

5 Diskussion

Der Nachweis von Mykoplasmen wird meist mit der arbeitsaufwendigen und zeitintensiven kulturellen Anzucht der entnommenen Proben und anschließender serologischer und/ oder biochemischer Identifizierung durchgeführt. Der kulturelle Nachweis von Mykoplasmen ist jedoch aufgrund von Überwucherungen durch Bakterien und Pilze sowie schnell wachsender Mykoplasmenpezies, die langsamwachsende überwachsen, mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität, sowie des Zeit- und Arbeitsaufwandes, stellt der Nachweis mykoplasmales DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion eine geeignete Alternative zur kulturellen Anzucht dar. Schnelle, sensitive und spezifische Tests zur Untersuchung von Nukleinsäuren pathogener Mykoplasmen sind schon oft beschrieben, wurden jedoch meist zur diagnostischen Untersuchung von Wirtschaftsgeflügel und den dort vorkommenden Mykoplasmen entwickelt. Deswegen erfolgte hier meist nur eine Testung der Spezifität gegen Mykoplasmenpezies, die bisher beim Wirtschaftsgeflügel nachgewiesen wurden. Die Isolierung geflügelpathogener Mykoplasmenpezies auch bei anderen Vogelarten stellt für eine epidemiologische Untersuchung von Mykoplasmen bei Wildvögeln, bei denen das Spektrum der dort vorkommenden Mykoplasmen noch nicht bekannt ist, neue Ansprüche an die Spezifität der jeweiligen PCR- Nachweismethode.

5.1 Etablierung der PCR- Verfahren

Ziel bei der Entwicklung und Etablierung der verschiedenen PCR- Nachweismethoden war es, eine hohe Spezifität und Sensitivität zu erzielen.

Eine besondere Bedeutung für die Spezifität und den Ablauf einer PCR stellt die Auswahl der Primer dar. Aufgrund phylogenetischer Studien von Mykoplasmen basierend auf der Untersuchung des 16S rRNS Gens (WEISBURG et al., 1989) kann auf die 16S rRNS-Sequenzen aller bekannten Mykoplasmenpezies in der Genbank[®] (NCBI, USA) zugegriffen werden. Sequenzvergleiche der bakteriellen 16S rRNS haben aufgezeigt, das in diesem Bereich hoch konservierte Regionen von Regionen mittlerer oder niedriger Homologie auch bei sehr eng verwandten Bakterienpezies unterbrochen werden (WOESE et al. 1983). Deshalb wurde als Targetsequenz für die zu entwickelnden Primerpaare die 16S rRNS der

Mykoplasmen gewählt. Auf der Grundlage dieser Homologieunterbrechungen konnten PCR-Verfahren zum Nachweis der geflügelpathogenen Mykoplasmenpezies MG, MS, MM, MI sowie der bei Greifvögeln vorkommenden Spezies *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. gypis* und *M. falconis* überprüft und entwickelt werden. Aufgrund der Ergebnisse des Sequenzvergleiches der 16S rRNS konnte zu jeder dieser Mykoplasmenpezies ein spezifisches Primerpaar gefunden werden, so dass dieser Sequenzabschnitt bei den bisher bekannten Mykoplasmenpezies als geeignete Ziel-DNS anzusehen ist. Eine Ausnahme hiervon stellte die 16S rRNS von *M. gallisepticum* und *M. imitans* dar, bei denen nach den Untersuchungen von BOYLE et al. (1993) innerhalb der 16S rRNS eine Sequenzhomologie von 99% besteht.

Die Sequenzbereiche innerhalb der 16S rRNS, die bei allen aviären Mykoplasmen eine Homologie aufwiesen, wurden auf die Eignung für eine Multispezies-PCR, also einem Nachweis von allen bekannten aviären Mykoplasmen untersucht.

Das von FAN et al. (1995) beschriebene Primerpaar zur Amplifikation mykoplasmales DNS amplifizierte zwar ebenfalls die DNS aller untersuchten Mykoplasmenpezies, jedoch wurde auch die DNS anderer Bakterienpezies mit erfasst. Somit ist dieses Primerpaar nur für eine Weiteruntersuchung von Reinkulturen einsetzbar, da Untersuchungen von Feldproben mit diesem Primerpaar zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten.

Das von LAUERMAN et al. (1995) eingesetzte Primerpaar von HARASAWA et al. (1986 und 1993) amplifiziert einen Abschnitt des 16S rRNS Gens über die Spacer Region bis zum Anfang der 23S rRNS, so dass Daten über die Sequenzen im Targetbereich nicht von allen bekannten aviären Mykoplasmen verfügbar sind. Somit konnte mit diesem Primerpaar nicht nachvollzogen werden, ob der Sequenzbereich der Primeransatzstellen homolog für alle Mykoplasmen ist. Ebenfalls konnte das Entstehen falsch negativer Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Die Primeransatzstellen der von VAN KUPPEVELD et al. (1992) beschriebenen PCR liegen innerhalb der 16S rRNS und binden spezifisch bei Vertretern der Klasse *Mollicutes*, die die Ordnung der *Mycoplasmatales*, der *Entomoplasmatales*, der *Acholeplasmatales* sowie der *Anaeroplasmatales* beinhaltet. Andere Bakterienpezies wurden nach den Untersuchungen von VAN KUPPEVELD et al. (1992) nicht erfasst. Daher wurde sich in dieser Studie, bezüglich des Screenings von Trachealtupfern verschiedener Greifvögel, für eine Modifizierung der PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992) entschieden. Hierbei wurde der spezifische, rückwärtige Primer beibehalten. Der vorwärts gerichtete Primer liegt in einem auch für andere Bakterienpezies homologen Sequenzbereich, bindet also nicht spezifisch. Dieser wurde innerhalb dieser Arbeit gegen einen geeigneten Primer ausgetauscht, so dass

das Amplifikationsprodukt von 270 bp auf 1013 bp vergrößert wurde. Damit steht nun ein größeres Amplifikationsprodukt zur weiteren Untersuchung (Sequenzierung, Restriktionsenzymanalyse) der amplifizierten DNS zur Verfügung. Dies kann bei der Untersuchung von Vogelpopulationen mit noch unbekannter Mykoplasmenprävalenz von großem Nutzen sein.

Die Überprüfung des Primerpaares von LAUERMAN et al. (1993) nach der Veröffentlichung von MAROIS et al. (2000) für den Nachweis von *M. synoviae*- DNS erwies sich als geeignet und wurde ohne Veränderungen aus der Literatur übernommen. Ebenso verhält es sich mit dem eingesetzten Primerpaar zum Nachweis von *M. meleagridis*. Dieses wurde von BOYLE et al. (1995) entwickelt und durch MOALIC et al. (1997) unter Feldbedingungen evaluiert und als hoch spezifisch dargestellt. Auch hier zeigte der Sequenzvergleich unter den 23 bekannten aviären 16S rRNS Mykoplasmassequenzen das Primerpaar als geeignet an. ZHAO und YAMAMOTO (1993 a und b) entwickelten zwar ebenfalls Primerpaare für den Nachweis von *M. synoviae* und *M. meleagridis*, jedoch ist die Lage der Targetsequenzen nicht bekannt. Da ein Sequenzvergleich bei diesen beschriebenen PCR- Verfahren nicht möglich war, wurden sie in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Zwar sind in der Literatur einige PCR-Verfahren zum Nachweis von MG beschrieben, jedoch wurde hier die Möglichkeit einer Differenzierung von MG und *M. imitans* vernachlässigt. Die Etablierung dieser Nachweismethoden erfolgte hierbei vornehmlich für die Untersuchung von Hühnern und Putenbeständen, bei denen MG einen der bedeutendsten Krankheitserreger darstellt, jedoch *M. imitans* noch nicht nachgewiesen werden konnte. So wurde *M. imitans* vornehmlich aus Enten (BRADBURY et al., 1993) und Gänsen (BUNTZ et al., 1986) isoliert. Über das Auftreten von *M. imitans* in Hühner- und Putenbeständen liegen jedoch keine Berichte vor, auch wenn KLEVEN (2003 c) nicht ausschließen kann, dass *M. imitans* in Geflügelbeständen oft fälschlicherweise als MG diagnostiziert wurde. Deshalb wurde in dieser Studie ein Primerpaar entwickelt, das trotz der 99%igen Homologie der 16S rRNS von MG und *M. imitans* (BOYLE et al. 1993) einen Sequenzbereich amplifiziert, der Unterschiede dieser beiden Mykoplasmenpezies aufweist. Dadurch kann eine Differenzierung von MG und *M. imitans* durch eine anschließende Restriktionsenzymanalyse erfolgen.

