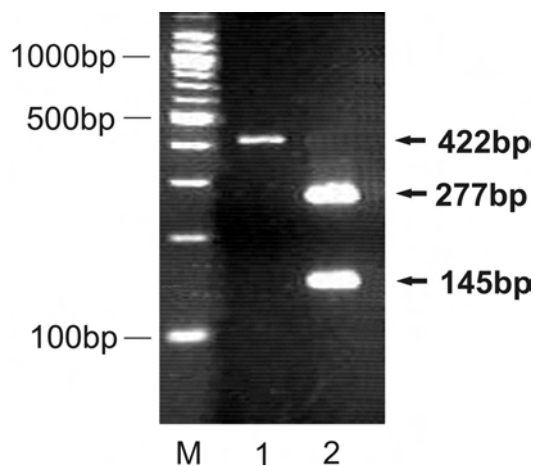
**Abb. 9a:**

REA des *M. synoviae*- PCR-  
Produktes mit dem Enzym Hinf I.  
M: 100bp- DNS- Größenmarker  
1: MS- PCR- Produkt ohne  
Restriktion  
2: MS- PCR- Produkt nach  
Restriktion durch Hinf I.



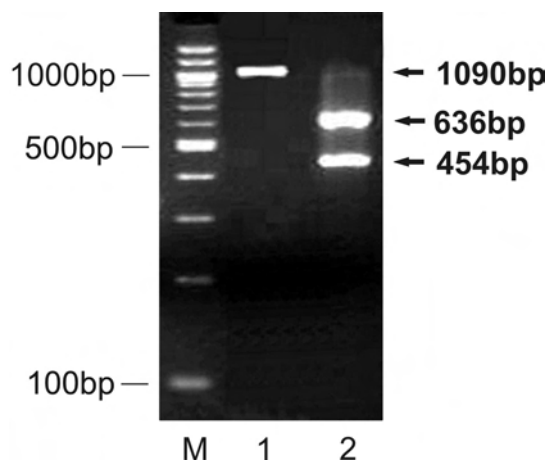
**Abb. 9b:**

REA des *M. iowae*- PCR-  
Produktes mit dem Enzym Mse I.  
M: 100bp- DNS- Größenmarker  
1: MI- PCR- Produkt ohne  
Restriktion  
2: MI- PCR- Produkt nach  
Restriktion durch Mse I



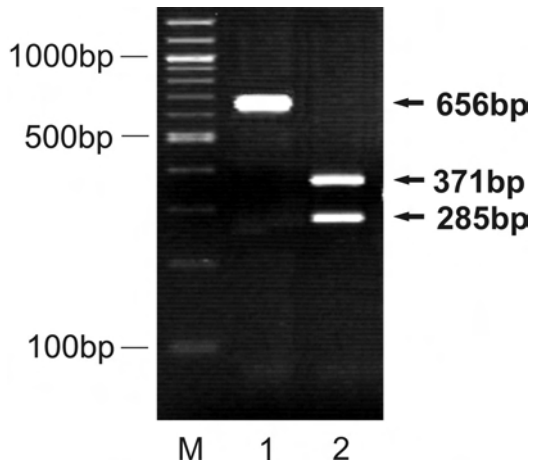
**Abb. 9c:**

REA des *M. meleagridis*- PCR-  
Produktes mit dem Enzym Hind III.  
M: 100bp- DNS- Größenmarker  
1: MM- PCR- Produkt ohne  
Restriktion  
2: MM- PCR- Produkt nach  
Restriktion durch Mse I.



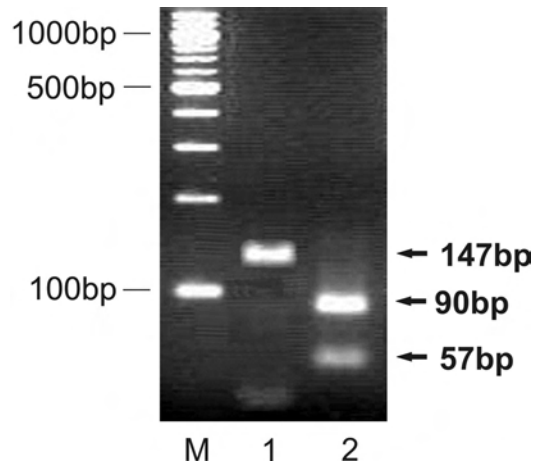
**Abb. 9d:**

REA des *M. buteonis*- PCR-  
Produktes mit dem Enzym Sst I.  
M: 100bp- DNS- Größenmarker  
1: *M. buteonis*- PCR- Produkt ohne  
Restriktion  
2: *M. buteonis*- PCR- Produkt nach  
Restriktion durch Sst I.



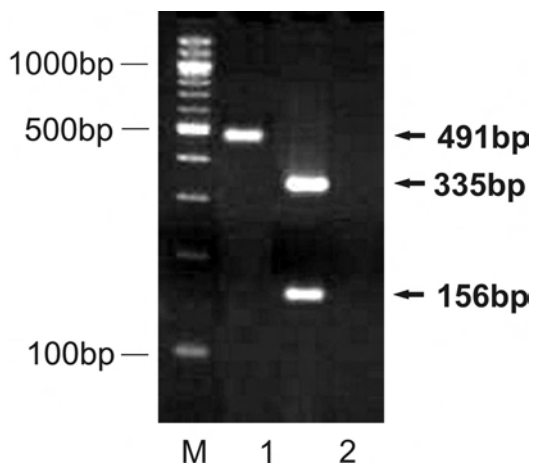
**Abb. 9e:**

REA des *M. corogypsi*- PCR-  
 Produktes mit dem Enzym Kpn I.  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: *M. corogypsi*- PCR- Produkt  
 ohne Restriktion  
 2: *M. corogypsi*- PCR- Produkt  
 nach Restriktion durch Kpn I.



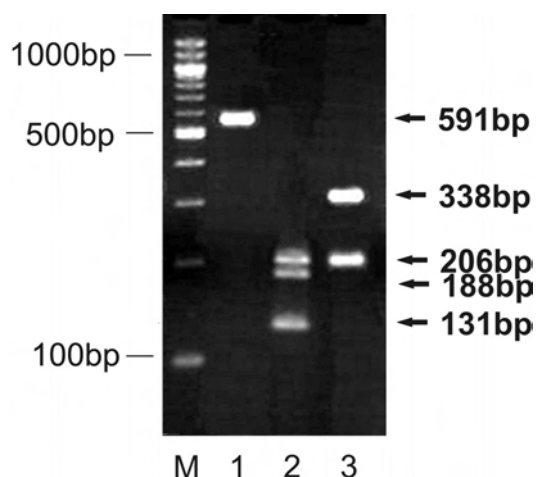
**Abb. 9f:**

REA des *M. falconis*- PCR-  
 Produktes mit dem Enzym Mse I.  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: *M. falconis*- PCR- Produkt  
 ohne Restriktion  
 2: *M. falconis*- PCR- Produkt  
 nach Restriktion durch Mse I.

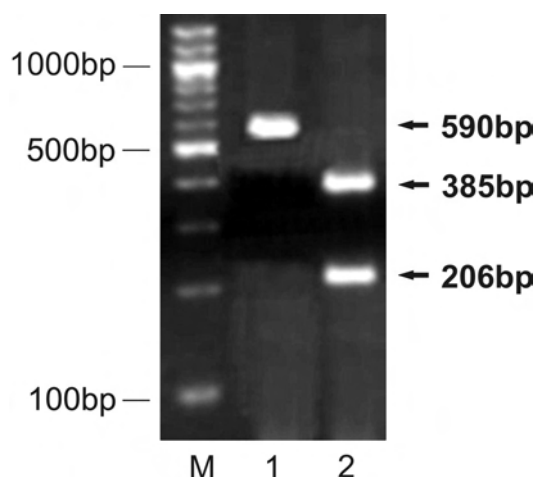


**Abb. 9g :**

REA des *M. gypis*- PCR-  
 Produktes mit dem Enzym Dpn II.  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: *M. gypis*- PCR- Produkt  
 ohne Restriktion  
 2: *M. gypis*- PCR- Produkt  
 nach Restriktion durch Dpn II.

**Abb. 9h:**

REA zur Differenzierung von MG und *M. imitans* mittels Mse I.  
 M: 100bp- DNS- Größensmarker  
 1: Positivkontrolle (MG- DNS) ohne Restriktion  
 2: MG- PCR- Produkt nach Restriktion mit Mse I.  
 3: *M. imitans*- PCR- Produkt nach Restriktion mit Mse I.

**Abb. 9i:**

REA zur Differenzierung von MG und *M. imitans* mittels Ase I.  
 M: 100bp- DNS- Größensmarker  
 1: *M. imitans*- PCR- Produkt nach Restriktion mit Ase I.  
 2: MG- PCR- Produkt nach Restriktion mit Ase I.

## 4.2 Untersuchung der Sensitivität der verschiedenen PCR-Nachweismethoden

Die Bestimmung der Nachweisgrenze für das jeweilige PCR- Nachweisverfahren erfolgte wie in Abschnitt 3.5.5 dargestellt. Dabei konnte mit der Multispezies- PCR sowohl die beispielhaft eingesetzte DNS von *M. gypis* als auch die DNS von *M. synoviae* bis zu einem Gehalt von 1 pg DNS/ Reaktionsansatz (Abb. 10a und c) nachgewiesen werden. Bei der Ermittlung der Sensitivität anhand Koloniebildender Einheiten (KbE) erfolgte bei beiden Mykoplasmenspezies noch ein positiver Nachweis bei 1 KbE/ Reaktionsansatz (Abb. 10b und d).

