

Untersuchungen zum Vorkommen und zur  
Bedeutung von Mykoplasmen bei Weißstörchen  
(*Ciconia ciconia*, LINNAEUS, 1758) und Beschreibung  
einer neuen Spezies (*Mycoplasma ciconiae* sp. nov.)

---

**Franca Möller Palau-Ribes**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Michael Lierz

**Untersuchungen zum Vorkommen  
und zur Bedeutung von  
Mykoplasmen bei Weißstörchen  
(*Ciconia ciconia*, LINNAEUS, 1758) und  
Beschreibung einer neuen Spezies  
(*Mycoplasma ciconiae* sp. nov.)**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Franca Möller Palau-Ribes**

Tierärztin aus Bonn Bad Godesberg

Gießen, 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

---

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Lierz

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Prüfer: PD Dr. R. Hospes

Tag der Disputation: 12. September 2016

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt, bzw. in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

**F. MÖLLER PALAU-RIBES**, D. ENDERLEIN, N. HAGEN, W. HERBST, H.M. HAFEZ, M. LIERZ (2016): Description and prevalence of *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. isolated from white stork nestlings (*Ciconia ciconia*), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016 Jun 6. doi: 10.1099/ijsem.0.001220 [Epub ahead of print].

**F. MÖLLER PALAU-RIBES**, L. ZIEGLER, D. ENDERLEIN, M. LIERZ (2013): The mycoplasmal flora of white storks (*Ciconia ciconia*).<sup>\*</sup> Vortrag. Tagungsband der First International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine 2013 (ISBN: 978-3-8359-6008-4), Wiesbaden, Deutschland, S. 392-393.

**\*Ausgezeichnet mit dem Helga Gerlach Student Award (Third Price)**

**F. MÖLLER PALAU-RIBES**, D. ENDERLEIN, C. BARTSCH, S.L. VOIGT-HEUCKE, M. WEIß, M. HUSSEIN, S. KIPPER, M. LIERZ (2012): Relevance of Mycoplasma in Ecologically Diverse Avian Species. Vortrag und Poster. Tagungsband des 19th International Congress of the IOM, Toulouse, Frankreich, 15.-20.07.2012, S. 41.

**F. MÖLLER PALAU-RIBES**, H.M. HAFEZ, N. HAGEN, C. BARTSCH, M. WEIß, S. KIPPER, M. LIERZ (2011): Significance of mycoplasmas in ecologically differing avian species such as white storks (*Ciconia ciconia*) and nightingales (*Luscinia megarhynchos*). Vortrag. Tagungsband Mycoplasma 2011, Göttingen, Deutschland, 04.-05.07.2011, S. 11.

M. LIERZ, **F. MÖLLER PALAU-RIBES**, N. HAGEN, C. BARTSCH, M. WEIß, H.M. HAFEZ, S. KIPPER (2011): Role of mycoplasmas in free-ranging white stork (*Ciconia ciconia*) and nightingale (*Luscinia megarhynchos*) populations. Vortrag. Tagungsband des European Mycoplasma Meeting, Chertsey, Großbritannien, 22.-24.06.2011, S. 21.

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>4</b>
2.1	Mollicutes (Mykoplasmen) .....	4
2.1.1	Phylognese und Taxonomie .....	4
2.1.2	Biologie .....	6
2.1.3	Veterinärmedizinische Bedeutung .....	9
2.1.4	Geflügelpathogene Mykoplasmen .....	12
2.1.4.1	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> (MG) .....	12
2.1.4.2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> bei Finkenvögeln .....	16
2.1.4.3	<i>Mycoplasma synoviae</i> (MS) .....	18
2.1.4.4	<i>Mycoplasma meleagridis</i> (MM) .....	21
2.1.4.5	<i>Mycoplasma iowae</i> (MI) .....	22
2.1.5	Weitere aviäre Mykoplasmen .....	23
2.1.6	Aviäre Ureaplasmen .....	30
2.1.7	Unbekannte und nicht valide beschriebene Mykoplasmenspezies .....	31
2.2	Bedeutung von Mykoplasmen für Wildvögel und Wildvogelpopulationen .....	32
2.3	Diagnostik aviärer Mykoplasmen .....	36
2.3.1	Direkte Nachweisverfahren .....	38
2.3.1.1	Kultivierung von Mykoplasmen .....	38
2.3.1.2	Identifizierung von Mykoplasmenisolaten .....	40

## VERZEICHNISSE

---

2.3.1.3	Molekularbiologische Nachweismethoden .....	42
2.3.2	Indirekte Nachweisverfahren.....	47
2.4	Beschreibung neuer Spezies der Klasse Mollicutes .....	48
2.5	Der Weißstorch .....	51
2.5.1	Biologie des Weißstorches.....	53
2.5.2	Übersicht mikrobiologischer und toxikologischer Befunde bei Weißstörchen .	54
2.6	Fragestellung .....	56
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>57</b>
3.1	Material .....	57
3.1.1	Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	57
3.1.2	Bezeichnung und Herkunft der Mykoplasmenkulturen .....	57
3.2	Methoden.....	63
3.2.1	Kultivierung von Mykoplasmen .....	63
3.2.2	Kultivierung anderer Bakterien.....	64
3.2.3	Molekularbiologische Untersuchungen .....	64
3.2.3.1	Extraktion der DNA .....	65
3.2.3.2	Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen.....	65
3.2.3.3	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR).....	65
3.2.3.3.1	16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007) (16S-rRNA-PCR) .....	66
3.2.3.3.2	16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR nach RAMÍREZ et al. (2008) (ITS-PCR) .....	67



## VERZEICHNISSE

---

3.2.3.3.3 Etablierung einer speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR)	68
3.2.3.4 Agarosegelelektrophorese	69
3.2.3.5 Aufreinigung der DNA-Amplikons	70
3.2.3.6 Sequenzierung und Sequenzanalysen	70
3.2.4 Serologische und zusätzliche phänotypische Untersuchungen	73
3.2.4.1 Biochemische Eigenschaften	73
3.2.4.1.1 Fermentation von Glucose	74
3.2.4.1.2 Hydrolyse von Arginin	75
3.2.4.1.3 Hydrolyse von Harnstoff	76
3.2.4.2 Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur	77
3.2.4.3 Ultrafiltration	78
3.2.4.4 Lichtmikroskopie	78
3.2.4.5 Elektronenmikroskopie	78
3.2.4.6 Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin	79
3.2.4.7 Immunobinding Assay	81
3.2.5 Herstellung spezifischer KaninchenHyperimmunseren gegen das Isolat ST 57	82
3.2.5.1 Antigenpräparation	83
3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA)	83
3.2.5.3 Immunisierung, Blutentnahme und Serumgewinnung	84
3.2.6 Prävalenzstudie	85

## VERZEICHNISSE

---

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>87</b>
4.1	Kultivierung von Mykoplasmen .....	87
4.2	Molekularbiologische Untersuchungen .....	88
4.2.1	16S-rRNA-Gensequenzvergleiche und phylogenetischer Stammbaum.....	89
4.2.2	ITS-Sequenzvergleiche und phylogenetischer Stammbaum.....	95
4.3	Serologische und zusätzliche phänotypische Untersuchungen .....	100
4.3.1	Biochemische Eigenschaften .....	100
4.3.1.1	Fermentation von Glucose .....	100
4.3.1.2	Hydrolyse von Arginin .....	101
4.3.1.3	Hydrolyse von Harnstoff.....	102
4.3.2	Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur .....	102
4.3.3	Ultrafiltration .....	104
4.3.4	Lichtmikroskopie .....	106
4.3.5	Elektronenmikroskopie.....	108
4.3.6	Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin .....	109
4.3.7	Serologische Eigenschaften.....	109
4.4	Formale Beschreibung von <i>Mycoplasma ciconiae</i> sp. nov.....	112
4.5	Prävalenzstudie zu <i>Mycoplasma ciconiae</i> sp. nov. ....	113
4.5.1	Speziesspezifische PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) .....	113
4.5.2	Geographische Verteilung.....	118
4.5.3	Statistische Auswertung.....	120

## VERZEICHNISSE

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>121</b>
5.1	Genotypische und phylogenetische Untersuchungen.....	122
5.1.1	<i>Mycoplasma ciconiae</i> sp. nov. ....	122
5.1.2	Weitere Mykoplasmenisolate .....	123
5.2	Nachweis von Mykoplasmen .....	125
5.2.1	Zusätzliche phänotypische Untersuchungen .....	129
5.3	Prävalenzstudie .....	134
5.3.1	Etablierung einer speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57, Typstamm von <i>Mycoplasma ciconiae</i> sp. nov. (ST57-PCR).....	134
5.3.2	Bedeutung von <i>Mycoplasma ciconiae</i> sp. nov. für Weißstörche.....	137
5.4	Schlussfolgerung .....	142
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>174</b>
	<b>Anhang I: Geräte und Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>174</b>
	I.I Geräte.....	174
	I.II Verbrauchsmaterial.....	176
	<b>Anhang II: Reagenzien .....</b>	<b>177</b>
	<b>Anhang III: Lösungen und Puffer .....</b>	<b>178</b>
	<b>Anhang IV: Medien für Mykoplasmen-Anzucht.....</b>	<b>180</b>
	IV.I SP4-Medium nach BRADBURY (1998).....	180

## VERZEICHNISSE

---

IV.I.I	SP4-Flüssigmedium.....	181
IV.I.II	SP4-Agarmedium.....	181
IV.II	Mykoplasmen-Standardmedium nach POVEDA (1998) .....	182
IV.II.I	Standard-Flüssigmedium mit 20% Serum.....	182
IV.II.II	Standard-Flüssigmedium mit 10% Serum.....	182
IV.II.III	Standard-Festmedium.....	182
IV.III	Biochemie-Test- und Kontrollmedien nach POVEDA (1998) .....	183
IV.III.I	Glucose-, Arginin- und Urea-Testmedium.....	183
IV.III.II	Biochemie-Kontrollmedium .....	183
IV.IV	<i>Ureaplasma</i> -Flüssig- und Agarmedium (DSMZ 1076b) .....	184
IV.IV.I	<i>Ureaplasma</i> -Flüssigmedium .....	184
IV.IV.II	<i>Ureaplasma</i> -Agarmedium .....	184
IV.V	Flüssigmedium modifiziert nach HAYFLICK .....	185
IV.V.I	AS-Flüssigmedium (10%, 5%, 2,5%, 1%).....	185
<b>Anhang V: Sequenzen für phylogenetische Untersuchungen.....</b>		<b>186</b>
V.I	Verwendete Nukleotidsequenzen aviärer Mykoplasmen.....	186
V.II	Sequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenpezies des Synoviae-Clusters .....	187
V.III	Sequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenpezies des Hominis-Clusters .....	187
V.IV	Sequenzen anderer Mykoplasmen .....	188
V.V	ITS-Sequenzen der Mykoplasmen-Isolate aus der PhD-Arbeit von SUÁREZ-PÉREZ (2011).....	189

## VERZEICHNISSE

---

<b>Anhang VI: Statistische Auswertung</b> .....	<b>190</b>
VI.I    Berechnung der optimalen Wachstumstemperatur der Isolate ST57 und ST101 .....	190
VI.II  Prävalenzstudie.....	190
<b>Danksagung</b> .....	<b>193</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>195</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum aller aviären Mykoplasmen des Genus <i>Mycoplasma</i> auf Basis der 16S-rRNA-Gen-sequenz. Als Außengruppe diente die Sequenz von <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> . Methode: Clustal W-Algorithmus .....	6
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Ultradünnschnitt) von <i>M. imitans</i> , modifiziert nach BRADBURY et al (1993) .....	7
Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahme spiegeleiförmiger Mykoplasmen-Kolonien des Isolates ST101 auf SP4-Agarmedium, 100x.....	8
Abbildung 4: Möglichkeiten der Diagnostik aviärer Mykoplasmen, modifiziert nach HAGEN (2007).....	37
Abbildung 5: Verbreitung der Weißstorch-Brutpaare in Deutschland 2004. Aus: KAATZ und KAATZ (2013).....	52
Abbildung 6: Geographische Lage der Weißstorch-Horste der Nestlinge, von denen Mykoplasmenkulturen für diese Arbeit verwendet wurden.....	61
Abbildung 7: Test-Ansätze zur Untersuchung der Fermentation von Glucose nach POVEDA (1998).....	75
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Messgrößen des Digitonin-Tests.....	80
Abbildung 9: 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992) modifiziert nach HAGEN (2007): DNA-Amplikons verschiedener Isolate in der erwarteten Länge (1.000 bp). Agarosegel 2%, Färbung GelRed™ .....	89
Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der 16S-rRNA-Gensequenzen (Algorithmus: Clustal W): Vergleich der Sequenzen der <i>Mycoplasma</i> -Isolate von Weißstorchnestlingen und eines adulten Weißstorches (1566/2012) aus dieser Arbeit mit bekannten Sequenzen aviärer Mykoplasmen des Genus <i>Mycoplasma</i> .....	91
Abbildung 11: 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS)-PCR nach RAMÍREZ (2008): DNA-Amplikons verschiedener Isolate in drei verschiedenen Längen (400-600 bp). Agarosegel 2%, Färbung GelRed™ .....	95

- Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS): Aviäre Myko-plasmen des Genus *Mycoplasma* und Weißstorch-Isolate (Algorithmus: Clustal W): Vergleich der Sequenzen der *Mycoplasma*-Isolate von Weißstorchnestlingen und eines adulten Weißstorches (1566/2012) aus dieser Arbeit mit bekannten Sequenzen aviärer Mykoplasmen des Genus *Mycoplasma*. ..... 96
- Abbildung 13: Grafische Darstellung der Verdopplungszeiten  $t_2$  (Tage) der *Mycoplasma*-Isolate ST57 und ST101 in SP4-Flüssigmedium in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur ..... 104
- Abbildung 14: Ergebnisse der Keimzahlbestimmung der Keimsuspension der Isolate ST57 und ST101 vor („Original“) und nach Filtration durch Filter mit verschiedenen Porendurchmessern in halblogarithmischer Darstellung; Kultivierung in SP4-Medium, Inkubation bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> ..... 105
- Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme der spiegeleiförmigen Mykoplasmen-Kolonien (*M. ciconiae* sp. nov., Typstamm ST 57) auf SP4-Agarmedium (Phasenkontrast), 100x. .... 106
- Abbildung 16: Färbung nach GRAM. (A) *Proteus mirabilis*, gramnegative Stäbchen; (B) Isolat ST57, gramnegative pleomorphe Partikel; (C) *Staphylococcus aureus*, grampositive Kokken; (D) Isolat ST101, gramnegative Aggregate und fadenartige Strukturen ..... 107
- Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Isolates ST57, Färbung: Negativkontrastierung mit 2%iger Phosphorwolframsäure ..... 108
- Abbildung 18: Immunobinding Assay. Links: positive Reaktion (dunkel-blaue Farbreaktion) von Kaninchen-Hyperimmunserum (Nr. 82) gegen das Isolat ST57 mit Kolonien des Isolates ST57; Rechts: negative Reaktion (keine Farbreaktion = weiß) von Kaninchen-Präimmunserum (Nr. 82) mit Kolonien des Isolates ST57. Lichtmikroskopische Aufnahmen, 16x. .... 110
- Abbildung 19: Ergebnis der speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) in Abhängigkeit von der im Reaktionsansatz eingesetzten Menge an genomischer DNA aus dem Isolat ST57, Agarosegel 2%, Färbung Ethidiumbromid ..... 115

## VERZEICHNISSE

---

Abbildung 20: Ergebnis der speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) in Abhängigkeit von der im Reaktionsansatz verwendeten Keimzahlen [KbE] des Isolates ST57, Agarose-gel 2%, Färbung Ethidiumbromid.....	116
Abbildung 21: Ergebnisse der PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) für die Mykoplasmenkulturen ST 1 bis ST 26, Agarosegel 2%, Färbung Ethidiumbromid.....	117
Abbildung 22: Geographische Lage der Weißstorch-Horste aus denen die untersuchten Nestlinge stammten: Übersicht.....	118
Abbildung 23: Geographische Lage der Weißstorch-Horste aus denen die untersuchten Nestlinge stammten: Region 1 Nord.....	119
Abbildung 24: Geographische Lage der Weißstorch-Horste aus denen die untersuchten Nestlinge stammten: Region 2 Süd .....	119



### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Klasse Mollicutes mit Unterteilung in Ordnungen, Familien und Gattungen, modifiziert nach HAGEN (2007) .....	5
Tabelle 2: Aviäre <i>Mycoplasma</i> - und <i>Ureaplasma</i> -Spezies, deren repräsentative Wirte sowie Pathogenitätseigenschaften, nach BROWN et al. (2011) .....	11
Tabelle 3: Übersicht molekularbiologischer und kultureller <i>Mycoplasma gallisepticum</i> (MG)-Nachweise bei verschiedenen Vogelspezies in Abhängigkeit von der Beobachtung klinischer Symptome.....	14
Tabelle 4: Übersicht kultureller und molekularbiologischer <i>Mycoplasma synoviae</i> (MS)-Nachweise bei verschiedenen Vogelspezies in Abhängigkeit von der Beobachtung klinischer Symptome .....	20
Tabelle 5: Auswahl speziesspezifischer und Multiplex-Mykoplasmen-PCR, Übersicht möglicher Zielgene und Methoden.....	44
Tabelle 6: Ausgewählte genusspezifische und Multispezies-PCR, Übersicht möglicher Zielgene und Methoden .....	45
Tabelle 7: Durchschnittliche Sequenzhomologie zwischen Spezies verschiedener phylogenetischer Einheiten der Klasse Mollicutes: Vergleich der Sequenzhomologien des 16S-rRNA-Gens, der ITS und des <i>rpoB</i> -Gens. Modifiziert nach VOLOKHOV et al. (2012).....	50
Tabelle 8: Verwendete Mykoplasmenkulturen von Weißstorchnestlingen mit Angaben zur jeweiligen Herkunft .....	58
Tabelle 9: Verwendete Mykoplasmen-Referenzstämme und -Referenzantiseren mit Angaben zur jeweiligen Herkunft .....	62
Tabelle 10: Verwendete Bakterienkulturen mit Angaben zu genauer Bezeichnung und Herkunft .....	64
Tabelle 11: Übersicht verwendeter Oligonukleotide (Primer) für die 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD (1992), modifiziert nach HAGEN (2007) (16S-rRNA-PCR) und 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR (ITS-PCR) nach RAMÍREZ (2008) .....	65

## VERZEICHNISSE

---

Tabelle 12: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (Mastermix) für die 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007).....	66
Tabelle 13: Temperatur-Zeit-Profil für die 16S rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007).....	66
Tabelle 14: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (Mastermix) für die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR (ITS-PCR) nach RAMÍREZ et al (2008) .....	67
Tabelle 15: Temperatur-Zeit-Profil für die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR (ITS-PCR) nach RAMÍREZ et al. (2008) .....	67
Tabelle 16: Immunisierungsprotokoll zur Herstellung von Kaninchen-Hyperimmunseren gegen Antigen des Isolates ST57. Zeitpunkte der Immunisierung mit Angabe der verwendeten Antigenmengen sowie Zeitpunkte der Blutentnahmen und Entblutung der Kaninchen.....	84
Tabelle 17: Bezeichnung der Isolate sowie GenBank-, DSMZ- und ATCC-Zugangsnummern (Accession No.) der mittels 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992) modifiziert nach HAGEN (2007), ITS-PCR nach RAMÍREZ (2008) und Amplikon-Sequenzierung untersuchten Mykoplasmen-Isolate von Weißstorchnestlingen und eines adulten Weißstorches (*), sowie Ergebnisse der Gruppenzuordnung der Isolate auf Basis der 16S-rRNA-Gensequenz.....	88
Tabelle 18: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich des 16S-rRNA-Gens zwischen den „ <i>Mycoplasma pullorum</i> -ähnlichen“ Mykoplasmen-Isolaten und Mykoplasmen des Synoviae-Clusters.....	92
Tabelle 19: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich des 16S-rRNA-Gens zwischen den „ <i>Mycoplasma spumans</i> -ähnlichen“ und „ <i>Mycoplasma gypis</i> -ähnlichen“ Mykoplasmen-Isolaten sowie Mykoplasmen des Hominis-Clusters .....	94
Tabelle 20: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) der „ <i>M. pullorum</i> -ähnlichen“ Isolate mit Mykoplasmen des Synoviae-Clusters .....	98
Tabelle 21: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) der „ <i>M. spumans</i> -ähnlichen“ und „ <i>M.gypis</i> -ähnlichen“ Isolate sowie Mykoplasmen des Hominis-Clusters.....	99

## VERZEICHNISSE

---

Tabelle 22: Ergebnisse des Versuchs zur Fermentation von Glucose der Isolate ST57 und ST101 im Vergleich zu <i>M. gallisepticum</i> und <i>M. arthritidis</i> unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C... 100	100
Tabelle 23: Ergebnisse des Versuchs zur Hydrolyse von Arginin der Isolate ST57 und ST101 im Vergleich zu <i>M. gallisepticum</i> und <i>M. arthritidis</i> unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C ..... 101	101
Tabelle 24: Ergebnisse des Versuchs zur Hydrolyse von Harnstoff der Isolate ST57 und ST101 im Vergleich zu <i>U. felinum</i> und <i>M. ar-thritidis</i> unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C ..... 102	102
Tabelle 25: Ergebnisse zur optimalen Wachstumstemperatur und zum Wachstumstemperturbereich bei der Anzucht des <i>Mycoplasma</i> -Isolates ST57 in SP4-Flüssigmedium, 5% CO <sub>2</sub> ..... 103	103
Tabelle 26: Ergebnisse zur optimalen Wachstumstemperatur und zum Wachstumstemperturbereich bei der Anzucht des <i>Mycoplasma</i> -Isolates ST101 in SP4-Flüssigmedium, 5% CO <sub>2</sub> ..... 103	103
Tabelle 27: Ergebnisse der Keimzahlbestimmung der Keimsuspension der Isolate ST57 und ST101 vor und nach Filtration durch Filter mit verschiedenen Porendurchmessern; Kultivierung in SP4-Medium, Inkubation bei 37°C, 5%CO <sub>2</sub> 105	105
Tabelle 28: Ergebnisse der serologischen Untersuchungen im Immunobinding-Assay (IBA) ..... 111	111
Tabelle 29: Selbstentwickelte Oligonukleotide (Primer) für die spezies-spezifische PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von <i>M. ciconiae</i> sp. nov. (ST57-PCR)..... 113	113
Tabelle 30: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (Mastermix) für die spezies-spezifische PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von <i>M. ciconiae</i> sp. nov. (ST57-PCR). ..... 114	114
Tabelle 31: Temperatur-Zeit-Profil für die speziesspezifische PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von <i>M. ciconiae</i> sp. nov. (ST57-PCR)..... 115	115
Tabelle 32: Nachweise von <i>M. ciconiae</i> sp. nov. bei Weißstorchnestlingen nach Regionen. Ergebnisse der speziesspezifischen PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von <i>M. ciconiae</i> sp. nov. (ST57-PCR) ..... 120	120

## VERZEICHNISSE

---

Tabelle 33: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz und der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) aller in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidsequenzen aviärer Mykoplasmenspezies .....	186
Tabelle 34: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz und der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) aller in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidsequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenspezies des Synoviae-Clusters.....	187
Tabelle 35: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz und der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) aller in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidsequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenspezies des Hominis-Clusters.....	187
Tabelle 36: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz von <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> , der Isolate 1566/2012 und Sp22 sowie Zugangsnummern der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) der Isolate 1566/2012 und Sp22. ....	188
Tabelle 37: Berechnete Verdopplungszeiten (in Tagen) der Isolate ST57 und ST101 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Die Isolate wurden in SP4-Medium, 5% CO <sub>2</sub> bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert.....	190
Tabelle 38: Datensatz für statistische Berechnungen der Nachweishäufigkeit von <i>Mycoplasma ciconiae</i> sp. nov. mittels ST57-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren: Verteilung der un-tersuchten Weißstorchnestlinge und zugehörigen Horste nach Regionen, der Anzahl Nestlinge pro Horst sowie dem Alter der Nestlinge pro Horst.....	190

### IV. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Acholeplasma</i>
AFLP	Längenpolymorphismus amplifizierter Fragmente (Englisch: Amplified-fragment length polymorphism)
ATCC	American Type Culture Collection
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Latein: <i>Aqua destillata</i> )
bp	Basenpaare (Englisch: base pairs)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
c	Zenti- ( $10^{-2}$ ) (Präfix vor SI-Einheiten)
d	Tag(e) (Englisch: day(s))
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Englisch: -acid)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP-Mix	Deoxynukleotidtriphosphat-Mischung aus: dATP, dCTP, dGPT und dTTP
dTTP	Desoxythreonintriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere (Latein: <i>et alii</i> )
f.	<i>forma</i> (Latein)
f	Femto- ( $10^{-15}$ ) (Präfix vor SI-Einheiten)
FBS	Fetal Bovine Serum (= FKS)
fem.	Linguistik: das weibliche Geschlecht, Genus eines Substantives (Lateinisch: <i>femininum</i> )

## VERZEICHNISSE

---

FKS	Fetales Kälberserum (= FBS)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigungskonstante
gen.	Genitiv (Lateinisch: [ <i>casus</i> ] <i>genitivus</i> )
gapA	Zytadherenzprotein von MG
ggf.	gegebenenfalls
GI-Test	Growth Inhibition Test (=Wachstumshemmtest)
GTP	Guanosintriphosphat
gyrA/B	DNA Gyrase Subunit A/B
h	Stunde(n) (Englisch: hour(s))
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAH	Hämagglutinations-Hemmtest
HPa	Weißstorch-Brutpaar (Horst-Paar)
HRM	High-resolution melting-curve analysis
Hrsg.	Herausgeber
IBA	Immunobinding Assay
IFT	Immunfluoreszenz-Test
IgG	Immunglobulin G
IOM	The International Organisation for Mycoplasmaology
ITS	16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region
JLU	Justus-Liebig-Universität
k	Kilo- (10 <sup>3</sup> ) (Präfix vor SI-Einheiten)
k. A.	keine Angabe
KVRAF	Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
L	Liter
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittel sicherheit
μ	Mikro- (10 <sup>-6</sup> ) (Präfix vor SI-Einheiten)
m	Meter
XVI	

## VERZEICHNISSE

---

m	Milli- ( $10^{-3}$ ) (Präfix vor SI-Einheiten)
mol	Mol (Stoffmenge) oder molar (Konzentration)
Mol-%	Molprozent (Stoffmengenanteil, veraltet)
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
M	DNA-Molekulargewichtsmarker
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight-Massenspektrometrie
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MGA_0319	hypothetisches Protein von MG
mgc2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> cytheadhesin 2
MI	<i>Mycoplasma iowae</i>
min	Minute(n)
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamid-Adenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
n	Nano- ( $10^{-9}$ ) (Präfix vor SI-Einheiten)
n.	Substantiv (Lateinisch: <i>nomen</i> )
NCBI	Nationales Institut für Verarbeitung und Speicherung biotechnologischer Daten der USA (Englisch: National Center for Biotechnology Information)
n. d.	nicht durchgeführt
NK	Negativkontrolle
No.	Nummer (Englisch: Number)
NTCC	National Type Culture Collection (Staatliche Typstamm-Sammlung von Großbritannien)
Obg	hochkonserviertes GTP-bindendes Protein
p	Piko- ( $10^{-12}$ ) (Präfix vor SI-Einheiten)

## VERZEICHNISSE

---

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Englisch: Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion(en) (Englisch: Polymerase chain reaction(s))
PK	Positivkontrolle
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (Englisch: Ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpoB	RNA-Polymerase-Betauntereinheit B (Englisch: -beta subunit B)
s	Sekunde(n)
S	Svedberg (= $10^{-13}$ s; Maßeinheit für Sedimentationskoeffizienten)
SI-Einheit	Internationales Einheitensystem für physikalische Größen (Französisch: Système international d'unités)
sp.	Spezies (Singular)
sp. nov.	Neu beschriebene Spezies (Latein: <i>species nova</i> )
spp.	Spezies (Plural)
SSA	Serumschnellagglutination
subsp.	Subspezies
syn.	synonym
TMC	The Mollicutes Collection (Stammsammlung der IOM)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>U.</i>	<i>Ureaplasma</i>
u. a.	unter anderem
USDA	Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten (Englisch: United States Department of Agriculture)
V	Volt
verd.	verdünnt
vlhA	Variable lipoprotein hemagglutinin A
z. B.	zum Beispiel
XVIII	



# 1 EINLEITUNG

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien der Klasse *Mollicutes* (EDWARD et al. 1967), die bei Säugetieren, Menschen, Vögeln, Reptilien, Fischen, Insekten und Pflanzen nachgewiesen wurden. Während es sich bei vielen Spezies um kommensale, apathogene oder fakultativ pathogene Erreger handelt, führen einige zu schwerwiegenden Krankheiten. Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Nutztierhaltung gewinnen pathogene Mykoplasmen zunehmend an Bedeutung. Bei Wirtschaftsgeflügel führen die geflügelpathogenen Mykoplasmenpezies *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) und *M. iowae* (MI) unter anderem zu chronischen Entzündungen der Atemwege sowie von Sehnenscheiden und Gelenken (BRADBURY 2005). Durch Produktionsausfälle sowie Behandlungs- und Bekämpfungsmaßnahmen entstehen hohe wirtschaftliche Verluste. Entsprechend ausführlich werden geflügelpathogene Mykoplasmen untersucht.

Über das Vorkommen und die Bedeutung von Mykoplasmen bei Wildvögeln gibt es jedoch nur wenige systematische Untersuchungen. Viele Pathogenitätsvermutungen beruhen auf Einzelfallberichten aufgefundener Wildvögel, so dass deren Aussagen zur Pathogenität in Bezug auf andere Individuen der jeweiligen Vogelart fraglich sind (FORSYTH et al. 1996; ERDÉLYI et al. 1999). Zudem sind verunfallte oder geschwächt aufgefundene Tiere für epidemiologische Studien ungeeignet, da sie keine repräsentative Stichprobe der Gesamtpopulation darstellen. Auf der Suche nach Nahrung gehen vorgeschädigte Tiere höhere Risiken ein als Artgenossen, womit wiederum die Wahrscheinlichkeit steigt, zu verunfallen oder aufgegriffen zu werden (LIERZ 1999; WOBESER 2006). Pathogenität ist das Resultat einer Interaktion zwischen Wirt und Mikroben und daher nicht nur von den Eigenschaften der Mikroben, sondern immer auch von der Konstitution des Wirtes abhängig (PIROFSKI et al. 2012). Um gezielt die Bedeutung einer Mykoplasmenpezies für eine Wildvogelspezies zu evaluieren, müssen daher zunächst epidemiologische Studien an gesunden, wildlebenden Individuen durchgeführt werden (LIERZ et al. 2008f). Bei Greifvögeln belegen zahlreiche Studien, dass es sich bei verschiedenen Mykoplasmenpezies um kommensale Organismen handelt (POVEDA et al. 1994; LIERZ et al. 2000b; LIERZ et al. 2002; LIERZ et al. 2008b). Auch bei gesunden Wildtauben werden regelmäßig Mykoplasmen der Spezies *M. columborale* und *M. columbinum* nachgewiesen (SHIMIZU et al. 1978). Es gibt jedoch auch Vogelarten, bei denen

Mykoplasmen natürlicherweise nicht oder sehr selten vorkommen. Nicht nachgewiesen wurden Mykoplasmen beispielsweise bei verschiedenen kleinen Zugvogelarten (WHALIN 2009) sowie bei kleinen Singvögeln (MÖLLER PALAU-RIBES et al. 2012). Einige Wildvogelarten kommen zudem als Vektoren für geflügelpathogene Mykoplasmen infrage (KLEVEN et al. 1983). Vereinzelt nachweisbar war beispielsweise MG bei klinisch unauffälligen Haussperlingen (*Passer domesticus*) aus unmittelbarer Umgebung infizierter Hühner (*Gallus gallus domesticus*) (JAIN et al. 1971; SHIMIZU et al. 1979) sowie bei Hausgimpeln (*Carpodacus mexicanus*) und Indianermeisen (*Baeolophus bicolor*) (LUTTRELL et al. 2001).

Weißstörche (*Ciconia ciconia*) kommen häufig in Europa vor und leben als anthropophile Vögel (Kulturfolger) in engem Kontakt zur Landwirtschaft und zu menschlichen Siedlungsgebieten. Als Zugvögel legen sie zudem lange Strecken zwischen Europa und Afrika zurück und können somit auch eine epidemiologische Verbindung für die Übertragung infektiöser Erreger zwischen afrikanischen und europäischen Ländern bilden (KALETA et al. 2012). Neben der Bedeutung für die Weißstörche selbst ist es daher wichtig, potentiell auf andere Vogelarten, Säugetiere oder Menschen übertragbare Krankheitserreger zu identifizieren. Mykoplasmen wurden bislang vereinzelt bei geschwächt aufgefundenen Weißstörchen isoliert, wobei deren Bedeutung nicht weiter evaluiert wurde (SUÁREZ-PÉREZ 2011). Im Rahmen einer Untersuchung an gesunden Weißstorchnestlingen in Deutschland wurden bei 107/108 (99,1%) der Trachealtupferproben DNA aviärer Mykoplasmen nachgewiesen, wobei die geflügelpathogenen Mykoplasmen MG, MS, MM und MI mittels speziesspezifischer PCR ausgeschlossen wurden.

Aus 83 Proben waren Mykoplasmen kultivierbar (HAGEN et al. 2004), die von den Autoren nicht weiter bestimmt wurden. Diese Kulturen und eine zusätzliche DNA-Probe stehen für die vorliegende Arbeit zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit sollen das Vorkommen und die Bedeutung von Mykoplasmen bei Weißstörchen evaluiert werden. Zwei in Vorarbeiten als mögliche neue Spezies identifizierte Isolate werden anhand phänotypischer Eigenschaften, darunter Zell- und Koloniemorphologie, Biochemie, Cholesterin-Abhängigkeit und optimaler Wachstumstemperatur charakterisiert (BROWN et al. 2007). Die genetische Untersuchung eines Teils der Isolate erfolgt zunächst auf Basis des 16S-rRNA-Gens, welches die Grundlage

## **EINLEITUNG**

---

mikrobieller Systematik bildet (STACKEBRANDT 2002). Die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) wird als zweite Gensequenz herangezogen, da diese bessere Unterscheidungsmöglichkeiten bei nah verwandten Spezies bietet (RAMÍREZ et al. 2008). Zusätzlich werden die antigenetischen Eigenschaften des Isolates ST57 als Vertreter einer möglichen neuen Spezies mittels Immunobinding Assay serologisch untersucht (KOTANI et al. 1985). Um die Bedeutung dieser möglichen Spezies in der Wildpopulation einschätzen zu können, wird eine speziesspezifische PCR etabliert und eine Prävalenzstudie anhand der vorliegenden Proben durchgeführt.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Mollicutes (Mykoplasmen)

#### 2.1.1 Phylogenese und Taxonomie

Der Trivialbegriff „Mykoplasmen“ findet Verwendung für Prokaryonten der Klasse Mollicutes („Weichhäuter“, lat.: mollis: weich, cutis: Haut) (EDWARD und FREUNDT 1967). Die Mollicutes sind die einzige Klasse des Phylum Tenericutes (BROWN et al. 2011). Durch eine Reduktion des Genoms spalteten sich Mykoplasmen vor etwa 600 Millionen Jahren wahrscheinlich von der *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Gruppe des Phylums Firmicutes ab (RAZIN et al. 1998). Durch die Genomreduktion gingen einige essentielle Gene verloren. Diese waren z.B. an der Zellwandsynthese oder an einigen Stoffwechselschritten beteiligt. Die heutige Gruppe der Mykoplasmen entwickelte sich wahrscheinlich vor etwa 500 Millionen Jahren. In dem Zuge entstand vermutlich auch die Eigenschaft des sterolabhängigen Wachstums (MANILOFF 2002; BRADBURY 2005). Das UGA-Codon, welches bei anderen Prokaryonten als Stopp-Codon dient, wurde zum Tryptophan-Codon umfunktioniert (BROWN et al. 2011). Der geringe Anteil der Basen Guanidin und Cytosin (G+C-Gehalt) von ca. 23 bis 40 Mol-% (BROWN et al. 2011) in der genomischen DNA der Mykoplasmen weist zudem auf eine Verwandtschaft zu den grampositiven Clostridien hin (WEISBURG et al. 1989; TRACHTENBERG 1998). Die nächsten rezenten Verwandten sind *Clostridium innocuum* und *Clostridium ramosum* (RAZIN et al. 1998). Die Mollicutes unterscheiden sich von anderen Prokaryonten durch ihre charakteristische Zellmorphologie, Koloniemorphologie, Größe und osmotische Labilität. Die Taxonomie der Mollicutes beruht auf vergleichenden Nukleotidsequenzanalysen der 16S-rRNA-Gene (WOESE et al. 1980) sowie serologischen und biochemischen Untersuchungen (BROWN et al. 2007). Anhand phänotypischer Eigenschaften sowie phylogenetischer Verwandtschaften werden die Mollicutes in vier Ordnungen unterteilt: Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Achole- und Anaeroplasmatales (TULLY et al. 1993). Die Taxonomie der Mollicutes mit den taxonomisch wichtigsten phänotypischen Eigenschaften wird in Tabelle 1 dargestellt.

## LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 1: Taxonomie der Klasse Mollicutes<sup>a</sup> mit Unterteilung in Ordnungen, Familien und Gattungen, modifiziert nach HAGEN (2007)

Taxonomie	Sterol-abhängigkeit	Wichtige phänotypische Eigenschaften	Habitat
<b>Ordnung I Mycoplasmatales</b>			
<b>Familie I Mycoplasmataceae</b>		Optimales Wachstum bei 37°C	
Gattung I <i>Mycoplasma</i> <sup>b</sup>	Ja		Menschen, Tiere
Gattung II <i>Ureaplasma</i>	Ja	Hydrolysiert Urea	Menschen, Tiere
<b>Ordnung II Entomoplasmatales</b>			
<b>Familie I Entomoplasmataceae</b>		Optimales Wachstum bei 30°C	
Gattung I <i>Entomoplasma</i>	Ja		Insekten, Pflanzen
Gattung II <i>Mesoplasma</i>	Nein	Benötigen 0,04% Tween 80	Insekten, Pflanzen
<b>Familie II Spiroplasmataceae</b>		Optimales Wachstum bei 30-37°C	
Gattung I <i>Spiroplasma</i>	Ja	Helikale Morphologie	Insekten, Pflanzen
<b>Ordnung III Acholeplasmatales<sup>d</sup></b>			
<b>Familie I Acholeplasmataceae</b>		Optimales Wachstum bei 30-37°C	
Gattung I <i>Acholeplasma</i>	Nein		Tiere, Pflanzen (Oberflächen)
<b>Ordnung IV Anaeroplasmatales</b>			
<b>Familie I Anaeroplasmataceae</b>		Optimales Wachstum bei 37°C	
Gattung I <i>Anaeroplasma</i>	Ja	Strikt anaerob	Pansen von Rind und Schaf

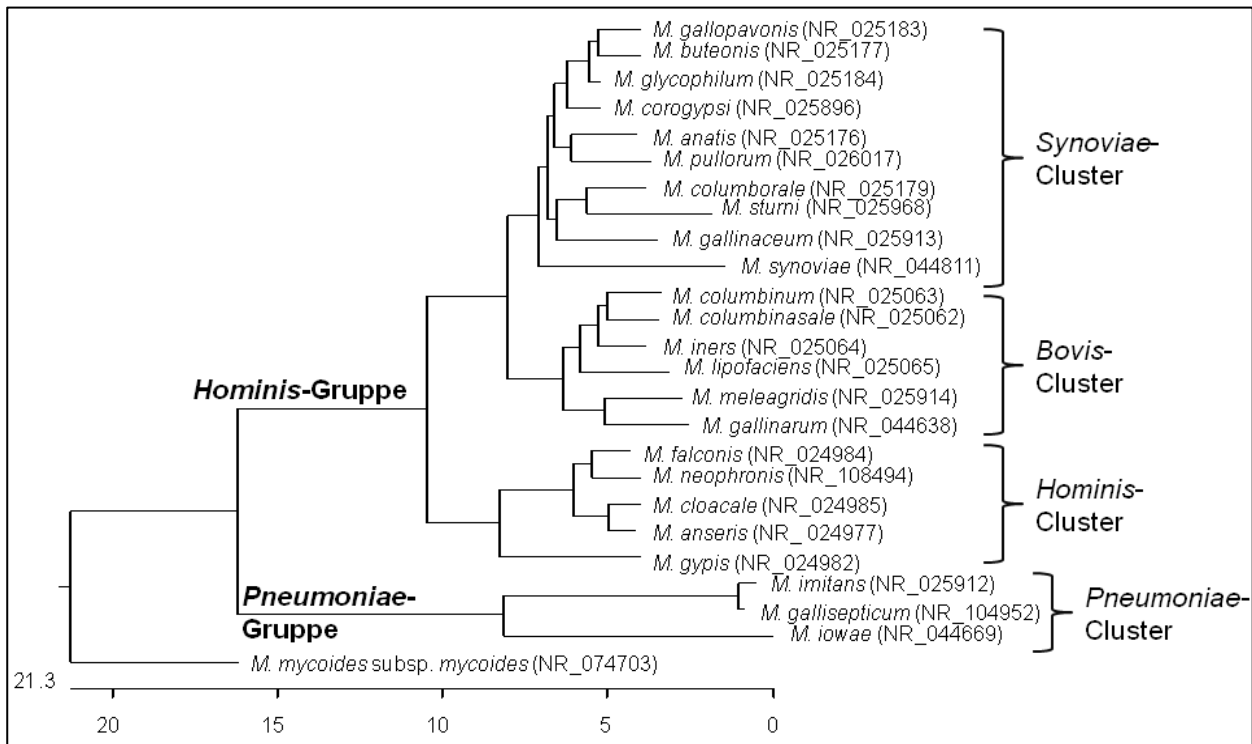
<sup>a</sup> anerkannt in den "revised minimum standards for the description of Mollicutes" BROWN et al. (2007), nach YAVARI (2010)

<sup>b</sup> Hämoplasmen wurden provisorisch der Gruppe Mykoplasmen zugeordnet; Ausnahmen sind die Spezies, die von kaltblütigen Vertebraten isoliert wurden.

<sup>d</sup> Phytoplasmen scheinen phylogenetisch mit den Acholeplasmen verwandt zu sein.

Bei Vögeln beschriebene Mollicutes stammen aus den Ordnungen Mycoplasmatales und Acholeplasmatales. Die Ordnung Mycoplasmatales besteht aus der Familie Mycoplasmataceae. In dieser Familie sind die zwei Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma* vertreten. Die sterolabhängigen Mycoplasmatales kommen bei Vertebraten vor. Aviäre Mykoplasmen der Gattung *Mycoplasma* können weiter in die *Hominis*- und *Pneumoniae*-Gruppe unterteilt werden. Innerhalb dieser Gruppen finden sich wiederum verschiedene Cluster (siehe Abbildung 1). *Ureaplasma* spp. können im Gegensatz zu

*Mycoplasma* spp. Harnstoff spalten, welches das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen diesen beiden Gattungen darstellt (RAZIN et al. 1984).



**Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum aller aviären Mykoplasmen des Genus *Mycoplasma* auf Basis der 16S-rRNA-Gensequenz. Als Außengruppe diente die Sequenz von *M. mycoides* subsp. *mycoides*. Methode: Clustal W-Algorithmus**

Die Zahlenleiste stellt Nukleotid-Substitutionen pro 100 Residuen dar. Die Bezeichnungen (NR) sind die Zugangsnummern, unter denen die Sequenzen in der Datenbank GenBank öffentlich zugänglich sind.

Die Ordnung Acholeplasmatales mit der einzigen Familie Acholeplasmataceae und der Gattung *Acholeplasma* zeichnet sich insbesondere durch die Eigenschaft des sterolunabhängigen Wachstums aus. Sie kommen sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen vor (BROWN et al. 2011).

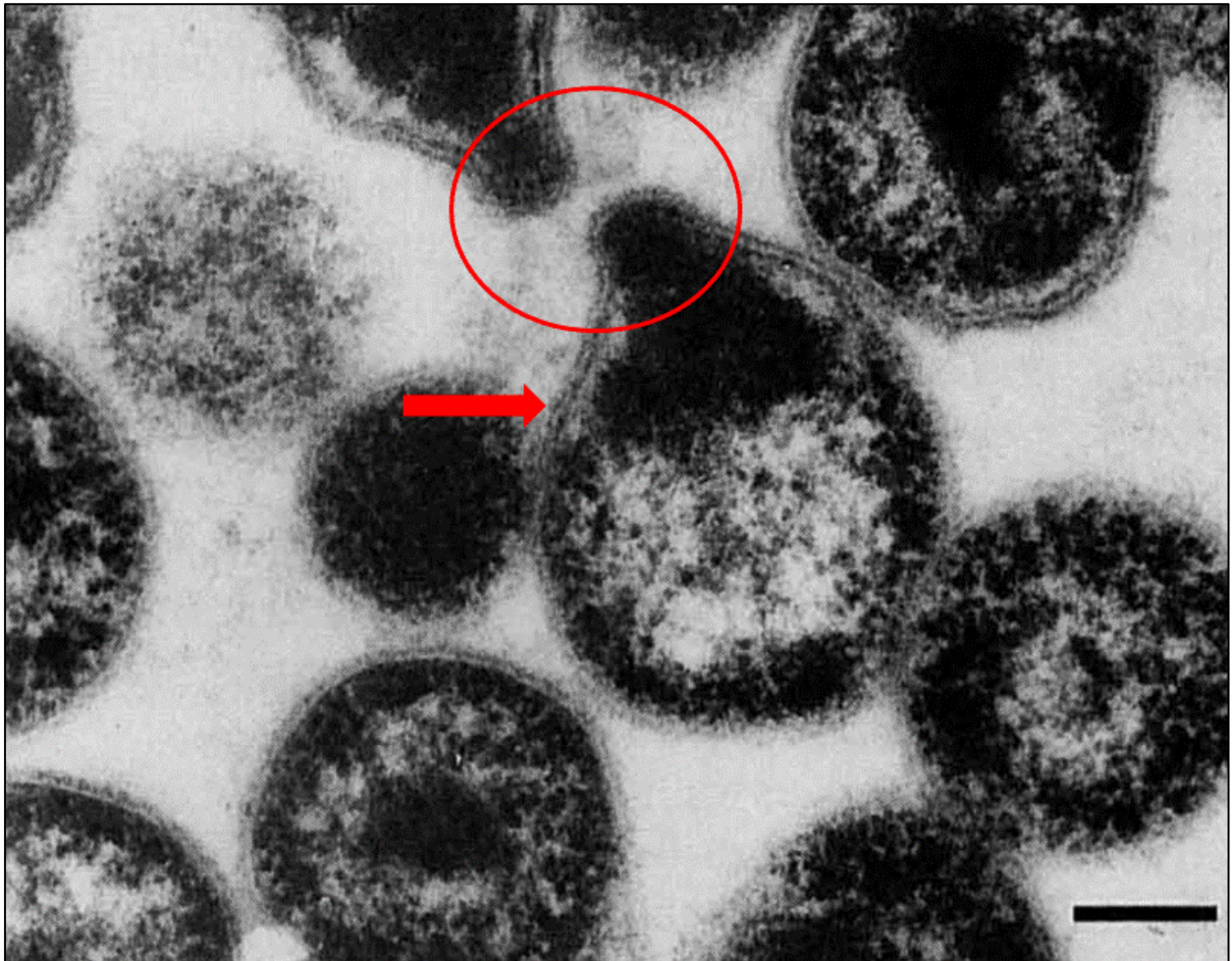
## 2.1.2 Biologie

Mykoplasmen gelten als die kleinsten freilebenden, selbst replizierenden Mikroorganismen (PIRIE 1973) und bestehen im wesentlichen aus drei Bestandteilen: Der Plasmamembran, Ribosomen und einem zirkulären, doppelsträngigen DNA-Molekül (BRADBURY 2005). Aufgrund der fehlenden Zellwand können Mykoplasmen Membranfilter einer Porengröße von 450 nm, seltener 220 nm oder 100 nm, passieren (BROWN et al. 2007; BROWN et al. 2011) und färben sich gramnegativ an (GYLSTORFF et al. 1985).

## LITERATURÜBERSICHT

---

Mykoplasmen haben eine geringe Größe und sind durch die fehlende Zellwand osmotisch fragil und pleomorph (MILES et al. 1998). Licht- und elektronenmikroskopisch betrachtet variiert ihre Form von sphärisch, ovoid, flaschenförmig und helikal bis filamentös mit einer Länge von 50 bis 500 nm. Einige haben eine spezifische Spitzenstruktur, die die Adhäsion an Wirtszellen und andere Strukturen ermöglicht (BROWN et al. 2011).



**Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Ultradünnschnitt) von *M. imitans*, modifiziert nach BRADBURY et al (1993)**

Erkennbar sind die flaschenförmigen Mykoplasmen mit terminaler „tip structure“ (Kreis) und der trilaminaren Zellmembran (roter Pfeil). Balken = 200 nm.

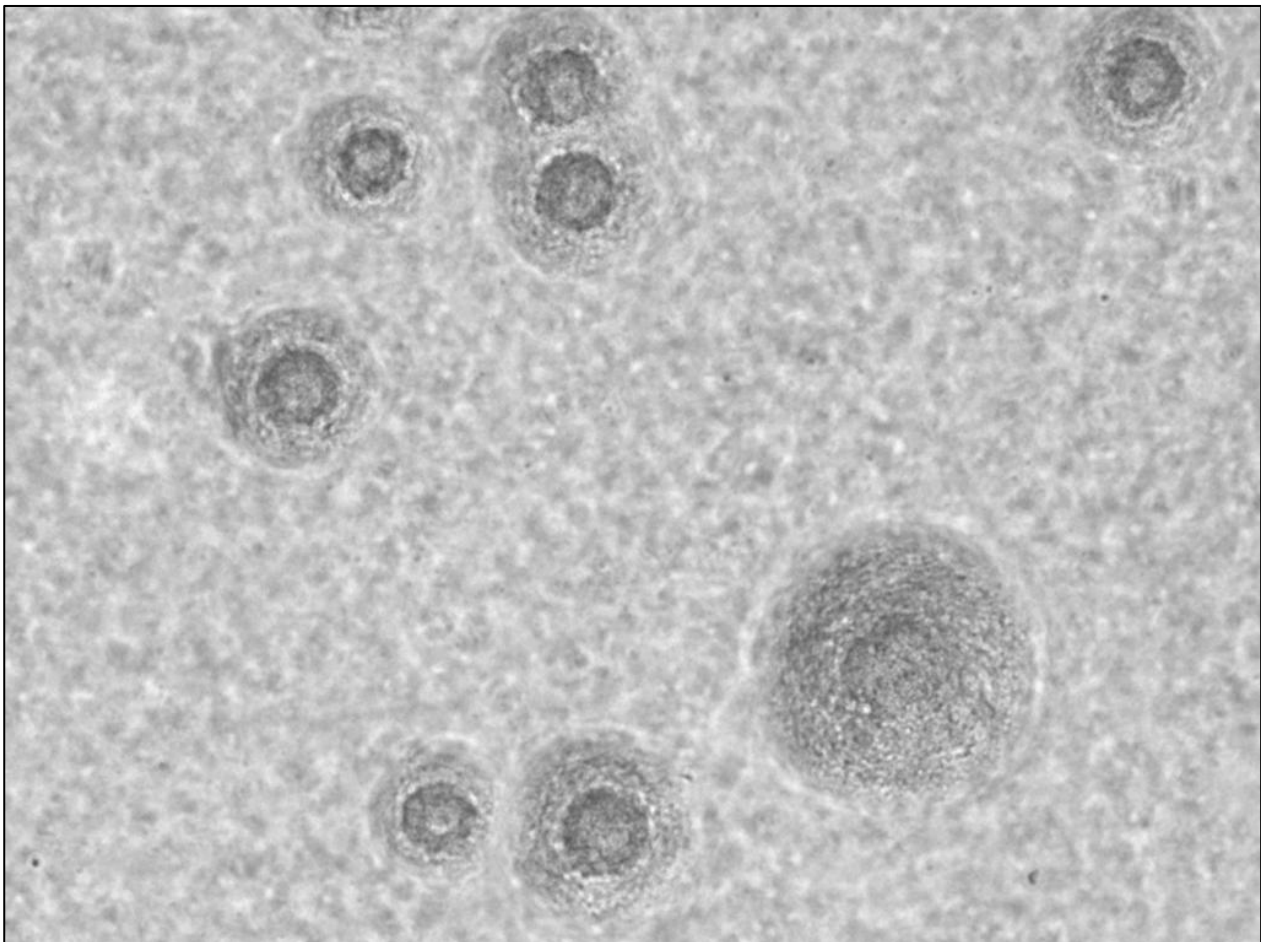
Die charakteristischen spiegeleiförmigen Kolonien auf Agarplatten (siehe Abbildung 3) haben in der Regel einen Durchmesser unter einem Millimeter und entstehen durch die Replikation der Mykoplasmen in den Interstitien der Agarfibrillen (MASOVER et al. 1985).

Bei einigen Mykoplasmenspezies wurde eine gleitende Motilität nachgewiesen, die meisten Spezies sind jedoch unbeweglich. Das Wachstum erfolgt unter aeroben, mikroaerophilen, zum Teil auch anaeroben Bedingungen. Die optimale Wachstums-

## LITERATURÜBERSICHT

---

temperatur liegt in der Regel bei 37°C. Bakteriellles Wachstum ist in der Regel bei Temperaturen von 20 bis 45°C möglich (BROWN et al. 2011). Mykoplasmen fehlen wichtige energieliefernde Systeme wie der Tricarbonsäurezyklus (MILES 1992), weshalb die meisten Mykoplasmen spezialisiert Cholesterin und Fettsäuren für ihr Wachstum benötigen. Diese Substanzen können sie nicht selbst synthetisieren, sondern beziehen sie aus ihrer Umgebung (RAZIN et al. 1998) und bauen sie direkt in ihre trilaminare Zellmembran ein, welche überwiegend aus Lipiden und Proteinen besteht (MASOVER und HAYFLICK 1985). Die Energiegewinnung erfolgt bei einem Teil der Mykoplasmen über den Abbau von Glucose oder anderer Kohlenhydrate durch Glycolyse. Andere Spezies gewinnen ihre Energie durch die Hydrolyse von Arginin oder Harnstoff, oder oxidieren organische Säuren wie Pyruvat oder Laktat (MILES 1992). Das begrenzte Repertoire an metabolischen Stoffwechselleistungen ist durch die geringe Größe ihres Genoms von 580 bis 1.350 kbp bedingt (BROWN et al. 2011).



**Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahme spiegeleiförmiger Mykoplasmen-Kolonien des Isolates ST101 auf SP4-Agarmedium, 100x**



### 2.1.3 Veterinärmedizinische Bedeutung

Mykoplasmen besiedeln bzw. infizieren Säugetiere, Menschen, Vögel, Reptilien und Fische, aber auch Insekten und Pflanzen. Während einige Mykoplasmenarten als obligat pathogen, also primäre Krankheitserreger, eingestuft werden, gelten die meisten Spezies als fakultativ pathogen (Synonym: opportunistisch) oder kommensal (BROWN et al. 2011). In der Literatur werden die Begriffe apathogen und kommensal in der Regel synonym verwendet. Definitionsgemäß ist nicht kommensal sondern apathogen (nicht krankmachend) das Gegenteil von pathogen (potentiell krankmachend). Kommensalismus ist hingegen ein Begriff aus der Ökologie, der eine Interaktion zwischen Individuen verschiedener Spezies beschreibt. Diese Form der Interaktion ist für eine Spezies positiv und für die andere neutral, weshalb sie allgemein zu den Probiosen zählt. Nutzt eine Interaktion beiden Spezies wird sie als Symbiose bezeichnet. Schadet eine Interaktion wiederum einer der Spezies, wie beispielsweise beim Parasitismus, handelt es sich um eine Antibiose (WIESNER et al. 2000).

Mykoplasmen sind insbesondere bei landwirtschaftlichen Nutztieren von großer Bedeutung. Einige primär pathogene Spezies führen insbesondere bei Wiederkäuern und Schweinen (*Sus scrofa domestica*) zu hohen wirtschaftlichen Schäden. Dazu gehören insbesondere verschiedene Subspezies von *Mycoplasma mycoides* sowie *Mycoplasma agalactiae*. *M. mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony Type wurde als erste veterinärmedizinisch bedeutende Mykoplasmenart im Jahre 1896 beim Rind (*Bos primigenius taurus*) entdeckt und führt zur verlustreichen kontagiösen Pleuropneumonie der Rinder (englisch: Contagious Bovine Pleuropneumonia, CBPP) (NOCARD et al. 1896). Als bedeutende Tierseuche wird die CBPP in der „List of notifiable diseases“ der Internationalen Organisation für Tiergesundheit (OIE) geführt und ist in Deutschland anzeigepflichtig. Ebenfalls verlustreich und OIE gelistet ist die kontagiöse Pleuropneumonie der Ziegen (*Capra aegagrus hircus*) (englisch: Contagious Caprine Pleuropneumonia, CCPP), hervorgerufen durch *M. mycoides* subsp. *capri* und *M. agalactiae* verursachen die kontagiöse Agalaktie, eine Mastitis mit deutlichem Rückgang der Milchleistung bei Schafen (*Ovis orientalis aries*) und Ziegen (BROWN et al. 2011). Bedeutend für Schweine ist vor allem *M. hyopneumoniae* als Erreger der Enzootischen Pneumonie (EP) (MARÉ et al. 1965). Von großer Bedeutung für Wirtschaftsgeflügelbestände sind die geflügelpathogenen Mykoplasmenarten *M. gallisepticum*, *M. synoviae*,

*M. meleagridis* und *M. iowae*, auf die im folgenden Abschnitt ausführlicher eingegangen wird. Neben direkten Schäden wie Produktionsausfälle, Behandlungen und Labordiagnostik verursachen Mykoplasmen in der Landwirtschaft vor allem indirekt hohe Kosten durch Prophylaxe sowie Überwachungs- und Eradikationsmaßnahmen (BRADBURY 2005; RAVIV et al. 2013). Veterinärmedizinisch bedeutende Mykoplasmenspezies treten auch bei Wildtieren auf. Infektionen mit *M. agassizii* führen zu schweren Erkrankungen des oberen Respirationstraktes bei der kalifornischen Gopherschildkröte (*Gopherus agassizii*) und der Georgia-Gopherschildkröte (*Gopherus polyphemus*) (BROWN et al. 2001b). *M. alligatoris* führt zu hohen Mortalitätsraten bei infizierten Mississippi-Alligatoren (*Alligator mississippiensis*) (BROWN et al. 2001a). Bei Krokodilen löst *M. crocodyli* Polyarthritiden, selten auch Pneumonien, aus (KIRCHOFF et al. 1997). Zu Pneumonien bei verschiedenen Robbenspezies führt *M. phocicerebrale*, dessen zoonotisches Potential sich in schwerwiegenden Wundinfektionen (seal finger) nach Bissverletzungen oder Kontakt mit infizierten, erkrankten oder verstorbenen Robben zeigt (BAKER et al. 1998; JANSEN et al. 2012). Die Wirtsspezifität ist dabei abhängig von der Mykoplasmenspezies. Während einige Mykoplasmen nur auf eine Wirtsspezies beschränkt sind, können andere eine Reihe verschiedener Wirtsspezies infizieren (PITCHER et al. 2005; DHONDT et al. 2014).

Neben obligat pathogenen Mykoplasmenspezies gibt es zahlreiche fakultativ pathogene Spezies, bei denen nach Infektion erst in Folge einer Immunsuppression des Wirtes klinisch manifeste Erkrankungen auftreten. Prädisponierend ist Stress, der durch vorausgegangene Infektionen, aber auch ernährungs- und haltungsbedingte Mangelsituationen, entstehen kann (HINZ et al. 2012). Bei klinisch manifesten Erkrankungen handelt es sich zudem häufig um multifaktorielle Geschehen, bei dem neben Mykoplasmen auch andere Erreger beteiligt sind (KLEVEN 1998; SELBITZ 2015). Mykoplasmen gelten zudem als Wegbereiter für andere Infektionserreger (LIERZ 2009). Insgesamt wurden bei verschiedenen Vogelspezies bislang 24 aviäre *Mycoplasma*-Spezies sowie *Ureaplasma gallorale* beschrieben (BROWN et al. 2011; SUÁREZ-PÉREZ et al. 2012). In Tabelle 2 werden die bislang beschriebenen aviären *Mycoplasma*- und *Ureaplasma*-Spezies mit repräsentativen Wirten und Pathogenität aufgeführt (BROWN et al. 2011). Die Pathogenität der in Tabelle 2 als „pathogen“ aufgeführten Spezies, außer *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* und *M. iowae*, ist umstritten (siehe Abschnitt 2.1.5). Neben diesen definierten und anerkannten Spezies gibt es insbesondere

## LITERATURÜBERSICHT

bei Wildvögeln zahlreiche Isolate, die bisher nicht charakterisiert sind (HINZ et al. 1994; KLEVEN 2003; FRASCA et al. 2005; LIERZ et al. 2008a; YAVARI 2010; SUÁREZ-PÉREZ 2011). *Acholeplasma laidlawii* und einige unbekannte *Acholeplasma*-Spezies werden regelmäßig bei verschiedenen Vogelarten isoliert. Ihnen wird bislang keine klinische Bedeutung zugemessen (JORDAN et al. 1980; BUNTZ et al. 1986; BENČINA et al. 1987a; TIONG 1990), sodass auf diese nicht weiter eingegangen wird. Im folgenden Abschnitt werden die bislang beschriebenen aviären Mykoplasmen in alphabetischer Reihenfolge vorgestellt.

**Tabelle 2: Aviäre *Mycoplasma*- und *Ureaplasma*-Spezies, deren repräsentative Wirte sowie Pathogenitätseigenschaften, nach BROWN et al. (2011)**

Spezies	repräsentative Wirte	Pathogenität	Erstbeschreibung
<i>M. anatis</i>	Enten	opportunistisch	ROBERTS (1964)
<i>M. anseris</i>	Gänse	opportunistisch	BRADBURY et al. (1988)
<i>M. buteonis</i>	Greifvögel	kommensal	POVEDA et al. (1994)
<i>M. cloacale</i>	Hühnervögel	kommensal	BRADBURY et al. (1984)
<i>M. columbinasale</i>	Tauben	kommensal	JORDAN et al. (1982)
<i>M. columbinum</i>	Tauben	kommensal	SHIMIZU et al. (1978)
<i>M. columborale</i>	Tauben	kommensal	SHIMIZU et al. (1978)
<i>M. corogypsi</i>	Geier	pathogen	PANANGALA et al. (1993)
<i>M. falconis</i>	Falken	opportunistisch	POVEDA et al. (1994)
<i>M. gallinaceum</i>	Hühnervögel	pathogen	JORDAN et al. (1982)
<i>M. gallinarum</i>	Hühnervögel	kommensal	FREUNDT (1955)
<i>M. gallisepticum</i>	Hühnervögel	pathogen	EDWARD (1960)
<i>M. gallopavonis</i>	Puten	opportunistisch	JORDAN et al. (1982)
<i>M. glycyphilum</i>	Hühnervögel	kommensal	FORREST et al. (1984)
<i>M. gypis</i>	Geier	opportunistisch	POVEDA et al. (1994)
<i>M. imitans</i>	Enten, Gänse	pathogen	BRADBURY et al. (1993)
<i>M. iners</i>	Hühnervögel	kommensal	EDWARD und KANAREK (1960)
<i>M. iowae</i>	Puten	pathogen	JORDAN et al. (1982)
<i>M. lipofaciens</i>	Hühnervögel	kommensal	BRADBURY et al. (1983)
<i>M. meleagridis</i>	Puten	pathogen	YAMAMOTO et al. (1965)
<i>M. neophronis</i>	Geier	unklar	SUÁREZ-PÉREZ et al. (2012)
<i>M. pullorum</i>	Hühnervögel	pathogen	JORDAN et al. (1982)
<i>M. sturni</i>	Singvögel	pathogen	FORSYTH et al. (1996)
<i>M. synoviae</i>	Hühnervögel	pathogen	OLSON et al. (1964)
<i>U. gallorale</i>	Hühnervögel	kommensal	KOSHIMIZU et al. (1987)

*M.* = *Mycoplasma*, *U.* = *Ureaplasma*

### 2.1.4 Geflügelpathogene Mykoplasmen

Von großer veterinärmedizinischer Bedeutung für Vögel sind die vier geflügelpathogenen Mykoplasmenspezies *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* und *M. iowae*, die daher im folgenden Abschnitt ausführlicher betrachtet werden. Die Pathogenität der weiteren in Tabelle 2 als „pathogen“ aufgeführten Spezies ist umstritten, daher werden diese Spezies in Abschnitt 2.1.5, „weitere aviäre Mykoplasmen“, aufgeführt.

#### 2.1.4.1 *Mycoplasma gallisepticum* (MG)

MG ist klinisch und wirtschaftlich einer der weltweit bedeutendsten Erreger von Atemwegsinfektionen des Wirtschaftsgeflügels, insbesondere Hühnern und Puten (*Meleagris gallopavo* forma *domestica*) (RAVIV und LEY 2013). Infektionen mit MG sind allgemein als chronische Atemwegserkrankung bei Hühnern (Chronic respiratory disease of chickens, CRD), und infektiöse Sinusitis bei Puten (infectious sinusitis of turkeys) bekannt (RAVIV und LEY 2013). Eine Infektion mit MG führt vornehmlich zu respiratorischen Erkrankungen mit Pneumonie, Tracheitis, Konjunktivitis und Aerosacculitis (NUNOYA et al. 1995). In seltenen Fällen treten bei Puten zudem Encephalitis, Meningitis, Torticollis und Ataxie auf (WYRZYKOWSKI et al. 2013). Zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen kommt es durch Immunsuppression des Wirtes (NUNOYA et al. 1995) oder zusätzlicher Infektionen mit beispielsweise dem Virus der infektiösen Bronchitis (IBV), dem Virus der Rhinotracheitis der Pute (TRTV) oder mit *E. coli* (RANCK et al. 1970; MURAKAMI et al. 2002; BRADBURY 2005; RAVIV und LEY 2013). Auch der Einsatz einiger Lebendimpfstoffe kann bei MG-infizierten Tieren zu schwereren Krankheitsverläufen führen (RAVIV und LEY 2013). Bei Legehennen und Elterntieren führen Salpingitis, Atrophie der Ovarien oder des Isthmus zu reduzierter Legeleistung. Eine Infektion der Embryonen durch vertikale Übertragung führt zu reduzierten Schlupfraten (NUNOYA et al. 1997). Arthritis oder Synovitis können ebenfalls durch Infektionen mit MG ausgelöst werden (RAVIV und LEY 2013). Die Übertragung von MG erfolgt horizontal durch direkten Kontakt oder belebte und unbelebte Vektoren (CHRISTENSEN et al. 1994; DHONDT et al. 2007; GHARAIBEH et al. 2011). Bei Hühnern und Puten wurde zusätzlich eine vertikale Übertragung experimentell nachgewiesen (JERSTAD et al. 1959; REIS et al. 1971). Einige Länder der EU und die USA haben aufgrund der hohen wirtschaftlichen Verluste in den letzten Jahrzehnten Kontroll- und Eradikationsprogramme (EU 2009; USDA 2011) implementiert, die vor allem auf der Ebene Reinzucht-, Großeltern- und

Elterntiere zum Tragen kommen. Diese Programme haben zu einer deutlichen Senkung der Inzidenz geführt (KÖHN et al. 2009; LANDMAN 2014). Ein Reservoir für MG stellen wahrscheinlich Hobby- bzw. Rassegeflügelbestände dar (DHONDT et al. 2014; HAESSENDONCK et al. 2014).

MG hat ein breites Wirtsspektrum, welches neben Hühnervögeln (Galliformes) Vogelspezies aus einer Reihe verschiedener Ordnungen, darunter Anseriformes (Gänsevögel), Columbiformes (Taubenvögel), Falconiformes (Falkenartige), Passeriformes (Sperlingsvögel), Piciformes (Spechtvögel), Ciconiiformes (Schreitvögel) und Psittaciformes (Papageien) umfasst. Bei einigen Vogelspezies war MG in Verbindung mit respiratorischen Symptomen nachweisbar, während MG bei anderen Spezies auch ohne klinische Symptomatik gefunden wurde (BRADBURY et al. 2001b; DHONDT et al. 2014). Eine Übersicht der Vogelspezies, bei denen MG nachgewiesen wurde, sowie eine kurze Beschreibung der Symptomatik, findet sich in Tabelle 3. Nicht in dieser Tabelle aufgeführt sind die Nachweise aus verschiedenen Spezies der Familie der Finkenvögel (Fringillidae) aus Nordamerika, die in Zusammenhang mit einer Epidemie durch finkenpathogene MG-Stämme stehen. Auf die besondere Bedeutung von MG bei Finkenvögeln wird im folgenden Abschnitt (2.1.4.2) ausführlicher eingegangen.

## LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 3: Übersicht molekularbiologischer und kultureller *Mycoplasma gallisepticum* (MG)-Nachweise bei verschiedenen Vogelspezies in Abhängigkeit von der Beobachtung klinischer Symptome

Vogel- spezies	Positive Proben (Gesamt)	Symptome		Methodik, Beschreibung Symp- tome, Kommentare	Quelle
		Ja	Nein		
Gans	4 (204)		X	Kultur; Nutzgeflügel, Spezies nicht eindeutig, Überwucherung durch kommensale Myko- plasmen	BUNTZ et al. (1986)
Gans	10 (12)		X	Kultur; Isolate auch aus Embryonen; Nähe zu MG-infizierten Hühnern	BENČINA et al. (1988a)
Ente	k. A.		X	Kultur; Spezies nicht eindeutig	STIPKOVITS et al. (1992)
Ente	9 (16)		X	Kultur; Isolate auch aus unbe- fruchteten Eiern und abgestorbenen Emb- ryonen, aus Nähe MG- infizierter Hühner	BENČINA et al. (1988b)
Stockente ( <i>Anas platy- rhynchos</i> )	1 (57)		X	PCR	MICHIELS et al. (2016)
Trottellumme ( <i>Uria aalge</i> )	2 (50)		X	Kultur; Totfunde, Todes- ursache: Verölung	PETERMANN et al. (1989)
Graureiher ( <i>Ardea cinerea</i> )	2 (4)		X	PCR	MICHIELS et al.(2016)
Indianermei- se ( <i>Baeolo- phus bicolor</i> )	12 (28)		X	Kultur; aus Umgebung von Geflügelfarmen	LUTTRELL et al. (2001)
Feldsperling ( <i>Passer montanus</i> )	2 (47)		(X)	Kultur; 22 aus Geflü- gelstall, 25 Totfunde oder Wildfänge, keine Symptome beschrieben	SHIMIZU et al. (1979)
Haussperling ( <i>Passer domesticus</i> )	2 (63)		X	Kultur	JAIN et al. (1971)
Turteltaube ( <i>Streptopelia turtur</i> )	2 (14)		X	Kultur	JAIN et al. (1971)
Ringeltaube ( <i>Columba palumbus</i> )	1 (80)		X	PCR	MICHIELS et al. (2016)
Brieftaube	6 (22)		X	Kultur; Rassegeflügel; auch MS-Nachweis; Nähe zu MG-infizierten Hühnern	BENČINA et al. (1987a)
Glanzkrähe ( <i>Corvus splendens</i> )	4 (24)		X	Kultur	GANAPATHY et al. (2007)

## LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 3: Fortsetzung

Vogel- spezies	Positive Proben (Gesamt)	Symptome		Methodik, Beschreibung Symp- tome, Kommentare	Quelle
		Ja	Nein		
Saatkrähe ( <i>Corvus frugilegus</i> )	4 (4)	X		Kultur; Perikarditis, Pneumonie	PENNYCOTT et al. (2005)
Elster ( <i>Pica pica</i> )	1 (10)		X	PCR	MICHIELS et al. (2016)
Japanische Wachtel ( <i>Coturnix japonica</i> )	12 (18) Embryo- nen: 5 (24)	X		Kultur; Nutzgeflügel; Respiratorische Symp- tome, Synovitis; auch MS-Nachweis	BENČINA et al. (1987a)
Japanische Wachtel Steinhuhn ( <i>Alectoris graeca</i> )	k. A.	X		Kultur; Konjunktivitis; Sinusitis; schlechte Legeleistung	REECE et al. (1986a)
Virginia- wachtel ( <i>Colinus virginianum</i> )		X		Kultur; Chronische Atemwegs- erkrankung, ca. 1.200/ 9.000 Tieren betroffen; Puten mit Isolat infizierbar	MADDEN et al. (1967)
Fasan ( <i>Phasianus colchicus</i> )	4 (5)	X		Kultur; Nutzgeflügel; hochgradig respiratori- sche Symptome, Mor- talität knapp 20%, Tra- cheitis, Aerosacculitis	BENČINA et al. (2003)
Pfau ( <i>Pavo cristatus</i> )	5 (5)	X		Kultur; Nutzgeflügel; Rhinitis, Konjunktivitis, Sinusitis, Atemgeräu- sche	BENČINA et al. (2003)
Steinhuhn Pfau	k. A.	X		Nutzgeflügel Sinusitis, Konjunktivitis, Atemnot, Todesfälle, Einbruch Legeleistung	COOKSON et al. (1994)
Gelbscheitel- amazone ( <i>Amazona ochrocephala auropalliata</i> )	1 (5)	X		Kultur; Respiratorische Symp- tome, Aerosacculitis, granulomatöse Pneu- monie, 20% Mortalität / + <i>Proteus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Acine- tobacter</i> spp.	BOZEMAN et al. (1984)
Wanderfalke ( <i>Falco peregrinus</i> )	2 (2)	X		Kultur; Sinusitis, respiratori- sche Symptome	POVEDA et al. (1990a)
Präriefalke ( <i>Falco mexicanus</i> )	1 (34)		X	Nestling; Nur Antikörpernachweis, HI-Titer 1:20	MORISHITA et al. (1998)

HI-Titer = Titer im Hämagglutinations-Hemmungstest (engl. hemagglutination inhibition titer), MG = *Mycoplasma gallisepticum*, MS = *Mycoplasma synoviae*, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Die Folgen einer Infektion mit MG hängen neben der Virulenz des Erregers, Immunstatus des Wirtes und Sekundärinfektionen auch von der infizierten Vogelart ab. Nach experimenteller Infektion zeigten Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*) (BOZEMAN et al. 1984) und Kanarienvögel (*Serinus canaria* forma *domestica*) (HAWLEY et al. 2011) respiratorische Symptome und pathologische Veränderungen. Mit MG experimentell infizierte Haussperlinge (*Passer domesticus*) (KLEVEN und FLETCHER 1983), Haustauben (*Columba livia* f. *domestica*) (GHARAIBEH und HAILAT 2011) und Pekingenten (*Anas platyrhynchos* forma *domestica* Syn. *Anas peking*) (YAMADA et al. 1983b) blieben hingegen über den gesamten Untersuchungszeitraum klinisch unauffällig. Haussperlinge scheinen nur temporäre Infektionen ohne klinische Symptomatik zu durchlaufen, können in diesem Zeitraum jedoch Hühner infizieren (KLEVEN und FLETCHER 1983).