Für den Nachweis von MI beschrieben KEMPF et al. (1994) ein Primerpaar, das eine Gensequenz innerhalb der 16S rRNS amplifizierte, wobei bei der Untersuchung einiger Bakterienpezies immer wieder unspezifische Banden auftraten. Da bei der Untersuchung von Trachealtupfern aus Wildvogelpopulationen mit erheblichen Kontaminationen bakterieller DNS gerechnet werden muss, ist es möglich, dass auch hier unspezifische Banden auftreten

und dies eine Auswertung der Untersuchungsergebnisse erschweren könnte. Deshalb wurde von der Anwendung dieser Nachweismethode in dieser Studie abgesehen.

Auch die PCR- Verfahren, die LAIGRET et al. (1996) sowie ZHAO und YAMAMOTO (1993 b) beschreiben, wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt, da die hier beschriebenen Primer nicht innerhalb der 16S rRNS liegen, was einen ausreichenden Sequenzvergleich unter allen bekannten aviären Mykoplasmen unmöglich macht. Deshalb wurde für den Nachweis von MI ein eigenes Primerpaar entwickelt und in dieser Studie evaluiert und eingesetzt.

PCR- Methoden zum Nachweis von bei Greifvögeln isolierten Mykoplasmenspezies liegen in der derzeitigen Literatur nicht vor. Lediglich OAKS et al. (2004 a) entwickelten eine PCR zum Nachweis von *M. vulturii*, welche aus einer Wildpopulation von Bengalgeiern (*Gyps bengalensis*) in Pakistan isoliert wurden.

Auch für diese PCR- Verfahren zum Nachweis der greifvogelspezifischen Mykoplasmen *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis* konnten Sequenzunterschiede innerhalb der 16S rRNS festgestellt und passende Primer dazu entwickelt werden.

Neben der Spezifität sollten die Primerpaare nach LINZ und DEGENHARDT (1990) gleich lang sein und bei gleicher Temperatur hybridisieren sowie einen GC-Gehalt von 50% aufweisen (SAIKI 1989). Aufgrund des hohen Homologiegrades innerhalb der 16S rRNS der aviären Mykoplasmen, mussten bezüglich dieser Anforderungen an die Primer Kompromisse gemacht werden, um eine optimale Spezifität zu gewährleisten, so dass innerhalb der Primerpaare unterschiedliche GC-Gehalte vorliegen und somit auch die errechnete Schmelztemperatur der einzelnen Primer unterschiedlich ausfällt.

Aus diesem Grunde wurde zur Erfassung der optimalen Annealingtemperatur eine Temperaturgradienten- PCR für die jeweilige PCR Nachweismethoden durchgeführt. Nach INNIS und GELFAND (1990) ist für eine optimal eingestellte PCR mit einer maximal möglichen Spezifität der Primer, die höchstmögliche Annealingtemperatur (Hybridisierungstemperatur) anzustreben. Eine Erhöhung der Annealingtemperatur führt über eine Instabilisierung falsch hybridisierter Primer zu einer Verbesserung der Spezifität, bewirkt aber, ab einem bestimmten Temperaturwert, eine Verringerung der Effektivität der Amplifikation, das die Dissoziationsrate der homologen Primer- Template- Hybridisate erhöht (INNIS und GELFAND, 1990; WU et al., 1991). Die Gradienten- PCR erfolgte für alle Nachweisverfahren mit einem Temperaturgradienten von 65 – 50 °C. Dabei zeigte sich, dass das Temperaturoptimum für die Hybridisierung bei der *M. falconis*- PCR im Bereich von 57 – 50 °C bzw. bei 63 – 54 °C bei den übrigen PCR- Methoden lag. Deshalb wurde die Temperatur, in der das stärkste Amplifikationssignal auftrat in das Reaktionsprotokoll

übernommen. Die optimale Annealingtemperatur der MS- PCR lag hierbei 6 °C über den Angaben von LAUERMAN et al. (1993). Durch die erfolgte Verlängerung der Primer um zwei Nukleotide am 5'- Ende des Primerpaares nach MAROIS et al. (2000), erhöht sich jedoch auch die zu errechnende Schmelztemperatur, was auch zu einer Erhöhung der Annealingtemperatur führt. Die optimale Annealingtemperatur des Primerpaares von BOYLE et al. (1995), der eine Temperatur von 60 °C angibt, wurde in dieser Studie mit 56 °C festgestellt, was mit dem Einsatz von optimal aufeinander abgestimmte Reagenzien durch das Taq PCR Master Mix Kit[®] erklärt werden kann.

Da das Temperaturoptimum der Taq- Polymerase nach GELFAND (1989) bei Temperaturen von 75 °C – 80 °C liegt, wurde die Synthese (Elongationsphase) aller PCR- Nachweisverfahren bei 72 °C durchgeführt, um eine vorzeitige Denaturierung kleinerer Hybride mit niedrigerem Schmelzpunkt zu verhindern, bevor eine Verlängerung stattfinden kann (LINZ und DEGENHARDT, 1990).

SAIKI et al. (1990) empfehlen die Dauer der Synthese der Länge der zu amplifizierenden Sequenz anzupassen und geben 1 min pro kbp an, LINZ und DEGENGARDT (1990) sprechen von einem Richtwert von 1-2 Minuten pro kbp. Dennoch sollte die Synthese minimal eingestellt sein, da sonst die Bildung von unspezifischen Produkten gefördert wird. SAMBROOK et al. (1989) geben an, dass unter optimalen Bedingungen 60 bp pro Sekunde synthetisiert werden und in der Produktbeschreibung der Firma Qiagen für das TAQ PCR Master Mix Kit[®] wird eine Synthese von 2 - 4 kbp/min bei 72 °C angegeben, so dass bei den hier durchgeführten PCR- Nachweisverfahren eine Extensions- bzw. Synthesezeit von 30 sec eingesetzt wurde.