Bei der MG/*M. imitans*- PCR, der MI- PCR sowie der *M. corogypsi*- PCR liegt die Nachweisgrenze für DNS bei 100 fg DNS/ Reaktionsansatz (Abb. 10e, g, k, q). Die Nachweisgrenze der KbE liegt bei 0,1 KbE/ Reaktionsansatz (Abb. 10f, h, l, r). Die Bestimmung der Nachweisgrenze der MG/ *M. imitans*- PCR erfolgte sowohl mit MG als auch mit *M. imitans* (Abb. 10e, f, g, h).

Bei der Ermittlung der Sensitivität der MS-PCR, *M. falconis*- PCR und *M. gypis*- PCR konnten 1 pg DNS/ Reaktionsansatz (Abb. 10i, s, u) und 1 KbE/ Reaktionsansatz nachgewiesen werden (Abb. 10j, t, v). Die Nachweisgrenze der *M. buteonis*- PCR liegt bei 50 fg DNS/ Reaktionsansatz (Abb. 10o) und 0,05 KbE/ Reaktionsansatz (Abb. 10p).

Die Ermittlung der Sensitivität der MM- PCR ergab eine Nachweisgrenze von 10 pg DNS/Reaktionsansatz bzw. 10 KbE/ Reaktionsansatz (Abb. 10m und n)

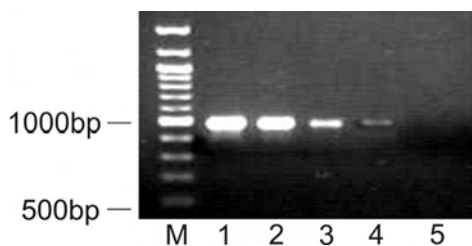
Die ermittelten Nachweisgrenzen sind in Tabelle 20 angegeben.

**Tab. 20:**

Sensitivität der verschiedenen PCR- Nachweismethoden

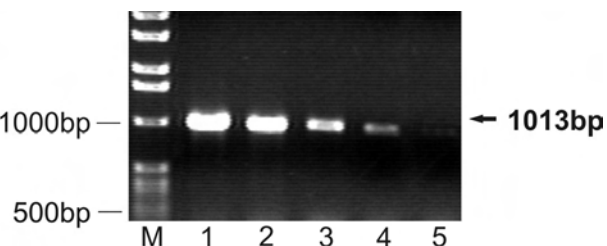
PCR	Sensitivität/ Reaktionsansatz	
	DNS	KbE
Multispezies- PCR <sup>1</sup>	1 pg	1 KbE
MG/ <i>M. imitans</i> - PCR	100 fg	0,1 KbE
MS- PCR	1 pg	1 KbE
MI- PCR	100 fg	0,1 KbE
MM- PCR	10 pg	10 KbE
<i>M. buteonis</i> - PCR	50 fg	0,05 KbE
<i>M. corogypsi</i> - PCR	100 fg	0,1 KbE
<i>M. falconis</i> - PCR	1 pg	1 KbE
<i>M. gypis</i> - PCR	1 pg	1 KbE

<sup>1</sup> Sensitivitätsnachweis anhand der DNS von MS sowie von *M. gypis*



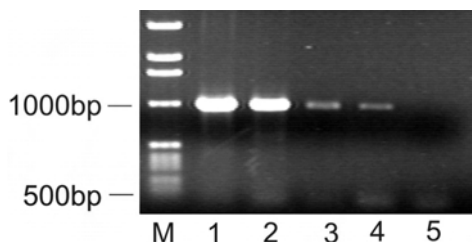
**Abb. 10a:**

Sensitivität Multispezies- PCR  
*M. gypis*- DNS- Verdünnungsreihe  
 M: 1kbp- DNS- Größenmarker  
 1: 1 ng, 2: 100 pg, 3: 10 pg, 4: 1 pg,  
 5: 100 fg



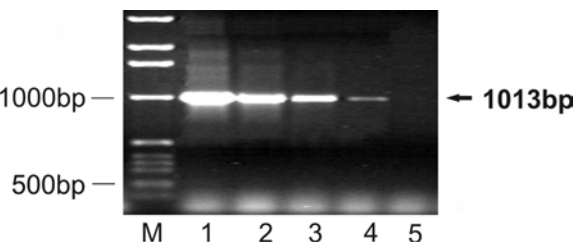
**Abb. 10b:**

Sensitivität Multispezies- PCR  
*M. gypis*- KbE- Verdünnungsreihe  
 M: 1kbp- DNS- Größenmarker  
 1: 10<sup>3</sup> KbE, 2: 10<sup>2</sup> KbE, 3: 10 KbE,  
 4: 1 KbE, 5: 0,1 KbE



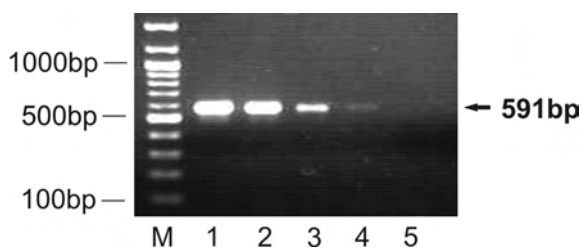
**Abb. 10c:**

Sensitivität Multispezies- PCR  
*M. synoviae*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 1kbp- DNS- Größenmarker  
 1: 1 ng, 2: 100 pg, 3: 10 pg, 4: 1 pg,  
 5: 100 fg



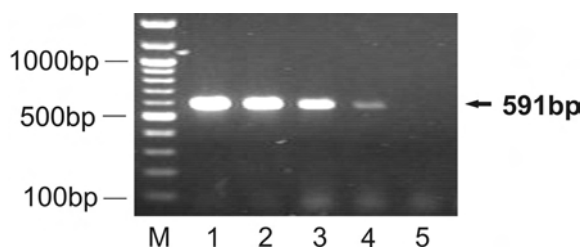
**Abb. 10d:**

Sensitivität Multispezies- PCR  
*M. synoviae*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 1kbp- DNS- Größenmarker  
 1: 10<sup>3</sup> KbE, 2: 10<sup>2</sup> KbE, 3: 10 KbE,  
 4: 1 KbE, 5: 0,1 KbE



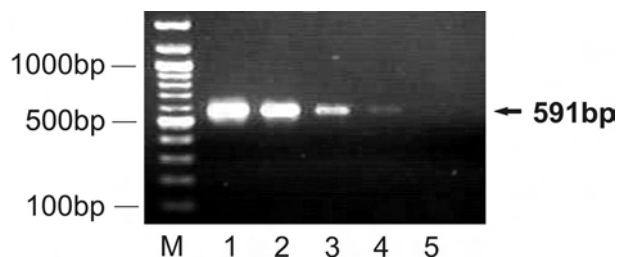
**Abb. 10e:**

Sensitivität MG/*M. imitans*- PCR  
 MG- DNS- Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 100 pg, 2: 10 pg, 3: 1 pg,  
 4: 100 fg, 5: 50 fg



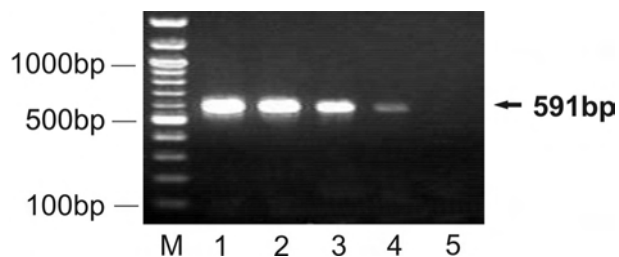
**Abb. 10f:**

Sensitivität MG/*M. imitans*- PCR  
 MG- KbE- Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 10<sup>2</sup> KbE, 2: 10 KbE, 3: 1 KbE,  
 4: 0,1 KbE, 5: 0,05 KbE



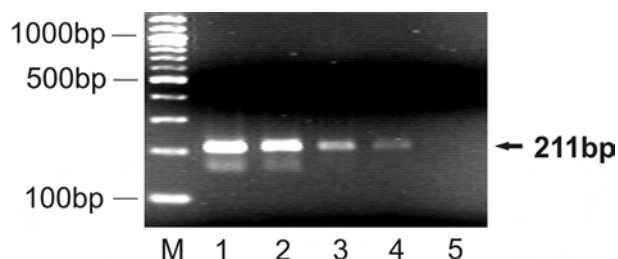
**Abb. 10g:**

Sensitivität MG/*M. imitans*- PCR  
*M. imitans*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 100 pg, 2: 10 pg, 3: 1 pg,  
 4: 100 fg, 5: 50 fg



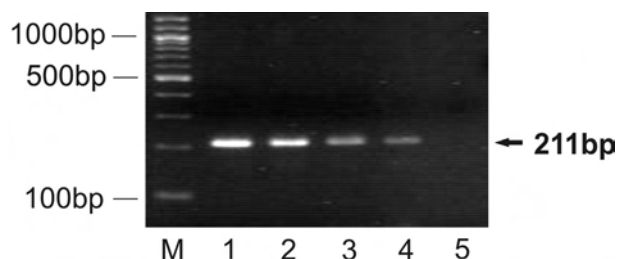
**Abb. 10h:**

Sensitivität MG/*M. imitans*- PCR  
*M. imitans*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 102 KbE, 2: 10 KbE, 3: 1 KbE  
 4: 0,1 KbE, 5: 0,05 KbE



