

6 Zusammenfassung

Ein Beitrag zum Vorkommen von Mykoplasmen bei Greifvögeln mittels konventioneller und molekularbiologischer Methoden

Mykoplasmen sind Krankheitserreger des Wirtschaftsgeflügels und verursachen dort hohe wirtschaftliche Verluste. Über das Vorkommen und die Verbreitung von Mykoplasmen bei gesunden Greifvögeln ist bisher wenig bekannt. Mykoplasmen sind aufgrund ihrer anspruchsvollen Kulturbedürfnisse, des langsamen Wachstums und aufgrund von Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen mit kulturellen Methoden nur schwer nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden PCR- Methoden zum Nachweis von Mykoplasmen bei Greifvögeln entwickelt, um das Vorkommen von Mykoplasmen bei diesen Tieren festzustellen.

Um geeignete PCRs zum Nachweis aller bekannten Mykoplasmen sowie der Mykoplasmenspezies *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. iowae* (MI), *M. meleagridis* (MM), *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis* zu finden, wurden dazu die 16S rRNS- Sequenzen aller 24 bekannten aviären Mykoplasmen miteinander verglichen.

Für den Nachweis aller Mykoplasmen (Multispezies- PCR) wurde hierfür die PCR von VAN KUPPEVELD et al. (1993) modifiziert, für den Nachweis von MS und MM wurden die bereits in der Literatur beschriebenen PCR- Verfahren überprüft.

Ebenfalls wurde jeweils eine PCR zum Nachweis von MI, MG/*M. imitans*, sowie der bei Greifvögeln beschriebenen Mykoplasmenspezies *M. buteonis*, *M. falconis*, *M. corogypsi* und *M. gypis* entwickelt. Dabei war das Ziel, dass eine Differenzierung der Spezies MG und *M. imitans* erfolgen konnte, da bei der Untersuchung von Feldproben das Vorkommen von beiden Erregern nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Spezifität der PCR- Verfahren konnte durch den Einsatz von 23 aviären Mykoplasmen sowie weiteren Mykoplasmenspezies von Säugetieren und zellwandtragenden Bakterien nachgewiesen werden. Die Differenzierung der Mykoplasmenspezies MG und *M. imitans* erfolgte durch eine an die PCR anschließende Restriktionsenzymanalyse mit den Enzymen AseI und MseI, bei der unterschiedliche Restriktionsfragmentmuster entstanden.

Unter den in dieser Studie etablierten PCR-Protokollen ließen sich in der Multispezies- PCR, der MS- PCR, *M. falconis*- sowie *M. gypis*- PCR 1 pg DNS bzw. 1 KbE pro Reaktionsansatz nachweisen. Für die MG/*M. imitans*- PCR, MI- PCR sowie die *M. corogypsi*- PCR lag die Nachweisgrenze bei 100 fg DNS bzw. 0,1 KbE , für die *M. buteonis*- PCR bei 50 fg DNS

bzw. 0,05 KbE pro Reaktionsansatz. Für die MM- PCR konnte eine Sensitivität/ Reaktionsansatz von 10 pg DNS bzw. 10 KbE festgestellt werden.

In einer anschließenden Feldstudie wurden Trachealtupferproben von 60 klinisch gesunden Greifvögeln, die sowohl aus der Wildpopulation, als auch Gefangenschaftshaltung stammten untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen neu etablierten PCR- Methoden eingesetzt. Parallel dazu erfolgte die kulturelle Anzucht der Trachealtupferproben dieser Vögel mit anschließender Identifizierung mittels des Immuno- Binding- Assays (IBA).

Dabei gelang die kulturelle Isolierung von Mykoplasmen bei 76,6% (n=46) der 60 untersuchten Trachealtupfer. Bei 15% (n=9) zeigte sich kein Wachstum und bei 8,4% (n=5) trat eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen auf. Die Mutispezies- PCR zeigte bei 88,3% (n=53) ein positives Ergebnis. Bei 8,4% (n=5) der untersuchten Proben verlief die PCR negativ und in 3,3% (n=2) zeigte sich eine Inhibition der PCR.