Großen Einfluss auf die Spezifität und die Sensitivität hat auch die Anzahl der Zyklen in der PCR. Eine geringe Zyklenzahl führt im Allgemeinen zu einer geringeren Ausbeute und somit zu einer niedrigeren Sensitivität. Zu viele Zyklen können aufgrund der Vermehrung von stattgefundenen Fehlamplifikationen zu einer Bildung von unspezifischen Produkten führen. In den späten Zyklen kommt es durch den Verbrauch an Primern und dNTPs, durch die hohen Produktkonzentrationen und der zunehmenden Konkurrenz durch unspezifische Produkte zu einer Rehybridisierung und einer inkompletten Denaturierung der Produkte, das zu einem Plateau in der Amplifikationsrate des spezifischen Produktes führt. Dadurch können unspezifische Produkte aus früheren Fehlamplifikationen bevorzugt vermehrt werden und zu unspezifischen Hintergrundbanden auf dem Agarosegel führen (SAIKI 1989; INNIS und GELFAND 1990). Bei den hier mit 35 Zyklen durchgeführten PCR- Verfahren konnten eine ausreichende Sensitivität sowie das Ausbleiben unspezifischer Hintergrundbanden beobachtet werden.

Gerade bei Untersuchungen einer latent infizierten Population ist eine hohe Sensitivität der Nachweismethode erforderlich, da mit einer geringeren Erregeranzahl in den Proben gerechnet werden muss, als bei einer Population, bei der ein akutes Krankheitsgeschehen vorliegt. Deswegen wurde die Bestimmung der Sensitivität der hier erarbeiteten PCR-Verfahren durchgeführt. Diese wurde anhand einer DNS- Verdünnungsreihe, sowie einer Verdünnungsreihe der zuvor bestimmten Koloniebildenden Einheiten (KbE) bestimmt. Für den Sensitivitätsnachweis der Multispezies- PCR wurde beispielhaft die DNS, bzw. Kulturen der Mykoplasmenspezies *M. synoviae* als Vertreter der geflügelpathogenen und *M. gypis* als Vertreter der Greifvogelmykoplasmen eingesetzt. Die Grenze der noch nachweisbaren DNS von MS und *M. gypis* konnte bei 1 pg DNS, bzw. der noch nachweisbaren KbE- Menge bei 1 KbE festgesetzt werden und entsprach der Nachweisgrenze, die VAN KUPPEVELD et al. (1992) für das von ihnen entwickelte Primerpaar angibt. Damit konnte nachgewiesen werden, dass der Austausch des vorwärtsgerichteten Primers durch die Modifizierung der PCR von VAN KUPPEVELD et al. (1992) hinsichtlich der Sensitivität keinerlei Nachteile ergaben. Da die Sensitivitätsbestimmung anhand der Mykoplasmenspezies MS und *M. gypis* erfolgte, also Spezies, die bei unterschiedlichen Vogelgruppen nachgewiesen wurden, kann angenommen werden, dass die Sensitivität dieser PCR für alle aviären Mykoplasmen in diesem Bereich liegt.

Als Nachweisgrenze für die MS- PCR mit dem Primerpaar nach LAUERMAN et al. (1993) sowie MAROIS et al. (2000) werden 100 KbE angegeben. MAROIS et al. (2000) arbeitet jedoch mit dem modifizierten Primerpaar, welches auch in dieser Studie eingesetzt wurde und übernahm die Nachweisgrenze die LAUERMAN et al. (1993) nachgewiesen hatten. Dies bedeutet, dass genaue Studien über die Sensitivität dieses modifizierten Primerpaares nicht vorliegen. In der hier durchgeführten Untersuchung konnte eine Nachweisgrenze von 1 pg DNS, bzw. 1KbE ermittelt werden.

Sowohl bei der MG/*M. imitans*- PCR, als auch bei der *M. corogypsi*- PCR lag die Nachweisgrenze bei 100 fg DNS, bzw. 0,1 KbE. Die entwickelten Primerpaare zum Nachweis von MI, *M. falconis* und *M. gypis* zeigten bei 1 pg DNS, bzw. 1 KbE ein noch nachweisbares Amplifikationsprodukt. Die PCR zum Nachweis von *M. buteonis* weist noch eine Menge von 50 fg DNS, bzw. eine KbE- Menge von 0,05 KbE auf.

Die Nachweisgrenze der MM- PCR mit dem von BOYLE et al. (1995) entwickelten Primerpaar lag bei den hier angewendeten PCR- Bedingungen bei 10 pg, bzw. 10 KbE. Leider geben BOYLE et al. (1995) keine Nachweisgrenze für die von ihnen entwickelte PCR an.

Bei allen PCR- Nachweismethoden wurden die mittels DNS- Gehalt festgestellten Sensitivitätsgrenzen durch die Untersuchung anhand der eingesetzten Menge von KbEs bestätigt.

Sowohl die Sensitivitätssteigerung um den Faktor 10 der MS- PCR, als auch die unterschiedlichen Sensitivitäten der einzelnen PCR- Nachweismethoden untereinander, können durch die Wahl der einzelnen Primer erklärt werden. So kann z.B. eine Veränderung der Primerlänge dazu führen, dass die Anlagerung (Hybridisierung) der Primer an die DNS- Einzelstränge erleichtert wird, und somit eine höhere Ausbeute an Amplifikationsprodukten entsteht. Dadurch stehen im nächsten Reaktionszyklus mehr Matrizen für eine Anlagerung zur Verfügung, das zu einer Erhöhung der Sensitivität führt. Genauso verhält es sich im gegenteiligen Fall (INNIS und GELFAND, 1990). Primer, die optimal für die Spezifität geeignet sind, müssen nicht grundsätzlich aufgrund ihrer Länge und GC- Gehaltes optimal hinsichtlich der Sensitivität gestaltet sein. Eine weitere Erklärung der Sensitivitätssteigerung der MS- PCR kann in der qualitativ besseren Probenaufbereitung liegen. So bestand die Probenaufbereitung für die PCR bei der Sensitivitätsuntersuchung von LAUERMAN et al. (1993) lediglich in der Lösung der Proben in PBS mit anschließender Erhitzung für zehn Minuten. Eine optimale Freisetzung der DNS mit gleichzeitiger Beseitigung von Stoffen, die die PCR negativ beeinflussen können (Inhibitoren), wie es mit dem hier eingesetzten DNS Extraktions- Kit gegeben war, erfolgte bei LAUERMAN et al (1993) nicht.

Nach den Angaben einiger Autoren (HYMAN et al., 1989; LEVISOHN et al., 1989; NASCIMENTO et al., 1991; ZHAO und YAMAMOTO, 1993 a und b) ist mit einer DNS- Menge von 1ng nur in der akuten Phase einer Infektion zu rechnen, das einer Menge von 10^4 KbE entspricht. Bei einer chronischen Infektion mit Mykoplasmen ist jedoch mit geringeren Werten zu rechnen. Auch wenn die PCR- Nachweismethode von *M. meleagridis* mit 10 pg die niedrigste Sensitivität aufweist, liegt sie doch 100 fach unterhalb des Wertes, mit dem bei akuten Infektionen zu rechnen ist. Somit erscheinen die hier untersuchten Nachweismethoden hinsichtlich ihrer Sensitivität für die Untersuchung von latent infizierten Vogelpopulationen geeignet.