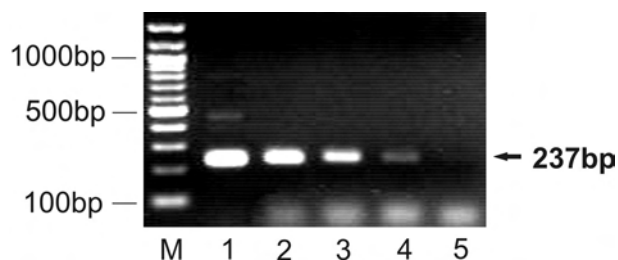
**Abb. 10i:**

Sensitivität *M. synoviae*- PCR  
*M. synoviae*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 1 ng, 2: 100 pg, 3: 10 pg,  
 4: 1 pg, 5: 100 fg



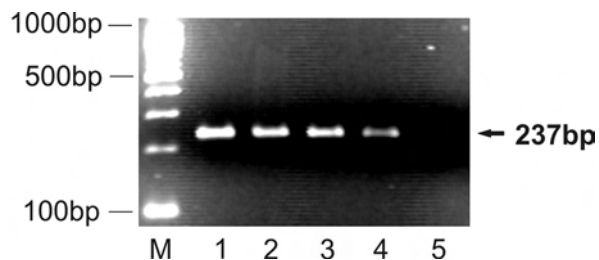
**Abb. 10j:**

Sensitivität *M. synoviae*- PCR  
*M. synoviae*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 10<sup>3</sup> KbE, 2: 10<sup>2</sup> KbE, 3: 10 KbE  
 4: 1 KbE, 5: 0,1 KbE



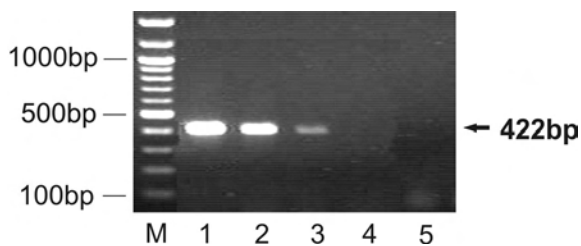
**Abb. 10k:**

Sensitivität *M. iowae*- PCR  
*M. iowae*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 100 pg, 2: 10 pg, 3: 1 pg,  
 4: 100 fg, 5: 50 fg



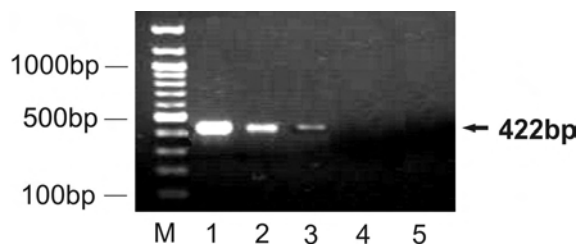
**Abb. 10l:**

Sensitivität *M. iowae*- PCR  
*M. iowae*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 10<sup>2</sup> KbE, 2: 10 KbE, 3: 1 KbE  
 4: 0,1 KbE, 5: 0,05 KbE



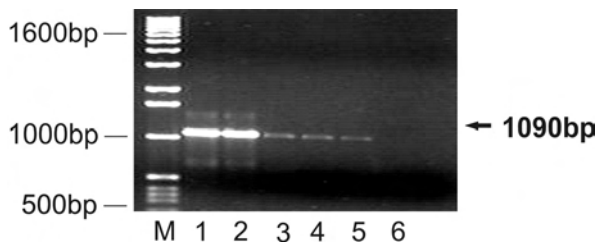
**Abb. 10m:**

Sensitivität *M. meleagridis*- PCR  
*M. meleagridis*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 1 ng, 2: 100 pg, 3: 10 pg,  
 4: 1 pg, 5: 100 fg



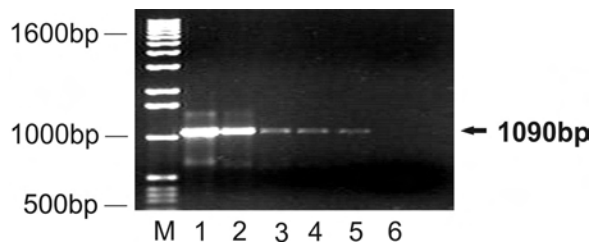
**Abb. 10n:**

Sensitivität *M. meleagridis*- PCR  
*M. meleagridis*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1:  $10^3$  KbE, 2:  $10^2$  KbE, 3: 10 KbE  
 4: 1 KbE, 5: 0,1 KbE



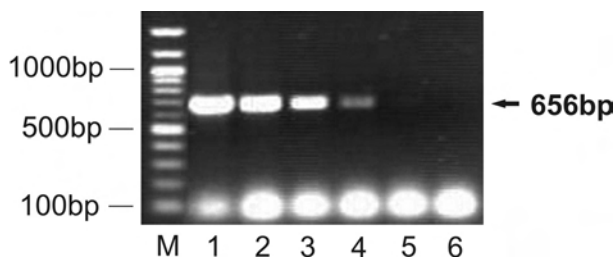
**Abb. 10o:**

Sensitivität *M. buteonis*- PCR  
*M. buteonis*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 1kbp- DNS- Größenmarker  
 1: 100 pg, 2: 10 pg, 3: 1 pg,  
 4: 100 fg, 5: 50 fg, 6: 25 fg



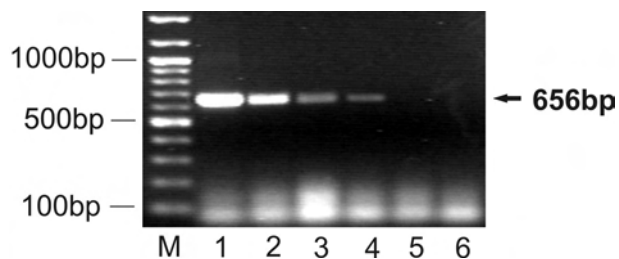
**Abb. 10p:**

Sensitivität *M. buteonis*- PCR  
*M. buteonis*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 1kbp- DNS- Größenmarker  
 1:  $10^2$  KbE, 2: 10 KbE, 3: 1 KbE  
 4: 0,1 KbE, 5: 0,05 KbE,  
 6: 0,025 KbE



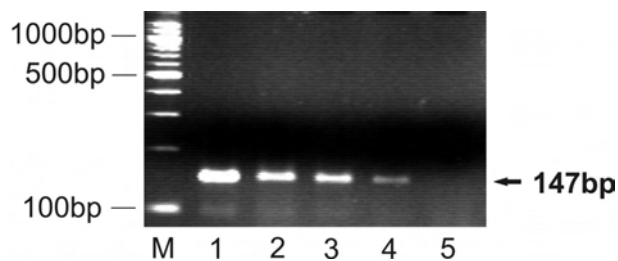
**Abb. 10q:**

Sensitivität *M. corogypsi*- PCR  
*M. corogypsi*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 100 pg, 2: 10 pg, 3: 1 pg,  
 4: 100 fg, 5: 50 fg, 6: 25 fg



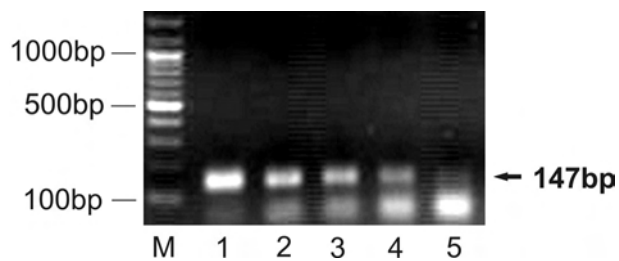
**Abb. 10r:**

Sensitivität *M. corogypsi*- PCR  
*M. corogypsi*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1:  $10^2$  KbE, 2: 10 KbE, 3: 1 KbE  
 4: 0,1 KbE, 5: 0,05 KbE,  
 6: 0,025 KbE



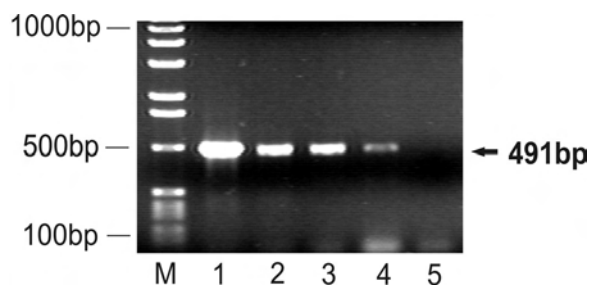
**Abb. 10s:**

Sensitivität *M. falconis*- PCR  
*M. falconis*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 1 ng, 2: 100 pg, 3: 10 pg,  
 4: 1 pg, 5: 100 fg