### **2.1.4.2 *Mycoplasma gallisepticum* bei Finkenvögeln**

Im Winter 1993/1994 wurde ein vermehrtes Auftreten von Konjunktivitiden bei Hausgimpeln (*Haemorrhous mexicanus*, früher: *Carpodacus mexicanus*) an der Ostküste der USA beobachtet und der Erreger als MG identifiziert (FISCHER et al. 1997; DHONDT et al. 1998). Die MG-Konjunktivitis der Hausgimpel entwickelte sich rasch zu einer großflächigen Epidemie (DUCKWORTH et al. 2003; LEY et al. 2006) und ist bis heute in weiten Bereichen der nordamerikanischen Verbreitungsgebiete der Hausgimpel endemisch (DHONDT et al. 2014). Schätzungen zufolge verstarben im Zeitraum von 1994 bis 1998 infolge dieser Epidemie einige Millionen Hausgimpel. Etwa zwei Jahre nach Infektion der ersten Hausgimpel, Ende 1995, wurde die MG-Konjunktivitis bei einer weiteren Finkenspezies, dem Goldzeisig (*Carduelis tristis*), nachgewiesen (FISCHER et al. 1997). Auch ein Blauhäher (*Cyanocitta cristata*) wurde nach indirektem Kontakt mit Hausgimpeln infiziert (LEY et al. 1997). Neben der großflächigen Epidemie bei Hausgimpeln und vereinzelt Nachweisen bei anderen Singvogelarten gab es im Winter 1998/1999 zusätzlich eine lokal begrenzte MG-Epidemie bei Hakengimpeln (*Pinicola enucleator*) und Abendkernbeißern (*Coccothraustes vespertinus*) in Quebec (Kanada) (MIKAELIAN et al. 2001). Klinisch erkrankte Vögel fielen durch allgemeine Schwäche, verkrustete Augenlider, geschwollene Infraorbitalsinus und ein gestörtes Sehvermögen auf (FISCHER et al. 1997). Pathologisch zeigte sich bei betroffenen Vögeln ein schlechter Ernährungszustand, unilaterale oder bilaterale katarrhalische und lymphoplasmatische Konjunktivitis und Rhinitis sowie eine mucopurulente Entzündung des *Sinus infraorbitalis* (MIKAELIAN et al. 2001). Die hohen Verluste in der Vogelpopulation waren nicht nur auf



die Infektion mit MG selbst zurückzuführen. Insbesondere durch die beeinträchtigte Sicht infolge der Konjunktivitis verhungerten und verunfallten die Vögel vermehrt und wurden häufiger Opfer von Beutegreifern (NOLAN et al. 1998). Vergleiche der MG-Isolate aus Hausgimpeln mit zirkulierenden Stämmen und Impfstämmen des Wirtschaftsgeflügels zeigten, dass es sich um ein isoliertes Geschehen in der Singvogelpopulation handelte (LEY et al. 1997). Untersuchungen mittels RAPD (Randomly amplified Polymorphic DNA) ergaben zudem, dass diese Epidemie wahrscheinlich zunächst durch einen Stamm hervorgerufen wurde. Ein Stamm unterschied sich deutlich von den anderen Stämmen, welches die Autoren mit Mutation des ursprünglichen Stammes bzw. einer zweiten Eintragsquelle in die Wildvogelpopulation erklärten (CHERRY et al. 2006). Vergleichende genetische Untersuchungen mit MG-Stämmen aus Nutzgeflügelbeständen, die aus den Jahren vor der Epidemie stammten, legen nahe, dass sich die finkenpathogenen Stämme aus diesen heraus entwickelt haben (DELANEY et al. 2012). Finkenpathogene MG-Stämme waren dabei sehr wahrscheinlich das Ergebnis eines einzigen erfolgreichen Wirtswechsels (MIKAELIAN et al. 2001; HOCHACHKA et al. 2013). Innerhalb kürzester Zeit konnte zudem eine Evolution der Stämme beobachtet werden, die experimentell in einer Virulenzsteigerung sowie erhöhter Bakterienlast, einer Voraussetzung für ein hohes Übertragungspotential, darstellbar war (HAWLEY et al. 2013). Mittels experimenteller Infektionen konnten bei vier Finkenarten, darunter Hausgimpel, Goldzeisig, Fichtenzeisig (*Spinus pinus*) und Purpurgimpel (*Haemorrhous purpureus*), sowie bei der Hälfte der infizierten Indianermeisen, eine Konjunktivitis induziert werden (FARMER et al. 2005). Schwarzkopfmeisen (*Poecile atricapillus*) konnten experimentell ebenfalls infiziert werden, die Tiere zeigten jedoch keine klinischen Symptome (DHONDT et al. 2015). Mittels epidemiologischer Studien in endemischen Gebieten konnte ein Kontakt zu MG bei zahlreichen Spezies nachgewiesen werden. Bei insgesamt 27 Vogelspezies aus 15 Familien wurde MG molekularbiologisch und/oder serologisch nachgewiesen, wobei Konjunktivitis bei nicht-Fringillidae sehr selten war (HARTRUP et al. 2000; LUTTRELL et al. 2001; FARMER et al. 2005; DHONDT et al. 2014). Die deutlich höchsten Prävalenzen hatten Hausgimpel, sodass das Infektionsgeschehen wahrscheinlich hauptsächlich auf diese Spezies konzentrierte (DHONDT et al. 2014). Die Beteiligung anderer Vogelspezies, beispielsweise als Reservoir, kommt möglicherweise infrage (LUTTRELL et al. 2001).

### 2.1.4.3 *Mycoplasma synoviae* (MS)

Infektionen mit MS können bei Hühnern und Puten zu der „infektiösen Synovitis“ führen. Meist verlaufen sie jedoch als subklinische Infektion der oberen Atemwege (FERGUSON-NOEL et al. 2013). Abhängig vom Organotropismus und der Virulenz der Stämme führen die Infektionen zu sehr unterschiedlichen klinischen Symptomen: Arthropathische Stämme von MS führen vor allem bei Broilern und Mastputen zu Lahmheiten durch artikuläre Läsionen wie Tendovaginitis und exsudative Synovitis (KAWAKUBO et al. 1980). Stämme mit Tropismus zum Ovidukt führen bei Legehennen zu einer verminderten Leistung und höheren Anteilen von Brucheiern durch Poldefekte, sogenannten „eggshell apex abnormalities (EAA)“ (MOHAMMED et al. 1987; FEBERWEE et al. 2009; RANCK et al. 2010; RANCK 2011). Seltener kann MS Aerosacculitis bei Broilern hervorrufen, welche zu höheren Verwurfraten bei Schlachtkörpern führt (KLEVEN et al. 1972). MS wird bei Hühnern und Puten direkt und indirekt horizontal sowie vertikal übertragen (KLEVEN 1998). Aufgrund der vertikalen Übertragung sollten insbesondere Elterntiere, Großelterntiere und Reinzuchten engmaschig überwacht und positive Bestände gemerzt werden (HAFEZ et al. 2006).

Im Gegensatz zu der Bekämpfung von MG gibt es in der EU zur Bekämpfung von MS bislang keine gesetzlichen Regelungen. Dennoch werden in einigen Ländern Überwachungs- und Eradikationsprogramme auf freiwilliger Basis durchgeführt. Während die Prävalenz von MG deutlich abnimmt, gewinnt MS in Europa zunehmend an Bedeutung (FEBERWEE et al. 2008; MICHIELS et al. 2016). Eine Studie aus den Niederlanden zeigte bei Legehennen eine Seroprävalenz von 73%, bei Legehennen-Elterntieren von 25% (FEBERWEE et al. 2008). Niedrigere Prävalenzen zeigten sich auch in den anderen Produktionsrichtungen: In der Broilermast und bei Broiler-Elterntieraufzuchten lagen die Seroprävalenzen bei 6% bei Broiler-Elterntierbeständen in der Produktionsphase bei 35%. Auch Broiler-Großelterntiere waren mit einer Seroprävalenz von 10% nicht MS-frei (FEBERWEE et al. 2008). In Belgien wurden 26,5% der untersuchten Broiler-Bestände serologisch positiv auf MS getestet. Andere Produktionsrichtungen wurden in dieser Studie nicht auf MS untersucht (MICHIELS et al. 2016). Auch eine Studie in Deutschland zeigte, dass MS bei 75% (14/19) der untersuchten Legehennenbetriebe molekularbiologisch nachweisbar war (KÖHN et al. 2009). Neben den wirtschaftlichen Verlusten durch Behandlungskosten und Leistungseinbußen betroffener Mast- und Legeherden

entstehen durch MS, analog zu MG, Kosten durch Eradikationsprogramme (FEBERWEE et al. 2008; KÖHN et al. 2009; RANCK 2011).

Natürliche Infektionen mit MS finden sich neben Hühnern und Puten bei verschiedenen Vogelspezies mit und ohne klinische Symptomatik (Tabelle 4). Keine klinischen Symptome zeigten Brieftauben (REECE et al. 1986b; BENČINA et al. 1987a), Feldsperlinge und ein Rothuhn (*Alectoris rufa*) (POVEDA et al. 1990a). In zwei Studien wurden MG und MS zudem bei klinisch unauffälligen Enten (BENČINA et al. 1988b), Gänsen (BENČINA et al. 1988a) und unbefruchteten Eiern sowie Embryonen aus diesen Herden nachgewiesen. Das Wassergeflügel stammte aus gemischten Geflügelhaltungen, bei denen im Vorfeld bei den dort gehaltenen Hühnerherden Mykoplasmosen diagnostiziert worden waren. In anderen Studien wurde MS jedoch auch bei Enten mit respiratorischen Symptomen nachgewiesen, wobei diese Enten zusätzlich mit verschiedenen *Pasteurella spp.* infiziert waren (TIONG 1990). Auch bei Japanischen Wachteln mit respiratorischen Symptomen und Synovitis fand sich MS, hier in Verbindung mit MG (BENČINA et al. 1987a). Ein kausaler Zusammenhang zwischen MS und respiratorischer Symptomatik ist somit in beiden Fällen nicht eindeutig gegeben. MS war auch aus pathologisch veränderten Lungenproben geschlachteter Strauße (*Struthio camelus*) nachweisbar (TEBYANIAN et al. 2014). Bei Perlhühnern (*Numida meleagris*) mit Synovitis konnte MS aus den betroffenen Gelenken isoliert werden. Dieses Isolat führte bei einer experimentellen Infektion von Perlhühnern zu Synovitis und Sinusitis (PASCUCCI et al. 1976). Die Induktion klinischer Infektionen gelang mittels intravenöser Injektion bei Fasanen- und Gänseküken (SEVOIAN et al. 1958) sowie Wellensittichen (BOZEMAN et al. 1984). Experimentell gelangen zudem subklinische Infektionen bei Pekingenten (YAMADA et al. 1983a) und Hausperlingen (KLEVEN und FLETCHER 1983). Während Sperlinge geringgradige Läsionen in den Luftsäcken zeigten, waren bei Pekingenten auch Infraorbitalsinus und Luftröhre betroffen. Klinische Symptome wurden hingegen bei keiner der beiden Spezies beobachtet. Nur bei einem der zehn inokulierten Sperlinge gelang eine Reisolierung von MS, daher werden Sperlinge als weitestgehend resistent gegenüber einer Infektion mit MS angesehen (KLEVEN und FLETCHER 1983).

## LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 4: Übersicht kultureller und molekularbiologischer *Mycoplasma synoviae* (MS)-Nachweise bei verschiedenen Vogelarten in Abhängigkeit von der Beobachtung klinischer Symptome

Vogel- spezies	Positive Proben (Gesamt)	Symptome		Methode, Beschreibung Symptome, Kommentare	Quelle
		Ja	Nein		
Brieftaube	1 (22)		X	Kultur; Rassegeflügel; auch MG-Nachweis	BENČINA et al. (1987a)
Brieftaube	3 (20)	X		Kultur; Respiratorische Symptome; verdick- te Luftsäcke; Schleim in Trachea, Nachweis weiterer Mykoplasmen und Bakterien	REECE et al. (1986b)
Ringeltaube	3 (80)		X	PCR	MICHIELS et al. (2016)
Feldsperling	3 (40)		X	Kultur; auf Geflügelbetrieb gefangen	POVEDA et al. (1990a)
Hausper- ling	12 (401)		X	Real-time-PCR, Tupfer Konjunktiven; Choane: 5 x positiv	MICHIELS et al. (2016)
Rabenkrähe ( <i>Corvus corone</i> )	1 (35)		X	PCR	MICHIELS et al. (2016)
Rothuhn ( <i>Alectoris rufa</i> )	1 (15)		X	Kultur; Nutzgeflügel	POVEDA et al. (1990a)
Fasan	Gesund: 8 (17) Krank: 1 (103)	X	X	Kultur; aus Nähe infizierter Hühnerbestände	BRADBURY et al. (2001a)
Japanische Wachtel	14 (18) Embryonen: 10 (24)	X		Kultur; Nutzgeflügel Respiratorische Symptome, Synovitis; auch MG-Nachweis	BENČINA et al. (1987a)
Perlhuhn ( <i>Numida meleagris</i> )	k. A.	X		Kultur; Synovitis; Experimentelle Infektion von Perl- hühnern mit diesem Isolat erfolgreich	PASCUCCI et al. (1976)
Ente	8 (16)		X	Kultur; Nutzgeflügel-Isolate auch aus unbefruch- teten Eiern und ab- gestorbenen Emb- ryonen; aus Bestand infizierter Hühner	BENČINA et al. (1988b)

Tabelle 4: Fortsetzung

Vogel- spezies	Positive Proben (Gesamt)	Symptome		Methode, Beschreibung Symptome, Kommentare	Quelle
		Ja	Nein		
Ente	9 (263)	X		Kultur; Nutzgeflügel 68x Mykoplasmen; 53x Pasteurellen	TIONG (1990)
Gans	5 (12)		X	Kultur; Nutzgeflügel Isolate auch aus Embryonen; aus Bestand mit infizier- ten Hühnern	BENČINA et al. (1988a)
Zwerg- flamingo ( <i>Phoenico- naias minor</i> )	1 (4)	X		Kultur; 10/12 Tieren ver- storben; 1x Kathar- rhalische Tracheitis, fibrinöse Aerosaccu- litis; + <i>Staphylococ- cus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp.	CATANIA et al. (2016)

MG = *Mycoplasma gallisepticum*, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

## 2.1.4.4 *Mycoplasma meleagridis* (MM)

Die MM-Infektion stellte früher eine der wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten für die Putenindustrie dar. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich vertikal über Bruteier inapparent infizierter Puten-Elterntierherden. Durch die Infektion kommt es bei Bruteiern aus betroffenen Herden zu einer moderat erhöhten Embryosterblichkeit und damit reduzierten Schlupfraten (CHIN 2013). Vertikal infizierte Putenküken entwickeln Aerosacculitis, Wachstumsdepression und Skelettdeformationen mit verringerter Mastleistung und hohen Verwurfraten am Schlachthof (YAMAMOTO et al. 1965; CHIN 2013). Da MM bei Embryonen im distalen Verdauungstrakt und der *Bursa fabricii* gefunden wurde, können Immunsuppression und genitale Infektionen geschlechtsreifer Puten ebenfalls auf diesen Übertragungsweg zurückzuführen sein (REIS und YAMAMOTO 1971). MM kann auch horizontal sowohl direkt als auch indirekt übertragen werden. Eine direkte Übertragung kann u.a. über den Paarungsakt erfolgen. Die indirekte Übertragung geschieht beispielsweise während der artifiziellen Insemination von Hennen oder der Geschlechtsbestimmung von Putenküken (YAMAMOTO et al. 1967; BRADBURY 2005). Erfolgt eine aerogene Übertragung bleibt die Infektion auf den Respirationstrakt limitiert

(KUMAR et al. 1969). Während früher der Putenindustrie vor allem aufgrund der Produktionsausfälle und Behandlungen erhebliche Kosten entstanden, beschränken sich die Kosten inzwischen weitestgehend auf prophylaktische Maßnahmen, z. B. serologische Diagnostik bei Elterntierherden (CARPENTER et al. 1981; EU).

Nachweisbar war MM neben Puten auch bei einem Goldfasan (POVEDA et al. 1990a), Japanischen Wachteln, Tauben, Fasanen und Pfauen (STIPKOVITS 1992). MM wurde zudem bei gesunden Greifvögeln verschiedener Spezies gefunden. In einer Studie wurde bei 5 von 68 verunfallten wildlebenden Greifvögeln MM isoliert. Dabei handelte es sich um zwei Mäusebussarde (*Buteo buteo*), einen Schwarzmilan (*Milvus migrans*) und zwei Turmfalken (*Falco tinnunculus*), welche keine respiratorische Symptomatik oder histopathologischen Läsionen der Luftsäcke aufwiesen (LIERZ et al. 2000a). Auch bei 33,3% von in Gefangenschaft gehaltenen und klinisch unauffälligen Falken wurde MM isoliert. Positiv waren zwei Wanderfalken, drei Sakerfalken (*Falco cherrug*), ein Lannerfalken (*Falco biarmicus*), vier Ger-Sakerfalken-Hybriden (*F. rusticolus* x *F. cherrug*) sowie drei Ger-Wanderfalken-Hybriden (*F. rusticolus* x *F. peregrinus*) (LIERZ et al. 2002).

### **2.1.4.5 *Mycoplasma iowae* (MI)**

Die MI-Infektion betrifft hauptsächlich Puten. Während in Europa (CATANIA et al. 2012) und den USA (LEY et al. 2010) die Erkrankung aufgrund erfolgreicher Eradikationsprogramme nur noch sporadisch auftritt, ist der MI-Status der Putenbestände in vielen Ländern unbekannt (BRADBURY et al. 2008). Wie bei MM ist auch bei MI vor allem die vertikale Übertragung durch inapparent infizierte Elterntiere von Bedeutung. Über das infizierte Ovidukt gelangen die Mykoplasmen ins Ei und den Embryo, welches in einer erhöhten Embryosterblichkeit resultiert (McCLENAGHAN et al. 1981). Eine horizontale Übertragung findet nach dem Schlupf der Küken, häufig bereits in der Brüterei, statt (MIRSALIMI et al. 1989). Putenhennen können sich durch kontaminiertes Sperma beim Paarungsakt bzw. der artifiziellen Insemination infizieren (BRADBURY 2005). Eine MI-Infektion zeichnet sich bei Putenküken durch eine unspezifische Symptomatik mit Wachstumsdepression, schlechtem Federkleid, Beinschwäche und leichter Aerosacculitis aus (BRADBURY et al. 2013). In letzter Zeit stehen insbesondere die Skelettdeformationen aufgrund vertebraler Chondrodystrophie im Vordergrund (LEY et al. 2010). Neben Puten sind auch Hühner für eine Infektion mit MI empfänglich (BENČINA et al. 1987b). Bei Broiler-Elterntieren wurden experimentell Tendosynovitis, Arthritis, Seh-

nenfibrosen und -rupturen durch MI induziert. Eine persistierende Infektion erfolgte nicht (BRADBURY et al. 1991).

Isoliert wurde MI desweiteren bei Rebhühnern (*Perdix perdix*) mit erhöhten Verlusten und respiratorischer sowie gastrointestinaler Symptomatik. Zusätzlich fanden sich bei diesen Tieren Kokzidien, Trichomonaden, *E. coli*, *Clostridium perfringens* und *Aspergillus* spp. Aufgrund der Ähnlichkeit der Erkrankung mit der MI-Infektion bei Puten gingen die Autoren von MI als primärem Pathogen aus (CATANIA et al. 2014). Ein weiterer Nachweis gelang bei einer Gelbscheitelamazone aus einem Bestand mit respiratorischer Symptomatik und erhöhten Verlusten. Bei der Amazone wurden postmortal Sinusitis und Aerosacculitis diagnostiziert. Neben MI wurden MG, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Proteus* spp. und *E. coli* isoliert, sodass die Autoren von einem multifaktoriellen Geschehen ausgehen, bei der die Rolle von MI unklar ist (BOZEMAN et al. 1984). MI wurde zudem in Großbritannien bei Wildvögeln und Vögeln aus zoologischen Gärten gefunden. Isoliert wurde MI dabei aus einem wildlebenden Star, einem Kormoran (*Phalacrocorax carbo*), einem Graureiher (*Ardea cinerea*) und einer Ringeltaube (*Columba palumbus*). Die Nachweise aus Zootieren umfassten Isolate aus einer Eiderente (*Somataria mollissima*), einem Rothalsbülbul (*Rubigula dispar*) und einem Rotohryuhina (*Yuhina castaniceps*, Synonym *Staphida castaniceps*) (AMIN 1977).

### 2.1.5 Weitere aviäre Mykoplasmen

Die Pathogenität vieler aviärer Mykoplasmenspezies ist ungeklärt bzw. umstritten. Pathogenitätsvermutungen beruhen meist auf Fallberichten, bei denen bei klinisch erkrankten Tieren Mykoplasmen gefunden wurden und so ein Bezug hergestellt wurde (FORSYTH et al. 1996; ERDÉLYI et al. 1999). Bei systematischen Untersuchung klinisch unauffälliger Wildvogelpopulationen waren einige Mykoplasmenspezies auch bei diesen Tieren regelmäßig nachweisbar, sodass frühere Pathogenitätsvermutungen teilweise widerlegt wurden (LIERZ et al. 2008b; LIERZ et al. 2008d; ZIEGLER et al. 2014). Auf die Bedeutung von Mykoplasmen für Wildvögel bzw. Wildvogelpopulationen wird an anderer Stelle ausführlich eingegangen (siehe Abschnitt 2.2). Im folgenden Abschnitt werden

die bisher beim Vogel beschriebenen Mykoplasmen in alphabetischer Reihenfolge kurz charakterisiert.

Die Erstisolierung von *M. anatis* erfolgte aus Enten mit Sinusitis (ROBERTS 1964). Auch in weiteren Studien wurde *M. anatis* bei klinisch erkrankten Enten in Verbindung mit anderen Mykoplasmen und zellwandbildenden Bakterien, darunter die primär pathogenen Spezies *Pasteurella multocida* und *Riemerella* (früher *Pasteurella*) *anatipestifer*, nachgewiesen (TIONG 1990). In zwei kommerziellen Entenhaltungen wurde bei Entenküken mit zentralnervösen Störungen, Beinschwäche, Atemnot und Diarrhoe *M. anatis* identifiziert, während andere Krankheitsursachen ausgeschlossen wurden. Histopathologisch wurden bei den Tieren lymphohistiozytäre Meningitis und Cerebroventriculitis, Aerosacculitis und Pneumonie sowie eine Splenomegalie diagnostiziert (IVANICS et al. 1988). Nachgewiesen wurde *M. anatis* ebenfalls bei einem Sakerfalken mit Atemnot und Sinusitis, bei dem histopathologisch eine fokale Pneumonie diagnostiziert wurde (POVEDA et al. 1990b). Im Rahmen von epidemiologischen Studien fand sich *M. anatis* hingegen auch bei klinisch unauffälligen Wildenten und Rallen, genauer vier Stockenten (*Anas platyrhynchos*), einer Dunkelente (*Anas rubripes*) und einem Schnatterentenküken (*Anas strepera*) (GOLDBERG et al. 1995) sowie drei Löffelenten (*Anas clypeata*) und vier Blässhühnern (*Fulica atra*) (POVEDA et al. 1990a). Experimentelle Infektionen zur Pathogenität führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Infektionsversuche an embryonierten Enteneiern resultierten in niedrigeren Schlupfraten, geringeren Schlupfgewichten und reduzierten Gewichtszunahmen, während die Infektion von Eintagsküken keine klinischen Symptome induzierte (AMIN et al. 1978; SAMUEL et al. 1995).

*M. anseris* gilt als fakultativ pathogen (BROWN et al. 2011). Erstmals wurde *M. anseris* aus dem Phallus eines Ganters mit Phallus- und Kloakenentzündung isoliert (STIPKOVITS et al. 1986) und beschrieben (BRADBURY et al. 1988). *M. anseris* war auch bei klinisch unauffälligen Zuchtgänsen nachweisbar (HINZ et al. 1994).

*M. buteonis* wurde erstmalig aus der Trachea eines Mäusebussards mit leichten histopathologischen Veränderungen isoliert (POVEDA et al. 1990b) und beschrieben (POVEDA et al. 1994). Regelmäßig isoliert wird *M. buteonis* bei klinisch gesunden Individuen verschiedener Falkenarten, Habichtartigen (Accipitridae) (POVEDA et al. 1994; LIERZ et al. 2008b; LIERZ et al. 2008f) und Kormoranen (STENKAT et al. 2011). Für Sakerfalken ist *M. buteonis* möglicherweise pathogen, da diese im Respirationstrakt, Nervensystem



und Knochen eines Nestlings mit Pneumonie, Ataxie und Dyschondroplasie isoliert wurden (ERDÉLYI et al. 1999). Bei einem juvenilen Buntfalken (*Falco sparverius*) mit Sinusitis wurden *M. buteonis*, *Avibacterium gallinarum* und *Staphylococcus pasteurii* nachgewiesen (BEZJIAN et al. 2014). Aufgrund des gleichzeitigen Nachweises der fakultativ pathogenen Bakterien sind Rückschlüsse auf die Pathogenität von *M. buteonis* in diesem Fall nicht möglich.

***M. cloacale*** wurde erstmalig aus der Kloake eines Putenkükens isoliert und ist vermutlich apathogen (BRADBURY und FORREST 1984). Neben Puten wurde *M. cloacale* auch aus der Kloake einer Vielzahl anderer Vogelarten isoliert, darunter Hühner, Puten, Gänse und Enten (BENČINA et al. 1987a; BENČINA et al. 1988b). Nachweise bei Wildvögeln umfassten zahlreiche Entenarten, darunter Stockenten und ein Stockentenküken, Riesentafelenten (*Aythya valisineria*), Dunkelenten, (GOLDBERG et al. 1995) eine Reiherente (*Aythya fuligula*) und eine Tafelente (*Aythya ferina*). Ebenfalls isoliert wurde *M. cloacale* aus einer wildlebenden Feldlerche (*Alauda arvensis*) einem wildlebenden Star, einem Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*) und einem Kleinspecht (*Dendrocopos minor*) aus zoologischen Gärten (BRADBURY et al. 1987).

***M. columbinasale*** wurde erstmals aus den Nasenmuscheln gesunder Tauben isoliert (JORDAN et al. 1982). Nachgewiesen wurde *M. columbinasale* zudem aus klinisch unauffälligen Felsentauben (*Columba livia*), Brieftauben und indischen Pfautauben (BENČINA et al. 1987a; NAGATOMO et al. 1997). Auch bei Tauben mit respiratorischen Symptomen wurde *M. columbinasale* isoliert. Da die meisten der untersuchten Tauben parallel verschiedene andere Infektionen aufwiesen, sahen die Autoren jedoch keinen gesicherten ätiologischen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *M. columbinasale* und respiratorischen Erkrankungen (KEYMER et al. 1984).

***M. columbinum*** und ***M. columborale*** wurden im Rahmen einer Studie zu Mykoplasmen bei Wildtauben aus der Trachea und dem Oropharynx gesunder Tauben isoliert und beschrieben (SHIMIZU et al. 1978). Beide Spezies waren zudem in Brief- und Rassetauben (KEYMER et al. 1984; REECE et al. 1986b; ESPOSITO 2000; LORIA et al. 2005) und einer Saatkrähe (STRUGNELL et al. 2011) mit respiratorischen Symptomen nachweisbar. *M. columborale* wurde außerdem aus den Luftsäcken eines Wanderfalken isoliert, der mit Tauben gefüttert worden war (POVEDA et al. 1990b). Die Anzucht gelang auch aus verletzt bzw. geschwächt aufgefundenen Tauben und einem Sperber (*Accipi-*

*ter nisus*) (SUÁREZ-PÉREZ 2011) sowie einer Fliege (KEMPF et al. 2000a). Die Rolle dieser beiden Spezies bei respiratorischen Erkrankungen ist nicht abschließend geklärt (KEYMER et al. 1984; ESPOSITO 2000).

***M. corogypsi*** wurde aus einem abszedierten Fußballen eines Rabengeiers (*Coragyps atratus*) isoliert und beschrieben (PANANGALA et al. 1993). Weitere Nachweise gelangen bei insgesamt vier Rabengeiern mit Polyarthritits und Tendosynovitis (RUDER et al. 2009; VAN WETTERE et al. 2013), jedoch auch bei einem gesunden Wanderfalken, vier Sakerfalken und einem Ger-Sakerfalken-Hybriden (LIERZ et al. 2002). Die Pathogenität ist somit auch bei dieser Spezies nicht abschließend geklärt.

***M. falconis*** wurde ursprünglich aus Trachea und Sinus von Sakerfalken mit Sinusitis isoliert (POVEDA et al. 1990b). *M. falconis* wird jedoch auch regelmäßig bei klinisch gesunden adulten und juvenilen Individuen verschiedener Falkenarten isoliert, darunter Gerfalken, Ger-Sakerfalken-Hybriden, Turmfalken, Baumfalken (*Falco subbuteo*), Rötelfalken (*Falco naumanni*) und Wüstenfalken (*Falco peregrinoides*) (LIERZ et al. 2002; LIERZ et al. 2008d; LIERZ et al. 2008f). Nachweisbar war *M. falconis* zudem bei klinisch unauffälligen Trielen (SCHMIDT et al. 2009) sowie zwei geschwächt aufgefundenen Adlern, wobei es sich um einen Habichtsadler (*Hiraaetus fasciatus*) und einen Schlangensadler (*Circaetus gallicus*) handelte (SUÁREZ-PÉREZ 2011). Aufgrund der zahlreichen Nachweise bei klinisch gesunden Greifvögeln handelt es sich wahrscheinlich um eine apathogene oder fakultativ pathogene Mykoplasmenspezies (LIERZ et al. 2008b).

***M. gallinaceum*** ist vermutlich ein Schleimhautkommensale bei Hühnern, der erstmalig aus der Trachea von Hühnern isoliert wurde (JORDAN et al. 1982). Durch ihr rasches Wachstum *in vitro* stellt diese Spezies vor allem eine Herausforderung für die Anzucht langsamer wachsender geflügelpathogener Spezies dar, da diese häufig überwuchert werden (BRADBURY et al. 2001b). Außer bei Hühnern (BENČINA et al. 1987b) wurde *M. gallinaceum* bislang bei Fasanen mit Sinusitis in Verbindung mit *Pasteurella multocida*, *E. coli* und *M. glycyphilum* (CHIN et al. 2001) sowie bei Enten mit *P. multocida* und weiteren Mykoplasmen isoliert (TIONG 1990). Weitere Nachweise gelangen bei Fasanen mit respiratorischen Symptomen (BRADBURY et al. 2001b), klinisch unauffälligen Wildputen (HOFFMAN et al. 1997), einem Goldfasan, Tauben und einem Wanderfalken (POVEDA et al. 1990a).

***M. gallinarum*** gilt als apathogener Erreger, da er regelmäßig bei klinisch unauffälligen Tieren isoliert wird (POVEDA et al. 1990a). Dazu zählen Hühner, Tauben, Puten, Enten, Gänse (JORDAN und AMIN 1980; REECE et al. 1986b; BENČINA et al. 1987a; BENČINA et al. 1987b). Einzelne Nachweise gab es zudem bei zwei Goldfasanen, einem Mönchsgeier (*Aegypius monachus*) (POVEDA et al. 1990a), einem chinesischen Bambushuhn (*Bambuiscola thoracica*), zwei Haussperlingen, einem Zwergschwan (*Cygnus bewickii*), einem Jungfernkranich (*Anthropoides virgo*) (SHIMIZU et al. 1979) einer Aaskrähne (*Corvus corone*) mit Pasteurellose (STRUGNELL et al. 2011) und Schweinen (TAYLOR-ROBINSON et al. 1968). Bei einem Wiedehopf mit zentralnervöser Symptomatik wurde *M. gallinarum* zusammen mit einem hohen PMV-1-Titer, bei einem Wanderfalken mit respiratorischer Symptomatik in Kombination mit MG, *M. gallinaceum* und *M. iners* isoliert (POVEDA et al. 1990a).

***M. gallopavonis*** wird regelmäßig bei klinisch gesunden Wildputen isoliert (LUTTRELL et al. 1992; HOFFMAN et al. 1997). Auch bei gesunden Hühnern, die Kontakt mit Wildputen hatten, war der Erreger nachweisbar (HOFFMAN et al. 1997). Ein Nachweis gelang zudem bei zwei Aaskrähen mit respiratorischer Symptomatik infolge einer Pasteurellose (STRUGNELL et al. 2011). Da *M. gallopavonis* erstmalig aus einer Pute mit Aerosacculitis isoliert wurde, ist das pathogene Potential dieser Spezies unklar (JORDAN et al. 1982).

***M. glycyphilum*** wurde aus dem Ovidukt eines adulten Huhns aus einer Herde mit suboptimaler Legeleistung isoliert. Ebenfalls isoliert wurden bei diesem Huhn MG und *M. iners*. Pathogenitätsstudien ergaben erhöhte Mortalität bei Hühnerembryonen und einen Tropismus zum Gastrointestinaltrakt mit Wachstumsdepression bei Hühnerküken. Für Putenküken und -embryonen war der Erreger apathogen (FORREST und BRADBURY 1984). Isoliert wurde *M. glycyphilum* zudem aus Fasanen und Rebhühnern mit respiratorischer Symptomatik zusammen mit anderen primär pathogenen Erregern (BRADBURY et al. 2001b; CHIN und GOSHGARIAN 2001) sowie klinisch unauffälligen Hühnern (BENČINA et al. 1987a; BENČINA et al. 1987b), Wasserrallen (*Rallus aquaticus*) und Kormoranen (*Phalacrocorax carbo*) (STENKAT et al. 2011).

***M. gypis*** wurde aus Gänsegeiern (*Gyps fulvus*) mit unspezifischer respiratorischer Symptomatik isoliert und beschrieben (POVEDA et al. 1990b; POVEDA et al. 1994). *M. gypis* wurde außerdem bei verletzt oder geschwächt aufgefundenen Mäusebussarden und einem Turmfalken ohne respiratorische Symptomatik nachgewiesen.