Die Überprüfung der Spezifität der hier entwickelten und untersuchten PCR- Nachweisverfahren erfolgte anhand der DNS verschiedener Mykoplasmenspezies, sowie Zellwand tragender Bakterienspezies, die in der PCR als Matrize eingesetzt wurden. Da mittels dieser PCR- Verfahren eine Untersuchung von Greifvogelpopulationen durchgeführt werden sollte, bei denen die Prävalenz der Mykoplasmenspezies noch relativ unbekannt war, sollte diese Spezifitätsprüfung nicht nur anhand der dort häufig nachgewiesenen Mykoplasmenspezies, sondern anhand aller bekannten aviären Mykoplasmenspezies

erfolgen. Die in der Literatur beschriebenen PCR- Nachweismethoden wurden hierbei oft nur gegen eine begrenzte Auswahl von Mykoplasmen getestet, wobei das Augenmerk vornehmlich bei denjenigen Mykoplasmen spezial lag, die beim Wirtschaftsgeflügel zu erwarten sind. Eine Testung dieser Methoden gegen die bei Greifvögeln isolierten Mykoplasmen spezial *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* sowie *M. gypis* wurde nicht durchgeführt. Einzige Ausnahme hiervon stellt die Evaluierung der MG- PCR durch GARCIA et al. (2005) dar, in der ebenfalls alle bekannten aviären Mykoplasmen (exkl. *M. vulturii*) zur Spezifitätsuntersuchung eingesetzt wurden. Jedoch amplifiziert dieses Primerpaar sowohl die DNS von MG als auch von *M. imitans*. Die Primeransatzstellen sind so gewählt, dass die Sequenzen des Amplifikats beider Mykoplasmen spezial identisch sind, so dass eine nachfolgende Untersuchung durch Sequenzierung oder Restriktionsenzymanalyse zur Differenzierung dieser beiden Spezial keinen Erfolg bringt.

In der vorliegenden Untersuchung wurden von den 24 bekannten aviären Mykoplasmen spezial mit Ausnahme von *M. vulturii*, 23 aviäre Mykoplasmen spezial und zusätzlich 9 weitere Spezial der Gattung *Mycoplasma* sowie ein Vertreter der Gattung *Acholeplasma* getestet. Des Weiteren wurden Zellwand tragende Bakterien extrahiert, darunter auch Vertreter, die regelmäßig bei Vögeln isoliert werden.

Die Multispezial- PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992) konnte hierbei die DNS aller eingesetzten Mykoplasmen spezial sowie die DNS von *Acholeplasma laidlawii*, nicht jedoch die DNS der eingesetzten Zellwand tragenden Bakterien spezial amplifizieren. Damit wurden die Untersuchungsergebnisse von VAN KUPPEVELD et al. (1992), dass ausschließlich DNS der Vertreter der Klasse *Mollicutes* von dieser PCR erfasst werden, auch nach dem Austausch des vorwärtsgerichteten Primers, bestätigt.

Die der Klasse der *Mollicutes* angehörigen Vertreter der Ordnung *Entomoplasmatales* kommen nur bei Pflanzen und Insekten, die Vertreter der Ordnung *Anaeroplasmatales* nur im Pansen von Wiederkäuern vor, so dass sich dieses Primerpaar für ein Screening von Tupferproben aus Vogelpopulationen eignet, da es die DNS aller getesteten aviären Mykoplasmen nachweisen konnte. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass ein positives Ergebnis dieser PCR auch aufgrund von Ureaplasmen, welche zu der Ordnung der *Mycoplasmatales* gehören, sowie Acholeplasten (Ordnung der *Acholeplasmatales*), entstehen kann. Vertreter beider Ordnungen konnten vereinzelt bei Vögeln isoliert werden (PAN et al., 1987; STIPKOVITS et al., 1986 b; TIONG, 1990; VARGA et al., 1989).

Eine Überprüfung der Spezifität des modifizierten Primerpaares der MS- PCR erfolgte in der Untersuchung von MAROIS et al. (2000) nicht. LAUERMAN et al. (1993) testete die Spezifität der ursprünglichen Primer anhand von acht verschiedenen aviären

Mykoplasmenspezies. Sowohl anhand der in der Veröffentlichung von LAUERMAN et al. (1993) eingesetzten Mykoplasmenspezies, als auch anhand aller anderen bekannten Mykoplasmenspezies einschließlich der greifvogeltypischen Mykoplasmen, konnte innerhalb der hier durchgeführten Studie die Spezifität bestätigt werden. Dies trifft auch für die *M. meleagridis*- PCR zu, bei der BOYLE et al. (1995) elf verschiedene Mykoplasmenspezies zur Spezifitätsprüfung einsetzen.

Auch die speziesspezifischen Primerpaare zum Nachweis von MI, *M. buteonis*, *M. gypis*, *M. corogypsi* und *M. falconis* amplifizierten ausschließlich die DNS aus den Reaktionsansätzen, in denen die jeweilige spezifische DNS enthalten war. Somit konnte auch für diese PCR- Nachweismethoden die Spezifität nachgewiesen werden.

Das Primerpaar zum Nachweis von MG/ *M. imitans* amplifizierte, wie erwartet, sowohl die DNS von MG, als auch die DNS von *M. imitans*.

Damit eine Differenzierung zwischen den Mykoplasmenspezies MG und *M. imitans* erfolgen konnte, wurden die Primer so gewählt, dass ein DNS- Fragment amplifiziert werden konnte, mit dem durch den Einsatz eines Restriktionsenzym ein unterschiedliches Restriktionsfragmentmuster entstand. Dafür wurde das Restriktionsenzym AseI verwendet, das in der amplifizierten MG- Sequenz eine Spaltstelle aufweist, während in dem *M. imitans*-Produkt diese Spaltstelle nicht vorhanden ist und das PCR- Produkt somit nicht gespalten wird. Somit konnten beide Mykoplasmenspezies voneinander unterschieden werden. Kommt es jedoch durch andere Faktoren, wie z.B. einer Inaktivierung des Restriktionsenzym oder falscher Durchführung der Restriktionsenzymanalyse zu keiner Spaltung des PCR-Amplifikats, so besteht die Gefahr, dass mit dem Einsatz von AseI MG positive Proben fälschlicherweise als *M. imitans* diagnostiziert werden. Somit ist das Restriktionsenzym AseI zur Differenzierung dieser beiden Mykoplasmenspezies nur bedingt geeignet. Der Einsatz des Restriktionsenzym MseI führte jedoch bei beiden PCR- Produkten zu einer Spaltung und somit zu unterschiedlichen Restriktionsfragmentmustern, so dass eine sichere Unterscheidung der beiden Mykoplasmenspezies möglich war.

Die Gefahr, dass *M. imitans*- Isolate, wie nach KLEVEN (2003 c), fälschlich als MG bei Untersuchungen von Feldproben identifiziert werden, kann somit ausgeschlossen werden. Auch der Einsatz anderer Mykoplasmenspezies, sowie Zellwand tragender Bakterien erbrachte bei allen PCR- Nachweismethoden weder ein spezifisches, noch ein unspezifisches Amplifikationsprodukt.

Die Überprüfung der Spezifität anhand des jeweils amplifizierten DNS- Fragments mittels Restriktionsenzymanalyse zeigte, dass alle PCR- Amplifikate der jeweiligen

Nachweisverfahren die spezifischen Restriktionsfragmentmuster aufwiesen und konnte somit als spezifisch eingeordnet werden.

Insgesamt erwiesen sich die optimierten PCR- Verfahren, zum spezifischen und sensitiven Nachweis der jeweiligen Mykoplasmenreferenzstämme unter Laborbedingungen als geeignet.

5.2 Ergebnisse der epidemiologischen Studie über das Auftreten von Mykoplasmen bei Greifvögeln

Über das Vorkommen von Mykoplasmen bei Greifvögeln in Deutschland liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. LIERZ (1999) gelang es bei einer Untersuchung verletzt aufgefundener Greifvögel und Eulen aus Berlin und Brandenburg bei 38,8% von 68 untersuchten Vögeln Mykoplasmen mittels kultureller Anzucht nachzuweisen.