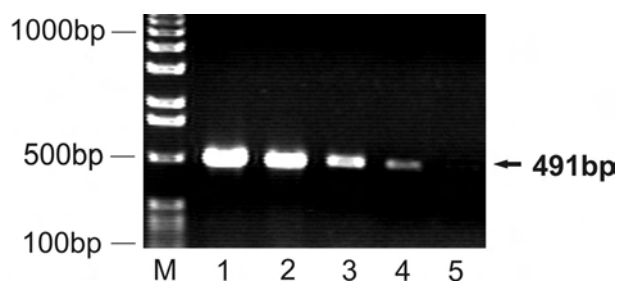
**Abb. 10t:**

Sensitivität *M. falconis*- PCR  
*M. falconis*- KbE-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1:  $10^3$  KbE, 2:  $10^2$  KbE, 3: 10 KbE  
 4: 1 KbE, 5: 0,1 KbE



**Abb. 10u:**

Sensitivität *M. gypis*- PCR  
*M. gypis*- DNS-  
 Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 1 ng, 2: 100 pg, 3: 10 pg,  
 4: 1 pg, 5: 100 fg



**Abb. 10v:**

Sensitivität *M. gypis*- PCR  
*M. gypis*- KbE- Verdünnungsreihe  
 M: 100bp- DNS- Größenmarker  
 1: 103 KbE, 2: 102 KbE,  
 3: 10 KbE 4: 1 KbE, 5: 0,1 KbE



### 4.3 Nachweis von Mykoplasmen aus Trachealtupfern von Greifvögeln

60 Greife und Eulen wurden mit Hilfe von Trachealtupfern mittels Anzucht und PCR auf das Vorkommen von Mykoplasmen untersucht.

#### 4.3.1 Kulturelle Untersuchung der Trachealtupfer

Von den 60 untersuchten Trachealtupfern konnten bei 46 Proben (76,6%) in der kulturellen Anzucht Mykoplasmenkolonien nachgewiesen werden. 9 Proben (15,0%) zeigten kein Wachstum von Mykoplasmen und 5 Proben (8,4%) wiesen eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen auf, die eine Kultivierung unmöglich machte (Tab. 21).

Bei den 16 untersuchten Nestlingen konnten bei 14 Proben (87,5%) Mykoplasmenkolonien nachgewiesen werden, bei zwei Proben (12,5%) trat eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen auf.

Bei 15 (88%) der untersuchten 17 Trachealtupfer der Findlinge gelang der Nachweis von Mykoplasmenkolonien. Von den zwei verbleibenden trat bei einer Probe eine Kontamination (6%) auf und eine Trachealtupferprobe eines Kauzes (*Strix aluco*) zeigte in der kulturellen Anzucht kein Wachstum von Mykoplasmenkolonien (6,0%).

Von den 27 untersuchten Bestandstieren konnten bei 18 Tieren (66,6%) Mykoplasmen nachgewiesen werden, sieben (26,0%) der untersuchten Tiere zeigten kein Wachstum und bei zwei Proben (7,4%) trat ebenfalls eine Kontamination auf (Tab. 22).

Somit gelang der kulturelle Nachweis von Mykoplasmen bei 76,6% der untersuchten Trachealtupfer, wobei 87,5% der Nestlinge, 88% der Fundtiere und 66,6% der Bestandstiere Mykoplasmen aufwiesen.

#### 4.3.2 Untersuchung der Trachealtupfer mittels der Multispezies- PCR

Die Untersuchung der Tupferproben mittels der Multispezies- PCR erbrachte bei 53 Proben (88,3%) einen positiven DNS- Nachweis. Bei 7 der untersuchten Trachealtupferproben konnte keine DNS nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Untersuchung dieser negativen Proben auf die Qualität der extrahierten DNS zeigte sich, dass bei 2 Proben (3,3%) eine Hemmung der PCR- Reaktion vorlag, so dass diese PCR- Ergebnisse nicht auswertbar waren. Fünf (8,4%) der mit dieser PCR untersuchten Proben zeigten die spezifische Bande auf der Höhe von 360 bp. Daneben trat hierbei eine unspezifische Bande auf der Höhe von 560 bp auf. Somit erfolgte bei diesen fünf Proben der Nachweis, dass keine Inhibition der Multispezies- PCR stattgefunden hat. Eine mykoplasmale DNS lag somit in diesen Trachealtupfern nicht vor (Abb. 11 und Tab. 21).

Bei allen hier untersuchten Nestlingen gelang ein positiver PCR-Nachweis. Bei 17 untersuchten Fundtieren wurde nur in einem Fall (5,9%) eines Kauz (*Strix aluco*) ein negatives Ergebnis erzielt während alle 16 untersuchten Fundtiere der Ordnung der Greifvögel (*Falconiformes*) ein positives Ergebnis zeigten (94,1%). Bei den 27 untersuchten Tupferproben der Bestandsvögel konnte in 77,8% (21x) mykoplasmale DNS nachgewiesen werden, vier (14,8%) der untersuchten Bestandsvögel waren in der PCR negativ und zwei Proben (7,4%) waren inhibiert (Tab. 22).

Somit erbrachten 88,3% der untersuchten Trachealtupfer in der Multispezies- PCR ein positives Ergebnis, wovon 100% der Nestlinge, 94,1% der Fundtiere und 77,8% der Bestandsvögel mit positivem Ergebnis untersucht wurden.

**Tab. 21:**

Ergebnisse der Kultur und der Untersuchung mittels Multispezies- PCR

Ergebnis	Kultur	Multispezies- PCR
Positiv	46 (76,6%)	53 (88,3%)
Negativ	9 (15%)	5 (8,4%)
Kontaminiert <sup>1</sup> / Inhibiert <sup>2</sup>	5 (8,4%)	2 (3,3%)

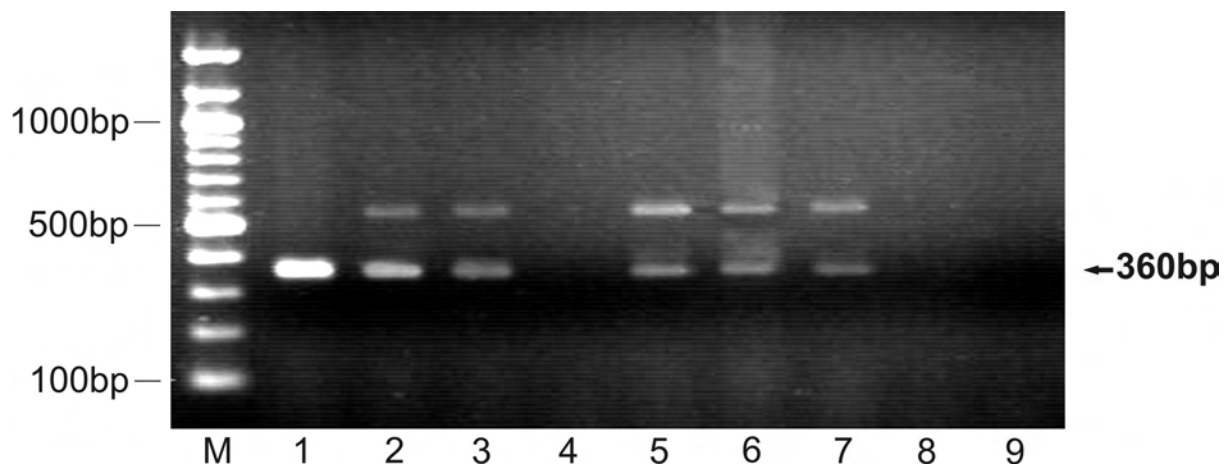
<sup>1</sup> bei diesen Isolaten trat eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen auf, so dass keine Mykoplasmenanzucht möglich war.

<sup>2</sup> bei nachfolgender Untersuchung der Qualität der extrahierten DNS der in der Multispezies-PCR negativen erfolgte kein DNS-Nachweis (s. 4.3.2.1)

**Tab. 22:**

Ergebnisse der Kultur und der Untersuchung mittels Multispezies- PCR bei Nestlingen (Wildtiere bei Beringung), Fundtieren und Bestandsvögeln

Herkunft	Kultur			Multispezies- PCR		
	positiv	negativ	kontaminiert	positiv	negativ	inhibiert
Nestlinge (n = 16)	14 (87,5%)	---	2 (12,5%)	16 (100%)	---	---
Fundtiere (n = 17)	15 (88,0%)	1 (6,0%)	1 (6,0%)	16 (94,1%)	1 (5,9%)	---
Bestandstiere (n = 27)	18 (66,6%)	7 (26,0%)	2 (7,4%)	21 (77,8%)	4 (14,8%)	2 (7,4%)



**Abb. 11:**

Überprüfung der Qualität der extrahierten DNS der in der Multispezies- PCR negativen Trachealtupfer

Die Reaktion wurde, wie in Tabelle14 angegeben, durchgeführt und die entstandenen Amplifikate in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

M: 100bp- DNS- Größenmarker, 1: Puten- DNS- Positivkontrolle, 2: M141, 3: M142, 4: M144, 5:M137, 6: M143, 7:M145, 8: M110, 9: Negativkontrolle

#### 4.4 Differenzierung der nachgewiesenen Mykoplasmen

Sowohl die in der Kultur isolierten als auch die in der Multispezies- PCR positiven Trachealtupferproben wurden mit Hilfe des Immuno- Binding- Assays (IBA) bzw. des speziesspezifischen PCR- Verfahrens weiter untersucht. Eine Übersicht über die untersuchten Tiere und die jeweiligen Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen 23 bis 27 gegeben.