In Luftsackbiopsien dieser Tiere fanden sich gehäuft perivaskuläre lymphozytäre und/oder plasmazelluläre Infiltrationen. Die Autoren hielten somit eine primäre Pathogenität für unwahrscheinlich, schlossen jedoch ein pathogenes Potential, wie auch bei *M. falconis* und *M. buteonis*, nicht aus (LIERZ et al. 2000b). Unterstützt wird die These durch Nachweise bei gesunden freilebenden Greifvogelnestlingen der Familien Falconidae und Accipitridae, darunter Mäusebussarde, Habichte (*Accipiter gentilis*), Rotmilane (*Milvus milvus*) und Rohrweihen (*Circus aeruginosus*) (LIERZ et al. 2008b) sowie bei einem klinisch unauffälligen adulten Mäusebussard (LIERZ et al. 2008c). Nachgewiesen wurde *M. gypis* zudem bei Trielen mit teilweise unspezifischer klinischer Symptomatik (SCHMIDT et al. 2009).

***M. imitans*** wurde bei Enten, Gänsen und Rebhühnern isoliert und zunächst aufgrund serologischer Kreuzreaktionen fälschlicherweise als MG diagnostiziert (DUIPIELLET 1984; BUNTZ et al. 1986; BRADBURY et al. 1993). Die Verwechslungsgefahr zwischen *M. imitans* und MG ist bis heute eine diagnostische Herausforderung. Aufgrund ihrer engen genetischen und antigenetischen Verwandtschaft können neben serologischen Kreuzreaktionen nicht alle PCR auf Basis des 16S-rRNA-Gens diese beiden Spezies unterscheiden (MEKKES et al. 2005). Eine Differenzierung ist beispielsweise mittels Restriktionsenzymanalyse oder Sequenzierung des PCR-Amplikons möglich (FAN et al. 1995; LIERZ et al. 2008c). Bei Rothuhnküken waren experimentell pathologische Veränderungen der oberen Atemwege induzierbar, im Vergleich zu der Infektion mit MG verlief diese jedoch mit milderer Symptomatik (GANAPATHY et al. 1998a). Bei Putenküken führte eine experimentelle Infektion zu geringgradigen respiratorischen Symptomen, während eine Co-Infektion mit Turkey Rhinotracheitis Virus (TRTV) zu wesentlich deutlicheren Läsionen und klinischen Symptomen führte (GANAPATHY et al. 1998b). Untersuchungen an Trachealzellkulturen von Hühner- und Entenembryonen zeigten eine Ziliostase sowie Adhärenz und Proliferation auf der Epitheloberfläche. Die Autoren vermuten daher auch bei diesen beiden Spezies in vivo ein pathogenes Potential (ABDULWAHAB et al. 1996).

***M. iners*** wird regelmäßig aus der Trachea von Hühnern isoliert (DIERKS et al. 1967; BENČINA et al. 1987a; BENČINA et al. 1987b). Zudem konnte *M. iners* aus einem Leberabszess sowie Sperma von Hühnern isoliert werden (SHIMIZU et al. 1979). Experimentelle Infektionen durch direkte Inokulation in Luftsäcke von Hühnerküken produzierten

geringgradige oder keine Läsionen. *M. iners* wurde daher als fraglich pathogen eingestuft (DIERKS et al. 1967). Infektionsversuche an Hühnerembryonen identifizierten sowohl einen apathogenen als auch einen Stamm, der zu käsigen Veränderungen in Gelenken, der Leber, inneren Organen und vereinzelt im Herz führte (WAKENELL et al. 1995). Isoliert wurde *M. iners* außerdem von Fasanen, Rebhühnern (BRADBURY et al. 2001b) und einem Wanderfalken mit respiratorischer Symptomatik sowie einem Goldfasan, einer Taube (POVEDA et al. 1990a) und beim Schwein (TAYLOR-ROBINSON und DINTER 1968).

***M. lipofaciens*** wurde bei klinisch unauffälligen Hühnern, einer Pute und einer Ente isoliert (BRADBURY et al. 1983; BENČINA et al. 1987a; BENČINA et al. 1987b). *M. lipofaciens* wurde zudem aus einem unbefruchteten Ei eines Habichts isoliert, bei 423 weiteren Eiern verschiedener Greifvogelspezies waren hingegen keine Mykoplasmen nachweisbar (LIERZ et al. 2007b). Im Rahmen epidemiologischer Studien an gesunden Greifvögeln war *M. lipofaciens* nicht nachweisbar (LIERZ und HAFEZ 2008a; LIERZ et al. 2008b; LIERZ et al. 2008f). Experimentelle Infektionen von Hühner- und Putenembryonen mit diesem Isolat von *M. lipofaciens* führten zu hoher Embryomortalität und pathologischen Veränderungen (LIERZ et al. 2007a; LIERZ et al. 2007c), daher wird von einem pathogenen Potenzial ausgegangen. Eine akzidentelle aerogene Laborinfektion führte bei einem Menschen zu Rhinitis, Pharyngitis und Serokonversion (LIERZ et al. 2008e).

***M. neophronis*** wurde aus den oberen Atemwegen sechs verunfallt aufgefundener Schmutzgeier (*Neophron percnopterus majorensis*) isoliert. Da keiner dieser Geier Atemwegssymptome zeigte, handelt es sich bei *M. neophronis* vermutlich um eine kommensale Spezies (SUÁREZ-PÉREZ et al. 2012).

***M. pullorum*** kommt bei Huhn, Pute, Wachtel, Rebhuhn, Fasan, und Taube vor (BENČINA et al. 1987a; BENČINA et al. 1987b; POVEDA et al. 1990a; MOALIC et al. 1997; BRADBURY et al. 2001b). Experimentelle Infektionen durch direkte Inokulation in Luftsäcke von Hühnerküken produzierten geringgradige oder keine Läsionen. Daher wurde *M. pullorum* als fraglich pathogen eingestuft (DIERKS et al. 1967). Ein Isolat aus verstorbenen Putenembryonen eines Bestandes mit verminderter Schlupfrate erwies sich jedoch experimentell als pathogen für Puten- und Hühnerembryonen (MOALIC et al. 1997).

*M. sturni* wurde sowohl bei asymptomatischen Wildvögeln als auch bei Vögeln mit einer Reihe infektiöser und nicht-infektiöser Erkrankungen isoliert. Nachgewiesen wurde *M. sturni* bei klinisch unauffälligen Rabenkrähen (*Corvus corone corone*), Amerikanerkrähen (*Corvus brachyrhynchos*), Wanderdrosseln (*Turdus migratorius*) und einem Star (LUTTRELL et al. 2001; WELLEHAN et al. 2001; ZIEGLER et al. 2014). Isoliert wurde *M. sturni* auch von zahlreichen Vögeln mit Konjunktivitis. Dazu zählen Stare (FORSYTH et al. 1996; FRASCA et al. 1997), ein Blauhäher (*Cyanocitta cristata*), eine Spottdrossel (*Mimus polyglottos*) (LEY et al. 1998) und eine Amerikanerkrähe (WELLEHAN et al. 2001). In Schottland wurde *M. sturni* aus juvenilen Amseln (*Turdus merula*), Saatkrähen (*Corvus frugilegus*), Aaskrähen (*Corvus corone*), Elstern (*Pica pica*) und Staren isoliert, die zusätzlich an verschiedenen infektiösen und nicht infektiösen Erkrankungen wie Aspergillose, Mangelernährung, Parasitosen, Traumata und Enzephalitiden litten (PENNYCOTT et al. 2005). *M. sturni* fand sich bei Schwalben (*Petrochelidon pyrrhonota*) mit Konjunktivitis, Rhinitis und Sinusitis, hier in Verbindung mit Kryptosporidien (LEY et al. 2012). *M. sturni* wurde ebenfalls bei Aaskrähen und Saatkrähen mit Pasteurellose isoliert, wobei es sich wahrscheinlich um einen Nebenfund handelte (STRUGNELL et al. 2011). Insgesamt bleibt die Pathogenität von *M. sturni* unklar, eine Krankheitsbeteiligung wird nicht ausgeschlossen (PENNYCOTT et al. 2005). Da *M. sturni* jedoch auch bei zahlreichen asymptomatischen Krähenvögeln isoliert wurde, wird das pathogene Potential in Frage gestellt (ZIEGLER et al. 2014).

### 2.1.6 Aviäre Ureaplasmen

Über die Pathogenität von Ureaplasmen bei Vögeln ist wenig bekannt. Die bislang einzige beim Vogel beschriebene Spezies ist ***Ureaplasma gallorale*** (KOSHIMIZU et al. 1987). *U. gallorale* wurde bei klinisch unauffälligen Hühnern aus Konjunktiven, Nasenhöhle, Oropharynx und Trachea isoliert. Experimentell konnten mit diesen Isolaten keine pathologischen Veränderungen in Hühnern induziert werden (KOSHIMIZU et al. 1982). Ureaplasmen wurden auch bei Puten mit reduzierter Fertilität isoliert, die Spezies wurde in dieser Studie nicht bestimmt. Bei untersuchten Hähnen fand sich eine erhöhte Zahl veränderter Spermatozoen und bei Hennen histopathologische Läsionen im Ovidukt (STIPKOVITS et al. 1983). Mit einem Isolat aus Puten konnten experimentell bei Hühnern

und Puten eine serofibrinöse Aerosacculitis und Serokonversion induziert werden (STIPKOVITS et al. 1978).

### 2.1.7 Unbekannte und nicht valide beschriebene Mykoplasmenspezies

Publiziert wurden die aviären Mykoplasmenspezies *M. vulturis*, *M. sphenisci* und „Strain 1220“, welche jedoch bislang nicht als valide Spezies anerkannt sind (BROWN et al. 2011). *M. vulturis* wurde aus Leber und Milz eines an einer Diclofenac-Vergiftung verstorbenen Bengalgeiers (*Gyps bengalensis*) isoliert (OAKS et al. 2004), konnte bislang jedoch nicht in zellfreiem Medium kultiviert werden. *M. sphenisci* stammt aus einem Brillenpinguin (*Spheniscus demersus*) mit wiederkehrendem mukös-käsigem Ausfluss aus der Choane (FRASCA et al. 2005). Diese Spezies wurde bislang nur in Co-Kultur mit eukaryotischen Zellen angezüchtet. Der „Strain 1220“ wurde aus Gösseln im Alter von drei bis vier Wochen mit respiratorischen und zentralnervösen Störungen isoliert. In den betroffenen Herden lag die Morbidität bei 15-25%, die Mortalität bei 3-8%. Pathologisch-anatomisch zeigten sich eine sero-fibrinöse Polyserositis sowie Perikarditis und Meningitis. Andere Erreger wurden nur vereinzelt bei den Gösseln nachgewiesen, weshalb „Strain 1220“ vermutlich pathogen für Gössele ist (STIPKOVITS et al. 1993). Bei Untersuchungen verschiedener Vogelspezies finden sich regelmäßig Mykoplasmen, die keiner beschriebenen Spezies zugeordnet werden können. Nachgewiesen wurden nicht identifizierbare Mykoplasmen beispielsweise bei Stockenten, Dunkelenten und einer Riesentafelente (GOLDBERG et al. 1995), einer Dreizehenmöwe (KEMPF et al. 2000b), Weißstörchen und Weißstorchnestlingen (HAGEN et al. 2004; SUÁREZ-PÉREZ 2011) sowie verschiedenen Falkenarten und einer Rohrweihe (LIERZ et al. 2008c; LIERZ et al. 2008f). In einer Studie bei Wildvögeln 75 verschiedener Spezies auf den Kanarischen Inseln konnten mittels Sequenzierung der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) und Denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) nur 11% der Isolate (19/174) aus 36 Vogelspezies sicher bis zur Speziesebene identifiziert werden. In dieser Studie wurden serologische Untersuchungen jedoch nur mit 19 Isolaten zur Bestätigung der Spezieszugehörigkeit durchgeführt (SUÁREZ-PÉREZ 2011).

## 2.2 Bedeutung von Mykoplasmen für Wildvögel und Wildvogelpopulationen

Krankheiten in Wildvogelpopulationen werden hauptsächlich im Hinblick auf zwei Fragestellungen untersucht: Einerseits wird der Einfluss bestimmter Erreger auf die Population selbst, andererseits das Vorkommen tier- und humanpathogener Erreger hinsichtlich einer Reservoir- oder Vektorfunktion der Population untersucht. Insbesondere für die Erhaltung bedrohter Vogelarten ist der Einfluss auf das Individuum bzw. die betroffene Population von Bedeutung (LIERZ et al. 2008f; DEEM et al. 2012). Wichtig ist eine Krankheit in diesem Zusammenhang erst, wenn sie einen Einfluss auf die Lebensdauer oder Fertilität des Individuums hat, da diese die Fitness des Individuums und damit die Populationsdichte beeinflusst (WOBESER 2006). Ein kausaler Zusammenhang zwischen Erreger und Krankheit ist bei Wildtieren jedoch schwer nachzuweisen, da viele Einflussfaktoren aus der Umwelt wie Ernährung, Prädation, Klima und Reproduktion zu berücksichtigen wären, jedoch häufig nicht hinreichend bekannt sind (WOBESER 2006). Wildtierpopulationen fungieren häufig als Reservoir und können als Vektoren für tier- und humanpathogene Erreger in Frage kommen (DASZAK 2000; HÖFLE et al. 2012). Untersuchungen zur Ausbreitung bakterieller Pathogene bei Wildvögeln dienen daher auch als Modelle zur Beurteilung der Ausbreitung von Pathogenen bei anderen Vogelarten (BENSKIN et al. 2009), anderen Tierarten und dem Menschen (HAWLEY et al. 2013). Zudem geben solche Untersuchungen Hinweise, ob vorkommende Erreger für eine Tierart pathogen sein können, oder doch eher als Kommensale anzusehen sind.

Zum Vorkommen und zur Bedeutung von Mykoplasmen bei Wildvögeln gibt es nur wenige systematische Untersuchungen. Viele Pathogenitätsvermutungen beruhen auf Nachweisen aus geschwächt oder verunfallt aufgefundenen Wildvögeln (FORSYTH et al. 1996; ERDÉLYI et al. 1999), sodass verallgemeinernde Aussagen in Bezug auf die Pathogenität einer Mykoplasmenspezies für die Vogelspezies fraglich sind. Erschwert wird die Interpretation zudem dadurch, dass sich bei klinisch kranken Wildvögeln häufig Mykoplasmen in Verbindung mit anderen Erregern finden (PENNYCOTT et al. 2005; STRUGNELL et al. 2011; BEZJIAN und BEZJIAN 2014). Bei den Mykoplasmen kann es sich somit um Primär- oder Sekundärerreger, aber auch um Zufallsbefunde handeln. Um eine fundierte Aussage zur Pathogenität treffen zu können, müssen daher zunächst Untersuchungen durchgeführt werden, welche die Prävalenz in der Wildvogelpopulation



eruiieren (LIERZ et al. 2008b). Für diese epidemiologischen Studien sind verunfallte oder geschwächt aufgefundene Tiere nachteilig, da sie nicht als repräsentativ für die Gesamtpopulation angesehen werden können. Auf der Suche nach Nahrung gehen kranke oder geschwächte Tiere höhere Risiken ein als Artgenossen, womit wiederum die Wahrscheinlichkeit zu verunfallen oder aufgegriffen zu werden, steigt (WOBESER 2006). Zudem kann bereits die Haltung von Wildtieren in Gefangenschaft selbst, z.B. zur Rehabilitation in Auffangstationen oder im Rahmen von Auswilderungsprojekten, durch stressbedingte Immunsuppression das Krankheitsgeschehen beeinflussen (FRIEND et al. 1969). Innerhalb von Stationen entstehen auch unnatürlich hohe Populationsdichten über längere Zeiträume, die zu einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Infektion und somit zu höheren Erregerprävalenzen als in der Wildpopulation führen könnten (PENNYCOTT et al. 2005; SUÁREZ-PÉREZ 2011). Da verunfallte bzw. geschwächt aufgefundene Vögel jedoch deutlich leichter zugänglich sind als andere wildlebende Vögel, werden häufig zunächst epidemiologische Studien mit diesen Tieren durchgeführt, um einen ersten Einblick in die Wildpopulation zu erhalten (LIERZ et al. 2008b).

Studien zum Vorkommen von Mykoplasmen zeigen deutliche Prävalenzunterschiede bei verschiedenen Vogelspezies. Bei krank bzw. tot aufgefundenen Seevögeln, darunter 15 Sturmschwalben (*Hydrobates pelagicus*) (CANDELA et al. 2008), 41 Dreizehnmöwen (*Rissa tridactyla*), 26 Silbermöwen (*Larus argentatus*) und 34 Lachmöwen (*Larus ridibundus*), waren keine Mykoplasmen nachweisbar (PETERMANN et al. 1989). Bei anderen Seevögeln fanden sich dagegen niedrige bis mittlere Prävalenzen. Bei geschwächt aufgefundenen Gelbschnabel-Sturmtauchern (*Calonectris diomedea*) lag die Mykoplasmen-Prävalenz bei 2,38% (1/42) (SUÁREZ-PÉREZ 2011), während Mykoplasmen aus 12% (6/50) krank bzw. tot aufgefunderer Trottellummen isoliert wurden (PETERMANN et al. 1989). Die Autoren spekulierten, dass die insgesamt niedrige Prävalenz bei Seevögeln an ihrem fehlenden Menschenkontakt sowie ihren Habitaten liege (SUÁREZ-PÉREZ 2011). Im Widerspruch dazu waren in dieser Studie bei geschwächt aufgefundenen Mittelmeermöwen (*Larus michahelis*) hingegen bei 31 von 53 Tieren (58,5%) Mykoplasmen kultivierbar, die jedoch keiner Spezies zugeordnet werden konnten (SUÁREZ-PÉREZ 2011).

Nicht nachweisbar waren Mykoplasmen in einer Studie mit 36 Individuen 12 verschiedener kleiner Zugvogelspezies aus der Ordnung Passeriformes mit unbekannter Todes-

ursache (WHALIN 2009). In einer neueren Studie wurden zufällig ausgewählte, gesunde Individuen kleiner Singvogelarten (Ordnung Passeriformes, Unterordnung Passeri), darunter 137 Nachtigallen (*Luscinia megarhynchos*) sowie 83 Blau- (*Cyanistes caeruleus*) und Kohlmeisen (*Parus major*), gefangen und auf Mykoplasmen untersucht (MÖLLER PALAU-RIBES et al. 2012). Auch in dieser Studie gelang kein Mykoplasmenachweis. Im Rahmen einer Untersuchung zum Erregerspektrum von Geflügel und einheimischen Wildvögeln auf der Galápagos-Insel Floreana waren keinem der 274 untersuchten Singvögel (Passeriformes) Mykoplasmen nachweisbar (DEEM et al. 2012). Es gibt somit Vogelspezies, bei denen Mykoplasmen natürlicherweise nicht oder nur sehr selten vorkommen, sodass bei erkrankten Individuen dieser Spezies ein positiver Mykoplasmenbefund vermutlich als bedeutend zu werten ist (MÖLLER PALAU-RIBES et al. 2012).

Eine hohe Prävalenz einer Mykoplasmenspezies bei klinisch unauffälligen Individuen einer Vogelspezies gilt als Hinweis auf eine fakultativ pathogene oder apathogene, rein kommensale Lebensweise (SUÁREZ-PÉREZ 2011). Eine hohe Prävalenz findet sich unter anderem bei Tauben, bei denen drei Mykoplasmenspezies als kommensal gelten: *M. columborale*, *M. columbinasale* und *M. columbinum* (siehe Abschnitt 2.1.5). In einer Studie fanden sich beispielsweise Rein- bzw. Mischkulturen von *M. columbinum* und *M. columborale* in Trachea (35,2%; 19/54 Tiere positiv) und Oropharynx (66,7%; 14/21 Tiere positiv) (SHIMIZU et al. 1978). Bei einigen Wasservogelspezies scheinen ebenfalls apathogene Mykoplasmen vorzukommen. *M. glycyphilum* war bei 68% der untersuchten, klinisch unauffälligen, wildlebenden Wasserrallen und bei 60% der Kormorane nachweisbar (STENKAT et al. 2011). Bei verschiedenen Spezies wildlebender Enten fanden sich unter anderem *M. cloacale* bei 37% (19/51), *M. anatis* hingegen nur bei 18% (9/51) und der untersuchten Tiere (GOLDBERG et al. 1995). Bei klinisch unauffälligen, wildlebenden Pelikanen (*Pelecanus onocrotalus*) waren bei 98% (49/50) der untersuchten Tiere mittels genusspezifischer PCR Mykoplasmen nachweisbar, eine Identifizierung der Spezies erfolgte hier nicht (ASSUNÇÃO et al. 2007). Ausführliche epidemiologische Studien wurden bei Greifvögeln durchgeführt (LIERZ 2009). In einer Studie wurde *M. falconis* mit einer Prävalenz von 62,7% bei Rötelfalken nachgewiesen. Dabei handelte es sich um vergleichende Untersuchungen anhand von 20 Vögeln, 43 abgestorbenen Embryonen und 18 infertilen Eiern aus einer Zucht- sowie 82 Vögeln aus drei wildlebenden Populationen. Alle untersuchten Eier und Embryonen waren Mykoplasmen-

negativ, zudem gab es keine signifikanten Unterschiede der Mykoplasmen-Prävalenz zwischen Zucht- und Wildpopulation (LIERZ et al. 2008f). In einer weiteren Studie an klinisch gesunden Falken in Menschenobhut wurden bei 66,7% (10/15) der Falken *M. falconis* sowie bei 40% (6/15) der Falken *M. buteonis* nachgewiesen (LIERZ et al. 2008d). Die Autoren folgerten, dass es sich bei diesen Mykoplasmenspezies nicht um primär pathogene Erreger handelt. Trotz der hohen Prävalenz in der gesunden Population, wird eine Beteiligung von Mykoplasmen an respiratorischen Erkrankungen bei Greifvögeln weiterhin diskutiert. Die Interpretation beschriebener Fälle ist schwierig, da es sich häufig um multifaktorielle Geschehen handelt, bei dem neben Mykoplasmen auch andere, teilweise primär pathogene, Erreger nachgewiesen werden (MORISHITA et al. 1997; BEZJIAN und BEZJIAN 2014). Klinisch manifeste Erkrankungen bei Greifvögeln durch Mykoplasmen könnten jedoch infolge einer Immunsuppression des Wirtes durch vorausgegangene Infektionen, aber auch ernährungs- und haltungsbedingte Mangel-situationen, auftreten (LIERZ et al. 2002; HINZ und BEHR 2012). Während *M. falconis* und *M. buteonis* regelmäßig bei klinisch unauffälligen Greifvögeln nachweisbar waren, fand sich *M. corogypsi* hingegen nicht (LIERZ et al. 2008b; LIERZ et al. 2008d), bzw. mit niedrigen Prävalenzen von 5,6% (4/71) bei Sakerfalken und 2,5% (jeweils 1/40) bei Wander- und Ger-Sakerfalkenhybriden (LIERZ et al. 2002). Besteht bei klinisch kranken Greifvögeln der Verdacht auf eine Mykoplasmeninfektion, sollte daher immer eine Speziesdifferenzierung vorgenommen werden (LIERZ 2009). Neben der Mykoplasmenspezies ist auch bei Greifvögeln die Vogelspezies von Bedeutung. Im Gegensatz zu Falken und Bussarden, waren bei klinisch gesunden Geiern keine Mykoplasmen im Respirations-trakt nachweisbar. Analog zu anderen Vogelspezies, ist bei erkrankten Geiern ein Mykoplasmenachweis daher eher als bedeutend einzustufen (LIERZ et al. 2008d).

Neben der Ermittlung der Prävalenz können vor allem Prävalenzunterschiede zwischen kranken und gesunden Individuen einer Spezies wichtige Hinweise auf die Bedeutung von Mykoplasmen für die jeweilige Vogelspezies geben. Bei Fasanen fand sich *M. synoviae* (MS) in einer Studie überraschenderweise nur bei 0,97% (1/103) der Tiere mit respiratorischer Symptomatik, hingegen bei 47% (8/17) der klinisch gesunden Tiere. Diese Studie widerlegt die Annahme, dass MS bei Fasanen in Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen eine ursächliche Rolle spielt (BRADBURY et al. 2001a). Ein weiteres Beispiel für die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung ist *M. sturni*. Während *M. sturni* bei 68% (15/22) tot aufgefundener Krähenvögel (Corvidae)

in Verbindung mit einer Reihe verschiedener Erkrankungen nachgewiesen wurde (PENNYCOTT et al. 2005), war diese Spezies auch bei klinisch unauffälligen wildlebenden Krähenvögeln mit einer geringeren Prävalenz von 10% (9/86) nachweisbar (ZIEGLER et al. 2014). In diesem Fall ist somit ein kausaler Zusammenhang diskutierbar. Da die kranken Tiere sich zum Zeitpunkt der Probennahme bereits in Gefangenschaft befanden, kann die höherer Prävalenz hingegen auch mit einer stressbedingten Immunsuppression in Zusammenhang stehen (FRIEND und TRAINER 1969).

Auch bei Weißstörchen ist die Bedeutung von Mykoplasmen bislang unklar. Im Rahmen einer Studie wurden bei 100% (6/6) geschwächt aufgefundener Weißstörche Mykoplasmen isoliert, wobei diese Isolate keiner bekannten Spezies zugeordnet werden konnten (SUÁREZ-PÉREZ 2011). Eine ähnlich hohe Prävalenz mit 99,1% (107/108) fand sich anhand molekularbiologischer Untersuchungen bei klinisch unauffälligen Weißstorchnestlingen. Aus allen 83 Kulturen waren Mykoplasmen kontaminationsfrei kultivierbar (HAGEN et al. 2004). Weiterführende Untersuchungen an zwei Isolaten zeigten, dass es sich wahrscheinlich um neue Spezies handelt (LIERZ et al. 2011). Diese 83 Kulturen sowie eine DNA-Probe bilden die Basis der vorliegenden Arbeit. In dieser Arbeit werden beide Isolate ausführlich charakterisiert und ein Isolat als Typstamm einer neuen Mykoplasmenspezies beschrieben. Um die Bedeutung dieser neuen Spezies für Weißstörche bzw. Weißstorchnestlinge zu eruieren, wird zusätzlich eine Prävalenzstudie anhand der 83 vorliegenden Kulturen sowie einer zusätzlichen DNA-Probe durchgeführt.

## 2.3 Diagnostik aviärer Mykoplasmen

Infektionen durch aviäre Mykoplasmen können entweder über einen direkten Erregernachweis oder indirekt anhand von Antikörpern diagnostiziert werden (RAVIV et al. 2009). Der direkte Erregernachweis erfolgt dabei entweder über Isolierung und Identifikation der Mykoplasmenspezies oder die Detektion von Mykoplasmen-DNA mittels molekularbiologischer Methoden. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Möglichkeiten der Diagnostik aviärer Mykoplasmen. Auf die einzelnen Methoden wird in den folgenden Abschnitten, gegliedert nach direkten und indirekten Nachweisverfahren, detaillierter eingegangen.

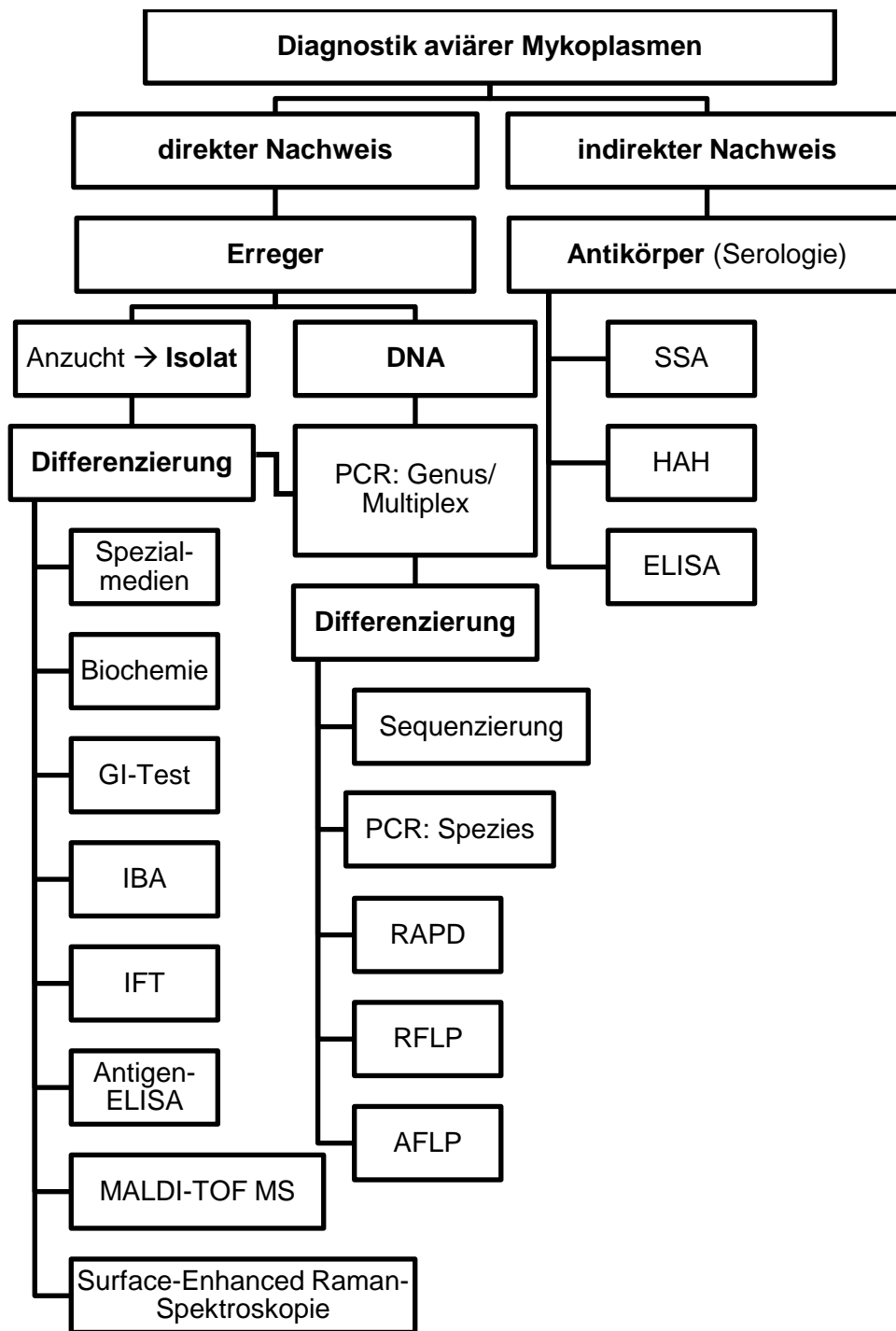


Abbildung 4: Möglichkeiten der Diagnostik aviärer Mykoplasmen, modifiziert nach HAGEN (2007)

AFLP = Längenpolymorphismus amplifizierter Fragmente, DNA = Desoxyribonukleinsäure, ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay, GI = Growth Inhibition, HAH = Hämagglutinations-Hemmtest, IBA = Immunobinding Assay, IFT = Immunfluoreszenztest, RAPD = Randomly Amplified Polymorphic DNA, RFLP = Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus, MALDI-ToF MS =Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight Massenspektrometrie, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, SSA = Serumschnellagglutination

### 2.3.1 Direkte Nachweisverfahren

#### 2.3.1.1 Kultivierung von Mykoplasmen

Der Gold-Standard für die Diagnostik aviärer Mykoplasmen ist bis heute die Kultivierung, da nur anhand der gewonnenen Isolate weiterführende Untersuchungen, unter anderem Infektionsversuche, Antibiogramme oder die Beschreibung neuer Spezies, möglich sind (BRADBURY 1998; RAVIV und LEY 2013). Einige Mykoplasmenspezies wachsen ausschließlich in Zellkulturen (OAKS et al. 2004); die meisten Spezies sind jedoch in zellfreien Spezialnährmedien kultivierbar. Bei diesen Medien handelt es sich um sehr komplexe Flüssig- und Agarmedien, da Mykoplasmen aufgrund ihrer geringen Genomgröße ein sehr begrenztes Repertoire metabolischer StoffwechsellLeistungen haben, sodass viele Nährstoffe von außen zugeführt werden müssen (BROWN et al. 2011). Das Wachstum von Mykoplasmen ist abhängig von Cholesterin und assimilierbaren Fettsäuren, welche dem Medium in Form von tierischem Serum zugesetzt werden. Verwendet werden in der Regel Pferdeserum, fetales Kälberserum (FKS) oder Schweineserum, wobei sich letzteres insbesondere bei der Kultivierung aviärer Mykoplasmen bewährt hat (BRADBURY 1998). Nährmedien enthalten zudem Fleischextrakte, Pepton und Frischhefe-Extrakt als Quellen für Stickstoff, Kohlenstoff, Vitamine und Aminosäuren. Das Frischhefe-Extrakt liefert mit Purin- und Pyrimidinbasen präformierte Nucleinsäure-Vorstufen, die ebenfalls obligatorisch für das Wachstum benötigt werden, da sie von den Mykoplasmen nicht synthetisiert werden können (WAITES et al. 2003). Zur Energiegewinnung nutzen die meisten Mykoplasmenspezies Glucose oder Arginin (MILES 1992), die beide den Medien zugegeben werden. Einige Mykoplasmenspezies, z.B. MS, benötigen weitere Zusätze wie Zystein oder Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) (RAZIN 1978), welches auch in Form von Nicotinamid zugegeben werden kann (BOETTGER et al. 2006). Um das Wachstum von Mykoplasmen im Flüssigmedium makroskopisch sichtbar zu machen, wird die Änderung des pH-Wertes durch deren Stoffwechselprodukte genutzt. Als pH-Indikator wird meist Phenolrot mit einem Umschlagbereich zwischen pH 6,4 und 8,2 eingesetzt. Wird Glucose oxidiert, entstehen Säuren, wodurch der pH-Wert sinkt und das Flüssigmedium sich von rot nach gelb umfärbt. Aus Arginin entsteht das alkalische Stoffwechselprodukt Ammonium, woraufhin der pH-Wert steigt und das Flüssigmedium sich rotviolett färbt (ALUOTTO 1970). Besonders wichtig ist die Überwachung des pH-Wertes bei Mykoplasmenspezies wie MS, da diese empfindlich auf starke Veränderungen reagieren. Bei Umfärbung des Flüssig-

mediums muss ein Teil der Probe zeitnah in frischem Medium subkultiviert werden, um das Absterben der Mykoplasmen infolge aufgebrauchter Nährstoffe zu verhindern. Eine Änderung des pH-Wertes kann jedoch auch auf das Wachstum von Kontaminanten, häufig zellwandbildenden Bakterien, hindeuten. Daher wird neben der Anzucht in Flüssigmedium immer ein Aliquot auf Agarplatten aufgebracht, auf denen das Wachstum von Mykoplasmenkolonien lichtmikroskopisch beurteilt wird (BRADBURY 1998). Eine ausführliche Beschreibung der Abläufe findet sich in Material und Methoden (siehe Abschnitt 3.2.1, Kultivierung von Mykoplasmen). Trotz der Zugabe von Penicillinen zur Hemmung zellwandbildender Bakterien und Thalliumacetat zur Hemmung von Bakterien- und Pilzwachstum treten bakterielle und mykotische Kontaminationen regelmäßig auf, welche die Anzucht erschweren oder sogar gänzlich verhindern können (KEMPF 1998; LIERZ et al. 2000b; LIERZ et al. 2002). Durch Ultrafiltration wird versucht, zellwandbildende Bakterien aus der Mykoplasmenkultur zu entfernen, da nur Mykoplasmen aufgrund der fehlenden Zellwand diese Bakterienfilter passieren können (BROWN et al. 2011). Eine große Herausforderung bei der Anzucht ist zudem die Überwucherung von langsam wachsenden, z.B. geflügelpathogenen, durch schneller wachsende, z.B. kommensale, Mykoplasmen (KEMPF 1998). Eine Möglichkeit, diese Spezies zu trennen, ist die direkte Ausplattierung mehrerer Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1.000) des Flüssigmediums, eine tägliche Beurteilung des Koloniewachstums auf Agarplatten, und die Identifizierung sowie gezielte Subkultivierung langsamer wachsender Kolonien. Identifiziert werden können langsamer wachsende Spezies in Mischkulturen auch durch Markierung der Kolonien mit spezifischen Kaninchen-Hyperimmunseren und deren Färbung mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunperoxidase (ROSENGARTEN et al. 1996) oder mittels Immunobinding Assay (KOTANI und MCGARRITY 1985). Ist die kontaminierende Spezies bekannt, kann deren Koloniewachstum auf einer Agarplatte gehemmt werden, indem ein spezifisches Kaninchen-Hyperimmunserum in einen ausgestanzten Bereich gegeben wird. In einem bestimmten Radius um dieses Serum befinden sich anschließend nur noch Kolonien anderer Spezies (DIERKS et al. 1967). Ein Ansatz für die Trennung von MG und apathogenen Mykoplasmen basiert auf Hühnerembryofibroblasten-Zellkulturen. Da nur MG in die Zellen eindringen kann, werden alle anderen Spezies, die nicht invasiv sind, durch die Behandlung der Zellkultur mit Gentamicin abgetötet (BOETTGER und DOHMS 2006). Bislang ist es jedoch mit keiner Methode zuverlässig möglich, Mykoplasmen-Reinkulturen zu erhalten (BRADBURY et al. 2001b).