Bei den eigenen Untersuchungen wurden zwei verschiedene diagnostische Methoden angewendet. Hierzu gehören die kulturelle Anzucht und der molekularbiologische Nachweis mittels PCR.

In dieser Studie wurden 60 Greifvögel auf das Vorkommen von Mykoplasmen untersucht. Dabei handelte es sich um Falkenartige (*Falconidae*), Habichtsartige (*Accipitridae*) und jeweils einen Vertreter der Eulen und Käuze (*Strigidae*).

In der kulturellen Anzucht konnten bei 76,6% (n=46) der 60 untersuchten Tiere Mykoplasmen nachgewiesen werden. Ein ähnlich hohes positives Ergebnis ergab die Untersuchung dieser Vögel mit der modifizierten Multispezies- PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992). Hierbei gelang von 60 untersuchten Trachealtupfern bei 88,3% (n=53) ein positiver Nachweis. 9 Proben (15%) zeigten in der kulturellen Anzucht kein Wachstum und in der PCR waren 5 dieser Proben (8,4%) ebenfalls negativ. Bei 2 Proben (3,3%) (M110, Steinadler und M144, Gänsegeier) konnte festgestellt werden, dass es zu einer Störung der PCR kam, so dass keine Aussage über das Ergebnis der PCR getroffen werden konnte. Die Proben eines Steinadlers und eines Gänsegeiers, die in der PCR inhibiert waren, zeigten zwar auch kein Wachstum in der kulturellen Anzucht, dennoch kann nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass bei diesen Arten keine Mykoplasmen vorlagen, da bei zwei untersuchten

Habichten ebenfalls die Anzucht negativ verlief, die PCR jedoch ein positives Ergebnis aufwies. Das negative Anzuchtergebnis bei dem untersuchten Steinadler sowie dem Gänsegeier kann in der geringen Probenanzahl für diese Arten liegen, da POVEDA et al. (1994) die Isolierung von *M. gypis* bei Gänsegeiern sowie *M. gallinarum* bei Mönchsgeiern gelang. Dies beweist, dass bei diesen Arten diese Mykoplasmenspezies vorkommen können.

Bei den sechs der in der kulturellen Anzucht negativen Tiere, bzw. den fünf in der PCR negativen Tiere handelt es sich um Bestandsvögel, bei denen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass in der Vergangenheit eine antibakterielle Therapie erfolgt war. Diese könnte dazu geführt haben, dass der Erreger zum Probennahmezeitpunkt nicht mehr vorhanden war, so dass weder eine Erregeranzucht, noch die PCR zu einem positiven Ergebnis führen konnte. So berichten auch JORDAN et al. (1989), KEMPF (1991), SKELLY et al. (1986) und STIPKOVITS (1988) über Schwierigkeiten beim Nachweis von Mykoplasmen nach antibakteriellen Behandlungen.

Ein Kauz, der aus der Wildpopulation stammte, blieb in der Erregerisolierung und der PCR negativ. In der Literatur ist der Nachweis von Mykoplasmen bei dieser Vogelart noch nicht beschrieben worden, jedoch kann hier, aufgrund nur eines untersuchten Tieres keine Aussage über das Vorkommen von Mykoplasmen gemacht werden.

Das die Anzahl der negativen Nachweise in der kulturellen Anzucht mit 15% höher liegt, als bei der PCR mit 8,4% kann darin begründet sein, dass die PCR nicht auf lebende Organismen angewiesen ist und aufgrund ihrer Sensitivität nur sehr wenig Mykoplasmen-DNS benötigt, um ein positives Ergebnis anzuzeigen. Hinzu kommt, dass Mykoplasmen zum Teil nur schwer in künstlichen Medien zu kultivieren sind und somit bei der Kultivierung verloren gehen können (KEMPF, 1998; NASCIMENTO et al., 1991). So wird in der Literatur davon berichtet, dass die kulturelle Anzucht von Mykoplasmen negativ verlief, obwohl es in serologischen Untersuchungen und Untersuchungen mittels PCR zu positiven Ergebnissen kam (GERLACH 1998, MALLISON und ROSENSTEIN 1976). Dennoch muss erwähnt werden, dass es auch bei der PCR bei Vorhandensein von Inhibitoren in der Probe oder fehlerhafter DNS Präparation zu möglichen falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Dies war in dieser Studie bei zwei Proben (3,3%) der Fall. Hier konnte durch eine weiterfolgende PCR zum Nachweis von α -Aktin (HAUCK et al., 2006; ZIMMERMAN et al., 1994), einem Bestandteil des Zytoskeletts, das in Eukaryontenzellen vorkommt, festgestellt werden, dass eine PCR aufgrund der Qualität der DNS in diesen zwei Proben nicht stattgefunden hat. Dies kann einerseits auf das Vorhandensein von Inhibitoren, die den PCR Ablauf stören können (ROLFS et al., 1992), begründet sein, andererseits kann auch eine

fehlerhafte Probennahme/Transport oder DNS Extraktion die Ursache darstellen. Die Tatsache, dass beide Proben eine unterdurchschnittliche Quantität bei der DNS Bestimmung mittels Spektralphotometer aufzeigten, kann darauf hinweisen, dass hier ein Problem bei der Probennahme oder der DNS Extraktion vorlag. Da beide Proben jedoch sowohl in der PCR, als auch in der Anzucht keinerlei Ergebnis erbrachten, ist nicht auszuschließen, dass hier eine fehlerhafte Probennahme/Transport durchgeführt wurde.

In dieser Untersuchung kam es zusätzlich bei der kulturellen Anzucht bei 5 Proben (8,4%) zu einer Kontamination mit Bakterien und Pilzen, die bei einer PCR nicht ins Gewicht fallen. Ein Grund für diese Kontaminationen liegt darin, dass in dieser Studie auf das toxische Thalliumacetat zur Unterdrückung dieser Organismen verzichtet und statt dessen Antibiotika eingesetzt wurde, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination erhöht ist, da die Antibiotika nicht so effektiv wirken wie das Thalliumacetat. Dennoch ist in dieser Studie die Kontaminationsrate von 8,4% (n=5) im Gegensatz zu der Studie von LIERZ (1999), in der bei 68 untersuchten Trachealtupfern bei 19,4% der Isolate eine Kontamination auftrat, relativ gering. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in dieser Studie auch mit dem im Feld gewonnenen Proben sofort eine Verdünnung erstellt und jede davon so schnell wie möglich kulturell angezchtet wurde. Dadurch kam es zu einer Ausdünnung der unerwünschten Begleitflora, und eine Überwucherung der Mykoplasmen blieb in den meisten Fällen aus. Diese Bedingungen lagen bei den Studien von LIERZ (1999) nicht vor. Hier erfolgten die Probenentnahme und die Weiterbearbeitung zur Anzucht geographisch getrennt, so dass die Proben auf postalischem Wege zum weiterbearbeitenden Labor transportiert wurden. Dieser Zeitraum, in dem die Proben unter nicht optimalen Bedingungen gelagert wurden, könnte ausreichend gewesen sein, dass es zu einer Überwucherung durch die Begleitflora kam oder ein Teil der Mykoplasmen abgestorben sind und somit nicht mehr angezchtet werden konnten.