##### 4.4.1 Differenzierung der isolierten Mykoplasmen mittels IBA

Die Differenzierung der isolierten Mykoplasmen erfolgte mit Hilfe des IBA wie unter 3.3.7 beschrieben. Hierbei wurden spezifische Hyperimmunseren gegen MG, MS, MI, MM, *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. gypis* und *M. falconis* eingesetzt (Tab 8).

Von den zu untersuchenden 46 positiven kulturellen Mykoplasmenanzuchten konnten 54 Mykoplasmenisolate nachgewiesen werden, wobei bei acht Anzuchten (17,4%) eine Mischkultur vorlag. Von diesen 54 Mykoplasmennachweisen konnten 28 (51,9%) nicht weiter differenziert werden, 26 Isolate (48,1%) wurden mittels IBA als *M. falconis* (12x; 22,2%), *M. gypis* (10x, 18,5%) und *M. buteonis* (4x, 7,4%) differenziert (Tab. 28).

Bei den verschiedenen untersuchten Greifvogelarten konnte *M. falconis* ausschließlich bei Falken nachgewiesen werden. Der Nachweis von *M. buteonis* gelang bei drei Falken und einer Rohrweihe. Eine Identifizierung der Mykoplasmenkolonien auf *M. gypis* gelang bei fünf Mäusebussarden und fünf Rotmilanen. Alle 14 positiven Anzuchten der Habichtstrachealtupfer konnten nicht weiter identifiziert werden. Des Weiteren traten nicht zu identifizierende Mykoplasmen bei Wanderfalken (5x), Mäusebussarden (5x), einem Baumfalken, einem Berberfalken, einem Rotmilan sowie einer Schleiereule auf (Tab. 29).

Somit konnten 48,1% der insgesamt 54 Mykoplasmenisolate mittel der IBA weiter differenziert werden, wobei bei 100% der Habichtsisolate keine Differenzierung gelang.

#### 4.4.2 Differenzierung der Mykoplasmenspezies mittels speziesspezifischer PCR

Die Differenzierung der 53 in der Multispezies- PCR positiven Trachealtupferproben erfolgte unter Verwendung speziesspezifischer Primerpaare zur Detektion von MG/*M. imitans*, MS, MM, MI sowie *M. buteonis*, *M. corogyphi*, *M. falconis* und *M. gypis*. Dabei gelangen insgesamt 68 Mykoplasmenachweise, wovon bei 12 (22,6%) der untersuchten positiven Trachealtupfern Mischkulturen nachgewiesen wurden. 23 (33,8%) der insgesamt 68 Mykoplasmenachweise konnten nur anhand des positiven Ergebnisses der Multispezies-PCR geschlussfolgert werden, da eine Reaktion mit den hier eingesetzten speziesspezifischen Primerpaaren ausblieb.

Ein DNS-Nachweis gelang für *M. falconis* (15x; 22,0%), *M. buteonis* (11x; 16,2%) und *M. gypis* (11x; 16,2%). Das spezifische Primerpaar für MM reagierte in 8 Fällen (11,8%) mit der in der PCR eingesetzten DNS aus den Trachealtupfern (Tab. 28).

Bei den verschiedenen Greifvögeln wurde die DNS von *Mycoplasma falconis* ausschließlich bei Falken (15x) nachgewiesen. Der Nachweis der DNS von *Mycoplasma buteonis* gelang bei neun Falken, einem Mäusebussard und einer Rohrweihe. Die DNS von *Mycoplasma gypis* wurde bei fünf Rotmilanen, fünf Mäusebussarden und einem Habicht detektiert.

*Mycoplasma meleagridis*- DNS wurde bei sieben Falken und einer Rohrweihe nachgewiesen.

Eine Differenzierung der mykoplasmalen DNS mit den hier eingesetzten PCR-Nachweismethoden zu MG/*M. imitans*, MS, MI, MM, *M. buteonis*, *M. corogyphi*, *M. falconis*, *M. gypis* gelang bei siebzehn Habichten, drei Falken, zwei Mäusebussarden und einer Schleiereule nicht (Tab. 30).

Somit konnten 56,6% der 53 untersuchten Trachealtupfer mittels der speziesspezifischen PCRs differenziert werden, wobei bei 22,6% der Trachealtupfer Mischkulturen nachgewiesen werden konnten.

## Ergebnisse

**Tab. 23:**

Ergebnisse der Untersuchung der Falken- Tupferproben mittels Kultur und IBA sowie Multispezies- und speziesspezifischer PCR.

Proben nr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung	Multispezies-PCR	Kultur / IBA-Untersuchung	speziesspezifische PCR
<b>Wanderfalken (<i>Falco peregrinus</i>)</b>							
GD8	adult	♂	Berlin	Bestand	positiv	n.i.	n.i.
GD12	adult	♀	Berlin	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i>
GD13	adult	♂	Berlin	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i>	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i>
M15	adult	♀	Berlin	Bestand	positiv	n.i.	n.i.
M24	adult	♂	Berlin	Bestand	positiv	n.i.	<i>M. falconis</i> <i>M. meleagridis</i>
M25	adult	♀	Mönchengladbach	Bestand	positiv	n.i.	n.i.
M26	adult	♀	Ennepetal	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i> n.i.	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i> <i>M. meleagridis</i>
M42	adult	♂	Brandenburg	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i>	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i> <i>M. meleagridis</i>
<b>Turmfalke (<i>Falco tinnunculus</i>)</b>							
M14	juvenil	♀	Berlin	Fundtier	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i> <i>M. meleagridis</i>
M73	adult	♀	Berlin	Fundtier	positiv	kontaminiert	<i>M. buteonis</i>
M81	adult	♂	Berlin	Fundtier	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i>
M82	adult	♂	Berlin	Fundtier	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i>
M129	juvenil	♂	Berlin	Fundtier	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i>
<b>Baumfalken (<i>Falco subbuteo</i>)</b>							
M130	adult	♀	Brandenburg	Fundtier	positiv	n.i.	<i>M. falconis</i>
<b>Berberfalken (<i>Falco pelegrinoides pelegrinoides</i>)</b>							
GD9	adult	♀	Berlin	Bestand	positiv	n.i.	<i>M. buteonis</i> <i>M. meleagridis</i>
GD10	adult	♂	Berlin	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i>
<b>Sakerfalken (<i>Falco cherrug</i>)</b>							
M17	adult	♂	Nordrhein-Westfalen	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i>	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i> <i>M. meleagridis</i>
M31	adult	♀	Nordrhein-Westfalen	Bestand	positiv	kontaminiert	<i>M. falconis</i> <i>M. buteonis</i>
<b>Gerfalke (<i>Falco rusticolus</i>)</b>							
M146	adult	♀	Hamburg	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i>
<b>Ger- Saker- Hybridfalken</b>							
M27	adult	♀	Nordrhein-Westfalen	Bestand	positiv	kontaminiert	<i>M. meleagridis</i>
M28	adult	♀	Nordrhein-Westfalen	Bestand	positiv	<i>M. falconis</i>	<i>M. falconis</i>

Die Abkürzung n.i. bedeutet, dass eine Identifizierung der Mykoplasmenkolonien mit den eingesetzten Hyperimmunsereen bzw. speziesspezifischen PCR-Nachweismethoden nicht möglich war.

**Tab. 24:**

Ergebnisse der Untersuchung der Habicht- Tupferproben mittels Kultur und IBA sowie Multispezies- und speziesspezifischer PCR.

Proben Nr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung	Multispezies-PCR	Kultur/ IBA-Untersuchung	speziesspezifische PCR
M5	juvenil	♀	Berlin	Fundtier	positiv	n.i.	n.i.
M48	adult	♀	Brandenburg	Bestand	positiv	n.i.	n.i.
M55	adult	♀	Berlin	Bestand	positiv	n.i.	n.i.
M57	adult	♀	Berlin	Fundtier	positiv	n.i.	n.i.
M59	adult	♂	Berlin	Bestand	positiv	n.i.	n.i.
M60	adult	♂	Berlin	Bestand	positiv	negativ	n.i.
M62	adult	♀	Berlin	Bestand	positiv	n.i.	n.i.
M111	juvenil	♀	Brandenburg	Beringung	positiv	n.i.	n.i.
M112	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung	positiv	n.i.	n.i.
M113	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung	positiv	kontaminiert	n.i.
M114	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung	positiv	kontaminiert	<i>M. gypis</i>
M115	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung	positiv	n.i.	n.i.
M116	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung	positiv	n.i.	n.i.
M117	juvenil	♂	Brandenburg	Beringung	positiv	n.i.	n.i.
M138	adult	♀	Berlin	Bestand	positiv	negativ	n.i.
M150	adult	♀	Brandenburg	Fundtier	positiv	n.i.	n.i.
M151	adult	♂	Berlin	Fundtier	positiv	n.i.	n.i.
M152	adult	♀	Brandenburg	Fundtier	positiv	n.i.	n.i.

Die Abkürzung n.i. bedeutet, das eine Identifizierung der Mykoplasmenkolonien mit den eingesetzten Hyperimmunseren bzw. speziesspezifischen PCR-Nachweismethoden nicht möglich war

**Tab. 25:**

Ergebnisse der Untersuchung der Mäusebussard- Tupferproben mittels Kultur und IBA sowie Multispezies- und speziesspezifischer PCR.