Trotz dieser Herausforderungen bietet die Anzucht insbesondere für die Mykoplasmen-diagnostik bei Vogelspezies, die nicht zum Geflügel zählen, deutliche Vorteile gegenüber spezifischeren Methoden. Gerade bei Wildvögeln ist meist nicht bekannt, welche Mykoplasmen bei dieser Vogelspezies vorkommen, sodass mittels der verhältnismäßig unspezifischen Anzucht ein möglichst breites Spektrum erfasst wird (SUÁREZ-PÉREZ 2011). Zudem werden Isolate bei vielen Methoden der Speziesidentifizierung benötigt (BROWN et al. 2007; FEBERWEE et al. 2009). Da molekularbiologische Methoden meist sensitiver sind, werden nach Möglichkeit Anzucht und PCR parallel durchgeführt, um ein exaktes Bild zu erhalten (LIERZ et al. 2007b).

### **2.3.1.2 Identifizierung von Mykoplasmenisolaten**

Zur Identifizierung der Isolate werden verschiedene Methoden verwendet (Abbildung 4), die meist auf antigenetischen Eigenschaften der Mykoplasmen basieren. Bei Immunfluoreszenztests (IFT) (GARDELLA et al. 1983) und dem Immunobinding Assay (IBA) (KOTANI und MCGARRITY 1985) binden spezifische Antikörper aus Kaninchen-Hyperimmunseren an bestimmte Antigene in den Mykoplasmenkolonien. In einem Waschvorgang werden nicht gebundene Kaninchen-Antikörper entfernt und ein zweiter Antikörper zugegeben, der wiederum an die Kaninchen-Antikörper bindet (anti-Kaninchen-Antikörper, Engl. anti-rabbit-antibody). Dieser ist mit einer Substanz verbunden (konjugiert), welche z.B. mit einem zugegebenen Farbstoff reagiert. Bei einer positiven Reaktion bindet beim IFT ein Fluoreszenzfarbstoff, der im Fluoreszenzmikroskop bei bestimmten Wellenlängen grünes Licht emittiert. Beim IBA sind die anti-Kaninchen-Antikörper Peroxidase-konjugiert, sodass sich der zugegebene Farbstoff bei Kontakt mit diesen Antikörpern durch Oxidation blau färbt (HAGEN 2007). Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) basieren auf dem gleichen Prinzip, bei dieser Methode werden jedoch statt der Kaninchen-Hyperimmunseren häufig monoklonale Antikörper verwendet, um die Spezifität zu erhöhen (MAY et al. 1997). Eine andere Methode ist der Wachstumshemmtest bzw. Growth Inhibition (GI) Test. Bei diesem wird die Hemmzone des Koloniewachstums auf einer Agarplatte beurteilt, bei der ein spezifisches Kaninchen-Hyperimmunserum in einen ausgestanzten Bereich gegeben wird (DIERKS et al. 1967). Eine sichere Speziesidentifizierung mittels GI-Test kann nur anhand von Reinkulturen durchgeführt werden, während IBA, IFT und ELISA auch bei Mischkulturen



eingesetzt werden. Diese Methoden dienen ausschließlich der Identifikation von Mykoplasmen bekannter Spezies, da nur für diese spezifische Kaninchen-Hyperimmunseren existieren. Da es eine Reihe von Kreuzreaktionen gibt, sind diese Untersuchungen jedoch auch bei diesen Spezies nicht immer zielführend (BEN ABDELMOUMEN et al. 1995). Problematisch sind Kreuzreaktionen insbesondere bei der Identifizierung potentiell neuer Spezies oder unerwarteter Spezies (ROSENGARTEN und YOGEV 1996). Die biochemische Differenzierung („bunte Reihe“) hat bei Mykoplasmen wegen ihres reduzierten Stoffwechsels diagnostisch eine nur sehr eingeschränkte Aussagekraft (POVEDA 1998). Standardisiert wurden die Verfahren zur Untersuchung der Fermentation von Glucose sowie Hydrolyse von Arginin und Harnstoff (ALUOTTO 1970). Während die meisten *Mycoplasma* spp. Glucose oder Arginin als Energiequelle nutzen, unterscheiden sich *Ureaplasma* spp. von diesen durch das Enzym Urease. Dieses Enzym ist in der Lage, Harnstoff in Ammonium- und Carbonat- bzw. Hydrogencarbonat-Ionen zu spalten (FURR 1998). Biochemische Untersuchungen sind sehr aufwendig, da zunächst Reinkulturen erzeugt und diese in mehreren Schritten an Medien mit reduzierten Inhaltsstoffen angepasst werden müssen. Mithilfe dieser vereinfachten Medien werden unerwünschte Reaktionen mit einem der zahlreichen Inhaltsstoffe vermieden, die in den komplexen Anzuchtmedien enthalten sind. Nach Anpassung der Mykoplasmen an die Medien mit reduzierten Inhaltsstoffen findet die eigentliche biochemische Untersuchung in den Testmedien jeweils mit und ohne Glucose, Arginin und Harnstoff statt (POVEDA 1998). Der Test dauert mindestens vier Wochen und ist abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und Anpassungsfähigkeit der jeweiligen Mykoplasmenspezies. Im Entwicklungsstadium befindet sich die Anwendung weiterer Methoden, darunter Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) (NEVILLE et al. 2011) und Silver Nanorod Surface-Enhanced Raman-Spektrometrie (HENNIGAN et al. 2012). Beide Methoden machen sich die Spezifität von Massenspektren zunutze, die bei der Anregung von Isolaten durch Laserstrahlen entstehen.

Bewährt hat sich zur Identifikation aviärer Mykoplasmen eine Kombination aus Anzucht und molekularbiologischer Untersuchung. Dabei werden zunächst mittels Einzelkolonie-Subkulturen Reinkulturen gewonnen. Aus diesen wird DNA isoliert und mittels genusspezifischer PCR das 16S-rRNA-Gen oder die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) amplifiziert. Das Amplikon wird anschließend sequenziert (SUÁREZ-PÉREZ 2011) und die Sequenz schließlich mit hinterlegten Sequenzen aus Referenz-

datenbanken, z.B. GenBank, abgeglichen. Für Mischkulturen bzw. bei Mischinfektionen, die vor allem bei Wildvögeln regelmäßig vorkommen (POVEDA et al. 1990a; SUÁREZ-PÉREZ 2011), ist die direkte Amplifikation mittels genuspezifischer PCR nur bedingt geeignet. Unterschiedliche Sequenzen können dabei zu Signalüberlagerungen führen, sodass das Ergebnis häufig nicht auswertbar ist. Daher ist auch hier die Anlage neuer Subkulturen sinnvoll, um Reinkulturen zu erhalten.

### 2.3.1.3 Molekularbiologische Nachweismethoden

Da die Mykoplasmenkultivierung mit hohem Aufwand, Kosten und einem Zeitraum von mehreren Wochen bis zu einer Diagnose verbunden ist, werden in der Routinediagnostik hauptsächlich molekularbiologische Methoden für den Erregernachweis verwendet. Molekularbiologische Methoden basieren in der Regel auf der Amplifikation spezifischer Gene mittels Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) (NOORMOHAMMADI 2013). Unterschieden werden dabei speziesspezifische PCR, bei denen eine Mykoplasmenart detektiert wird, und Multiplex-PCR, die mehrere definierte Mykoplasmenarten detektieren. Außerdem gibt es genuspezifische bzw. Multispezies-PCR, die viele oder vermeintlich alle Spezies des Genus *Mycoplasma* und teilweise auch weiterer Genera detektieren.

Gezielt auf geflügelpathogene Mykoplasmenarten werden hauptsächlich Wirtschaftsgeflügelbestände, aber auch Fasane und andere Wildvögel, untersucht (BRADBURY et al. 2000). Dabei kommen sowohl konventionelle als auch real-time PCR, meist als speziesspezifische oder Multiplex-PCR, zum Einsatz (Tabellen 5, 6). Benötigt werden für diese Methoden Genabschnitte, die sich deutlich zwischen den Mykoplasmenarten, jedoch kaum innerhalb einer Art, unterscheiden (RAMÍREZ et al. 2006). Speziell für geflügelpathogene Mykoplasmen wurden PCR auf Basis einer Reihe verschiedener Gene entwickelt (Tabelle 5), darunter das 16S-rRNA-Gen, die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS), das Gen für das *M. gallisepticum*-Cytadhesin-2 (*mgc2*), das Gen für das hochkonservierte GTP-bindende Protein (Obg), das Gen für das hypothetische Protein von MG (MAG\_0319) sowie das Gen für das variable Lipoprotein Hämagglutinin A (*vlhA*). Neben der reinen Detektion werden speziesspezifische PCR auch zur Differenzierung zwischen Impf- und Feldstämmen (SHAHID et al. 2014) eingesetzt.

Relativ neu ist das sogenannte „Multi locus sequence typing“ (MLST). Bei dieser Methode werden mehrere verschiedene Loci des bakteriellen Genoms mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Anhand dieser Sequenzen ist die Unterscheidung von Stämmen innerhalb einer Spezies möglich. MLST dient unter anderem zum Nachweis epidemiologischer Zusammenhänge und kann damit beispielsweise zur Verbesserung von Kontroll- und Eradikationsprogrammen für *M. synoviae* beim Wirtschaftsgeflügel eingesetzt werden (CIZELJ et al. 2015; DIJKMAN et al. 2016). Speziesspezifische PCR werden auch zur Detektion von Mutationen eingesetzt (JEFFERY et al. 2007). Dabei werden insbesondere real-time PCR mit anschließender High-Resolution Melting-Curve Analysis (HRM) verwendet. Mit dieser Methode wird der Schmelzpunkt des Amplikons so genau bestimmt, sodass auf diese Weise bereits der Austausch einer Base festgestellt werden kann (WITWER et al. 2003; ZHOU et al. 2005; YANG et al. 2009). Speziesspezifische und Multiplex-PCR bieten den Vorteil, dass gezielt auf einzelne Spezies untersucht werden kann, ohne andere Spezies mit zu erfassen. Sinnvoll ist diese Herangehensweise beispielsweise im Rahmen der Bestandsdiagnostik beim Nutzgeflügel, da hier kommensale Mykoplasmen keine Rolle spielen und damit auch nicht mit erfasst werden sollen. Ist das Ergebnis der PCR negativ, wird damit jedoch auch nur das Vorkommen einer bzw. weniger Spezies ausgeschlossen.

Für die Mykoplasmandiagnostik bei anderen Vogelspezies, bei denen das Spektrum an möglichen Mykoplasmenarten unbekannt ist, sind speziesspezifische und Multiplex-PCR hingegen nur sehr eingeschränkt einsetzbar (LIERZ 2009).

## LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 5: Auswahl speziesspezifischer und Multiplex-Mykoplasmen-PCR, Übersicht möglicher Zielgene und Methoden

Detektierte Spezies	Zielgen(e)	Methodik, Kommentar	Quelle
<b>Speziesspezifische PCR</b>			
MG	16S-rRNA	Real-time PCR; keine Unterscheidung von <i>M. imitans</i>	MEKKES und FEBERWEE (2005)
MG	ITS <i>mgc2</i> MGA_0319 <i>gapA</i>	Aufbau einer Datenbank	ARMOUR et al. (2013)
MG	Lipoprotein	Real-time PCR	KAHYA et al. (2010)
MS	ITS 23S-rRNA		RAMÍREZ et al. (2006)
MS	<i>vlhA</i>	JEFFERY et al. 2007: Real-time-PCR-HRM assay	HONG et al. (2004) JEFFERY et al. (2007) HAMMOND et al. (2009)
MS	<i>Obg</i>	HRM; Differenzierung von Impfstamm	SHAHID et al. (2014)
MI	ITS 23S-rRNA		RAMÍREZ et al. (2012)
MG/ <i>M. imitans</i> , MS, MM, MI	16S-rRNA		LIERZ et al. (2008c)
<i>M. buteonis</i> , <i>M. falconis</i> , <i>M. gypis</i> , <i>M. corogypsi</i>	16S-rRNA		LIERZ et al. (2008d)
<b>Multiplex-PCR</b>			
MG, MS, MM, MI	MG: <i>mgc2</i> ; MS, MM: ITS; MI: 16S-rRNA	Real-time TaqMan PCR	RAVIV und KLEVEN (2009)
MG, MS	Nicht aufgeführt	Real-time TaqMan PCR mit interner Kontrolle	SPRYGIN et al. (2010)
MG, MS	MG: Lipoprotein MS: 16S-rRNA	Real-time PCR	FRAGA et al. (2013)

*M.* = *Mycoplasma*, MG = *M. gallisepticum*, MS = *M. synoviae*, MI = *M. iowae*, MM = *M. meleagridis*, ITS = 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region, rRNA = ribosomale Ribonucleinsäure, *mgc2* = MG cytoadhesin 2, *gapA* = Zytadherenzprotein von MG, MGA\_0319 = hypothetisches Protein von MG, *Obg* = hochkonserviertes Guanosin-triphosphat-bindendes Protein, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

## LITERATURÜBERSICHT

Für Vogelspezies mit unbekanntem Mykoplasmenspektrum werden daher genus-spezifische bzw. Multispezies-PCR eingesetzt (Tabelle 6). Dabei werden alle Spezies innerhalb eines Genus bzw. ein breites Spektrum verschiedener Spezies des Genus erfasst. Für diese Methode geeignete Genabschnitte bestehen aus Bereichen, die innerhalb des Genus *Mycoplasma* hochkonserviert sind und damit bei allen Spezies die gleiche Sequenz haben. In anderen Bereichen müssen die Sequenzen dieser Genabschnitte wiederum Speziesunterschiede aufweisen, damit nach der Detektion auch eine Identifikation der einzelnen Spezies durch Restriktionsenzymanalyse oder eine Sequenzierung möglich ist (RAMÍREZ et al. 2008).

Tabelle 6: Ausgewählte genuspezifische und Multispezies-PCR, Übersicht möglicher Zielgene und Methoden

Detektierte Spezies	Zielgen(e)	Methodik, Kommentar	Quelle
<b>Genusspezifische bzw. Multispezies-PCR</b>			
<i>Mycoplasma, Acholeplasma, Spiroplasma, Ureaplasma</i>	16S-rRNA		VAN KUPPEVELD et al. (1992)
Genus <i>Mycoplasma</i>	ITS	Keine Spezifitätsuntersuchungen	RAMÍREZ et al. (2008)
<i>Mollicutes</i>	ITS		VOLOKHOV et al. (2006)
<i>Mollicutes</i>	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i>	3 separate PCR	VOLOKHOV et al. (2007)
Genus <i>Mycoplasma</i>	ITS	real-time PCR-HRM-assay; nur wenige Spezies getestet	REBELO et al. (2011)

PCR = Polymerase-Kettenreaktion(en); rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure, ITS = 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region, *gyrA/B* = Gyrase Subunit A/B, *rpoB* = RNA-Polymerase-Betauntereinheit B, HRM = High-Resolution Melting-Curve Analysis

Für genuspezifische PCR kommen eine Reihe verschiedener Zielgene infrage. Geeignet sind das 16S-rRNA-Gen, auf welchem die Taxonomie der *Mollicutes* basiert (BROWN et al. 2011), sowie die nicht kodierende 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) und das proteinkodierende Gen der Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase (RNA-Polymerase-beta-subunit-Gen, *rpoB*). Bei der ITS und dem *rpoB*-Gen sind die Unterschiede zwischen den Spezies deutlicher ausgeprägt als bei dem 16S-rRNA-Gen (Tabelle 7), sodass sich diese insbesondere für die Differenzierung nah verwandter Spezies eignen. Zudem sind diese Sequenzen von allen *Mollicutes* öffentlich zugänglich (RAMÍREZ et al. 2008; VOLOKHOV et al. 2012). Einige Mykoplasmenspezies haben jedoch

eine zusätzliche Kopie der ITS mit Insertion oder Deletion in ihrem Genom, sodass bei einer direkten Sequenzierung keine eindeutige Sequenz identifizierbar ist. In diesen Fällen muss vor der Sequenzierung die ITS in einen Plasmidvektor kloniert werden (VOLOKHOV et al. 2012). Anstelle der Sequenzierung werden weiterhin auch einfachere Methoden der Speziesdifferenzierung eingesetzt. Dazu zählt die Restriktionsfragmentanalyse, die auf dem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP, restriction fragment length polymorphism) bestimmter DNA-Abschnitte des Genoms beruht. Bei der Analyse wird das Amplikon mit Restriktionsenzymen geschnitten und per Gelelektrophorese untersucht (LIERZ et al. 2008c). Häufiger verwendet wird die Weiterentwicklung dieser Methode, die AFLP (Amplified-fragment length polymorphism) (CHERRY et al. 2006). Eingesetzt werden diese Methoden unter anderem zum Ausschluss falschpositiver Ergebnisse (LIERZ et al. 2008c) sowie zur Differenzierung bei speziesspezifischen PCR, die bekannte Kreuzreaktionen mit einer nah verwandten Spezies, beispielsweise MG und *M. imitans*, aufweisen (HAGEN 2007). Nicht zielführend sind sowohl die Sequenzierung als auch die Restriktionsfragmentanalyse bei Mischkulturen, da es durch die Überlagerung unterschiedlicher Sequenzen zu Signalüberlagerungen bzw. nicht interpretierbaren Fragmentmustern kommen kann.

Zur Diagnostik aviärer Mykoplasmen bei Vogelspezies mit unbekanntem Mykoplasmenspektrum empfiehlt sich die parallele Untersuchung mittels Anzucht und PCR, da so die Vorteile beider Methoden genutzt werden können (LIERZ 2009). Mittels PCR können im Gegensatz zur Anzucht Mykoplasmen direkt und auch in kontaminierten Proben detektiert werden, zudem weisen diese eine höhere Sensitivität auf (BRADBURY et al. 2001b; LIERZ et al. 2007b; LIERZ et al. 2008d). Im Gegenzug können durch Anzucht auch Mykoplasmen erkannt werden, die vor allem bei Mischkulturen mit bekannten Spezies bei molekularbiologischer Untersuchung schneller übersehen werden können (LIERZ et al. 2008b; LIERZ et al. 2008d). Eine zweite Untersuchungsmethode ist auch sinnvoll, da bereits eine oder wenige Mutationen im Bereich der Zielsequenz der Primer (FEBERWEE et al. 2005) oder Inhibitoren der Amplifikation zu falschnegativen PCR-Ergebnissen führen (KEMPF 1998).

### 2.3.2 Indirekte Nachweisverfahren

Der indirekte Nachweis einer Mykoplasmeninfektion erfolgt durch serologische Methoden. Dabei werden die Antikörper gegen bestimmte Mykoplasmenarten mittels Serumschnellagglutination (SSA), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Hämagglutinationsshemmtest (HAH) nachgewiesen (Abbildung 4). Da die Serologie schneller, einfacher durchzuführen und kostengünstiger ist als direkte Nachweismethoden, ist sie in der Herdendiagnostik beim Wirtschaftsgeflügel weit verbreitet. Für die Untersuchung von Geflügel auf Antikörper gegen die geflügelpathogene Mykoplasmen MG, MS, MM und MI sind zahlreiche Testsysteme etabliert und kommerziell erhältlich (FEWERWEE et al. 2005; KAHYA et al. 2010). Für andere Vogelspezies sind diese Testsysteme jedoch nicht validiert (NADEEM et al. 2014). Dies hat häufig falsch-negative Untersuchungsergebnisse zur Folge, sodass beispielsweise Prävalenzen zu niedrig eingeschätzt werden (KLEVEN und FLETCHER 1983; YAMADA und MATSUO 1983a; DHONDT et al. 2014). Auch die Bedeutung positiver serologischer Ergebnisse bei nicht-Geflügelspezies ist unklar (HOLLAMBY et al. 2003; HAGEN et al. 2004). Da serologische Tests zudem häufig eine geringe Spezifität haben, sollten positive Befunde, auch beim Wirtschaftsgeflügel, immer durch andere Methoden bestätigt werden (CHARLTON 2000). Da die Aussagekraft indirekter Nachweisverfahren für alle Vogel- und Mykoplasmenarten außer des Geflügels bzw. der geflügelpathogenen Spezies limitiert ist, basiert die Diagnostik weitestgehend auf direkten Nachweisverfahren.

### 2.4 Beschreibung neuer Spezies der Klasse Mollicutes

Die Mindestanforderungen für die Beschreibung neuer Spezies der Klasse Mollicutes werden durch das „International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) Subcommittee on Taxonomy of Mollicutes“ festgelegt. Diesen Anforderungen zugrunde liegt ein polyphasischer taxonomischer Ansatz mit einer Kombination aus 16S-rRNA-Gensequenzanalyse, serologischen Untersuchungen sowie ergänzenden phänotypischen Daten (BROWN et al. 2007). Für die Beschreibung einer neuen Spezies muss dargelegt werden, dass sich ein Isolat einer potentiell neuen Art signifikant von allen vorher beschriebenen Spezies unterscheidet. Mollicutes („Weichhäuter“) werden durch das Fehlen einer Zellwand charakterisiert (EDWARD und FREUNDT 1967), welches bei der Beschreibung einer neuen Spezies *in vitro* durch Ultrafiltration bestätigt wird. Die meisten Mykoplasmen-Anzuchtmedien enthalten Antibiotika, welche die Zellwandsynthese hemmen. Potentiell können sich in diesen Medien auch Bakterien mit geschädigter Zellwand vermehren, welche mit Mollicutes verwechselt werden können. Aufgrund dessen muss die Reversion eines zellwandgeschädigten Bakteriums zu einem Bakterium mit intakter Zellwand ausgeschlossen werden. Dazu wird meist eine wiederholte Subkultivierung in antibiotikafreiem Medium und anschließender Beurteilung der Zellen bzw. Kulturen durchgeführt (BROWN et al. 2007). Beschrieben werden auch die Zell- und Koloniemorphologie durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen (GYLSTORFF und BOVÉ 1985). Evaluiert wird zudem die Cholesterinabhängigkeit des Wachstums (FREUNDT et al. 1973). Diese Untersuchung dient der Abgrenzung des Genus *Asteroleplasma* sowie der Ordnung Acholeplasmatales, die im Gegensatz zu allen anderen Mollicutes kein cholesterinabhängiges Wachstum aufweisen (siehe Tabelle 1). Da Mykoplasmen ein sehr begrenztes Repertoire metabolischer StoffwechsellLeistungen haben und somit Spezies auf diese Weise nur sehr eingeschränkt differenzierbar sind, sind nur drei biochemische Untersuchungen im Rahmen der Speziesbeschreibung durchzuführen: Von Bedeutung sind die Hydrolyse von Arginin und die Fermentation von Glucose, da bei den meisten MykoplasmenSpezies einer dieser beiden Stoffe als Energielieferant dient. Wichtig ist außerdem die Hydrolyse von Harnstoff, die der Abgrenzung von *Ureaplasma* spp. dient (ALUOTTO 1970). Als weitere phänotypische Eigenschaften werden die optimale Wachstumstemperatur und der Wachstumstemperaturbereich ermittelt (KONAI et al. 1996).



Die Taxonomie der Mollicutes basiert auf der Sequenz des 16S-rRNA-Gens. Neben dieser Sequenz werden Spezies der Klasse Mollicutes hauptsächlich anhand ihrer antigenetischen Eigenschaften differenziert, welche serologisch charakterisiert werden (VOLOKHOV et al. 2012). Für die Beschreibung muss die potentielle neue Spezies so ausführlich wie möglich serologisch gegen nah verwandte Spezies abgegrenzt werden. Dazu zählen alle Spezies, deren 16S-rRNA-Gensequenzen mit derjenigen der potentiell neuen Spezies über 94% Übereinstimmung zeigen und somit einer monophyletischen Gruppe angehören, bzw. die aus demselben Habitat stammen (BROWN et al. 2007). Dabei wird zunächst die potentielle neue Spezies gegen Antiseren der Referenzstämme der entsprechenden Spezies getestet. Im nächsten Schritt muss polyklonales Kaninchen-Hyperimmunserum gegen die potentielle neue Spezies hergestellt und gegen die entsprechenden Referenzstämme anderer Spezies getestet werden. Die Aussagekraft der serologischen Untersuchung ist jedoch umstritten, da es einerseits eine Reihe von Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Spezies gibt, andererseits auch innerhalb einer Spezies eine deutliche antigenetische Heterogenität auftreten kann (WHITCOMB et al. 1995; ROSENGARTEN und YOGEV 1996).

Für die Beschreibung einer neuen Spezies müssen zudem molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Da die Sequenz des 16S-rRNA-Gens die Basis der Taxonomie der Mollicutes bildet, muss diese Sequenz bestimmt und in einer öffentlichen Datenbank (z.B. GenBank®) hinterlegt werden, sowie eine phylogenetische Analyse der Verwandtschaft zwischen der 16S-rRNA-Gensequenz der potentiell neuen Spezies und derjenigen von verwandten Spezies durchgeführt werden. Aufgrund der engen Verwandtschaft können die Unterschiede zwischen 16S-rRNA-Gensequenzen teilweise sehr gering sein (siehe Tabelle 7). Daher ist es sinnvoll, weitere Gensequenzen zu analysieren und in die Beschreibung mit einzubeziehen. Als geeignet erwiesen haben sich hier die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) und das RNA-Polymerase-beta-subunit (*rpoB*)-Gen. Beide Genabschnitte sind bei Mykoplasmen hochkonserviert, haben eine höhere Variabilität zwischen verschiedenen Spezies als das 16S-rRNA-Gen (siehe Tabelle 7) und deren Sequenzen sind von allen Referenzstämmen öffentlich zugänglich (VOLOKHOV et al. 2006; RAMÍREZ et al. 2008; VOLOKHOV et al. 2012).

## LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 7: Durchschnittliche Sequenzhomologie zwischen Spezies verschiedener phylogenetischer Einheiten der Klasse Mollicutes: Vergleich der Sequenzhomologien des 16S-rRNA-Gens, der ITS und des *rpoB*-Gens. Modifiziert nach VOLOKHOV et al. (2012)

Sequenzhomologie [%]			
Phylogenetische Einheit	16S-rRNA-Gen	ITS	rpoB-Gen
Bovis-Lipophilum-Cluster	93,58 ± 2,17	83,26 ± 4,93	79,11 ± 5,15
Hominis-Cluster	94,58 ± 2,56	83,61 ± 7,74	80,22 ± 4,99
Neurolyticum-Hyopneumoniae-Cluster	90,76 ± 4,47	71,59 ± 11,86	75,74 ± 8,36
Mycooides-Entomoplasmataceae-Cluster	94,03 ± 3,07	79,12 ± 13,31	82,70 ± 6,07
Mycooides-Cluster	96,93 ± 2,81	94,95 ± 3,37	91,56 ± 5,72
Synoviae-Cluster	93,53 ± 1,97	83,05 ± 5,62	78,98 ± 5,30
Mycoplasma-Ureaplasma-Klade	78,76 ± 7,94	69,92 ± 11,05	67,94 ± 8,89
Ureaplasmen	95,55 ± 2,23	87,36 ± 6,37	67,94 ± 8,89
Genitalium-Pneumoniae-Cluster	92,78 ± 4,06	77,82 ± 12,36	72,65 ± 11,78

rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure, ITS = 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region; rpoB = RNA-Polymerase-Betauntereinheit B

Als Speziesgrenze wird bei Mollicutes allgemein eine 16S-rRNA-Gensequenzhomologie von 97% angenommen (STACKEBRANDT et al. 1994). Liegen Homologien darüber, sollten die beiden Spezies zusätzlich anhand einer DNA-DNA-Hybridisierung differenziert werden (STACKEBRANDT 2002). Bei der Beschreibung neuer Spezies der Mollicutes zeigte sich, dass die Ergebnisse der Serologie sehr gut mit den Ergebnissen der DNA-DNA-Hybridisierung übereinstimmen, sodass diese bis auf wenige Ausnahmen, z. B. bei der Differenzierung von MG und *M. imitans*, als nicht notwendig erachtet wird (BRADBURY et al. 1993; BROWN et al. 2007). Die Untersuchung des mol%-Gehaltes an Guanidin und Cytosin (G+C-Gehalt) der DNA wird durchgeführt, wenn die neu zu beschreibende Spezies auch einem neuen Genus zugeordnet werden soll. Bei der Beschreibung neuer

Spezies innerhalb eines etablierten Genus wird diese Untersuchung als optional angesehen (STACKEBRANDT 2002).

Formal muss für die Beschreibung einer Spezies ein Isolat als Typstamm definiert werden und, möglichst mit weiteren Isolaten derselben Spezies, bei zwei anerkannten Stammsammlungen hinterlegt werden (BROWN et al. 2007). Anerkannt sind z.B. die American Type Culture Collection (ATCC), die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder die National Collection of Type Cultures (NCTC) in Großbritannien. Zusätzlich muss das hergestellte Kaninchen-Hyperimmunserum gegen den Typstamm bei einer nicht näher definierten anerkannten Sammlung hinterlegt werden (BROWN et al. 2007). Zuletzt wird die neue Spezies einer Ordnung, Familie und Gattung in der Klasse Mollicutes zugeordnet und ein spezifischer Speziesname vergeben. Zusammen mit einer Beschreibung der Methoden, anhand derer die neue Spezies eindeutig identifizierbar ist, wird die vollständige Beschreibung der Spezies im International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology oder einer anderen auflagenstarken wissenschaftlichen Zeitschrift publiziert (BROWN et al. 2007).

## 2.5 Der Weißstorch

Der Weißstorch (*Ciconia ciconia*) lebt als Kulturfolger in engem Kontakt zur Landwirtschaft und zum Menschen und dient als Indikatorspezies für intakte Habitate mit hoher Biodiversität. Der Weltbestand der Weißstörche wird auf 233.000 Paare (HPa) geschätzt. In den letzten 10 Jahren nahm die Population dabei um über 40% zu (THOMSEN 2013). In Deutschland liegt die Brutpopulation derzeit bei etwa 4.000 Brutpaaren, wobei hier die Population aufgrund niedriger Reproduktionsraten und hoher Mortalität als instabil gilt. Über 90% dieser Brutpopulation befinden sich in den Bundesländern, die zum Wassereinzugsgebiet der Elbe gehören (siehe Abbildung 5) (KAATZ et al. 2013).

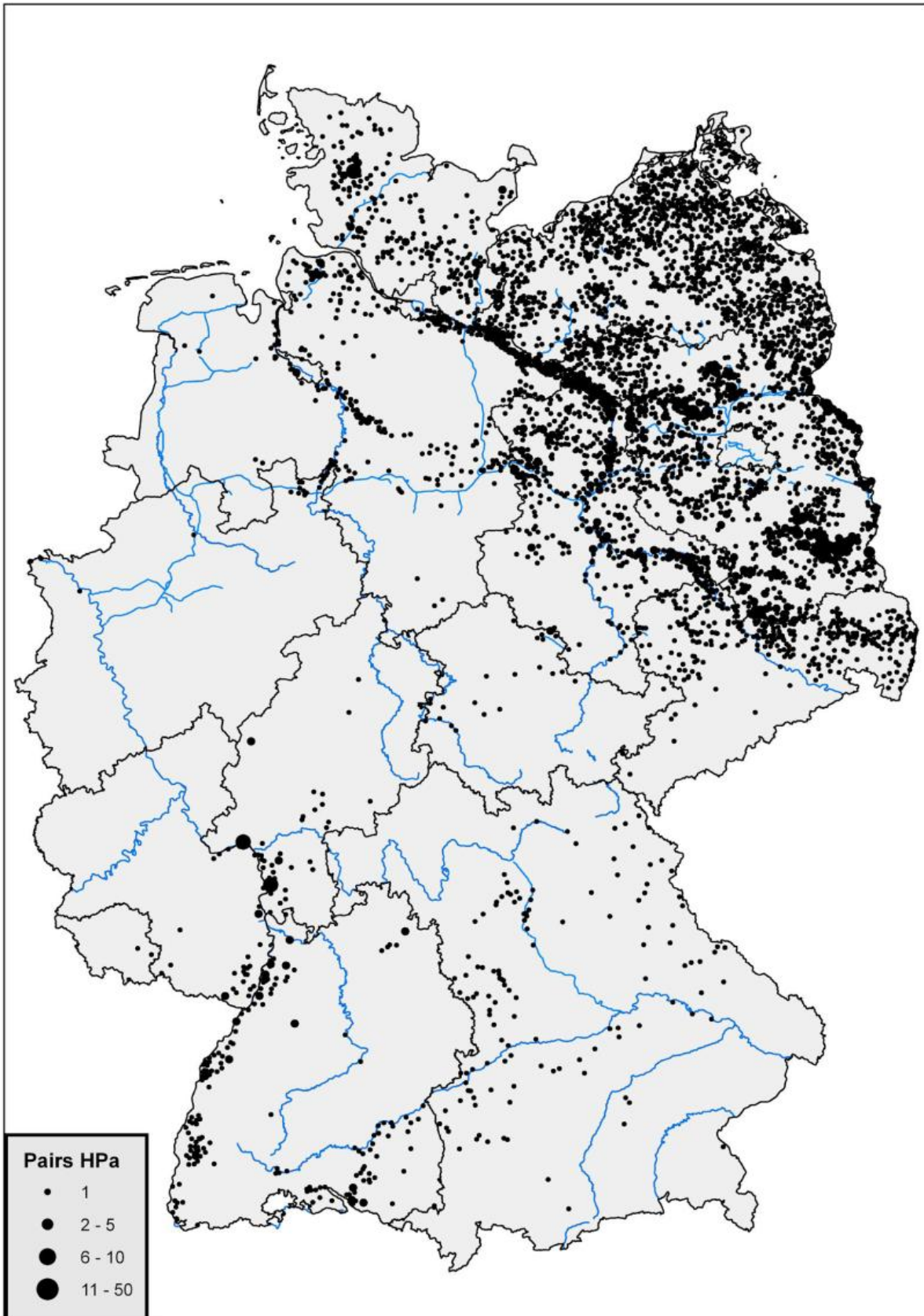


Abbildung 5: Verbreitung der Weißstorch-Brutpaare in Deutschland 2004. Aus: KAATZ und KAATZ (2013)

HPa = Horst-Paar

### 2.5.1 Biologie des Weißstorches

Als Zugvogel ist der Weißstorch in Europa, Nordafrika und im Mittleren Osten heimisch. Es gibt zwei Subspezies. *C. c. ciconia* (LINNAEUS 1758), welcher in Europa, Westasien und Südafrika brütet und meist im tropischen Afrika und Südafrika überwintert. *C. c. asiatica* (Severtsov 1873) kommt in Zentralasien vor und überwintert im Gebiet von Iran bis Indien. Da Weißstörche von ihren Brutgebieten in Europa lange Strecken zu ihren Winterquartieren in Afrika zurücklegen, stellen sie eine epidemiologische Verbindung für eine mögliche Übertragung infektiöser Erreger zwischen den beiden Kontinenten dar (KALETA und KUMMERFELD 2012).

Als Habitate nutzen Weißstörche dabei überwiegend offene Landschaften. Sumpfbereiche werden insbesondere in den paläarktischen Regionen (Europa, Asien nördlich des Himalaya, Nordafrika, nördliches Arabien) bevorzugt. In Afrika sind sie in Steppen, Wiesenflächen, Savannen und Ackerland in Wassernähe anzutreffen (ELLIOT 1992). Weißstörche haben ein sehr breites Futterspektrum. Dazu gehören Kleinsäuger, große Insekten, juvenile und adulte Amphibien, Reptilien, Würmer, Fische etc. (TRYJANOWSKI et al. 2002). Des Weiteren fressen Weißstörche aber auch Wiesel (*Mustela nivalis*), sowie junge Ziegen und Kitten (*Felis silvestris catus*), selten außerdem Küken und Eier bodenbrütender Vogelarten (ELLIOT 1992). Als Futterquellen dienen dem Weißstorch gemähte Wiesen (JOHST et al. 2001), häufig aber auch Mülldeponien (HÖFLE et al. 2012). Vor allem im Winter führen Mülldeponien zu einer durchgängigen Verfügbarkeit von Nahrung. Zusammen mit den zunehmend milderen Wintern aufgrund der Klimaerwärmung führt dies dazu, dass ein Teil der Weißstorchpopulation nicht mehr zu den angestammten Winterquartieren zieht, sondern in Europa überwintert (MASSEMIN-CHALLET et al. 2006; GILBERT et al. 2016). Zusätzlich erweiterte sich das Futterspektrum mit dem in den 1970er Jahren aus Nordamerika eingeschleppten Neozoen *Procambarus clarkii*, dem roten amerikanischen Sumpfkrebs (GILBERT et al. 2016).