Bei einer weiteren Untersuchung von 30 gesunden Falken im Mittleren Osten durch LIERZ et al. (2002) trat bei keinem der untersuchten Falken eine Kontamination auf und es konnten bei allen Tieren Mykoplasmen nachgewiesen werden. So ist durchaus anzunehmen, dass LIERZ (1999) unter optimaleren Anzuchtbedingungen, wie sie in der vorliegenden Studie und der von LIERZ et al. (2002) herrschten, ein höherer Mykoplasmenachweis gelungen wäre. Das positive Ergebnis von 88,3% der untersuchten Proben in der Multispezies-PCR lässt auf eine ähnlich hohe Prävalenz an Mykoplasmen bei Greifvögeln schließen, wie sie LIERZ et al. (2002) nachweisen konnte. Jedoch wurden die von LIERZ et al. (2002) untersuchten Tiere über vier Monate gemeinsam in Gefangenschaft gehalten, so dass eine Übertragung und Ausbreitung unter den Vögeln nicht ausgeschlossen werden konnte.

Obwohl mittels PCR bei 88,3% der untersuchten Greifvögel der vorliegenden Studie ein positives Ergebnis erzielt wurde, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass die eigentliche Nachweisrate an Mykoplasmen geringer ist, da mit der Multispezies-PCR nicht nur Spezies der Gattung *Mycoplasma*, sondern alle Spezies der Klasse *Mollicutes* erfasst werden. Da diese Klasse auch die Gattungen *Acholeplasma* sowie *Ureaplasma* beinhaltet, von denen Vertreter auch bei Vögeln isoliert werden konnten (PAN et al., 1987; STIPKOVITS et al., 1986 b; TIONG, 1990; VARGA et al., 1989), besteht die Möglichkeit, dass einige positive PCR Ergebnisse aufgrund der DNS von Acholeplasten oder Ureaplasten entstanden sind.

Dennoch untermauert die kulturelle Anzucht, in der bei 76,6% der untersuchten Greifvögel Mykoplasmen isoliert werden konnten, die hohe Nachweisrate der PCR-Untersuchung.

Da es sich in der vorliegenden Studie um symptomlose Vögel aus verschiedenen Regionen, die keinen direkten Kontakt zueinander hatten, handelt und der Nachweis sowohl bei Greifvögeln aus Beständen bei 77,8% (n=21) mittels PCR bzw. bei 66,6% (n=18) mittels Anzucht sowie aus der Wildpopulation bei 97,0% (n=32) mittels PCR, bzw. bei 87,9% (n=29) mittels Anzucht gelang, ist anzunehmen, dass bei Greifvögeln eine latente Infektion vorliegt. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass eventuell Mykoplasmen bei Greifvögeln zur normalen Atemwegsflora gehören, wie es auch schon LIERZ (1999) spekuliert hat. Untermauert wird dies durch die hohe Nachweisrate bei den Nestlingen. Hier erbrachte die PCR zu 100% (n=16), die kulturelle Anzucht zu 87,5% (n=14) ein positives Ergebnis. Ein Unterschied in der Infektionsrate zu adulten Tieren, wie es LIERZ (1999) feststellte, konnte hier nicht beobachtet werden, da sowohl bei den adulten Fundtieren (PCR n=16/94,1%; Anzucht n=15/88,0%) als auch bei den adulten Bestandstieren (PCR n=21/77,8%; Anzucht n=18/66,6%) eine sehr hohe Infektionsrate nachgewiesen werden konnte. Der geringere Nachweis von Mykoplasmen bei den Bestandsvögeln im Vergleich zu den Vögeln aus der Wildpopulation kann dadurch erklärt werden, dass diese unter besseren Bedingungen gehalten werden und es selten zu einem Kontakt zu Wildtieren kommt. Des Weiteren kann, wie schon erwähnt, nicht ausgeschlossen werden, dass eine medikamentelle Behandlung dieser Tiere erfolgte.

Alle in der kulturellen Anzucht positiven Proben wurden durch die Multispezies-PCR bestätigt.

Zur weiteren Differenzierung der kulturellen Nachweise in die Mykoplasmenspezies MG, MS, MM, MI, *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis* wurden der Immuno-Binding-Assay nach KOTANY und McGARRITY (1985) angewandt. Dabei konnten bei den 46 untersuchten kulturellen Anzuchten insgesamt 54 Isolate differenziert werden, wobei bei acht

untersuchten Proben (17,4%) mehrere Mykoplasmenspezies nachgewiesen wurden. Mittels der eingesetzten acht speziesspezifischen PCR- Methoden wurden insgesamt 68 Mykoplasmenspeziesnachweise geführt, wobei bei zwölf (22,6%) Tupferproben mehr als eine Mykoplasmenspezies nachgewiesen werden konnte. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse kann angenommen werden, dass Mykoplasmen regelmäßig in Mischkulturen vorliegen.

Bei den Untersuchungen bestätigten die verschiedenen speziesspezifischen PCRs alle mit der IBA identifizierten Mykoplasmenspezies und wiesen zusätzlich Mykoplasmen nach, die mittels IBA nicht differenziert oder erfasst werden konnten. Zusätzlich erfolgte bei diesen Nachweisen sowie auch bei denen, die durch Anzucht und IBA nicht bestätigt werden konnten, eine Restriktionsenzymanalyse sowie bei ausgewählten Proben eine Sequenzierung der Amplifikate, mit der die Spezifität dieser Proben bestätigt werden sollte.

Von den untersuchten Greifvogelproben konnten 28 (51,9%) der 54 Isolate, die mit der IBA untersucht wurden und 23 (33,6%) der 68 Nachweise, die mit der PCR untersucht wurden, nicht identifiziert werden. Dabei lag der größte Teil dieser nicht weiter zu identifizierenden Mykoplasmen bei den Habichten (IBA: n=14/50%; PCR: n=17/74%), aber auch bei Wanderfalken (IBA: n=5/17,8%; PCR: n=3/13%), Mäusebussard (IBA: n=5/17,8%; PCR: n=2/8,7%), Schleiereule (IBA: n=1/3,6%; PCR: n=1/4,3%) sowie Rotmilan, Baumfalke und Berberfalke (IBA jeweils: n=1/3,6%) gelang eine Identifizierung nicht. LIERZ et al. (2002) gelang bei den von ihnen untersuchten Falken bei 20% der Isolate keine Identifizierung. Auch hier wurden Antiseren gegen *M. gallisepticum*, *M. iowae*, *M. synoviae*, *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis* eingesetzt. In der Untersuchung von LIERZ (1999) konnten 7,4% der Isolate nicht identifiziert werden. Hierbei wurden noch zusätzlich Antiseren gegen *M. columbinum*, *M. columbinasale*, *M. columborale*, *M. anatis* und *M. adleri* verwendet. Das lässt den Schluss zu, dass weitere noch nicht beschriebene Mykoplasmenspezies bei Greifvögeln regelmäßig vorkommen, jedoch sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um eine weitere Charakterisierung und Identifizierung dieser Mykoplasmen durchzuführen. Dabei muss bei dem Einsatz der Multispezies- PCR immer bedacht werden, dass es sich bei den durch die eingesetzten speziesspezifischen PCRs nicht weiter differenzierten positiven Multispezies- PCR Nachweise möglicherweise auch um Vertreter der Gattungen *Acholeplasma* und *Ureaplasma* handeln kann. Ein deutlicher Vorteil bei der Untersuchung von Vogelpopulationen mit unbekanntem Mykoplasmenpektrum liegt hier in der kulturellen Anzucht und der Identifizierung der Isolate mittels IBA, da hier innerhalb eines Arbeitsschrittes weitere, nicht mit den eingesetzten Hyperimmunseren reagierende Mykoplasmenkolonien, visuell ausgemacht werden können. In der PCR

hingegen können Mischinfektionen möglicherweise unerkannt bleiben, da bei einer in der Multispezies- PCR positiven Probe, die auch bei einer speziesspezifischen PCR ein positives Signal aufweist, nicht hervor geht, ob weitere Mykoplasmenspezies vorliegen. Eine Möglichkeit wäre ein PCR- Amplifikat der Multispezies- PCR mittels verschiedener spezieller Restriktionsenzyme, die eventuell eine Unterscheidung mehrerer Mykoplasmenspezies zulassen, zu untersuchen, was sich jedoch sehr aufwendig gestaltet. Deswegen sollte in Prävalenzstudien, die ein generelles Vorkommen von Mykoplasmen innerhalb einer Population untersuchen, auf eine kulturelle Anzucht nicht verzichtet werden.