Die untersuchten Nestlinge zeigten dabei einen Mykoplasmenachweis von 87,5% mittels kultureller Anzucht, bzw. 100% mittels PCR. Bei den Fundtieren erfolgte bei 88% (kulturelle Anzucht) bzw. 94,1% (PCR) und bei den Bestandstieren 66,6% (kulturelle Anzucht) bzw. 77,8% (PCR) ein positives Ergebnis.

Von den in der kulturellen Anzucht erhaltenen 54 Isolate gelang eine Differenzierung mittels des IBA für *M. falconis* (n=12/20%), *M. gypis* (n=10/16,7%) und *M. buteonis* (n=4/6,7%).

Mittels der speziesspezifischen PCRs konnten *M. falconis* (n=15/25%), *M. gypis* (n=11/18,3%) und *M. buteonis* (n=11/18,3%) nachgewiesen werden. Dabei wurden alle in der IBA identifizierten Mykoplasmen durch die PCR bestätigt.

Die MM- PCR nach BOYLE et al. (1995) zeigte bei 8 Proben (13,3%) einen positiven MM Nachweis. Die anschließende Restriktionsenzymanalyse verlief jedoch negativ und eine Sequenzierung von drei Vertretern dieser Amplifikate zeigte, dass diese zwar untereinander identisch sind, jedoch nur zu 86% mit der Gensequenz von MM (L24106) übereinstimmen.

Ein anschließender Blast- Abgleich zeigte eine Homologie von 97% zu einem 16S rRNS- Sequenzabschnitt von *M. buteonis* (AF412971). Jedoch ist der untersuchte Sequenzbereich von 334 bp zu klein, um Schlussfolgern zu können, dass es sich hierbei um eine *M. buteonis*- Variante handeln könnte. Weitere Untersuchungen zur Abklärung der Identität dieser Mykoplasmen sind nötig.

Pathogene Mykoplasmen wie MG, MS, MI und *M. imitans* sowie die bei Greifvögeln schon isolierte Mykoplasmenart *M. corogypsi* konnten nicht nachgewiesen werden.

Es zeigte sich jedoch, dass bei Greifvögeln eine große Anzahl an Mykoplasmen nachgewiesen wurde, die nicht mit den hier eingesetzten Methoden identifiziert werden konnten. So konnten 28 (51,9%) der in der kulturellen Anzucht erhaltenen 54 Isolate nicht mit

dem IBA identifiziert werden und auch die eingesetzten speziesspezifischen PCRs erbrachten bei 23 Proben (38,3%) kein Ergebnis. Hier sind ebenfalls weiterführende Untersuchungen nötig um abzuklären, um welche Mykoplasmen es sich hierbei handelt.

Die epidemiologische Studie konnte aufzeigen, dass geflügelpathogene Mykoplasmen innerhalb der Greifvogelpopulation scheinbar keine Rolle spielen, jedoch ein hohes Vorkommen an Mykoplasmen vorherrscht, wovon ein Großteil nicht zu den bei Greifvögeln bislang nachgewiesenen Mykoplasmen *M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis* und *M. gypis* zugeordnet werden konnten.

Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass bei einem Einsatz der PCR bei Feldproben von Populationen mit unbekanntem Mykoplasmenspektrum nicht nur die Spezifitätskontrolle anhand aller bekannten aviären Mykoplasmenspezies, sondern auch die Etablierung einer weiteren Absicherung der Diagnose anhand einer Restriktionsenzymanalyse sowie anschließender Sequenzierung absolut unabdingbar ist. Die Ergebnisse der MM-PCR nach BOYLE et al. (1995) haben gezeigt, dass PCR-Methoden, die für Wirtschaftsgeflügelbestände etabliert wurden nicht ohne weiteres auf die Wildvogelpopulation übertragen werden können.