Neben der Futtersuche findet auch der Nestbau oft in unmittelbarer Nähe zum Menschen statt. Nester („Horste“) der Weißstörche finden sich häufig auf Hausdächern, Te-telegrafenmasten, oder anderen menschlichen Bauwerken (HÖFLE et al. 2012). Das selbe Nest wird dabei von den Elterntieren meist mehrere Jahre in Folge aufgesucht (VERGARA et al. 2006). In der Regel besteht ein Gelege aus vier Eiern, wobei die Gelegegröße von der Kondition der Elterntiere abhängt (SASVÁRI et al. 2001). Die Brut-

saison beginnt in den paläarktischen Regionen im Februar bis April (ELLIOT 1992). Die Küken schlüpfen nach einer Brutdauer von 33-34 Tagen. Als Nesthocker erreichen sie innerhalb von drei Wochen ein Gewicht von 1,7 kg. Bis zu diesem Alter können sie ihre Körpertemperatur nicht selbstständig regulieren und sind in dem Zeitraum somit besonders empfindlich gegen Witterungseinflüsse (TORTOSA et al. 2003; OLIAS et al. 2010). Im Alter von 8-9 Wochen werden die Jungstörche flügge. Geschlechtsreif werden Weißstörche mit durchschnittlich vier Jahren. Weißstörche können über 30 Jahre alt werden. Der älteste in freier Wildbahn anhand seines Ringes identifizierte Weißstorch war männlich und über 33 Jahre alt, wobei dieser Storch im Alter von 32 Jahren noch erfolgreich drei Junge aufgezogen hatte (ELLIOT 1992).

### **2.5.2 Übersicht mikrobiologischer und toxikologischer Befunde bei Weißstörchen**

Wie bei anderen Wildtierpopulationen können auch in der Weißstorchpopulation Wirt und Erreger nicht isoliert betrachtet werden. Neben der Pathogenität und Virulenz der Erreger beeinflussen zahlreiche Umweltfaktoren den Verlauf einer Infektion (WOBESER 2006). Weißstorchnestlinge unter drei Wochen bzw. unterhalb des kritischen Körpergewichtes von 1,7 kg sind besonders anfällig für Umwelteinflüsse, da sie ihre Körpertemperatur nicht selbstständig halten können (TORTOSA und CASTRO 2003; OLIAS et al. 2010). Zu einer hohen Mortalität bei Nestlingen kommt es in Jahren mit hohen Niederschlägen in den Monaten April und Mai (JOVANI et al. 2004). Der Faktor Wetter spielt vor allem bei schlechter Nahrungsverfügbarkeit eine Rolle. Steht ausreichend Futter zur Verfügung, nehmen die Nestlinge schneller zu, können früher ihre Körpertemperatur konstant halten und überwinden so rascher die kritische Phase (TORTOSA und CASTRO 2003). Während die bessere Nahrungsverfügbarkeit in der Nähe des Menschen somit einen positiven Einfluss auf die Population hat (AGUIRRE et al. 2007), sind Weißstörche dadurch andererseits vermehrt Schwermetall- (Cadmium, Blei, Quecksilber, Eisen, Zink) und Halbmetallverbindungen (Selen, Arsen) ausgesetzt. Quellen sind Mülldeponien und kontaminierte Böden durch industrielle (KULCZYKOWSKA et al. 2007) und landwirtschaftliche Nutzung mit Ausbringen von kompostiertem Hausmüll, Jauche, Mist und Pestiziden. Schwermetalle gelangen einerseits direkt über die Aufnahme von Bodenbestandteilen aber auch indirekt über Rückstände in Pflanzen und Beutetieren in die

Weißstörche (DE LA CASA-RESINO et al. 2014). Während in einer Untersuchung kein Einfluss von Schwermetallen auf das zellvermittelte Immunsystem nachweisen werden konnte (BAOS et al. 2006a), erwiesen sich Arsen, Zink und Cadmium bei Weißstörchen in einer anderen Studie als möglicherweise genotoxisch (BAOS et al. 2006b).

Zur Mikrobiota bei Weißstörchen gibt es nur wenige Untersuchungen. Bakterien verschiedener Genera wurden bei klinisch gesunden Weißstörchen beschrieben. Als Teil der physiologischen Darmmikrobiota oder Passanten werden *Proteus mirabilis* (KWIECIŃSKA-PIRÓG et al. 2011), *Aeromonas hydrophila* (GLÜNDER et al. 1989) und *Salmonella* Enteritidis (PALOMO et al. 2013) angesehen. Aus Kotproben verschiedener Wildvogelarten, darunter auch von Weißstörchen, wurden extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)- und plasmidkodierte AmpC- $\beta$ -lactamase (pAmpC)-produzierende sowie Cefotaxim-resistente (CTX<sup>R</sup>) *E. coli* isoliert. Die Autoren folgerten, dass Wildvögel als Träger dieser Bakterien zur globalen Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beitragen könnten (ALCALÁ et al. 2015). Im Rahmen von Untersuchungen zur bakteriellen Biodiversität bei gesunden Weißstörchen fanden sich in der Trachea adulter Weißstörche *Corynebacterium trachiae* sp. nov. (KÄMPFER et al. 2015c) sowie in der Choane von Weißstorchnestlingen *Gemmobacter intermedius* sp. nov. (KÄMPFER et al. 2015a) und *Psychrobacter ciconiae* sp. nov. (KÄMPFER et al. 2015b), die als neue Spezies beschrieben wurden. Im Blut klinisch gesunder Weißstorchnestlinge waren mittels PCR *Gardnerella vaginalis*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* und *S. vitulinus* nachweisbar (NAWROT et al. 2009). Ein  $\beta$ 2-toxinogener *Clostridium perfringens*-Stamm ( $\alpha$ -Toxin Gen cpa,  $\beta$ 2-Toxigenen cpb2) wurde aus dem Darm eines juvenilen Weißstorchs ohne intestinale Läsionen, jedoch ungeklärter Todesursache, isoliert (BOUJON et al. 2005). Zu einer hohen Sterblichkeit unter drei Wochen alter Nestlinge führten in Deutschland in den Jahren 2007 und 2008 *Aspergillus fumigatus* und zahlreiche Zygomyceten. *Thermomyces lanuginosus* war dabei in einem Nestling nachweisbar (OLIAS et al. 2010). Mykoplasmen waren aus der Trachea geschwächt aufgefundener Weißstörche (SPERGSER et al. 2009b; SUÁREZ-PÉREZ 2011) sowie gesunder Weißstorchnestlinge (HAGEN et al. 2004) *in vitro* kultivierbar, konnten jedoch bislang keiner Spezies zugeordnet werden.

### 2.6 Fragestellung

Im Gegensatz zu den ausführlich untersuchten geflügelpathogenen Mykoplasmen gibt es nur wenige systematische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von Mykoplasmen bei Wildvögeln. Bei verletzt oder geschwächt aufgefundenen Wildvögeln, insbesondere mit bestehender respiratorischer Symptomatik, werden nachgewiesene Mykoplasmen häufig als kausale Erreger betrachtet (BEZJIAN und BEZJIAN 2014). Während dies bei manchen Spezies zutrifft, kann diese Aussage jedoch nicht verallgemeinert werden. Bei Greifvögeln beispielsweise belegen zahlreiche Studien, dass einige Mykoplasmenspezies bei fast allen Tieren einer Population vorkommen, sodass es sich sehr wahrscheinlich um apathogene oder kommensale Organismen handelt (LIERZ 2009). Bei der Vielfalt an Wildvogel- und Mykoplasmenspezies ist daher eine differenzierte Betrachtungsweise notwendig. Bei verunfallt bzw. geschwächt aufgefundenen Weißstörchen wurden Mykoplasmen gefunden, die keiner Spezies zugeordnet werden konnten und deren Bedeutung bislang ungeklärt ist (SPERGSER und HÖFLE HANSEN 2009b; SUÁREZ-PÉREZ 2011).

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Vorkommen und die Bedeutung von Mykoplasmen bei Weißstörchen zu evaluieren und, sofern möglich, neue Mykoplasmenspezies aus dieser Vogelspezies zu beschreiben. Für die vorliegende Arbeit lagen 83 Mykoplasmenkulturen und eine DNA-Probe aus Trachealtupfern klinisch unauffälliger Nestlinge vor, die im Rahmen eines Beringungsprogrammes in Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Sachsen und Mecklenburg-Vorpommern zufallsverteilt gewonnen worden waren (HAGEN et al. 2004). Zwei in Vorarbeiten als Vertreter möglicherweise neuer Spezies identifizierte Isolate wurden anhand phänotypischer Eigenschaften, darunter Zell- und Koloniemorphologie, Biochemie, Cholesterin-Abhängigkeit und optimaler Wachstumstemperatur, näher charakterisiert. Zusätzlich erfolgten anhand ausgewählter Proben phylogenetische Untersuchungen auf Basis des 16S-rRNA-Gens sowie der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS). Zuletzt wurden spezifische Kaninchen-Hyperimmunseren hergestellt und antigenetische Eigenschaften der möglichen neuen Spezies mittels Immunobinding Assay untersucht. Um die Verbreitung dieser potentiell neuen Spezies in der gesunden Weißstorchpopulation zu evaluieren, und somit Rückschlüsse auf deren Bedeutung ziehen zu können, wurde eine speziesspezifische PCR etabliert und auf die vorliegenden Kulturen und eine DNA-Probe angewendet.



# 3 MATERIAL UND METHODEN

## 3.1 Material

### 3.1.1 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterialien, die nicht zur Standard-Laboraausstattung wie Pipetten, Kühlschränke etc., gehören, finden sich in Anhang I, oder sind gesondert im Text vermerkt. Reagenzien, die nicht zu Standard-Laborchemikalien, wie beispielsweise Natriumchlorid (NaCl) etc., gehören, sind in Anhang II aufgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer findet sich in Anhang III.

### 3.1.2 Bezeichnung und Herkunft der Mykoplasmenkulturen

Für diese Arbeit standen 83 Mykoplasmenkulturen und eine Probe mit isolierter DNA aus Trachealtupfern klinisch unauffälliger Weißstorchnestlinge im Alter von 2-7 Wochen zur Verfügung (HAGEN et al. 2004) (Tabelle 8). Die Isolate wurden im Zeitraum von Mai bis Juli 2003 im Rahmen der Beringung zur Bestandsüberwachung in Sachsen-Anhalt (26 Isolate), Sachsen (1 Isolat), Mecklenburg-Vorpommern (54 Isolate und 1 DNA-Probe) und Brandenburg (2 Isolate) entnommen. Eine Übersicht der geographischen Verteilung der Standorte der Horste, aus denen die beprobten Nestlinge stammen, findet sich in Abbildung 6. Bei der Anzucht der Kulturen in SP4-Medium zeigte sich in Voruntersuchungen, dass es sich bei einem Teil der Kulturen zu einem Farbumschlag des Mediums nach gelb, bei anderen wiederum zu einem Farbumschlag nach rotviolett kam. Als Vertreter dieser beiden Gruppen wurden zwei Kulturen ST57 (gelb) und ST101 (rotviolett) zufällig ausgewählt. Von diesen beiden Kulturen wurde jeweils ein Isolat mittels Einzelkolonie-Subkultivierung gewonnen. Anschließend wurde exemplarisch das 16S-rRNA-Gen dieser beiden Isolate sequenziert. Dabei wurde festgestellt, dass es sich wahrscheinlich um neue, bislang unbeschriebene, Spezies handelt (LIERZ et al. 2011). Alle 83 Kulturen wurden in dieser Arbeit erneut kultiviert; zudem wurde aus diesen DNA extrahiert. Weitere Untersuchungen wurden mit ausgewählten Isolaten durchgeführt. Die verwendeten Isolate werden in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt.

## MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 8: Verwendete Mykoplasmenkulturen von Weißstorchnestlingen mit Angaben zur jeweiligen Herkunft

Lfd. Nr.	RingNr.	Land	Ort	Horst	Bemerkungen (Alter, Proben)
ST 01	N323	ST	Heinrichsberg	künstl. Horst	4 Wochen; 2 Nestlinge;
ST 03	N333	ST	Rogätz Kater- berg	k. A.	3/3 Nestlingen
ST 05	H1397	ST	Angern	Schornstein Haus	1/4 Nestlingen
ST 06	H1398	ST	Wenddorf	Dach	3 Nestlinge
ST 07	H1399	ST	Wenddorf	Dach	3 Nestlinge
ST 10	N321HS	ST	Glindenberg	künstl. Horst	2,5 Wo.; 2/3 Nestl.
ST 11	N322HS	ST	Heinrichsberg	künstl. Horst	4 Wo.; 2 Nestl.
ST 12	H1404	ST	Bertingen Hof	Dach	2/2 Nestlingen
ST 13	H1403	ST	Bertingen Hof	Dach	2/2 Nestlingen
ST 14	H1409	SN	Burgstein	Telefonmast	3 Wo.; 1/3 Nestl.
ST 16	H1422	ST	Ihleburg	Schornstein	2 Wo.; 1/2 Nestl.
ST 17	H1419	ST	Biederitz	Schornstein Betriebsgelände	k. A.
ST 19	H1417	ST	Gerwisch	Schornstein Betriebsgelände	2/2 Nestlingen
ST 21	k. A.	ST	Gerwisch	Schornstein Betriebsgelände	2/2 Nestlingen
ST 20	H1415	ST	Blumenthal	k. A.	
ST 22	H1427	ST	Rietzel	Schornstein	2-4 Wo.; 2/2 Nestl
ST 23	H1429	ST	Rietzel	Dach	4 Wo.; 3/3 Nestl.
<b>ST 24*</b>	H1431	ST	Stegelitz	künstl. Horst	k. A.
ST 25	H1430	ST	Stegelitz	künstl. Horst	k. A.
<b>ST 26</b>	H1432	ST	Stegelitz	k. A.	k. A.
ST 27	H1423	ST	Güsen	künstl. Horst	4 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 28	H1424	ST	Güsen	künstl. Horst	4 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 29	H1426	MV	Hohensee	Schornstein	2 Wo.; 1/3 Nestl.
ST 34	H2026	MV	Vorderhagen	Horst auf Bau- ernhof	7 Wo.; 1/3 Nestl.
ST 36	H2029	MV	Vorderhagen	privater Bau- ernhof	7 Wo.; 2/3 Nestl.
ST 37	H2030	MV	Timkenberg	künstl. Horst	2 Wo.; 1/3 Nestl.
ST 38	H2031	MV	Bandekow	Baum Robinie	2-3 Wo.; 2/2 Nestl
<b>ST 39</b>	H2032	MV	Bandekow	Baum Robinie	2-3 Wo.; 2/2 Nestl
ST 40	H2033	MV	Groß Bengerstorf	künstl. Horst	6 Wo.; 1/2 Nestl.
ST 41	H2014	MV	Vellahn	künstl. Horst	6 Wo.; 3/4 Nestl.
ST 42	H2015	MV	Vellahn	künstl. Horst	6 Wo.; 3/4 Nestl.
ST 43	H2016	MV	Vellahn	künstl. Horst	6 Wo.; 3/4 Nestl.
ST 44	H2018	MV	Amt Neuhaus	künstl. Horst	5-6 Wo.; 2/3 Nestl
ST 45	H2019	MV	Amt Neuhaus	künstl. Horst	5-6 Wo.; 2/3 Nestl
ST 46	H2022	MV	Bandekow	Baum	6 Wo.; 3/3 Nestl.

## MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 8: Fortsetzung

Lfd. Nr.	RingNr.	Land	Ort	Horst	Bemerkungen (Alter, Proben)
ST 47	H2023	MV	Bandekow	Baum	6 Wo.; 3/3 Nestl.
ST 48	H2035	MV	Wiebendorf	künstl. Horst	5 Wo.; 1/3 Nestl.
ST 51	H2046	MV	Lütow	künstl. Horst	7 Wo.; 3/3 Nestl.
ST 53	H2048	MV	Lütow	künstl. Horst	kein PCR-Tupfer
ST 54	H2049	MV	Kronshof (Lübstorf)	Horst auf Leitung	5 und 7 Wochen; 2/3 Nestlingen
ST 55	H2051	MV	Kronshof (Lübstorf)	Horst auf Leitung	kein PCR-Tupfer
<b>ST 56*</b>	H2052	MV	Nielitz	künstl. Horst	7 Wo.; 2/2 Nestl.
<b>ST 57*</b>	H2053	MV	Nielitz	künstl. Horst	7 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 58	H2054	MV	(Lüttow-)Valluhn	Dachfirst	5 Wo.; 1 Nestling
ST 59**	H2055	MV	(Lüttow) Schadeland	künstl. Horst	>6 Wo.; 2/3 Nestl.
ST 60	H2056	MV	(Lüttow) Schadeland	künstl. Horst	>6 Wo.; 2/3 Nestl.
ST 61	H2057	MV	Testorf	künstl. Horst Bus	6 Wo.; 1 Nestling
ST 62	H2058	MV	Testorf	Wiese künstl. Horst	>6 Wo.; 2/3 Nestl.
ST 63	H2059	MV	Testorf	Wiese künstl. Horst	>6 Wo.; 2/3 Nestl.
ST 64	H2063	MV	Testorf	Dach Scheune	8 Wo.; 1/3 Nestl.
ST 65	H2073	MV	Rüterberg	künstl. Horst, Wiese	2 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 66	H2074	MV	Rüterberg	künstl. Horst, Wiese	2 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 67	H2076	MV	Dömitz	künstl. Horst, Wiese	6 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 68	H2075	MV	Dömitz	künstl. Horst, Wiese	6 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 69	H2078	MV	Klein Schmölen	künstl. Horst, Wiese	2/2 Nestlingen
<b>ST 71</b>	H2082	MV	Leussow	künstl. Horst	7 Wo.; 4/4 Nestl.
ST 72	H2083	MV	Leussow	künstl. Horst	7 Wo.; 4/4 Nestl.
ST 73	H2084	MV	Leussow	künstl. Horst	7 Wo.; 4/4 Nestl.
ST 74	H2085	MV	Leussow	künstl. Horst	7 Wo.; 4/4 Nestl.
ST 75	H2086	MV	Kuhstorf	künstl. Horst, Garten	4/4 Nestlingen
ST 76	H2087	MV	Kuhstorf	künstl. Horst, Garten	4/4 Nestlingen
ST 77	H2088	MV	Kuhstorf	künstl. Horst, Garten	4/4 Nestlingen
ST 78	H2089	MV	Kuhstorf	künstl. Horst, Garten	4/4 Nestlingen
ST 79	H2090	MV	Kirch-Jesar	Giebel Stall	3/3 Nestlingen
ST 81	H2092	MV	Kirch-Jesar	Giebel Stall	3/3 Nestlingen

## MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 8: Fortsetzung

Lfd. Nr.	RingNr.	Land	Ort	Horst	Bemerkungen (Alter, Proben)
ST 82	1	MV	Hagenow	k. A.	k. A.
ST 84	3	BB	Mühlenbeck	k. A.	k. A.
ST 85	4	BB	Mühlenbeck	k. A.	k. A.
ST 87	6	MV	Schossin	k. A.	3 Wo.; 1 Nestling
ST 88	7	MV	Schossin	k. A.	6-7 Wo.; 1 Nestl.
ST 90	9	MV	Holthusen	künstl. Horst	k. A.
ST 91	10	MV	Holthusen	künstl. Horst	k. A.
ST 92	11	MV	Alt Zachun	künstl. Horst	3 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 93	12	MV	Alt Zachun	künstl. Horst	3 Wo.; 2/2 Nestl.
ST 94	13	MV	Hoort	künstl. Horst	6 Wo.; 3/3 Nestl.
ST 95	14	MV	Hoort	künstl. Horst	6 Wo.; 3/3 Nestl.
<b>ST 99*</b>	19	MV	Lüblow	künstl. Horst, Wiese	6 Wo.; 3/3 Nestl.
<b>ST 101</b>	20	MV	Lüblow	künstl. Horst, Wiese	6 Wo.; 3/3 Nestl.
<b>ST 102*</b>	21	MV	Lüblow	künstl. Horst, Wiese	6 Wo.; 3/3 Nestl.
ST 103	M258	ST	Aken	Stadtturm	7-8 Wo.; 2/2 Nestl
ST 104	H1376	ST	Aken	Schornstein	7-8 Wo.; 3/3 Nestl
ST 105	H1378	ST	Köthen (Anhalt)	Giebelhaus	4-5 Wo.; 2/2 Nestl. (+H1379)
ST 107	H1381	ST	Osternienburg	Schornstein	k. A.
ST 108	H1383	ST	Osternienburg	Schornstein	k. A.

Bundesländer: ST = Sachsen Anhalt, SN = Sachsen, MV = Mecklenburg-Vorpommern, BB = Brandenburg, Wo: Alter der Nestlinge in Wochen, X/X Anzahl beprobte Nestlinge/vorhandene Nestlinge, Nestl. = Nestling(e), k. A. = keine Angaben, PCR = Polymerase-Kettenreaktion; Fettdruck: Proben wurden für weiterführende Untersuchungen verwendet, \*: Stämme bei DSMZ, ST 57<sup>T</sup> auch bei ATCC, hinterlegt, \*\*: von ST 59 liegt keine Kultur, sondern nur DNA vor.



**Abbildung 6: Geographische Lage der Weißstorch-Horste der Nestlinge, von denen Mykoplasmenkulturen für diese Arbeit verwendet wurden.**

Kreis: Beprobung von > 1 Nestling/Horst; Quadrat: Beprobung von 1 Nestling/Horst. Farbige Teilvergrößerungen dieser Karte finden sich im Abschnitt Ergebnisse (Abbildung 23, Abbildung 24)

Die geographische Verteilung wurde mit dem Programm Google Maps ([www.maps.google.de](http://www.maps.google.de)) dargestellt und passwortgeschützt elektronisch hinterlegt<sup>1</sup>.

Neben den Isolaten von Weißstorchnestlingen wurden Mykoplasmen-Referenzstämme und -Referenzantiseren aus Tabelle 9 verwendet.

<sup>1</sup> [https://www.google.com/maps/d/edit?mid=zTkQ6\\_TlpJRA.k0gliF7fDHTl](https://www.google.com/maps/d/edit?mid=zTkQ6_TlpJRA.k0gliF7fDHTl)

## MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 9: Verwendete Mykoplasmen-Referenzstämme und -Referenzantiseren mit Angaben zur jeweiligen Herkunft

Referenzstamm	Herkunft	Referenzantiserum	Herkunft
<i>A. laidlawii</i> PG8 (DSM23060)	TiHo	-	-
<i>M. anatis</i> 1340 (NCTC10156)	NCTC	<i>M. anatis</i> 1340	TMC
<i>M. anseris</i> 1219	TMC	<i>M. anseris</i> 1219	TMC
<i>M. arthritis</i> (NCTC10162)	FUB	-	-
<i>M. buteonis</i> Bb/T2g	TMC	<i>M. buteonis</i> Bb/T2g	TiHo
<i>M. canis</i> PG14 (NCTC10146)	FUB	<i>M. canis</i> PG14	TMC
<i>M. cloacale</i> 383	TMC	<i>M. cloacale</i> 383	TMC
<i>M. columbinasale</i> 694	TMC	<i>M. columbinasale</i> 383	TMC
<i>M. columbinum</i> MMP1	TMC	-	-
<i>M. columborale</i> MMP4	TMC	<i>M. columborale</i> MMP4	TiHo
<i>M. corogypsi</i> BV1	TMC	<i>M. corogypsi</i> BV1	TMC
<i>M. falconis</i> H/T1	TMC	<i>M. falconis</i> H/T1	TiHo
<i>M. felis</i> CO	FUB	<i>M. felis</i> CO	TMC
<i>M. gallopavonis</i> 1197	TMC	<i>M. gallopavonis</i> 1197	TMC
<i>M. gallinaceum</i> 887	TMC	<i>M. gallinaceum</i> 887	TiHo
<i>M. gallinarum</i> PG 16 (DSM19816)	DSMZ	<i>M. gallinarum</i> PG 16	TiHo
<i>M. gallisepticum</i> 75969	TMC	<i>M. gallisepticum</i> 75969	TMC
<i>M. glycyphilum</i> 486	TMC	<i>M. glycyphilum</i> 486	TMC
<i>M. gypis</i> B1/T1	TMC	-	-
<i>M. imitans</i> 4229	TMC	<i>M. imitans</i> 4229	JB
<i>M. iners</i> PG30 (NCTC10165)	NCTC	-	-
<i>M. iowae</i> DK-CPA	TMC	-	-
<i>M. lipofaciens</i> R171	TMC	-	-
<i>M. meleagridis</i> 17529	TMC	-	-
<i>M. pullorum</i> CKK (NCTC10187)	NCTC	<i>M. pullorum</i> CKK	TMC
<i>M. sturni</i> UCMF (ATCC51945)	TMC	<i>M. sturnidae</i> UCMF	TMC
<i>M. synoviae</i> NVU 1853	TMC	<i>M. synoviae</i> NVU 1853	TiHo
<i>U. felinum</i> FT2-B (DSM24216)	DSMZ	-	-

A. = *Acholeplasma*; M. = *Mycoplasma*; U. = *Ureaplasma*; FUB = Freie Universität Berlin, Institut für Hygiene und Mikrobiologie; DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; JB = Prof. J. Bradbury, University of Liverpool; NCTC = National Collection of Type Cultures; TiHo = Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; TMC = The Mollicutes Collection, betreut durch die IOM (International Organisation for Mycoplasmaology)

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Kultivierung von Mykoplasmen

Die Mykoplasmenkulturen in dieser Arbeit stammten aus Trachealtupfern von Weißstorchnestlingen (Tabelle 8) und lagen in SP4-Medium (BRADBURY 1998) bei -80°C vor (HAGEN et al. 2004). Die Mykoplasmen-Referenzstämme (Tabelle 9) lagen in SP4-Medium oder Hayflick-Medium (HAYFLICK 1965) bei -80°C oder lyophilisiert vor.

Zur Überprüfung der Vitalität wurden zunächst alle in dieser Arbeit verwendeten Mykoplasmenkulturen in SP4-Flüssig- und -Agarmedium nach BRADBURY (1998) kultiviert. Die genaue Zusammensetzung dieses Mediums findet sich in Anhang IV.I „SP4-Medium nach BRADBURY“. Tiefgefrorene Kulturen wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut, während lyophilisierte Kulturen mit SP4-Medium bis zu ihrem ursprünglichen Volumen aufgefüllt wurden. Für die Anzucht wurde die Mykoplasmen-suspension jeweils zweimal in frischem SP4-Medium verdünnt. Dazu wurden die Isolate für die erste Verdünnung in einem Verhältnis 1:2 in SP4-Medium überführt und durchmischt. Für die zweite Verdünnung wurden 200 µl in ein zweites Röhrchen mit 2,3 ml SP4-Flüssigmedium (Verdünnung 1:12,5) überführt. Je 50 µl der Originalsuspension sowie jeweils der Verdünnungen wurden auf eine SP4-Agarplatte gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h, sowie täglich für einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen, wurde mikroskopisch das Koloniewachstum auf SP4-Agarplatten sowie ein Farbumschlag des SP4-Flüssigmediums von rot nach gelb oder rotviolett untersucht. Trat ein Farbumschlag ohne Koloniewachstum auf, wurde sofort eine weitere Verdünnung (1:12,5) in SP4-Flüssigmedium angesetzt, davon 50 µl auf SP4-Agarplatte gegeben und der Ansatz wie oben beschrieben inkubiert. Bei fehlendem Koloniewachstum und/oder fehlendem Farbumschlag wurden nach 5 Tagen erneut je 50 µl des Flüssigmediums auf frische SP4-Agarplatten gegeben. Diese wurden wiederum für 5 Tage bei gleichen Bedingungen inkubiert. Bei einem Koloniewachstum auf SP4-Agarplatten wurden die entsprechenden Flüssigkulturen 2-3 Mal aliquotiert und bei -80°C eingefroren bzw. für weitere Untersuchungen verwendet. Parallel wurde eine bakterielle Kontamination der Mykoplasmenkultur durch Kultivierung von 100 µl der Mykoplasmen-suspension auf Columbia-Schafblutagarplatten (Oxoid, Wesel) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 Tage abgeschlossen.

Für die phänotypischen, serologischen und einen Teil der molekularbiologischen Untersuchungen wurden Isolate (Synonym: Klone bzw. englisch: Clone) verwendet. Dazu wurden bei der Anzucht einzelne Kolonien mit Hilfe von Tupfern direkt von den Agarplatten entnommen und in frischem Medium wie oben beschrieben subkultiviert. Um mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Reinkultur bzw. ein reines Isolat zu erhalten, wurde dieser Vorgang jeweils dreimal hintereinander wiederholt (BRADBURY 1998).

### 3.2.2 Kultivierung anderer Bakterien

Als Kontrollen für die Gramfärbung und im Rahmen der Spezifitätsbestimmung der selbst entwickelten PCR wurden in dieser Arbeit Bakterienkulturen der Spezies aus Tabelle 10 eingesetzt, die bei -80°C eingefroren oder wachsend vorlagen. Die Bakterien wurden auf Columbia-Schafblutagarplatten (Oxoid, Wesel) ausgestrichen und bei 37°C aerob für 24 h, *Clostridium perfringens* anaerob für 48 H, inkubiert. Im Anschluss an die Anzucht wurde Koloniematerial entnommen und in 1,5 ml bzw. 2 ml Mikroreaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren oder für weitere Untersuchungen verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Bakterienkulturen mit Angaben zu genauer Bezeichnung und Herkunft

Spezies	Bezeichnung des Isolates	Herkunft
<i>Salmonella</i> Enteritidis	493/2012	Feldisolat, KVRAF
<i>Escherichia coli</i>	211/2012	Feldisolat, KVRAF
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	Referenzstamm, KVRAF
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	939/2012	Feldisolat, KVRAF
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231	Referenzstamm, KVRAF
<i>Pasteurella multocida</i>	1187/5	Feldisolat, IHIT
<i>Clostridium perfringens</i>	DSM 756	Referenzstamm, IHIT

KVRAF = Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen; IHIT = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen

### 3.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Für die selbst entwickelte speziesspezifische PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) wurden alle 83 Mykoplasmenkulturen, die in SP4-Flüssigmedium vorlagen, sowie eine DNA-Probe verwendet (siehe Tabelle 8). Für die 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007) und 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR nach RAMÍREZ et al. (2008) wurden insgesamt 15 Isolate (Synonym „Klone“ bzw. engl. „Clone“) verwendet, die in SP4-Flüssigmedium vorlagen (siehe Tabelle 17).



### **3.2.3.1 Extraktion der DNA**

Die Mykoplasmenkulturen in SP4-Flüssigmedium wurden für 45 min bei 4.000 × g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 180 µl Lysispuffer ATL und 20 µl Proteinase K resuspendiert. Die Suspension wurde 120 min bei 56°C auf dem Schüttler inkubiert. Aus der Suspension wurde die DNA im QIAcube mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Bei den zellwandbildenden Bakterien wurde eine Öse Material von der Blutagarplatte mit 180 µl Lysispuffer ATL und 20 µl Proteinase K vermischt und analog zu den Mykoplasmenkulturen weiter verarbeitet. Zum Ausschluss der Kreuzkontamination wurde bei jedem Lauf eine Kontrolle mit 180 µl Lysispuffer ATL und 20 µl Proteinase K, jedoch ohne Zellpellet, mitgeführt und bei der ersten PCR mit untersucht.

### **3.2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen**

Die Konzentration der gelösten DNA wurde zur Qualitätssicherung der Isolierung und Optimierung der Reaktionsbedingungen für die PCR mittels des Spektrophotometers Nanodrop 2.000c nach Herstellerangaben bestimmt. Für die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden Templates mit DNA-Konzentrationen von 1 bis 20 ng/µl eingesetzt. War die DNA höher konzentriert, wurde diese verdünnt, war die Konzentration niedriger wurde erneut DNA aus der Kultur isoliert.

### **3.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma biomers.net GmbH, Ulm bezogen. Die Konzentration der Oligonukleotide betrug stets 100 pmol/µl. Für die 16S-rRNA-PCR (siehe 3.2.3.3.1) und ITS-PCR (siehe 3.2.3.3.2) wurden die Oligonucleotide (Primer) aus Tabelle 11 eingesetzt.

**Tabelle 11: Übersicht verwendeter Oligonukleotide (Primer) für die 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD (1992), modifiziert nach HAGEN (2007) (16S-rRNA-PCR) und 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR (ITS-PCR) nach RAMÍREZ (2008)**

<b>PCR</b>	<b>Bezeichnung der Primer</b>	<b>Primersequenz</b>
16S-rRNA-PCR	GPF MGSO	5'-GCT GGC TGT GTG CCT AAT ACA-3' 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'
ITS-PCR	RAM-ITS_fo RAM-ITS_re	5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3' 5'-CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3'

PCR = Polymerase-Kettenreaktion, Nukleinbasen: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T)

**3.2.3.3.1 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007) (16S-rRNA-PCR)**

Für die Amplifizierung des 16S-rRNA-Gens wurde die PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007) (16S-rRNA-PCR), verwendet, deren Amplikonlänge ca. 1.013 bp betrug. Eingesetzt wurde eine „High Fidelity“-Polymerase-Mischung (High Fidelity PCR Enzyme Mix, Qiagen GmbH, Hilden), die aus einer *Taq*-DNA-Polymerase und einer thermostabilen DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion besteht. Aufgrund der Korrekturlesefunktion wird eine höhere Genauigkeit erreicht, sodass sich die Amplifikate gut für die Sequenzierung eignen. Tabellarisch aufgeführt sind die Zusammensetzung der Ansätze (Tabelle 12) und die Temperatureinstellungen für den Thermocycler (Tabelle 13). Mit dieser PCR wurde DNA von insgesamt 15 Isolaten (Tabelle 17) untersucht. Auf Basis des Amplikons bzw. der Sequenz der 16S-rRNA-Gene dieser Proben wurden phylogenetische Untersuchungen durchgeführt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (Mastermix) für die 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007)**

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
RNase freies H <sub>2</sub> O	18,2
Puffer: „High fidelity buffer with MgCl <sub>2</sub> “	2,5
dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2,5 µM	1,0
Vorwärts-Primer 20 pmol/µl (GPF)	0,4
Rückwärts-Primer 20 pmol/µl (MGSO)	0,4
Polymerase: „High Fidelity Enzyme Mix“	0,1
Probe (DNA)	2,5
Gesamtvolumen	25,0

DNA = Desoxyribonukleinsäure, dNTP-Mix = Deoxynukleotidtriphosphat-Mischung, dATP = Desoxyadenosin-triphosphat, dCTP = Desoxycytidintriphosphat, dGTP = Desoxyguanosintri-phosphat, dTTP = Desoxythreonin-triphosphat, H<sub>2</sub>O = Wasser, MgCl<sub>2</sub> = Magnesiumchlorid, M = Molar, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, RNase = Ribonuklease

**Tabelle 13: Temperatur-Zeit-Profil für die 16S rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007)**

Zyklus	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	Denaturierung	94°C	4 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94°C	30 s	35
	Anlagerung (Annealing)	56°C	30 s	
	Verlängerung (Elongation)	72°C	30 s	
3	Verlängerung	72°C	10	1
4	Kühlung	4°C	Unbegrenzt	1

### 3.2.3.3.2 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR nach RAMÍREZ et al. (2008) (ITS-PCR)

Für die Amplifizierung der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) wurde die PCR nach RAMÍREZ et al. (2008) verwendet. Die Amplikonlänge dieser PCR liegt speziesabhängig zwischen 400 und 600 bp mit Ausnahme von MG (ca. 1.000 bp) und *M. imitans* (ca. 3.000 bp). Neben der ITS werden bei dieser PCR auch ca. 164 bp des 3'-Endes des 16S-rRNA-Gens sowie ca. 71 bp des 5'-Endes des 23-rRNA-Gens amplifiziert. Hierzu wurde analog zu der 16S-rRNA-PCR (siehe 3.2.3.3.1) eine „High Fidelity“ Polymerase-Mischung verwendet, da sich aufgrund der Korrekturfunktion die Amplifikate gut für die Sequenzierung eignen. Die Zusammensetzung der Ansätze (Tabelle 14) und die Temperatureinstellungen für den Thermocycler (Tabelle 15) sind tabellarisch aufgeführt. Mit dieser PCR wurde DNA derselben 15 Isolate (Tabelle 17) wie mit der 16S-rRNA-PCR untersucht und das Amplikon bzw. die Sequenz der ITS dieser Proben anschließend für phylogenetische Untersuchungen verwendet.