Bei den untersuchten Greifvögeln konnten die greifvogelspezifischen Mykoplasmen *M. falconis* in 12 Fällen (20%) mittels IBA und in 15 Fällen (25%) mittels der speziesspezifischen PCR nachgewiesen werden.

Dabei erfolgte der Nachweis bei *M. falconis* ausschließlich bei Falken, denn der Erreger wurde mittels IBA aus Wanderfalken (n=4), Turmfalken (n=4), Berberfalken (n=1) sowie einem Sakerfalken, einem Gerfalken und einem Ger- Saker- Hybridfalken bestimmt. Die PCR- Nachweismethode wies darüber hinaus *M. falconis* bei einem Wanderfalken, einem Sakerfalken und einem Baumfalken nach. Dies bestätigt die Studien von POVEDA et al. (1994) und LIERZ (1999) sowie LIERZ et al. (2002), die *M. falconis* ebenfalls nur aus Falkenproben nachweisen konnten.

Der Nachweis von *M. gypis* gelang mittels der IBA bei 10 Proben (16,7%) und der PCR bei 11 Proben (18,3%). Dabei wurde der Erreger durch den IBA bei fünf Mäusebussarden und fünf Rotmilanen identifiziert. Diese wurden durch das Ergebnis der speziesspezifischen PCR bestätigt. Zusätzlich zeigte ein Habicht in der PCR ein positives Ergebnis. Leider trat bei dieser Probe in der kulturellen Anzucht eine Kontamination auf, aber aufgrund der Restriktionsenzymanalyse und der Sequenzierung des *M. gypis*- PCR- Amplifikates konnte der Nachweis als spezifisch bestätigt werden.

Auffällig hierbei ist, dass mit beiden Identifikationsmethoden kein Nachweis von *M. gypis* bei Falken zu beobachten war. Untersuchungen von LIERZ et al. (2002) ergaben ebenfalls einen negativen Nachweis von *M. gypis* bei 30 untersuchten Falken aus dem Mittleren Osten. Dennoch scheinen Falken unter gewissen Umständen empfänglich für *M. gypis* zu sein, denn LIERZ (1999) gelang von insgesamt 19 untersuchten Falken die Isolation von *M. gypis* aus einem Turmfalken. Da in der Untersuchung von LIERZ (1999) verunfallte und kranke Vögel untersucht worden sind, bei Untersuchungen von gesunden Falken in dieser Studie und in der von LIERZ et al. (2002) kein einziger Nachweis von *M. gypis* gelang, kann darüber spekuliert werden, dass der Erreger nur aufgrund des geschwächten Zustandes des Falken dort anhaften konnte. Da *M. gypis* in diesen Untersuchungen nur bei Mäusebussarden und

Rotmilanen nachgewiesen wurde und auch LIERZ (1999) der Nachweis von *M. gypis*, ausgenommen von dem Turmfalke, nur bei Mäusebussarden gelang, können eher Habichtsartige als Hauptwirt für *M. gypis* angesehen werden.

M. buteonis wurde in der kulturellen Anzucht in vier Fällen (6,7%) identifiziert, mittels der PCR gelang der Nachweis in 11 Fällen (18,3%).

Dabei handelte es sich um Nachweise bei Wanderfalken (n=2), Sakerfalke (n=1), und Rohrweihe (n=1) mittels des IBA, die durch die PCR bestätigt wurden. Zusätzlich zu diesen Nachweisen konnte mit der PCR *M. buteonis* bei einem Wanderfalken, drei Turmfalken, einem Berberfalken, einem Sakerfalken und einem Mäusebussard nachgewiesen werden. Damit werden die Untersuchungsergebnisse von POVEDA et al. (1994), die *M. buteonis* bei Bussarden isolieren konnten, sowie LIERZ (1999) und LIERZ et al. (2002), die *M. buteonis* von Falken und Mäusebussarden isolierten, bestätigt. Auch wenn POVEDA et al. (1994) diesen Erreger aus Vögeln mit respiratorischer Symptomatik isolierten und eine pathogene Potenz vermuteten, zeigten die Tiere der Studien von LIERZ (1999) und LIERZ et al. (2002) sowie die Tiere dieser Studie keinerlei respiratorische Symptomatik, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Infektion von Falke und Bussard mit *M. buteonis* regelmäßig symptomlos oder latent verläuft.

M. corogypsi konnte in keiner der untersuchten Proben, weder in der kulturellen Anzucht und angeschlossener Identifizierung mittels IBA, noch durch die speziesspezifische PCR, nachgewiesen werden und bestätigt die Ergebnisse von LIERZ (1999), der bei 68 untersuchten Greifvögeln kein Isolat als *M. corogypsi* identifizieren konnte. LIERZ et al. (2002) konnten jedoch in einer Studie von 30 Falken aus dem Mittleren Osten in 6 Fällen *M. corogypsi* aus Trachealtupferproben isolieren und mittels IBA identifizieren. Ein Grund für diesen Nachweis bei Falken im Mittleren Osten, jedoch negativen Nachweis bei Tieren der hiesigen Breitengrade, kann die unterschiedliche geographische Lage und damit verbunden ein unterschiedliches Mykoplasmenspektrum sein. *M. corogypsi* wurde ursprünglich aus einem Fußsohlenabszess eines Geiers (PANANGALA et al. 1993) isoliert, und auch MORISHITA et al. (1997) isolierten diesen Erreger aus dem Sekret einer Pododermatitis eines Greifvogels. Leider geben weder PANANGALA et al. (1993) noch MORISHITA et al. (1997) an, ob von den untersuchten Tieren auch Trachealtupfer entnommen wurden, so dass nicht geklärt werden kann, ob es sich bei *M. corogypsi* um einen normalen Kommensalen der Trachealschleimhaut handelt, der sich von dort in das Wundgebiet über Benagen oder Futteraufnahme eingeschleppt haben könnte. Möglicherweise handelt es sich jedoch um eine Kreuzreaktion des in der IBA eingesetzten Antiserums aufgrund eines Antigensharing von zwei verschiedenen Mykoplasmenspezies.

Alle in dieser Studie mittels PCR erfolgten Nachweise der greifvogelspezifischen Mykoplasmen konnten durch eine anschließende Restriktionsenzymanalyse und Sequenzierung bestätigt werden.