Proben Nr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung	Multispezies-PCR	Kultur/ IBA-Untersuchung	speziesspezifische PCR
M45	adult	♂	Berlin	Fundtier	positiv	<i>M. gypis</i>	<i>M. buteonis</i> <i>M. gypis</i>
M65	adult	♀	Brandenburg	Fundtier	positiv	<i>M. gypis</i>	<i>M. gypis</i>
M66	adult	♂	Brandenburg	Fundtier	positiv	<i>M. gypis</i> n.i.	<i>M. gypis</i>
M118	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	n.i.	n.i.
M119	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	n.i.	n.i.
M120	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	<i>M. gypis</i> n.i.	<i>M. gypis</i>
M121	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	<i>M. gypis</i> n.i.	<i>M. gypis</i>

Die Abkürzung n.i. bedeutet, das eine Identifizierung der Mykoplasmenkolonien mit den eingesetzten Hyperimmunseren bzw. speziesspezifischen PCR-Nachweismethoden nicht möglich war.

**Tab. 26:**

Ergebnisse der Untersuchung der Rotmilan- Tupferproben mittels Kultur und IBA sowie Multispezies- und speziesspezifischer PCR.

Proben Nr.	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung	Multispezies-PCR	Kultur/ IBA-Untersuchung	speziesspezifische PCR
M122	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	<i>M. gypis</i>	<i>M. gypis</i>
M123	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	<i>M. gypis</i>	<i>M. gypis</i>
M124	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	<i>M. gypis</i>	<i>M. gypis</i>
M125	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	<i>M. gypis</i> n.i.	<i>M. gypis</i>
M126	juvenil	?	Brandenburg	Beringung	positiv	<i>M. gypis</i>	<i>M. gypis</i>

Die Abkürzung n.i. bedeutet, das eine Identifizierung der Mykoplasmenkolonien mit den eingesetzten Hyperimmunseren bzw. speziesspezifischen PCR-Nachweismethoden nicht möglich war.

**Tab. 27:**

Ergebnisse der Untersuchung der Tupferproben anderer Greifvögel und Eulen mittels Kultur und IBA sowie Multispezies- und speziesspezifischer PCR.

Proben Nr.	Art	Alter	Geschlecht	Herkunft	Haltung	Multispezies-PCR	Kultur/ IBA-Untersuchung	speziesspezifische PCR
M19	Rohrweihe ( <i>Circus aeroginosus</i> )	adult	♀	Berlin	Fundtier	positiv	<i>M. buteonis</i>	<i>M. buteonis</i> <i>M. meleagridis</i>
M72	Schleiereule ( <i>Tyto alba</i> )	adult	♀	Berlin	Fundtier	positiv	n.i.	n.i.
M110	Steinadler ( <i>Aquila chrysaetos</i> )	adult	♂	Nordrhein-Westfalen	Bestand	inhibiert	negativ	---
M137	Mönchsgeier ( <i>Aegypius monachus</i> )	adult	♂	Mecklenburg-Vorpommern	Bestand	negativ	negativ	---
M141	Gänsegeier ( <i>Gyps fulvus</i> )	adult	♂	Bayern	Bestand	negativ	negativ	---
M142	Gänsegeier ( <i>Gyps fulvus</i> )	adult	♂	Mecklenburg-Vorpommern	Bestand	negativ	negativ	---
M143	Kauz ( <i>Strix aluco</i> )	adult	♂	Berlin	Fundtier	negativ	negativ	---
M144	Gänsegeier ( <i>Gyps fulvus</i> )	adult	♀	Bayern	Bestand	inhibiert	negativ	---
M145	Uhu ( <i>Bubo bubo</i> )	adult	♂	Brandenburg	Bestand	negativ	negativ	---

Die Abkürzung n.i. bedeutet, das eine Identifizierung der Mykoplasmenkolonien mit den eingesetzten Hyperimmunseren bzw. speziesspezifischen PCR-Nachweismethoden nicht möglich war.



**Tab. 28:**

Mykoplasmennachweis und Identifizierung mittels IBA und PCR

Mykoplasmen- spezies	Identifizierung mittels IBA		Identifizierung mittels PCR	
	Anzahl an Isolaten (n=54)	% an untersuchten Vögeln (n = 60)	Anzahl an Identifizierungen (n=68)	% an untersuchten Vögeln (n=60)
<i>M. buteonis</i>	4 (7,4%)	6,7%	11 (16,2%)	18,3%
<i>M. corogypsi</i>	0	0	0	0
<i>M. falconis</i>	12 (22,2%)	20%	15 (22,0%)	25%
<i>M. gypis</i>	10 (18,5%)	16,7%	11 (16,2%)	18,3%
<i>M. gallisepticum</i>	0	0	0	0
<i>M. synoviae</i>	0	0	0	0
<i>M. iowae</i>	0	0	0	0
<i>M. meleagridis</i>	0	0	8 (11,8%)	13,3%
Nicht identifiziert <sup>1/2</sup>	28 (51,9%)	46,7%	23 (33,8%)	38,3%

<sup>1</sup> Nicht identifiziert im IBA mit Antisera gegen folgende Spezies: *M. buteonis*, *M. gypis*, *M. corogypsi*, *M. falconis*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis*

<sup>2</sup> Durch die PCR- Nachweisverfahren nicht zu identifizieren als MG/*M. imitans*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis*, *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis*, *M. gypis*

## Ergebnisse

**Tab. 29:**

IBA- Untersuchung

Mykoplasmenspezies bei verschiedenen Vogelarten, Mischkulturen möglich

Vogelart	Anzucht				Identifizierung von			n.i. <sup>2</sup>
	pos.	kont.	neg.	n.d. <sup>1</sup>	<i>M. falc.</i>	<i>M. but.</i>	<i>M. gypis</i>	
Wanderfalke (n=8)	8 100%	0	0	0	4 50%	2 25%	0	5 62,5%
Turmfalke (n=5)	4 80%	1 20%	0	1 20%	4 80%	0	0	0
Baumfalke (n=1)	1 100%	0	0	0	0	0	0	1 100%
Berberfalke (n=2)	2 100%	0	0	0	1 50%	0	0	1 50%
Sakerfalke (n=2)	1 50%	1 50%	0	1 50%	1 50%	1 50%	0	0
Gerfalke (n=1)	1 100%	0	0	0	1 100%	0	0	0
Ger- Sakerfalke (n=2)	1 50%	1 50%	0	1 50%	1 50%	0	0	0
Habicht (n=18)	14 77,8%	2 11,1%	2 11,1%	2 11,1%	0	0	0	14 77,8%
Mäusebussard (n=7)	7 100%	0	0	0	0	0	5 71,5%	5 71,5%
Rotmilan (n=5)	5 100%	0	0	0	0	0	5 100%	1 20%
Rohrweihe (n=1)	1 100%	0	0	0	0	1 100%	0	0
Schleiereule (n=1)	1 100%	0	0	0	0	0	0	1 100%

Drei Gänsegeier, ein Mönchsgeier, ein Steinadler, ein Kauz und ein Uhu waren in der kulturellen Anzucht negativ

<sup>1</sup> Differenzierung war aufgrund einer auftretenden Kontamination durch Bakterien und Pilze

<sup>2</sup> Nicht identifiziert im IBA mit Antisera gegen folgende Spezies: *M. buteonis*, *M. gypis*, *M. corogypsi*, *M. falconis*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis*

**Tab. 30:**

PCR- Untersuchung

Mykoplasmenspezies bei verschiedenen Vogelarten, Mischkulturen möglich

Vogelart	Identifizierung von				
	<i>M. falc.</i>	<i>M. but.</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. meleag.</i>	n.i. <sup>1</sup>
Wanderfalke (n=8)	5 62,5%	3 37,5%	0	3 37,5%	3 37,5%
Turmfalke (n=5)	4 80%	3 60%	0	1 20%	0
Baumfalke (n=1)	1 100%	0	0	0	0
Berberfalke (n=2)	1 50%	1 50%	0	1 50%	0
Sakerfalke (n=2)	2 100%	2 100%	0	1 50%	0
Gerfalke (n=1)	1 100%	0	0	0	0
Ger- Sakerfalke (n=2)	1 100%	0	0	1 100%	0
Habicht (n=18)	0	0	1 5,6%	0	17 94,4%
Mäusebussard (n=7)	0	1 14,3%	5 71,4%	0	2 28,6%
Rotmilan (n=5)	0	0	5 100%	0	0
Rohrweihe (n=1)	0	1 100%	0	1 100%	0
Schleiereule (n=1)	0	0	0	0	1 100%

Drei Gänsegeier, ein Mönchsgeier, ein Steinadler, ein Kauz und ein Uhu waren in der Multispezies- PCR negativ und wurden deshalb nicht mit den speziesspezifischen PCR-Nachweismethoden untersucht

<sup>1</sup>Durch die PCR- Nachweisverfahren nicht zu identifizieren als *MG/M. imitans*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis*, *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis*, *M. gypis*

#### 4.5 Spezifitätsnachweis der Feldproben

Zur Überprüfung der Spezifität der in den speziesspezifischen PCRs positiven Tupferproben erfolgte eine Restriktionsenzymanalyse der jeweiligen PCR- Amplifikate. Anschließend wurden einzelne Proben ausgewählt, bei denen eine Sequenzierung des gewonnenen Amplifikats mit einem abschließenden Sequenzvergleich der entsprechenden 16S rRNS-Mykoplasmensequenz der Genbank® (NCBI, USA) durchgeführt wurde.