**Tabelle 14: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (Mastermix) für die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR (ITS-PCR) nach RAMÍREZ et al (2008)**

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
RNase freies H <sub>2</sub> O	35,6
Puffer: „High fidelity buffer with MgCl <sub>2</sub> “	5,0
dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2,5 µM	5,0
Vorwärts-Primer 10 pmol/µl (RAM-ITS-fo)	0,5
Rückwärts-Primer 10 pmol/µl (RAM-ITS-re)	0,5
Polymerase: „High Fidelity Enzyme Mix“	0,4
Probe (DNA)	3,0
Gesamtvolumen	50,0

DNA = Desoxyribonukleinsäure, dNTP-Mix = Deoxynukleotidtriphosphat-Mischung, dATP = Desoxyadenosinetriphosphat, dCTP = Desoxycytidintriphosphat, dGTP = Desoxyguanosintri-phosphat, dTTP = Desoxythreonintriphosphat, H<sub>2</sub>O = Wasser, MgCl<sub>2</sub> = Magnesiumchlorid, M = Molar, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, RNase = Ribonuklease

**Tabelle 15: Temperatur-Zeit-Profil für die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region-PCR (ITS-PCR) nach RAMÍREZ et al. (2008)**

Zyklus	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	Denaturierung	94°C	5 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94°C	15 s	5
	Anlagerung (Annealing)	50°C	30 s	
	Verlängerung (Elongation)	72°C	120 s	
3	Schmelzen (Melting)	94°C	15 s	30
	Anlagerung (Annealing)	50°C	30 s	
	Verlängerung (Elongation)	72°C	122 s	
4	Verlängerung	72°C	10 min	1
5	Kühlung	4°C	Unbegrenzt	1

### 3.2.3.3.3 Etablierung einer speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR)

Um die Prävalenz der neu zu beschreibenden Mykoplasmenspezies, als deren Typstamm das Isolat ST57 definiert wurde, bei Weißstorchnestlingen zu ermitteln, sollte zum Nachweis dieses Isolates eine speziesspezifische PCR etabliert werden.

#### Auswahl der Oligonukleotide (Primer)

Für die Wahl des Primerpaares wurden zunächst die Sequenzen des 16S-rRNA-Gens und der ITS des Isolates ST57 mit den Gensequenzen aller bekannten aviären Mykoplasmen aus GenBank sowie der nah verwandten Spezies *M. felis*, *M. canis* und *M. bovirhinis* verglichen. Die Referenzsequenzdatenbank RefSeq wurde hier nicht verwendet, da diese zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht bestand. Mit dem Programm MegAlign (Lasergene 9.0, GATC Biotech, Konstanz) wurde ein Alignment durchgeführt und manuell auf spezifische Nukleotidaustausche durchsucht. Nach Vorauswahl eines kurzen für spezifische Primer vielversprechenden Bereiches wurden mit dem Programm PrimerSelect (Lasergene 9.0, GATC Biotech, Konstanz) mögliche Primer berechnet. Dieses Programm ermittelt Schmelztemperaturen, G+C-Gehalt, Dimere und Hairpins, und liefert somit weitere Auswahl- bzw. Ausschlusskriterien für PCR-Primer. Im Anschluss wurden die ausgewählten Primer synthetisiert (biomers.net GmbH, Ulm) und in Verbindung mit dem vorgefertigten Diagnostiksystem (Kit) HotStarTaq-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

#### Entwicklung eines Protokolls

Für die PCR wurde die HotStarTaq-DNA-Polymerase gewählt, da diese über eine Korrekturlesefunktion (proofreading) verfügt. Zusätzlich ist diese Polymerase bei Raumtemperatur nicht aktiv, sodass die Extension unspezifisch gebundener Primer und die Bildung von Primer-Dimeren bei niedrigen Temperaturen unterbleiben. Das Protokoll wurde auf Basis der Herstellerangaben der HotStarTaq-DNA-Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden) konzipiert und anschließend experimentell optimiert. Die Amplikons wurden abschließend mittels Agarosegelelektrophorese identifiziert, die DNA mit GelRed<sup>TM</sup> angefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

### Qualitätssicherung der PCR

Die DNA-Extraktion erfolgte analog zu 3.2.3.1. DNA-Amplicons der PCR wurden mittels Agarosegelelektrophorese identifiziert und eine Positivkontrolle (DNA des Isolates ST57) sowie Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) mitgeführt. Eine Stichprobe zehn zufällig ausgewählter DNA-Amplicons positiver Kulturen wurde sequenziert (ST3, ST12, ST20, ST26, ST29, ST36, ST43, ST54, ST58, ST68).

### Sensitivität und Spezifität der PCR

Die Spezifität der PCR wurde anhand der DNA aviärer *Mycoplasma*-Referenzstämme (n = 26; Tabelle 9) und häufig beim Vogel auftretender zellwandbildender Bakterien überprüft (n = 7; Tabelle 10). Die Sensitivität wurde anhand dezimaler DNA- und KbE-Verdünnungsreihen des Isolates ST57 ermittelt. Unterhalb einer Konzentration von 1 KbE/ml bzw. 1 pg/μl wurde die Verdünnungsreihe 1:2 weitergeführt. Die DNA wurde auf folgende Werte verdünnt: 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl, 500 fg/μl, 250 fg/μl, 125 fg/μl und 62,5 fg/μl. Die KbE wurden auf folgende Werte verdünnt: 10<sup>7</sup> KbE/ml, 10<sup>6</sup> KbE/ml, 10<sup>5</sup> KbE/ml, 10<sup>4</sup> KbE/ml, 10<sup>3</sup> KbE/ml, 100 KbE/ml, 1 KbE/ml, 0,5 KbE/ml, 0,25 KbE/ml und 0,125 KbE/ml.

### 3.2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die mittels PCR amplifizierte DNA (Amplikon) wurde mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese identifiziert. Als Matrix diente dabei im Elektrophoresepuffer TBE gelöste Agarose in einer Konzentration von 2%. Das Gemisch wurde aufgeköcht und die flüssige Agarlösung in sogenannte Gelschlitten gegossen, bei denen zusätzlich zur Formung von Vertiefungen ein Kamm eingesetzt wurde. Nach dem Erkalten des Agarosegels wurde der Gelschlitten in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Ein Volumen von jeweils 5 μl des Amplikons wurde entnommen, mit Ladepuffer (6xLoading Dye) vermischt, und in eine Vertiefung im Gel aufgetragen. Zur Beurteilung der Fragmentlängen der DNA-Amplicons wurde ein DNA-Molekulargewichtsmarker (Ladder) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V für ca. 30-45 min. Um die DNA-Amplicons unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die Agarosegele für 10 min in eine Ethidiumbromidlösung gelegt. Ethidiumbromid wird zwischen den Basenpaarungen

der Nukleinsäuren eingebaut (interkaliert) und fluoresziert unter UV-Licht. Nach der Färbung wurden die Gele auf einen UV-Illuminator gelegt und mit UV-Licht bestrahlt. Durch den Vergleich mit dem DNA-Molekulargewichtsmarker konnten die DNA-Amplikons einer bestimmten Länge zugeordnet werden. Bei Untersuchungen ab Februar 2014 wurde die Färbelösung GelRed™ in der Verdünnung von 1:10<sup>4</sup> dem Agarosegel zugegeben und ersetzte die Ethidiumbromid-Färbung. Untersucht wurde in diesem Zeitraum die DNA von 15 Mykoplasmenisolaten (siehe Tabelle 17) mittels 16S-rRNA- und ITS-PCR (siehe 3.2.3.3.1 und 3.2.3.3.2). Alle gefärbten Gele wurden mit einer Kamera fotografiert, die Bilder anschließend elektronisch gespeichert und ausgedruckt.

### 3.2.3.5 Aufreinigung der DNA-Amplikons

Für ein gutes Sequenzierungsergebnis muss die DNA möglichst frei von Verunreinigungen sein. Zur Entfernung von Primern, dNTPs, Enzymen und Salzen aus den PCR-Ansätzen wurden die DNA-Amplikons mit dem Kit „GeneJET PCR Purification Kit #K0701“ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) nach Anleitung der Hersteller mit den enthaltenen Reagenzien aufgereinigt.

### 3.2.3.6 Sequenzierung und Sequenzanalysen

Nach Aufreinigung der DNA-Amplikons wurde die DNA-Konzentration gemessen (siehe 3.2.3.2). Bei einer Amplikonlänge von 200-500 bp wurde die Konzentration auf 10 ng/μl eingestellt, bei einer Amplikonlänge von 500 bis 1.000 bp auf 20 ng/μl. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC Genomics (Berlin) mittels der Kettenabbruchmethode (SANGER et al. 1977) auf einer ABI 3730 XL-Plattform. Um möglichst fehlerfreie DNA-Sequenzen für die anschließende phylogenetische Auswertung zu erhalten, wurden für die PCR Polymerasen mit Korrekturlesefunktion (proofreading) verwendet und die Sequenzen mit den Programmen MegAlign und EditSeq (Lasergene 9.0, GATC Biotec, Kontanz) aufbereitet. Die Rückwärtssequenz wurde umgedreht und als Komplementärstrang übersetzt (reverse complement). Die resultierende DNA-Sequenz wurde anschließend mit der Vorwärtssequenz mittels Clustal W abgeglichen (alignment)

## MATERIAL UND METHODEN

---

(THOMPSON et al. 2002). Bei Abweichungen wurden anhand der Amplituden der Elektropherogramme die korrekten Basen ermittelt.

Zunächst wurde die Sequenz in das Suchprogramm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool der NCBI Database, National Library of Medicine, USA) eingegeben und mit allen dort hinterlegten Sequenzen verglichen. Im nächsten Schritt wurden die überarbeiteten 16S-rRNA-Gen- und ITS-Sequenzen mit denen aller aviären Mykoplasmen verglichen. Sobald auf diese Weise die Zuordnung zu einem Cluster möglich war, wurde ein Vergleich mit allen Mykoplasmen dieses Clusters durchgeführt. Zum Vergleich mit bereits beschriebenen Mykoplasmenspezies mittels des Programmes MegAlign wurden ausschließlich 16S-rRNA-Gensequenzen aus der online zugänglichen Referenzsequenz-Datenbank RefSeq (NCBI Reference Sequence Database, National Library of Medicine, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um editierte Sequenzen, die zuvor bei GenBank (Genbibliothek der National Library of Medicine, USA) hinterlegt worden waren.

Für die ITS-Sequenz existierten zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine editierten Referenzsequenzen. Hier wurden die bei GenBank hinterlegten Sequenzen von RAMÍREZ et al. verwendet, da diese Autoren die gleiche Methode angewendet hatten wie sie bei den Sequenzen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen (RAMÍREZ et al. 2008). Ebenfalls für die phylogenetischen Untersuchungen hinzugezogen wurden einige 16S-rRNA-Gen- sowie ITS-Sequenzen von Mykoplasmenisolaten aus Weißstörchen, die nicht aus dieser Arbeit stammen. Verwendet wurden die 16S-rRNA-Gensequenzen eines Isolates aus der Trachea eines verletzt aufgefundenen Weißstorches aus Hessen (1566/2012; KVRAF der JLU Gießen) sowie des Isolates Sp22 aus der Lunge eines Weißstorches (SPERGSEER und HÖFLE HANSEN 2009b). Die ITS-Sequenzen der Isolate aus dieser Arbeit wurden außerdem mit Sequenzen dreier Isolate aus Weißstörchen, die geschwächt in Ciudad Real (Spanien) und Toledo (Spanien) aufgefunden worden waren (T452T, T453CO, T454T) (SUÁREZ-PÉREZ 2011), sowie dem Isolat Sp22 verglichen (SPERGSEER et al. 2009a). Vollständige Listen der GenBank-„Accession Numbers“, sowie nur eingeschränkt öffentlich zugänglicher Sequenzen, finden sich in Anhang V: „Sequenzen für phylogenetische Untersuchungen“.

Die phylogenetischen Stammbäume und Distanzmatrices wurden mit dem Programm MegAlign (Lasergene 9.0, GATC Biotec, Kontanz) auf Basis des Algorithmus Clustal W

erstellt. Dabei berechnete das Programm zunächst für alle und gegen alle Sequenzen paarweise Alignments und speicherte deren Übereinstimmungen in einer Matrix. Diese Matrix wurde wiederum in eine Distanzmatrix konvertiert, wobei die einzelnen Werte den evolutionären Abstand zwischen den jeweiligen Sequenzpaaren widerspiegeln. In einem zweiten Schritt konstruierte das Programm anhand eines Neighbor-Joining-Algorithmus einen phylogenetischen Stammbaum. Damit die phylogenetischen Stammbäume für taxonomische Aussagen verwendbar waren, wurde die Position der Wurzel (Engl.: root) des Baumes identifiziert und mit *M. mycoides* Subspezies *mycoides* eine Spezies als Außengruppe (Engl.: outgroup) eingesetzt, die nicht von dem Selben ersten gemeinsamen Vorfahren abstammte wie alle anderen untersuchten Spezies (WEISBURG et al. 1989; NIXON et al. 1993). Um in einem letzten Schritt das Konfidenzniveau des so berechneten phylogenetischen Stammbaumes zu evaluieren, wurde mit dem Programm MegAlign (Lasergene 9.0, GATC Biotec, Kontanz) eine bootstrapping Analyse durchgeführt (FELSENSTEIN 1985). Die Werte wurden auf ganze Zahlen gerundet und an den Abzweigungen der phylogenetischen Stammbäume vermerkt. Werte von 70% und höher gelten dabei als Indikatoren für ein gutes Konfidenzniveau (VAN DE PEER 2009).



### 3.2.4 Serologische und zusätzliche phänotypische Untersuchungen

Nach den gültigen Mindeststandards für die Beschreibung einer neuen Spezies der Klasse Mollicutes sind bestimmte serologische Untersuchungen sowie die Produktion und Bereitstellung eines spezifischen Kaninchen-Hyperimmunserums gegen die neue Spezies vorgeschrieben (BROWN et al. 2007). Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit von Kaninchen-Hyperimmunseren gegen existierende Referenzstämme, wurde die Verpflichtung zur Durchführung ausführlicher serologischer Untersuchungen im Rahmen der Speziesbeschreibung durch das International Committee on Systematic of Prokaryotes (ICSP) Subcommittee Mollicutes jedoch aktuell ausgesetzt (FIRRAO et al. 2013).

#### 3.2.4.1 Biochemische Eigenschaften

In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass das SP4-Medium bei einigen Mykoplasmenkulturen einen Farbumschlag nach gelb, bei anderen nach rotviolett zeigte. Diese Farbumschläge weisen auf eine Umsetzung von Glucose bzw. Arginin durch die darin wachsenden Mykoplasmen hin. Ein Beweis ist anhand dieser Untersuchungen jedoch nicht möglich, da das Medium eine Vielzahl von Inhaltsstoffen enthält, die das Ergebnis verfälschen können. Zusätzlich handelte es sich bei den untersuchten Kulturen nicht sicher um Reinkulturen. Zwei Kulturen wurden daher exemplarisch als Vertreter der Gruppen ausgewählt und von diesen mittels dreimal hintereinander wiederholter Einzelkolonie-Subkultivierung (siehe 3.2.1) Isolate gewonnen: Das Isolat ST57 zeigte dabei einen Farbumschlag nach gelb, ST101 einen Farbumschlag nach rotviolett. Diese beiden Isolate wurden biochemisch auf die Umsetzung der Substrate Glucose, Arginin und Harnstoff untersucht. Die Untersuchung zur Umsetzung von Harnstoff ermöglicht die Differenzierung zwischen *Mycoplasma* spp. und *Ureaplasma* spp, und ist zusätzlich bei Speziesbeschreibungen vorgeschrieben (BROWN et al. 2007). Für die Adaptation der Mykoplasmen-Isolate an die Medien zur biochemischen Differenzierung wurden Mykoplasmen-Standard-Flüssigmedium mit einem 20%igen und 10%igen Anteil an Pferdeserum (Standard-Flüssigmedium-20% bzw. -10%) sowie Mykoplasmen-Standard-Agarmedium mit 20%igem Anteil an Pferdeserum nach POVEDA (Standard-Agarmedium) verwendet (POVEDA 1998). Die Zusammensetzung dieser Medien findet sich in Anhang IV.II „Mykoplasmen-Standardmedium nach POVEDA“. Die Isolate wurden

zunächst an die Medien mit niedrigem Serumanteil adaptiert um ein zügiges Wachstum in den Testmedien zu gewährleisten. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Suspension des Isolates in SP4-Flüssigmedium 1:2 mit Standard-Flüssigmedium-20% verdünnt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 24-96 h inkubiert. Die Aliquots der Mykoplasmenisolate wurden alle 24-72 Stunden 1:10 in frischem Standard-Flüssigmedium-20% subkultiviert, bis die Isolate vollständig an das Medium adaptiert waren. Zur Kontrolle des Wachstums wurden 50 µl der Isolate in Standard-Flüssigmedium-20% auf Standard-Agarmedium gegeben und täglich mikroskopisch beurteilt. Als vollständig adaptiert galten Isolate, sobald ihr Koloniewachstum auf Standard-Agarmedium mit dem Wachstum auf dem ursprünglich verwendeten SP4-Agarmedium weitestgehend identisch war. Mit den adaptierten Isolaten wurde das Vorgehen mit Standard-Flüssigmedium-10% wiederholt, bis sie auch an dieses Medium adaptiert waren. Bei beiden Isolaten reichte eine dreimalige serielle Subkultivierung zur Adaptierung aus. Die ersten Subkulturen der an das Standard-Flüssigmedium-10% adaptierten Isolate wurden anschließend für die jeweiligen biochemischen Untersuchungen verwendet.

### 3.2.4.1.1 Fermentation von Glucose

Für die Untersuchung der Fermentation von Glucose wurden Glucose-Testmedium sowie Testmedium ohne Glucose nach POVEDA verwendet (POVEDA 1998) (siehe Anhang IV.III „Biochemie-Test- und -Kontrollmedien nach POVEDA“). Eingesetzt wurden an Medium mit reduziertem Serumanteil angepasste Mykoplasmenisolate (siehe 3.2.4.1) in Standard-Flüssigmedium-10% (siehe Anhang IV.III). Neben den zu testenden Isolaten ST57 und ST101 wurden für die Fermentation von Glucose *M. gallisepticum* (MG, Referenzstamm 75969) als Positivkontrolle sowie *M. arthritidis* (Referenzstamm NCTC 10156) als Negativkontrolle eingesetzt. Jeweils zwei Röhrchen der Testmedien „mit Glucose“ und „ohne Glucose“ wurden mit je 200 µl einer der kultivierten Isolate und Referenzstämme (ST57, ST101, MG, *M. arthritidis*) beimpft. Zusätzlich wurden jeweils zwei Röhrchen dieser Testmedien mit 200 µl sterilem Standard-Flüssigmedium 10% versetzt (Kontrolle: unbeimpftes Medium mit Substrat). Von diesen Röhrchen wurde anschließend eines aerob bebrütet. Das jeweils andere der beiden Röhrchen wurde mit 0,5 ml sterilem Paraffin überschichtet, sodass ein anaerobes Milieu entstand. Eine Übersicht der einzelnen Flüssigmedium-Ansätze dieses Tests findet sich in Abbildung 7. Um ein Wachstum der Mykoplasmen nachweisen zu können wurde aus jedem Ansatz ein Aliquot von 50 µl auf Standard-Agarmedium gegeben und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

inkubiert. Bei den anaerob zu bebrütenden Röhrchen wurde ein weiteres Standard-Agarmedium beimpft und anaerob bei 37°C inkubiert. Die Flüssigmedien und Agarmedien wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen täglich begutachtet. Am letzten Tag (Tag 14) wurde, nach Entnahme des Paraffins, der pH-Wert aller Flüssigmedium-Ansätze bestimmt. Ein Abfall des pH-Werts um 0,5 pH-Einheiten oder mehr wurde als positives Testergebnis gewertet. Ein positives Testergebnis bedeutete, dass das getestete Isolat Glucose fermentieren konnte.

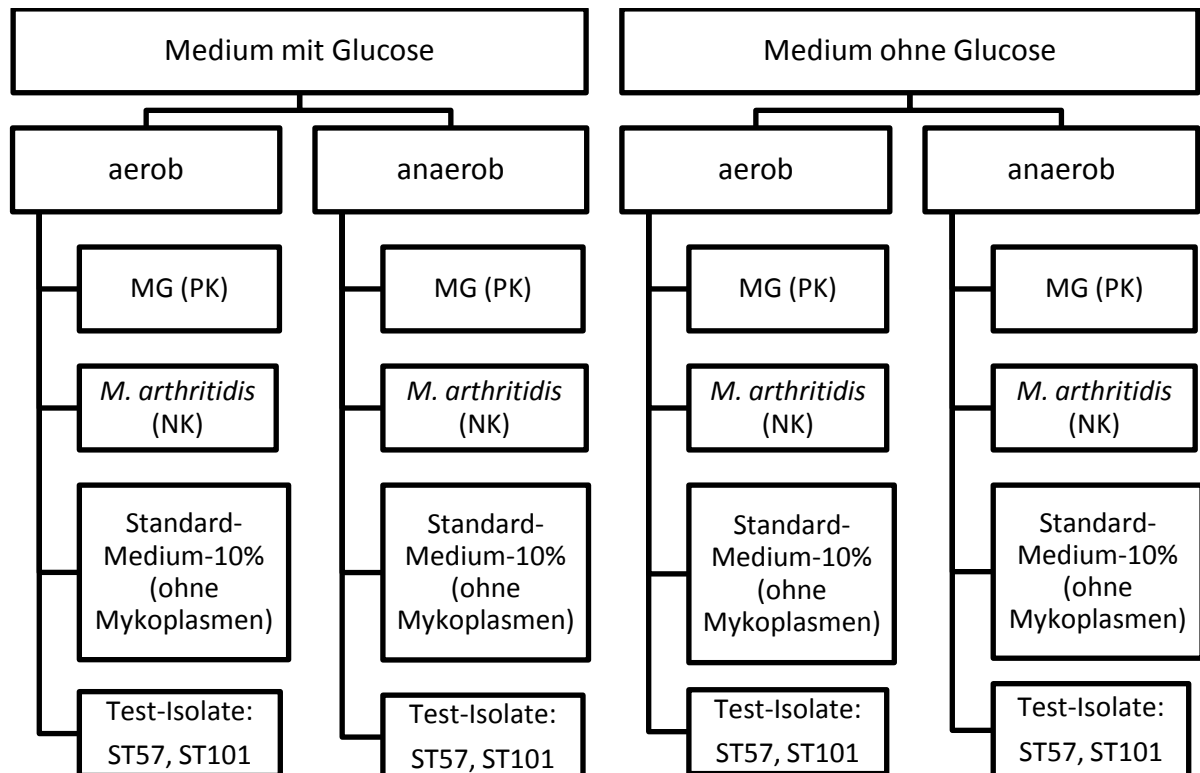


Abbildung 7: Test-Ansätze zur Untersuchung der Fermentation von Glucose nach POVEDA (1998)

*M.* = *Mycoplasma*; MG = *Mycoplasma gallisepticum*; PK = Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle

### 3.2.4.1.2 Hydrolyse von Arginin

Für die Untersuchung der Hydrolyse von Arginin wurde Arginin-Testmedium sowie Testmedium ohne Arginin nach POVEDA (1998) verwendet (siehe Anhang IV.III „Biochemie-Test- und -Kontrollmedien nach POVEDA“). Eingesetzt wurden dabei an Medium mit reduziertem Serumanteil angepasste Mykoplasmenisolate bzw. -referenzstämme (siehe 3.2.4.1) in Standard-Flüssigmedium-10% (siehe Anhang IV.III). Neben den Test-Isolaten ST57 und ST101 wurden für die Hydrolyse von Arginin *M. arthritidis* (Referenzstamm NCTC 10156) als Positivkontrolle sowie *M. gallisepticum* (MG, Referenzstamm

75969) als Negativkontrolle eingesetzt. Die Test-Isolate und Kontroll-Referenzstämme wurden analog der Untersuchung zur Fermentation von Glucose angesetzt (siehe 3.2.4.1.1). Lediglich die Glucose-Testmedien wurden durch die Testmedien „mit Arginin“ und „ohne Arginin“ ersetzt. Die Flüssigmedien und Agarplatten wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen täglich begutachtet. Bei Versuchsende (Tag 14) wurde der pH-Wert aller Flüssigmedien bestimmt. Ein Anstieg des pH-Werts um 0,5 pH-Einheiten oder mehr wurde als positives Testergebnis gewertet. Ein positives Testergebnis bedeutete, dass das getestete Isolat Arginin hydrolysieren konnte.

### 3.2.4.1.3 Hydrolyse von Harnstoff

Für die Untersuchung der Hydrolyse von Harnstoff wurde Harnstoff-Testmedium sowie Testmedium ohne Harnstoff nach POVEDA eingesetzt (siehe Anhang IV.III „Biochemie-Test- und -Kontrollmedien nach POVEDA“). Eingesetzt wurden an Medium mit reduziertem Serumanteil angepasste Mykoplasmenkulturen (siehe 3.2.4.1) in Standard-Flüssigmedium-10% (siehe Anhang IV.III). Neben den Test-Isolaten ST57 und ST101 wurde *M. arthritidis* (Referenzstamm NCTC 10156) als Negativkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle diente *Ureaplasma felinum* (Referenzstamm DSM 24216). Die Kultivierung von *U. felinum* vor dem Versuch erfolgte nach Anweisungen der DSMZ in Ureaplasma Flüssigmedium (siehe Anhang IV.VI „*Ureaplasma*-Flüssig- und -Agarmedium (DSMZ 1076b)“). Die Test-Isolate und Kontroll-Referenzstämme wurden analog der Untersuchung zur Fermentation von Glucose angesetzt (siehe 3.2.4.1.1). Lediglich die Glucose-Testmedien wurden durch die Testmedien „mit Harnstoff“ und „ohne Harnstoff“ ersetzt. Die Flüssigmedien und Agarplatten wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen täglich begutachtet. Bei Abschluss der Untersuchungen (Tag 14) wurde der pH-Wert aller Flüssigmedien bestimmt. Ein Anstieg des pH-Werts um 0,5 pH-Einheiten oder mehr wurde als positives Testergebnis gewertet. Ein positives Ergebnis bedeutete, dass das getestete Isolat Harnstoff hydrolysieren konnte.

### 3.2.4.2 Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur

Die Abhängigkeit des Wachstums von der Inkubationstemperatur der Isolate ST57 und ST101 wurde auf Basis des Wachstumstemperaturbereiches und der optimalen Wachstumstemperatur nach KONAI et al. (1996) in mikroaerophiler Atmosphäre (5% CO<sub>2</sub>) bestimmt. Das Wachstum wurde bei 10°C, 20°C, 23°C, 28°C, 37°C, 42°C, 44°C und 46°C beurteilt. Das zu testende Isolat wurde zunächst bei 37°C für 24 h in bzw auf SP4-Flüssig- und -Agarmedium vorinkubiert (siehe 3.2.1). Die Röhrchen mit SP4-Flüssigmedium wurden vor der Inokulation sechs Stunden bei den jeweiligen Zieltemperaturen vorinkubiert. Zu Versuchsbeginn wurde von dem bei der jeweiligen Zieltemperatur vorinkubierten Isolat eine log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe über 12 Stufen (1:10 bis 1:10<sup>12</sup>) hergestellt. Um sicherzustellen zu können, dass lebensfähige Isolate bei den verschiedenen Temperaturen inkubiert wurden, wurde jeweils ein Aliquot aus der ersten Verdünnungsstufe bei 37°C inkubiert und das Wachstum im SP4-Flüssig- und auf SP4-Agarmedium beurteilt (siehe 3.2.1). In allen Temperaturstufen wurde die Umfärbung des im SP4-Flüssigmedium enthaltenen Indikators Phenolrot von rot nach gelb oder rotviolett nach 8 Stunden sowie danach täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen beurteilt. Die Berechnung der Verdopplungszeiten erfolgte nach KONAI anhand „Medium azidifizierender bzw. alkalinisierender Einheiten“. Diese Methode stellt eine Alternative zu der Zählung koloniebildender Einheiten (KbE) dar. Bei dem Modell nach KONAI wird für die Berechnung angenommen, dass der Indikator umschlägt, sobald eine konstante Bakterienmenge im Testansatz (= Titer) N<sub>c</sub> erreicht ist und die Zuwachsraten unabhängig von der ursprünglich eingesetzten Bakterienmenge (= Ausgangstiter) sind. Basierend auf einer linearen Regression der Anzahl umgefärbter Verdünnungsstufen zu bestimmten Zeitpunkten bei den jeweiligen Inkubations-Temperaturen wurde die Verdopplungszeit t<sub>2</sub> mit Hilfe der Formel  $t_2 = \frac{\ln 2}{\mu}$  aus der für das Isolat und die jeweilige Temperatur spezifischen Wachstumskonstante  $\mu$  berechnet (KONAI et al. 1996). Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Universität Gießen. Die lineare Regression wurde dabei mit dem Programm BMDP 6D berechnet (DIXON 1993).

### 3.2.4.3 Ultrafiltration

Ein Volumen von jeweils 5 ml der Isolate ST57 und ST101 in SP4-Flüssigmedium wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit durch Membranfilter einer Porengröße von 0,8 µm, 0,45 µm und 0,22 µm filtriert. Vor und nach der Filtration wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten (KbE) in den Flüssigkeiten anhand einer dezimalen Verdünnungsreihe bestimmt (TULLY 1983).

### 3.2.4.4 Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie wurde mit den Isolaten ST57 und ST101 eine Färbung nach GRAM, modifiziert nach BARILE (BARILE 1983) durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubationszeit des jeweiligen Isolates in SP4-Flüssigmedium wurde das Medium resuspendiert und etwa 20 µl der Keimsuspension entnommen. Diese Suspension wurde auf einen Objektträger aufgetragen und nach Lufttrocknung auf dem Objektträger durch Überschichtung mit Methanol für 5 min fixiert. Nach Abgießen des Methanols, Wasserspülung und erneuter Lufttrocknung wurde der Objektträger mit Grams Kristallviolett-Lösung für 2 min überschichtet. Die Färbelösung wurde danach abgegossen und der Objektträger mit Jod-Jodkalium-Lösung (Lugolsche Lösung 20%ig) überschichtet. Nach einer Einwirkzeit von 1 min wurde die Lösung mit 96%igem Ethanol abgespült und anschließend für 30 s mit Ethanol überschichtet. Der Objektträger wurde wiederum mit Wasser gespült und dann mit Ziehl-Neelsens Karbol-fuchsin (20%ig) für 10 s gegengefärbt. Nach erneuter Wasserspülung und Lufttrocknung wurden die Mykoplasmen im Lichtmikroskop bei 1.000-facher Vergrößerung betrachtet. Zur Überprüfung der Färbung wurde *Staphylococcus aureus* als grampositive und *Proteus mirabilis* als gramnegative Bakterien verwendet (Tabelle 10). Dazu wurde etwas Koloniematerial mit einer Öse von der Schafblutagarplatte aufgenommen und mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung auf einem Objektträger vermischt. Das Material wurde luftgetrocknet und anschließend analog zu den Mykoplasmen gefärbt.

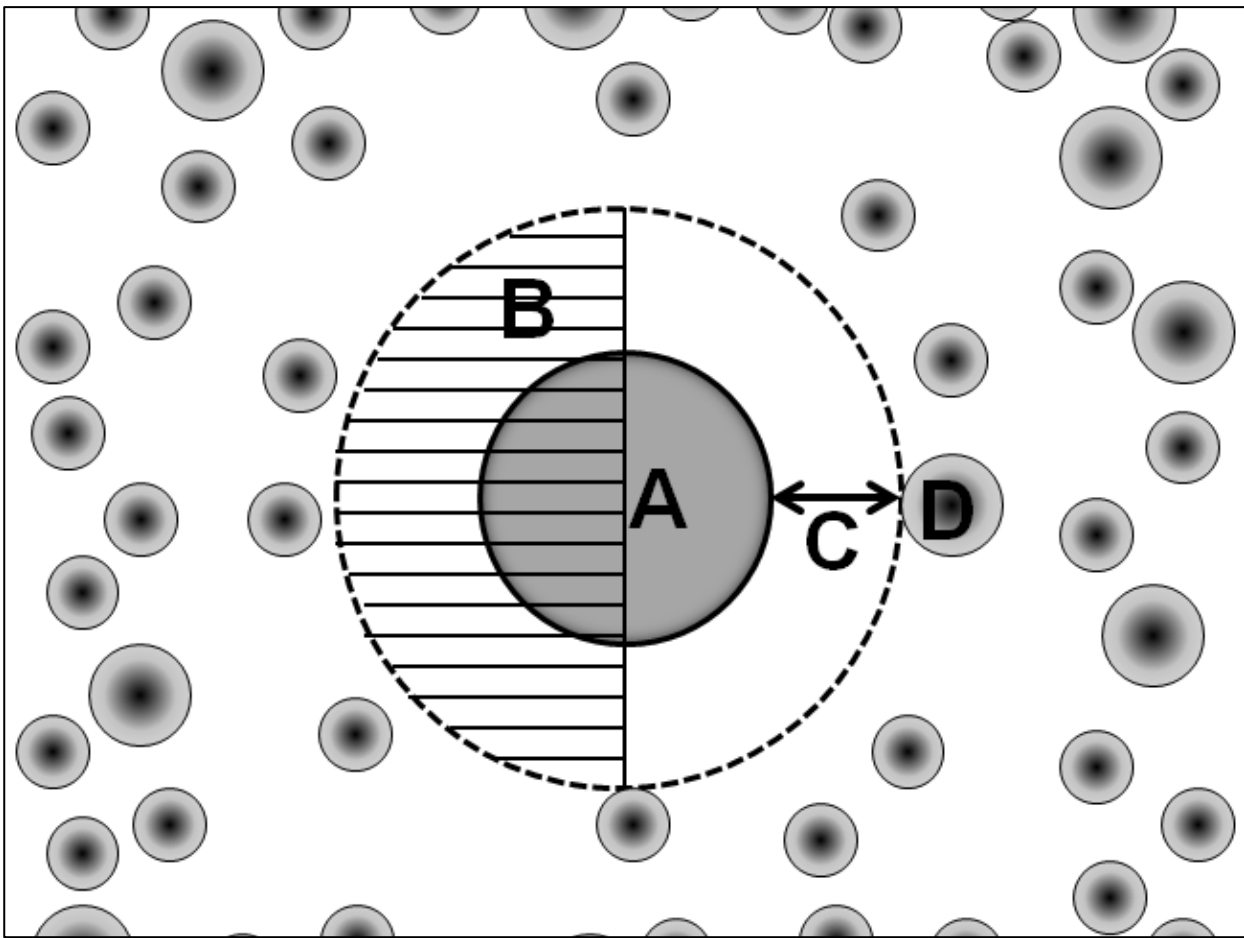
### 3.2.4.5 Elektronenmikroskopie

Das Isolat ST57 wurde im Rahmen der Speziesbeschreibung zusätzlich elektronenmikroskopisch untersucht. Diese Untersuchung wurde mit Unterstützung von Herrn Dr. W. Herbst am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Dabei wurde Koloniematerial des Isolates mit

einer sterilen Öse vom SP4-Agarmedium abgenommen und in 0,15 M Natriumchlorid suspendiert. Mit Formovar/Kohle beschichtete Kupfernetzchen wurden für 15 Min auf einen Tropfen der Bakteriensuspension aufgelegt. Getrocknet wurden die Kupfernetzchen durch leichte Berührung mit Filterpapier. Im Anschluss wurden diese ein bis zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Färbung (Negativkontrastierung) erfolgte durch einminütiges Auflegen der Kupfernetzchen auf einen Tropfen 2%ige Phosphorwolframsäure in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Die Proben wurden elektronenmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 10.000-40.000 untersucht.