Der Nachweis auf *M. synoviae* sowie *M. iowae* gelang weder in der kulturellen Anzucht, noch mittels der PCR, was die Untersuchungen von POVEDA et al. (1990 a und b), MORISHITA et al. (1997) sowie LIERZ (1999) und LIERZ et al. (2002) stützt. Auch der Nachweis von MG konnte in dieser Studie nicht erbracht werden, wobei POVEDA et al. (1990 b) von einem MG Nachweis aus einem Trachealtupfer eines Wanderfalken berichten. Jedoch konnten in den Studien von MORISHITA et al. (1997) sowie LIERZ (1999) und LIERZ et al. (2002) ebenfalls in keinem der untersuchten Greifvögel MG nachgewiesen werden.

Bei acht (13,3%) der 60 beprobten Vögel zeigte die MM- PCR nach BOYLE et al. (1995) ein positives Ergebnis, in der kulturellen Anzucht konnte dies jedoch mittels der IBA nicht bestätigt werden. Bei diesen positiven Vögeln handelte es sich um sieben Falken und eine Rohrweihe. Obwohl sich bei der Etablierung dieses PCR- Nachweisverfahrens das Primerpaar im Test mit 23 aviären Mykoplasmen als spezifisch erwies, zeigte die anschließende Restriktionsenzymanalyse dieser MM positiven Feldproben, dass ein unterschiedliches Restriktionsmuster zu dem des MM- Referenzstammes auftrat. Durch eine Sequenzierung der Amplifikate des Berberfalken (GD9), Turmfalken (M14) und eines Wanderfalken (M26) konnte ein 334 bp großes Fragment der PCR- Amplifikate miteinander verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass diese bei allen drei identisch waren und es sich nicht um MM handelte, auch wenn LIERZ (1999) und LIERZ et al. (2002) der Nachweis von MM mittels kultureller Anzucht und IBA- Identifizierung bei Greifvögeln gelangen. Der Vergleich dieses 334 bp großen Fragmentes des amplifizierten PCR- Produktes mit der 16S rRNS von *M. meleagridis* (L24106) ergab eine Homologie von nur 86%. Eine anschließende BLAST- Analyse ergab eine Homologie von 97% mit einem 16S rRNS Sequenzabschnitt von *M. buteonis*.

Der positive PCR- Nachweis von *M. buteonis* bei fünf der acht MM- positiven Fälle lässt zwar den Verdacht zu, dass es sich hier um eine Variante von *M. buteonis* handeln könnte, jedoch zeigten auch zwei Proben eine positive Reaktion in der MM- PCR, ohne dass *M. buteonis* in diesen Proben vorhanden war und in der Spezifitätsprüfung der PCR konnten keine Kreuzreaktionen zwischen diesen beiden Spezies festgestellt werden. So konnte bei einem Wanderfalken (M24) zusätzlich nur *M. falconis* nachgewiesen werden, während bei einem Ger- Saker- Hybriden (M27) nur MM in der PCR bestätigt wurde.

Aufgrund dessen, dass durch das Amplifikat bzw. der Sequenzierung nur ein kleiner Teil der ca. 1500 bp großen 16S rRNS vorliegt, können keine genauen Rückschlüsse auf die

vorliegende Mykoplasmenspezies gemacht werden und es sind weiterführende Untersuchungen auf biochemischer sowie molekulargenetischer Ebene nötig, um die Identität dieser Spezies zu klären.

Dies zeigt, wie wichtig es bei PCR- Untersuchungen von Wildvögeln ist, die Spezifität einer PCR- Nachweismethode durch weiterführende Untersuchungen zu bestätigen, vor allem, wenn bei diesen Vögeln das Erregerspektrum nicht bekannt ist. So ist die PCR nach BOYLE et al. (1995) eine etablierte Nachweismethode für MM beim Wirtschaftsgeflügel und mag dort auch für das Screening von Geflügelbeständen mit den dort üblicherweise vorkommenden Mykoplasmenspezies spezifisch sein, doch der vorliegende Fall zeigt, dass bei Vogelarten, bei denen noch nicht bekannte Mykoplasmenspezies zu vermuten sind, hinsichtlich der Spezifität Vorsicht geboten ist und weiterführende Untersuchungen, wie die hier angewendeten Sequenzierungen und Restriktionsenzymanalyse, zur Sicherung des Nachweises eines Erregers folgen müssen.

5.3 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit etablierten PCR- Nachweismethoden zeigten bei den Untersuchungen mittels der Referenzstämmen sowie den Zellwand tragenden Bakterien die gewünschte Spezifität und Sensitivität. Hiernach zeigten sie ihre Eignung für den Einsatz von Felduntersuchungen an Greifvögeln, bei denen die Prävalenz von Mykoplasmen noch weitgehend unbekannt war.

Dabei zeigte sich der große Vorteil der PCR gegenüber der kulturellen Anzucht in der Unabhängigkeit von lebenden Organismen und der Kontamination von Bakterien und Pilzen. Durch die Multispezies- PCR war ein schnelles und sensitives Screening der Trachealtupferproben auf das Vorhandensein von Mykoplasmen möglich und es erfolgte mit dieser PCR ein höherer Nachweis an Mykoplasmen als mit der kulturellen Anzucht. Hierbei muss aber bedacht werden, dass mit dieser PCR auch Vertreter der Gattungen *Ureaplasma* und *Acholeplasma* erfasst werden, die ebenfalls gelegentlich bei Vögeln vorkommen können. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der weiteren Differenzierung der Mykoplasmen erzielt. Hier zeigten ebenfalls die speziesspezifischen PCR Methoden eine höhere Nachweisrate als die Differenzierung der angezüchteten Mykoplasmen mit dem IBA.

Dennoch demonstrieren die in dieser Studie erzielten Ergebnisse, dass es bei der Untersuchung von Populationen mit unbekanntem Mykoplasmenspektrum notwendig ist, zwei unterschiedliche Nachweismethoden anzuwenden. So konnten mittels kultureller Anzucht und folgender IBA Mykoplasmenkolonien visuell erfasst werden. Damit war es möglich, ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand Kolonien zu erkennen, die mit keinem der eingesetzten Hyperimmunseren reagierten, während bei einer in der Multispezies-PCR positiven Probe mit folgender positiver speziesspezifischer PCR nicht ausgeschlossen werden konnte, dass hier Mischinfektionen mit anderen Mykoplasmen vorlagen, auf die mit einer speziesspezifischen PCR nicht untersucht wurde.

Ebenso zeigt das Ergebnis der MM-PCR, die als etablierte Nachweismethode von *M. meleagridis* bei der Untersuchung von Putenbeständen eingesetzt wird (BOYLE et al., 1995; MOALIC et al., 1998), wie wichtig der Einsatz einer zweiten Nachweismethode bei diesen Untersuchungen ist. Die Studie konnte aufzeigen, dass bei einem Einsatz der PCR bei Feldproben von Populationen mit unbekanntem Mykoplasmenspektrum nicht nur die Spezifitätskontrolle anhand aller bekannten aviären Mykoplasmenpezies sondern auch die Etablierung einer weiteren Absicherung der Diagnose anhand einer Restriktionsenzymanalyse oder anschließender Sequenzierung absolut unabdingbar ist. Die epidemiologische Studie konnte aufzeigen, dass geflügelpathogene Mykoplasmen innerhalb der Greifvogelpopulation scheinbar eine untergeordnete Rolle spielen, jedoch ein hohes Vorkommen an Mykoplasmen vorherrscht, wovon ein Großteil nicht den bei Greifvögeln nachgewiesenen Mykoplasmen *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis* zugeordnet werden konnte.

Weitere biochemische und molekulargenetische Untersuchungen müssen folgen, um die Identität dieser Mykoplasmen abzuklären.