#### 4.5.1 Spezifitätsnachweis anhand der Restriktionsenzymanalyse (REA)

Die aus den speziesspezifischen PCRs erhaltenen Amplifikate wurden anhand des entsprechenden Restriktionsenzym (Tab. 18) untersucht.

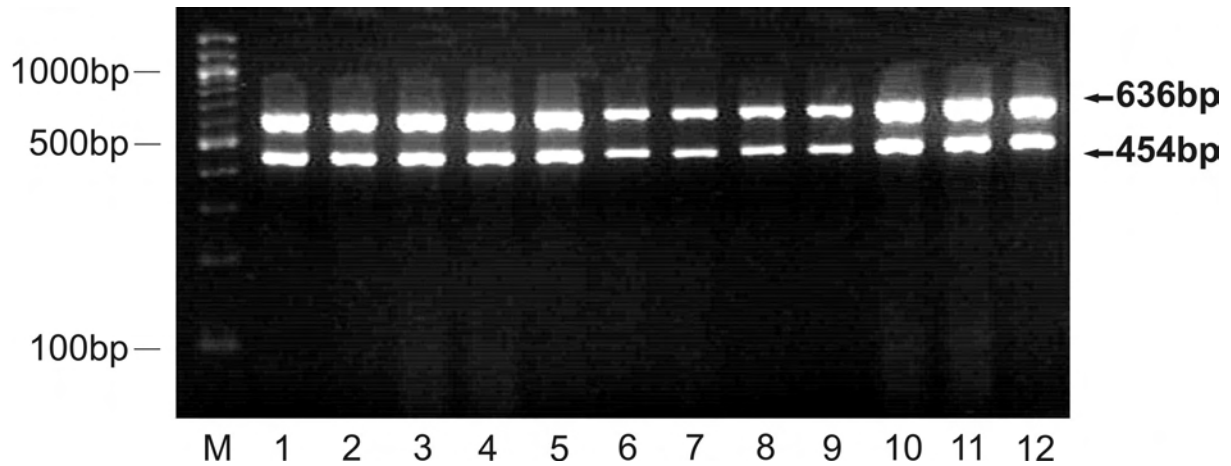
Dabei wurden alle 11 erhaltenen, 1090 bp große Amplifikate der *M. buteonis*- PCR mit dem Enzym Sst I in die erwarteten Fragmente von 454 und 636 bp gespalten (Abb. 12).

Auch die Untersuchung der 15 147 bp großen Amplifikate aus der *M. falconis*- PCR mit dem Restriktionsenzym Mse I zeigte nach der elektrophoretischen Auftrennung das erwartete Restriktionsprofil mit Fragmentgrößen von 90 und 57 bp (Abb. 13).

Ebenso verhielt es sich bei der Untersuchung der Amplifikate aus der *M. gypis*- PCR. Auch hier zeigten alle 11 erhaltenen, 491 bp großen Amplifikate nach Restriktion mit dem Enzym Dpn II das erwartete Fragmentmuster von 156 und 335 bp (Abb. 14).

Die Untersuchung der acht erhaltenen Amplifikate der MM- PCR mit dem Restriktionsenzym Hind III zeigte, dass keines der 422 bp großen Amplifikationsprodukte gespalten wurde, während das parallel dazu mitgetestete Amplifikat des MM- Referenzstammes (*M. meleagridis* 17529) das erwartete Fragmentmuster von 145 und 277 bp aufwies (Abb. 15).

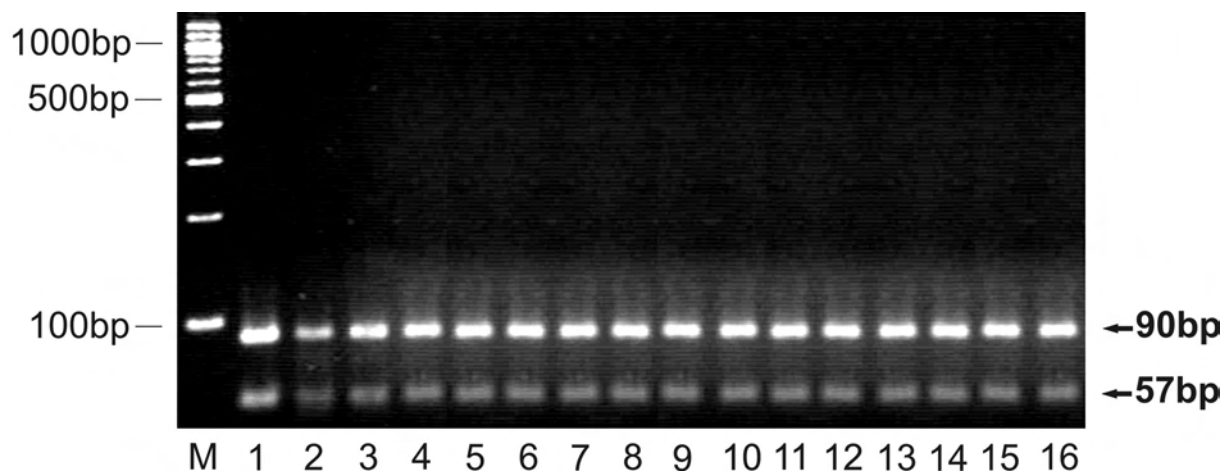
Somit konnte die Spezifität der *M. buteonis*-, *M. falconis*- und *M. gypis*- PCR Amplifikate der Feldproben mittels der REA nachgewiesen werden, während die REA der MM- PCR- Amplifikate der Feldproben negativ verlief.



**Abb. 12:**

Restriktionsenzymanalyse der *M. buteonis* positiven Feldproben

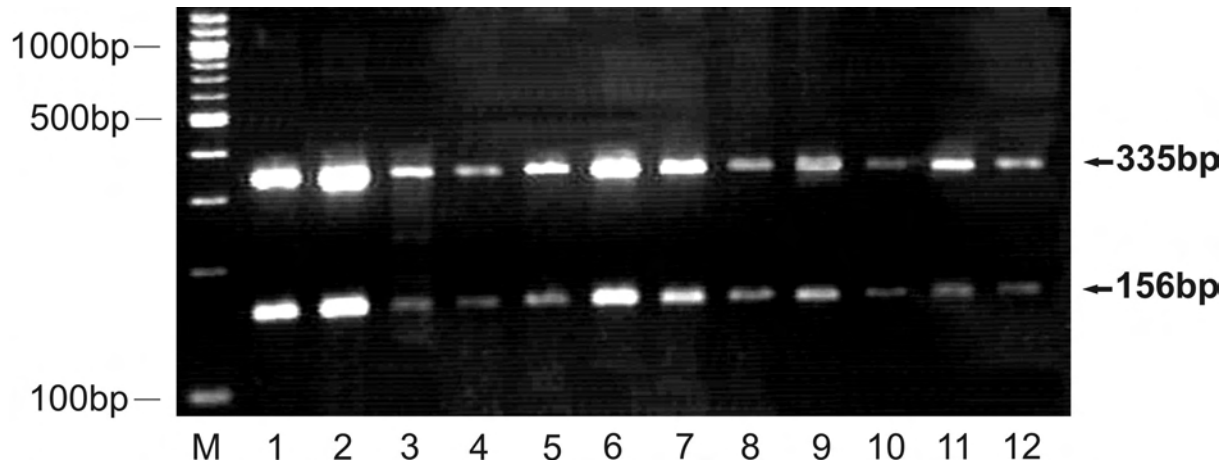
M: 100bp- DNS- Größenmarker, 1: *M. buteonis*- Referenzstamm, 2: GD9, 3: GD13,  
4: M17, 5: M19, 6: M26, 7: M31, 8: M42, 9: M45, 10: M73, 11: M81, 12: M82



**Abb. 13:**

Restriktionsenzymanalyse der *M. falconis* positiven Feldproben

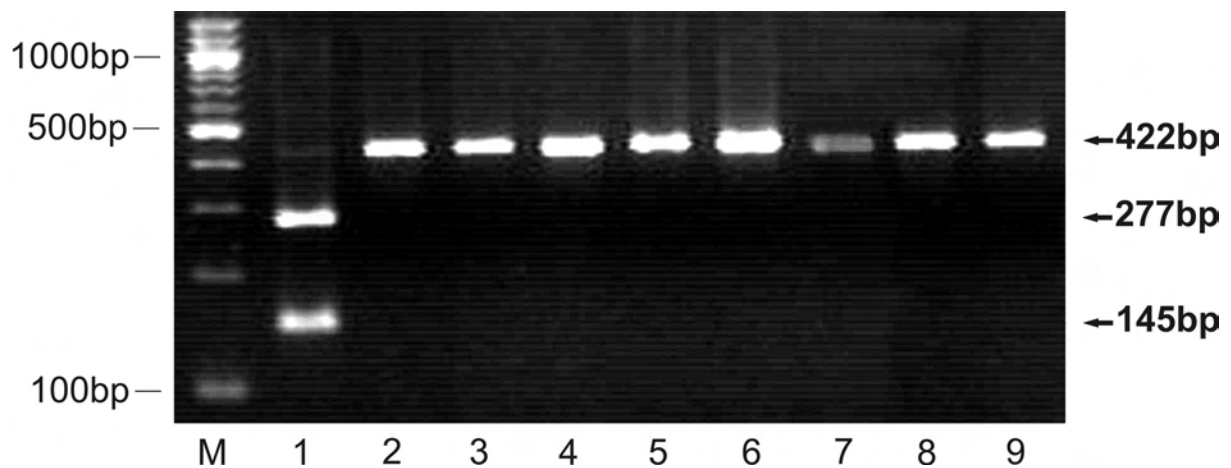
M: 100bp- DNS- Größenmarker, 1: *M. falconis*- Referenzstamm, 2: GD10, 3: GD12,  
4: GD13, 5: M14, 6: M17, 7: M24, 8: M26, 9: M28, 10: M31, 11: M42, 12: M81, 13: M82,  
14: M129, 15: M130, 16: M146



**Abb. 14:**

Restriktionsenzymanalyse der *M. gypis* positiven Feldproben

M: 100bp-DNS-Größenmarker, 1: *M. gypis*- Referenzstamm, 2: M45, 3: M65, 4: M66, 5: M114, 6: M120, 7: M121, 8: M122, 9: M123, 10: M124, 11: M125, 12: M126



**Abb. 15:**

Reatriktionsenzymanalyse der *M. meleagridis* positiven Feldproben

M: 100bp-DNS-Größenmarker, 1: *M. meleagridis*- Referenzstamm, 2: GD9, 3: M14, 4: M17, 5: M19, 6: M24, 7: M26, 8: M27, 9: M42

#### **4.5.2 Sequenzvergleich der Amplifikate mit der jeweiligen Genbank-Sequenz**

Zur weiteren Abklärung der Spezifität der erhaltenen Amplifikate wurden einzelne ausgesuchte PCR- Produkte sequenziert und mit der entsprechenden Genbank- Sequenz verglichen.

##### **4.5.2.1 Sequenzvergleich der *M. buteonis*- PCR positiven Feldproben**

Aus den in der *M. buteonis*- PCR positiven Feldproben wurden jeweils ein Amplifikat eines Falken (M73), eines Mäusebussards (M45) und einer Rohrweihe (M19) untersucht, so dass Sequenzen von *M. buteonis*- Nachweisen der unterschiedlichen Greifvogelspezies miteinander verglichen werden konnten. Dabei konnte bei der Sequenzierung der 1089 bp großen *M. buteonis*- PCR- Amplifikate ein 840 bp großer Sequenzbereich durch die vorwärts- und rückwärtsgerichteten Primer analysiert werden. Ein Vergleich dieses Sequenzbereiches der Proben M45, M73 und M19 untereinander ergab keinerlei Differenzen. Ein Sequenzvergleich zwischen den erhaltenen Gensequenzen der Feldproben und der in der Genbank für *M. buteonis* gespeicherten Gensequenz AF412971 ergab eine Homologie von 100%.

Somit konnten die mittels REA festgestellte Spezifität der *M. buteonis*- Feldprobenamplifikate bestätigt werden.

##### **4.5.2.2 Sequenzvergleich der *M. falconis*- PCR positiven Feldproben**

Ebenso erfolgte eine Sequenzierung der 146 bp großen *M. falconis*- PCR- Amplifikate M28 und M129. Da diese Mykoplasmaspezies nur bei Falken nachgewiesen werden konnte stammen die Amplifikate aus den Trachealtupferproben eines Turmfalken (M129) und eines Ger- Saker- Hybridfalken (M28). Durch die Sequenzierung der Amplifikate konnte ein 93 bp großer Sequenzbereich durch die vorwärts- und rückwärtsgerichteten Primer analysiert werden. Ein Sequenzvergleich der erhaltenen Amplifikatsequenzen sowohl untereinander, als auch mit der in der Genbank für *M. falconis* gespeicherten Gensequenz AF125592 ergab keinerlei Differenzen.

Die mittels REA festgestellte Spezifität der *M. falconis*- Feldproben- Amplifikate konnte somit bestätigt werden.

### **4.5.2.3 Sequenzvergleich der *M. gypis*- PCR positiven Feldproben**

*M. gypis* wurde in dieser Untersuchung bei Mäusebussarden, Rotmilanen und einem Habicht nachgewiesen, so dass jeweils eine dieser Vogelspezies zu einem Sequenzvergleich herangezogen wurde (M114, Habicht; M65, Mäusebussard; M123, Rotmilan). Durch die Sequenzierung der 491 bp großen Amplifikate konnte ein 427 bp großer Sequenzbereich analysiert werden. Dabei wiesen weder der Vergleich der Sequenzen der Feldproben untereinander, noch der Vergleich der Sequenzen mit der in der Genbank für *M. gypis* gespeicherten Gensequenz AF125589 Differenzen auf.

Somit erfolgte eine Bestätigung der mittels REA festgestellten Spezifität der *M. gypis*-Feldproben- Amplifikate.

### **4.5.2.4 Sequenzvergleich der MM- PCR positiven Feldproben**

Die Sequenzierung der 421 bp großen MM- PCR- Amplifikate erfolgte anhand von drei ausgewählten Falken- Feldproben GD9 (Berberfalke), M14 (Turmfalke) und M26 (Wanderfalke). Durch die vorwärts- und rückwärtsgerichteten Primer stand ein 334 bp großer Sequenzbereich zur Analyse zur Verfügung. Ein Vergleich dieser Sequenzbereiche der Feldprobenamplifikate untereinander ergab hierbei keinerlei Differenzen. Bei dem Vergleich dieser Sequenzbereiche mit der für MM in der Genbank gespeicherten Gensequenz L24106 zeigten sich jedoch Nukleotidunterschiede und es konnte nur eine Übereinstimmung von 86% festgestellt werden (Abb. 16). Ein Vergleich dieser Sequenzbereiche mit allen in der Genbank gespeicherten Sequenzdaten erbrachte eine Homologie von 97% zu der 16S rRNS- Sequenz von *M. buteonis* (AF412971) (Abb. 17).

Das Ergebnis des Sequenzvergleiches bestätigt das Ergebnis der REA, welche negativ für einen spezifischen Nachweis auf MM verlief.



## Ergebnisse

```

GD9, M14, M26  1   AGATTGGAA-AACGCTGAGAAATTAGCGCTAATGCCGGATACTTAG--- 45
                ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
L24106         100  AGATTGGGATAGCAAGTGGAAACATTTGATAATACCGAATATGTATATT 148

                46   TTTCGCATGAAATTAATATAAAAAGGAGCGTTT--GCTTCACTAGAGGAT 93
                ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
                149  TTTCGCATGAAATTTATATGAAAGAAGCCTTTAAGCTTCGCTAAAAGAG 197

                94   CGGGGTGCGTAACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCG 142
                ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
                198  CGGGGTGCGTAACATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCACCAAGGCA 246

                143  ATGATGTTT TAGCGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGAGA 191
                ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
                247  ATGATGTTT TAGCGGGTTGAGAGACTGAACCGCCACACTGGGACTGAGA 301

                192  TACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATG 240
                ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
                302  TACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTTCCACAATG 350

                241  GACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGG 288
                ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
                351  GACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAAGCCTTATGG 399

                289  GTTGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAAACAGAGGAGGAAATGC 334
                ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
                400  GTTGTAAACTGCTGTGGTAAGGGAAGAAAAAATAAATGAGGAAATGC 446
    
```

**Abb. 16:**

Sequenzvergleich der sequenzierten PCR- Produkte der Feldproben der MM- PCR mit der in der Genbank gespeicherten MM- Gensequenz L24106

In der oberen Zeile ist die Sequenzierung des PCR- Amplifikates der Feldproben (GD9, M14, M26) in der unteren Zeile die Gensequenz von *M. meleagridis* (L24106) dargestellt.

## Ergebnisse

GD9, M14, M26	1	AGATTGGAA-AACGCTGAGAAATTAGCGCTAATGCCGGATACTTA---	44
AF412971	91	AGATTGGAATAACGCTGAGAAATTAGCGCTAATGCCGGATACTTATTA	138
	45	GTTTCGCATGAAATTAATATAAAAAGGAGCGTTTGCTTCACTAGAGGAT	92
	139	GTTTCGCATGAAATTAATATAAAAAGAAGCGTTTGCTTCACTAGAGGAT	186
	93	CGGGGTGCGTAAACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGC	140
	187	TGGGGTGCCTAAACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCTTACCAAGGC	234
	141	GATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGA	188
	235	GATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGA	282
	189	GATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCACA	236
	283	GATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCACA	330
	237	ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCTT	284
	331	ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCTT	378
	285	TTCGGGTTGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAACAGAGGAGGAA	332
	379	TTCGGGTTGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAAGCAGAAGAGGAA	426
	333	ATGC 336	
	427	ATGC 430	

**Abb. 17:**

Sequenzvergleich der sequenzierten PCR- Produkte der Feldproben der MM- PCR mit der in der Genbank gespeicherten *M. buteonis*- Gensequenz.

In der oberen Zeile ist die Sequenzierung des PCR- Amplifikates der Feldproben (GD9, M14, M26), in der unteren Zeile die Gensequenz von *M. buteonis* (AF412971) dargestellt.