### 3.2.4.6 Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin

Im Rahmen der Speziesbeschreibung erfolgte die Untersuchung des Isolates ST57 auf Cholesterinabhängigkeit des Wachstums anhand des Digitonin-Inhibitions-Tests nach POVEDA (1998). Dieser Test weist die Cholesterinabhängigkeit indirekt über eine Wachstumshemmung in einem Digitonin-Gradienten nach. Digitonin führt zur Fällung von Cholesterin, womit dieses wiederum den Mikroorganismen nicht mehr zur Zellwandsynthese zur Verfügung steht. Verwendet wurden für diesen Test Standard-Flüssigmedium-20%, Standard-Festmedium (siehe Anhang IV.II: „Mykoplasmen-Standardmedium nach POVEDA“) und Antibiotika-Testblättchen. Ein Teil der Antibiotika-Testplättchen wurde mit einer 1,5%igen Digitonin-Lösung getränkt und über Nacht getrocknet (POVEDA 1998). Die Untersuchung der Cholesterinabhängigkeit wurde mit dem Isolat ST57, sowie den Referenzstämmen *M. falconis* (H/T1) und *A. laidlawii* (PG8) in SP4-Flüssigmedium durchgeführt. Dabei diente *M. falconis* als Kontrolle für cholesterinabhängiges Wachstum und *A. laidlawii* als Kontrolle für cholesterin-unabhängiges Wachstum. Die Isolate wurden durch dreimalige Subkultivierung (siehe 3.2.4.1) im Abstand von 24 h an das Standard-Flüssigmedium-20% angepasst und 24 h vor Testbeginn in Standard-Flüssigmedium-20% vorinkubiert. Die Agarplatten des Standard-Festmediums wurden vor Testbeginn eine Stunde bei 37°C getrocknet. Die Aliquots des in Standard-Flüssigmedium-20% vorinkubierten Isolates bzw. der vorinkubierten Referenzstämme wurden 1:100 und 1:10<sup>4</sup> verdünnt und 200 µl beider Verdünnungen auf je einer Agarplatte mit Standard-Festmedium ausgestrichen. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgekippt und jeweils ein mit Digitonin-Lösung getränktes sowie ein nicht-getränktes Antibiotika-Testblättchen mit einer sterilen Pinzette auf die Platte gelegt. Die nicht-getränkten Antibiotika-Testplättchen dienten dabei als Kontrollen zur Evaluation des Einflusses der Plättchen selbst auf die Hemmhofgrößen.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Messgrößen des Digitonin-Tests**

Auf der beimpften Agarplatte (Schema = Aufsicht) bildet sich um das Antibiotika-getränkte Testplättchen (A) abhängig von dem getesteten Isolat ein Hemmhof (B). Gemessen wird jeweils der Abstand (C) zwischen dem Rand des Testplättchens und dem Rand der nächstgelegenen Mykoplasmen-Kolonie (D).

Die beimpften Agarplatten wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 h inkubiert. Nach jeweils 24 und 48 h wurden die Abstände zwischen den Testplättchen und der nächstgelegenen Kolonie im Auflichtmikroskop vermessen. Die Abstand zwischen den Testplättchen und der nächstgelegenen Kolonie der cholesterin-abhängigen und -unabhängigen Kontrollorganismen wurden dazu mit dem Abstand zwischen den Testplättchen und der nächstgelegenen Kolonie des Teststammes verglichen (Abstand C, Abbildung 8). Bei einem Abstand von 5-20 mm wurde das Wachstum als cholesterin-abhängig, bei kleineren oder fehlenden Abstand wurde das Wachstum als cholesterin-unabhängig gewertet.



### 3.2.4.7 Immunobinding Assay

Der Immunobinding Assay (IBA) nach KOTANI und MCGARRITY ist ein Test zur Speziesidentifizierung von Mykoplasmenkolonien auf Agarplatten. Immunobinding Assays (KOTANI und MCGARRITY 1985) wurden in dieser Arbeit zunächst mit 10 Präimmunseren von Kaninchen durchgeführt, die zur Produktion von Hyperimmunserum gegen das Isolat ST57 eingesetzt werden sollten. Dabei wurde die unspezifische Reaktivität mit dem Isolat ST57 sowie den Referenzstämmen von *M. falconis* (H/T1) und *M. buteonis* (Bb/T2g) untersucht. Von den Kaninchen, bei denen keine Reaktivität des Präimmunserums festgestellt wurde, wurden zwei Tiere ausgewählt und immunisiert (siehe 3.2.5.3). Mit den dabei gewonnenen Kaninchen-Hyperimmunseren (Entblutungsseren) gegen das Isolat ST57 (ST57-Antiserum), im Folgenden „ST57-Antiserum“ genannt, wurden weitere Immunobinding-Assays durchgeführt. Getestet wurden die ST57-Antiseren dabei gegen ausgewählte Referenzstämmen. Dazu zählten alle vorliegenden Referenzstämmen aviärer Mykoplasmen sowie Referenzstämmen der beiden mit ST57 nah verwandten nicht-aviären Mykoplasmenpezies *M. canis* und *M. felis* (Tabelle 9). Das Isolat ST57 wurde wiederum gegen alle Referenz-Kaninchen-Hyperimmunseren der Referenzstämmen der oben genannten Mykoplasmenpezies (Tabelle 9) getestet. Zuletzt wurden die Isolate ST24-1, ST56-1, ST99 und ST102 (Tabelle 8) als potentielle Isolate derselben Spezies mittels IBA mit den ST57-Antiseren getestet.

Für den IBA wurden die Mykoplasmenkolonien zunächst auf Nitrocellulosemembran mit Porendurchmessern von 0,45 µm transferiert. Dazu wurden zuvor ausgestanzte Plättchen (Ø 1,4 cm) auf Agarplatten (SP4-Festmedium), die mit deutlich abgegrenzten Kolonien besiedelt waren, gelegt. Nach 10 min wurden die Plättchen mit der Kontaktfläche zum Agar nach oben in eine 24-Well-Makrowellplatte gelegt und die Oberseite markiert. Auf die Plättchen wurden 300 µl eines Kaninchen-Hyperimmunserums in einer Verdünnung von 1:1.000 gegeben und die Makrowellplatte für 30 Min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die enthaltenen spezifischen Antikörper binden in dieser Zeit an spezifische Antigene in den Kolonien, sofern es sich um die entsprechende Spezies handelt. Anschließend wurde das Serum mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Plättchen drei Mal mit ca. 5 ml Dulbeccos PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Auf die gewaschenen Plättchen wurden 300 µl Goat-Anti-Rabbit (GAR)-Peroxidase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:10<sup>3</sup> gegeben. In diesem Schritt bindet der zweite Antikörper wiederum an den ersten Antikörper. Die Makro-

wellplatte wurde 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde wiederum das Serum mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Plättchen drei Mal mit Dulbeccos PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 300 µl Chlor-naphthol-Substratlösung wurden die Plättchen bis zu einer deutlich sichtbaren blauen Farbreaktion entwickelt. Die blaue Farbreaktion der reaktiven Kolonien entsteht, sobald die Peroxidase den Farbstoff 4-Chlor-1-Naphthol oxidiert. Durch die Zugabe von Leitungswasser wurde die Farbentwicklung gestoppt. Nach Absaugen des Leitungswassers mit der Vakuumpumpe und der Trocknung der Plättchen konnten diese unter dem Auflichtmikroskop bei 16- bis 40-facher Vergrößerung ausgewertet werden. Bei einer positiven Reaktion sind die blau gefärbten Kolonien deutlich vom Hintergrund abgrenzbar, bei einer negativen Reaktion finden sich weiße Kolonien bei bläulicher Hintergrundfärbung (siehe Abbildung 18).

### **3.2.5 Herstellung spezifischer Kaninchen-Hyperimmunseren gegen das Isolat ST 57**

Die Herstellung der Kaninchen-Hyperimmunseren gegen das Isolat ST57 erfolgte in dieser Arbeit nach der Methode von BRADBURY (BRADBURY et al. 1983). Dabei werden Isolate in speziellen Medien mit reduziertem Serumanteil vermehrt (s. u.). Diese Isolate werden anschließend aus der Kultur gewonnen und aufgereinigt um Antigen (v.a. Protein) für die Immunisierung der Kaninchen zu erhalten (siehe 3.2.5.1). Das dadurch gewonnene Antigenpellet des Isolates wird anschließend resuspendiert, mit einem Adjuvans versetzt und zwei Kaninchen (New Zealand White Rabbits) nach einem festgelegten Schema injiziert (siehe 3.2.5.3). Von diesen beiden Kaninchen wird Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Verwendet wurde für diesen Versuch Flüssigmedium modifiziert nach HAYFLICK mit 10%, 5%, 2,5% und 1% "Ultra Low IgG" fetalem Kälberserum, nachfolgend „AS10“, „AS5“, „AS2,5“ und „AS1“ genannt (HAYFLICK 1965; YAVARI 2010) (siehe Anhang IV.V „Flüssigmedium modifiziert nach Hayflick“). Die Adaptation des Isolates an das serumreduzierte Medium erfolgte analog zu der Adaptation an die Medien zur biochemischen Differenzierung (siehe 3.2.4.1).

### 3.2.5.1 Antigenpräparation

Die Antigenpräparation erfolgte nach der Beschreibung von YAVARI (2010). Nach Adaptation des Isolates ST57 an das nährstoffreduzierte Flüssigmedium AS2,5 wurde das Isolat in insgesamt zwei Liter des Mediums vermehrt. Die Kulturen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C geerntet und bei 3.000 × g für 1,5 h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets drei Mal mit jeweils 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4 gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Suspension bei 3.000 × g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 15 ml steriler Dulbeccos PBS-Lösung resuspendiert und mit einer Zentrifugen-Filtereinheit (5 kDa) bei 3.000 × g für 15 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Retentat (Bakterienpellet) in 1 ml Dulbeccos PBS-Lösung resuspendiert. Die Antigen-suspensionen wurden bei -80°C gelagert. Ein Aliquot von 25 µl wurde für die Schätzung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA) verwendet. (siehe 3.2.5.2). Zur Bestätigung der Identität des Isolates wurde aus dem letzten Schritt ein Aliquot entnommen, daraus DNA isoliert, eine ITS-PCR durchgeführt, das Amplikon sequenziert und anhand bereits bekannter Sequenzen des Isolates ST57 identifiziert (siehe 3.2.3).

### 3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA)

Der BCA-Proteinnachweis wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen eingesetzt. Dieser Nachweis basiert auf der Eigenschaft von Proteinen, alkalisches Kupfer-II zu Kupfer-I zu reduzieren. Der Grad der Reduktion ist konzentrationsabhängig. Die Bicinchoninsäure ist ein hochspezifisches Chromogen für Kupfer-II und Kupfer-I. Mit Kupfer-II bildet es grüne Komplexe, mit Kupfer-I lilafarbene Komplexe. Das Absorptionsmaximum der lilafarbenen Komplexe liegt bei einer Wellenlänge des Lichtes von 562 nm. Die Proteinkonzentration einer Probe kann daher anhand der bei 562 nm gemessenen Extinktion ( $E_{562}$ ), im Vergleich zu einem verwendeten Proteinstandard, bestimmt werden (SMITH et al. 1985). Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Bicinchoninic-Assay-Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung wurde mit dem Nanodrop 2000c und einer Präzisionsküvette aus Quarzglas durchgeführt. Nach Erstellung einer Eichkurve mit den Proteinstandard-Lösungen (Bovines Serumalbumin BSA) wurden die Proben jeweils

unverdünnt und 1:10 verdünnt gemessen. Für die Berechnungen wurde der Wert der unverdünnten Probe verwendet, sofern dieser nicht über dem am höchsten konzentrierten Proteinstandard lag.

### 3.2.5.3 Immunisierung, Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Immunisierung von zwei, nach Testung der Präimmunseren ausgewählten (siehe 3.2.4.7), Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit erfolgte durch die Firma BioGenes GmbH, Berlin (Auftrag Nr. 41888; Tier Nr. 24332 (75) und 24333 (82)) nach dem Immunisierungsprotokoll aus Tabelle 16. Der Tierversuch wurde von der Firma BioGenes GmbH bei der zuständigen Behörde (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern) angezeigt (Aktenzeichen 7221.3-2-030/13). Es wurde ein von der Firma selbst hergestelltes Adjuvans verwendet, welches nach Firmenangaben inkomplettem Freudschem Adjuvans in der Zusammensetzung ähnelt und aus Bestandteilen von Grün- und Blaualgen besteht. Die Blutentnahmen erfolgten nach Sedation der Tiere mit Acepromazin durch Punktion der Ohrvene. Vor der finalen Entblutung wurden die Tiere mittels Bolzenschuss betäubt. Die Entblutung erfolgt mittels Kehlschnitt. Das bei den Blutentnahmen bzw. der Entblutung gewonnene Blut wurde zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, mit 0,02% Thimerosal (Konservierungsmittel) versetzt, bei 4°C gelagert und gekühlt versandt.

**Tabelle 16: Immunisierungsprotokoll zur Herstellung von Kaninchen-Hyperimmunseren gegen Antigen des Isolates ST57. Zeitpunkte der Immunisierung mit Angabe der verwendeten Antigenmengen sowie Zeitpunkte der Blutentnahmen und Entblutung der Kaninchen**

Tag	Maßnahmen
0	1. Blutentnahme, Präimmunserum Erstimmunisierung (300 µg Antigen/Kaninchen, subkutan)
7	2. Immunisierung (100 µg Antigen/Kaninchen, subkutan)
14	3. Immunisierung (100 µg Antigen/Kaninchen, subkutan)
21	4. Immunisierung (100 µg Antigen/Kaninchen, subkutan)
35	2. Blutentnahme (20 ml Serum/Kaninchen)
46	3. Blutentnahme (20 ml Serum/Kaninchen)
53	5. Immunisierung (100 µg Antigen/Kaninchen, subkutan)
63	Entblutung beider Kaninchen

### 3.2.6 Prävalenzstudie

Für die Prävalenzstudie wurden alle 83 vorliegenden Kulturen sowie eine Probe mit extrahierter DNA aus der Studie HAGEN et al. (2004) verwendet (siehe Tabelle 8). Aus den Kulturen wurde dazu zunächst DNA extrahiert (siehe 3.2.3.1), deren Konzentration gemessen sowie ggf. eingestellt (siehe 3.2.3.2). Parallel wurden alle Kulturen subkultiviert, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert (siehe 3.2.1). Die extrahierte Mykoplasmen-DNA aller 84 Proben von Weißstorchnestlingen wurde mit der neu entwickelten spezies-spezifischen ST57-PCR untersucht (siehe 3.2.3.3). Pro Nestling lag jeweils eine Kultur bzw. Probe vor. Die Datensätze wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP (DIXON 1993) und der Software BiAS (ACKERMANN 2010) durchgeführt.

Zunächst wurde der Anteil ST57-PCR-positiver Nestlinge durch Division der Anzahl ST57-PCR positiver Proben durch die Gesamtzahl untersuchter Proben von Weißstorchnestlingen berechnet (Prävalenzschätzer). Um die Genauigkeit des Prävalenzschätzers zu quantifizieren wurde das 95%-Konfidenzintervall (mit  $\alpha = 0,05$ ) auf Basis der Gesamtzahl untersuchter Proben (Realisationen  $n$ ), positiver Proben (Erfolge  $k$ ) und des Prävalenzschätzers (Parameter  $\vartheta$ ) berechnet (SACHS et al. 2006). Die ST57-PCR-positiven Nestlinge wurden anhand vorliegender Datensätze (siehe Tabelle 8) den Horsten und deren geographischer Lage zugeordnet. Für die weiteren statistischen Auswertungen wurden die Horste den geographischen Regionen 1 (Nord) und 2 (Süd) zugeordnet. ST14 stammte als einziger Nestling aus einer anderen geographischen Region, daher wurde dieser als „Ausreißer“ bei den weiteren statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt (siehe Tabelle 8 und Abbildung 6). Zunächst wurde in einer explorativen Analyse (1 Fall = 1 Nestling) mittels Chi-Quadrat-Test untersucht, ob es regionale Unterschiede in der Häufigkeit des Vorkommens ST57-ähnlicher-Isolate bei Weißstorchnestlingen gab. In einem zweiten Schritt wurden anhand einer „generalized mixed model analysis“ mit hierarchischer Struktur der Einflussfaktoren mit dem fixen Faktor Region zwei weitere Untersuchungen durchgeführt: Bei der ersten Untersuchung

wurde der Einfluss der Anzahl der Nestlinge pro Horst auf den Anteil positiver Nachweise von ST57 untersucht. Der Faktor Anzahl Nestlinge pro Horst diente dabei als „Random Faktor“, gegenübergestellt wurden die Fälle „1 Nestling“ und „mehr als 1 Nestling“. Bei der zweiten Untersuchung wurde neben der Anzahl Nestlinge pro Horst das Alter der Nestlinge als „Random Faktor“ berücksichtigt. Unterschieden wurden beim Alter die Fälle „bis 3 Wochen“ und „über 3 Wochen“, da Weißstorchnestlinge ab einem Alter von drei Wochen ihre Körpertemperatur selbstständig regulieren können. Als Alter wurde das geschätzte Alter durch die Probennehmer herangezogen. Der vollständige Datensatz zu diesen Untersuchungen findet sich in Anhang VI: „Statistische Auswertung“.

# 4 ERGEBNISSE

Für diese Arbeit standen 83 Mykoplasmenkulturen und eine DNA-Probe aus Trachealtupfern klinisch unauffälliger Weißstorchnestlinge im Alter von 2-7 Wochen zur Verfügung (HAGEN et al. 2004) (Tabelle 8). In Voruntersuchungen zeigte sich, dass es bei einem Teil der Isolate innerhalb von 24 h bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen zu einem Farbumschlag des SP4-Flüssigmediums nach gelb, bei anderen wiederum zu einem Farbumschlag nach rotviolett kam. Als Vertreter dieser beiden Gruppen wurden die Isolate ST57 (gelb) und ST101 (rotviolett) zufällig ausgewählt. Anschließend wurde exemplarisch das 16S-rRNA-Gen dieser beiden Isolate sequenziert. Dabei wurde festgestellt, dass es sich wahrscheinlich um neue, bislang unbeschriebene, Spezies handelt (LIERZ et al. 2011).

## 4.1 Kultivierung von Mykoplasmen

Aus allen 83 vorliegenden Kulturen waren in SP4-Flüssig- und SP4-Agarmedium Mykoplasmen kultivierbar. Der im SP4-Medium enthaltene Indikator Phenolrot zeigte bei allen Kulturen innerhalb von 24 h einen Farbumschlag nach gelb bzw. rotviolett. Auf den SP4-Agarplatten bildeten sich innerhalb von 24 h deutlich sichtbare, morphologisch unterschiedliche, Kolonien.

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurde eine Stichprobe von sieben Kultur ausgewählt, aus denen auf Basis morphologischer Unterscheidung ein oder zwei Isolate (engl. „clone“) gewonnen wurden (siehe 3.2.1). Vier dieser Isolate zeigten, analog zu dem Isolat ST57, eine Gelbfärbung des SP4-Flüssigmediums: ST24-1, ST56-1, ST99-1, ST102-1. Eine rotviolette Färbung des SP4-Flüssigmediums war, analog zu dem Isolat ST101, bei den acht Isolaten ST24-2, ST26-1, ST26-2, ST39-2, ST56-2, ST71-1, ST71-2 und ST102-2 zu beobachten.

## 4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurde eine Stichprobe der vorhandenen Isolate und Kulturen ausgewählt. Es handelte sich dabei, neben den Isolaten ST57 und ST101 um die Kulturen ST24, ST26, ST39, ST56, ST71, ST99 und ST102.

Tabelle 17: Bezeichnung der Isolate sowie GenBank-, DSMZ- und ATCC-Zugangsnummern (Accession No.) der mittels 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992) modifiziert nach HAGEN (2007), ITS-PCR nach RAMÍREZ (2008) und Amplikon-Sequenzierung untersuchten Mykoplasmen-Isolate von Weißstorchnebstlingen und eines adulten Weißstorches (\*), sowie Ergebnisse der Gruppenzuordnung der Isolate auf Basis der 16S-rRNA-Gensequenz

Veröffentlichte Bezeichnung des Isolates (in dieser Arbeit verwendete Abkürzung)	GenBank Accession No. der 16S-rRNA-Gensequenz	GenBank Accession No. der ITS-Gensequenz	Bezeichnung des Isolates bei DSMZ und ATCC	Gruppenzuordnung
ST 24 (ST24-1)	KP264569	KP264575	DSM 29008	<i>Mycoplasma pullorum</i> -ähnlich
ST 56 clone 1 (ST56-1)	KP264570	KP264576	DSM 29054	
ST 57 <sup>T</sup> (ST57)	KP264571	JN794081	DSM 25251 ATCC BAA-2401	
ST 99 (ST99)	KP264572	KP264577	DSM 29009	
ST 102 (ST102-1)	KT318270	KT318276	DSM 29010	
1566/2012*	KP264574	KP264579	DSM 29056	
ST 24 clone 2 (ST24-2)	KT318265	KT318271	-	<i>Mycoplasma gypis</i> -ähnlich
ST 39 clone 2 (ST39-2)	KT318266	KT318272	-	
ST 56 clone 2 (ST56-2)	KT318267	KT318273	DSM 29055	
ST 71 clone 1 (ST71-1)	KT318268	KT318274	-	
ST 71 clone 2 (ST71-2)	-	-	-	
ST 26 clone 1 (ST26-1)	KT318269	KT318275		<i>Mycoplasma spumans</i> -ähnlich
ST 26 clone 2 (ST26-2)	-	-	-	
ST 101 (ST101)	FJ155816	JX467696	-	
ST 102 clone 2 (ST102-2)				

ATCC = American Type Culture Collection, DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, ITS = 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure

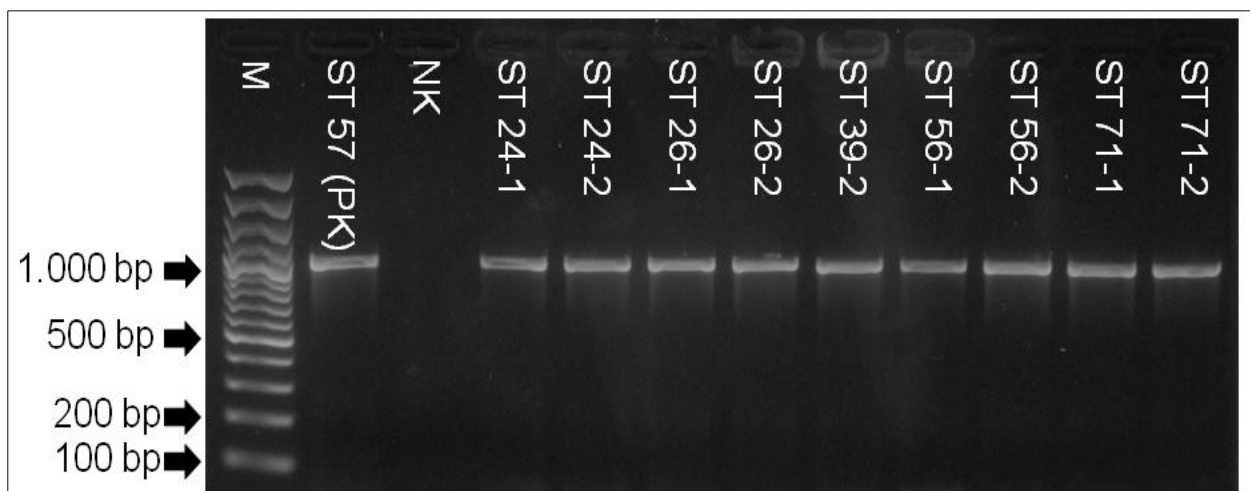


## ERGEBNISSE

Die Kulturen wurden ausgewählt, da sie in der speziesspezifischen ST57-PCR eine positive Reaktion zeigten (siehe 4.5). Somit war aus diesen Kulturen potentiell die Gewinnung weiterer Isolate möglich, die u.a. im Rahmen der Speziesbeschreibung bei der Stammsammlung der DSMZ hinterlegt werden sollten. Des Weiteren wurden die Sequenzen der 16S-rRNA-Gene und der ITS dieser Stämme in der öffentlich zugänglichen Datenbank GenBank hinterlegt (Tabelle 17).

### 4.2.1 16S-rRNA-Gensequenzvergleiche und phylogenetischer Stammbaum

Bei der 16S-rRNA-PCR wurde bei allen 15 untersuchten Isolaten (siehe Tabelle 17) von Weißstorchnestlingen ein DNA-Abschnitt von etwa 1.000 bp amplifiziert (Abbildung 9). Dieser Abschnitt wurde als Basis für Sequenzvergleiche (Alignments) und die Konstruktion phylogenetischer Stammbäume verwendet.

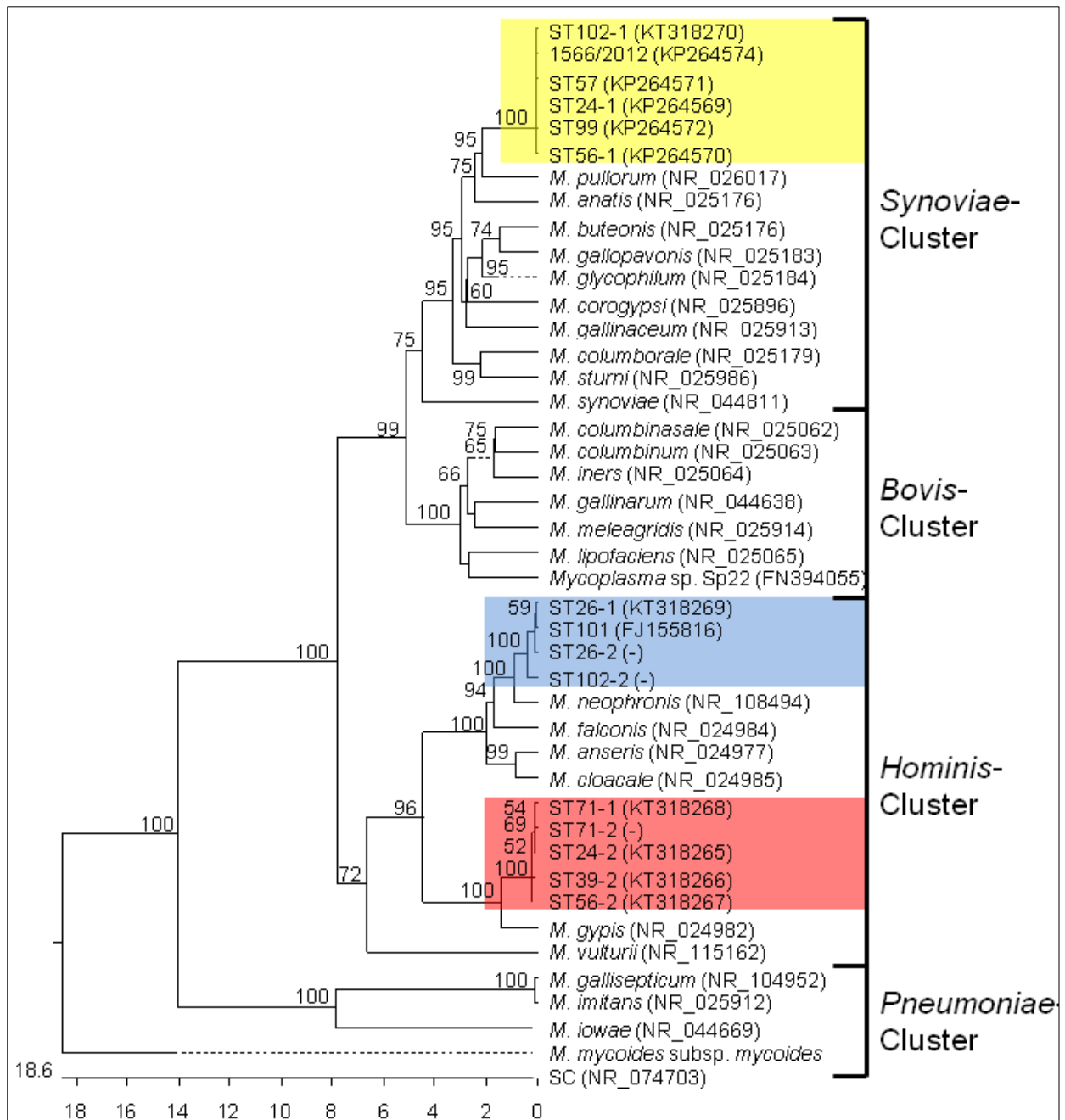


**Abbildung 9:** 16S-rRNA-PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992) modifiziert nach HAGEN (2007): DNA-Amplikons verschiedener Isolate in der erwarteten Länge (1.000 bp). Agarosegel 2%, Färbung GelRed™

M = 100 bp-DNA-Molekulargewichtsmarker; PK = Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); bp = base pairs (Basenpaare)

Anhand ihrer 16S-rRNA-Gensequenz konnten die Isolate drei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Tabelle 17). Die erste Gruppe bestand aus fünf Isolaten (ST24-1, ST56-1, ST57, ST99-1 und ST102-1), die dem Synoviae-Cluster zugeordnet werden konnten (Abbildung 10). Alle Isolate dieser Gruppe hatten in dem SP4-Flüssigmedium außerdem eine Gelbfärbung des Mediums gezeigt (4.1). Dieser Gruppe konnte weiter-

hin ein Isolat aus einem adulten Weißstorch (1566/2012) zugeordnet werden (siehe Tabelle 17 und Abbildung 10), der in Ranstadt (Hessen) flugunfähig aufgefunden und in der KVRAF der JLU Gießen untersucht wurde (siehe Anhang V.IV „Sequenzen anderer Mykoplasmen“). Die 16S-rRNA-Gensequenzhomologie der Isolate untereinander lag bei 99,9%-100%. Die Spezies mit den höchsten 16S-rRNA-Gensequenzhomologien zu den untersuchten Isolaten waren *M. pullorum* (94,9%-95,4%) und *M. anatis* (94,0%-94,3%). Die 16S-rRNA-Gensequenzhomologien dieser Isolate zu allen weiteren Mykoplasmaspezies des Synoviae-Clusters lagen unter 94%. Aufgrund der nächsten verwandten Spezies wurden diese Isolate als „***M. pullorum*-ähnliche**“ Gruppe benannt (Tabelle 18). Da *M. anatis* und *M. pullorum* Sequenzhomologien über 94% zu ST57 und der „*M. pullorum*-ähnlichen“ Gruppe aufwiesen, mussten diese zusätzlich serologisch von den Isolaten differenziert werden (siehe Tabelle 28), um ST57 und die anderen Isolate dieser Gruppe als Vertreter einer neuen Spezies beschreiben zu können (BROWN et al. 2007).



**Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der 16S-rRNA-Gensequenzen (Algorithmus: Clustal W): Vergleich der Sequenzen der *Mycoplasma*-Isolate von Weißstorchnestlingen und eines adulten Weißstorches (1566/2012) aus dieser Arbeit mit bekannten Sequenzen aviärer Mykoplasmen des Genus *My-coplasma***

Als Außengruppe diente die Sequenz von *M. mycoides* subsp. *mycoides*. Zahlen an den Knotenpunkten stellen Bootstrapping-Werte dar. Alle Werte sind auf ganze Zahlen gerundet, nur Werte über 50 sind dargestellt. Die Zahlenleiste stellt Nukleotid-Substitutionen pro 100 Residuen dar. Die Bezeichnungen in Klammern sind Zugangsnummern, unter denen die Sequenzen in der Datenbank GenBank öffentlich zugänglich sind. *M.* = *Mycoplasma*; Farbböcke: Gelb = „*M. synoviae*-ähnliche“ Isolate; Blau = „*M. spumans*-ähnliche“ Isolate; Rot = „*M. gypis*-ähnliche“ Isolate.

## ERGEBNISSE

Tabelle 18: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich des 16S-rRNA-Gens zwischen den "Mycoplasma pullorum-ähnlichen" Mykoplasmen-Isolaten und Mykoplasmen des Synoviae-Clusters

Mykoplasmen- spezies bzw. -isolat	Homologie %					
	ST102-1	ST99-1	ST57	ST56-1	ST24-1	1566/2012
<i>M. alligatoris</i>	93,3	93,2	93,2	93,2	92,8	93,2
<i>M. anatis</i>	<u>94,2</u>	<u>94,3</u>	<u>94,3</u>	<u>94,3</u>	<u>94,0</u>	<u>94,3</u>
<i>M. bovirhinis</i>	92,9	92,8	92,7	92,5	92,1	92,5
<i>M. buteonis</i>	91,9	91,9	92,0	92,0	91,6	92,0
<i>M. canis</i>	93,0	93,1	93,1	93,1	92,7	93,1
<i>M. citelli</i>	92,7	92,8	92,5	92,3	91,9	92,3
<i>M. columborale</i>	93,1	93,2	93,0	93,0	92,6	93,0
<i>M. corogypsi</i>	92,8	92,8	92,9	92,8	92,5	92,8
<i>M. crocodyli</i>	93,2	93,3	93,2	92,8	92,5	92,8
<i>M. cynos</i>	92,2	92,3	92,1	92,1	91,7	92,1
<i>M. edwardii</i>	93,8	93,8	93,8	93,8	93,4	93,8
<i>M. felis</i>	91,5	91,6	91,3	91,4	91,1	91,4
<i>M. gallinaceum</i>	92,7	92,8	92,8	92,7	92,3	92,8
<i>M. gallopavonis</i>	91,2	91,2	91,3	91,4	91,0	91,4
<i>M. glycyphilum</i>	93,3	93,3	93,4	93,3	93,0	93,3
<i>M. leonicaptivi</i>	93,3	93,3	93,1	93,1	92,7	93,1
<i>M. mustelae</i>	92,7	92,6	92,5	92,5	92,1	92,5
<i>M. oxoniensis</i>	92,7	92,8	92,6	92,6	92,2	92,6
<i>M. pullorum</i>	<u>95,3</u>	<u>95,3</u>	<u>95,4</u>	<u>95,3</u>	<u>94,9</u>	<u>95,3</u>
<i>M. sturni</i>	92,2	92,2	92,3	92,2	91,8	92,2
<i>M. synoviae</i>	91,6	91,7	91,3	91,1	90,7	91,1
<i>M. verecundum</i>	91,8	91,9	91,9	92,0	91,6	92,0
<b>1566/2012</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,9</b>	<b>***</b>
<b>ST24-1</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>***</b>	
<b>ST56-1</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>***</b>		
<b>ST57</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>***</b>			
<b>ST99-1</b>	<b>100</b>	<b>***</b>				
<b>ST102-1</b>	<b>***</b>					

Unterstrichen: Sequenzhomologie 94,0%-98,8%; Fettdruck: Sequenzhomologie 98,9%-100%, *M.* = *Mycoplasma*

Alle weiteren Isolate führten bei der Kultivierung zu einer Umfärbung des SP4-Mediums zu rotviolett und waren anhand ihrer Kolonimorphologie nicht differenzierbar. Anhand der Sequenzhomologien zeigte sich hingegen, dass es sich genetisch um zwei deutlich abgrenzbare Gruppen von Isolaten handelte.

Die zweite Gruppe bestand aus vier Isolaten (ST26-1, ST26-2, ST101 und ST102-2), die aus drei Nestlingen stammten. Diese Isolate wurden auf Basis der 16S-rRNA-Gensequenzhomologien dem Hominis-Cluster zugeordnet (Abbildung 10). Die Spezies mit der höchsten Sequenzhomologie war *M. spumans* (97,2%-98,9%), daher wurden diese Isolate als „***M. spumans*-ähnliche“ Gruppe** benannt. Im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen waren diese Isolate mit Sequenzhomologien von 99,0% bis 99,8% untereinander heterogener (Tabelle 19). Das Isolat ST101 wies mit 98,9% eine sehr hohe Sequenzhomologie mit *M. spumans* auf. Aufgrund dieser Sequenzhomologie, sowie nicht zur Verfügung stehender Antiseren gegen die Vielzahl von Mykoplasmenpezies mit einer Sequenzhomologien von über 94%, erfolgten hier schließlich keine weiteren Schritte zur Speziesbeschreibung. In Voruntersuchungen reagierte dieses Isolat im Immunobinding Assay jedoch nicht mit *M. spumans*-Antiserum (LIERZ, unveröffentlichte Daten).

Eine dritte Gruppe bildeten fünf Isolate aus vier Nestlingen (ST24-2, ST39-2, ST56-2, ST71-1 und ST71-2). Diese Isolate konnten anhand der 16S-rRNA-Gensequenzhomologien ebenfalls dem Hominis-Cluster zugeordnet werden (Abbildung 10) und wiesen untereinander deutliche Homologien von 99,6% bis 99,9% auf. *M. gypis* war mit 97,0% bis 97,3% die am nächsten verwandte Spezies (Tabelle 19), daher wurden diese Isolate als „***M. gypis*-ähnliche“ Gruppe** bezeichnet. Alle weiteren Spezies dieses Clusters wiesen Homologien unter 94% auf.

Das Isolat Sp22, welches aus der Lunge eines Weißstorchs isoliert wurde (SPERGSEER und HÖFLE HANSEN 2009b), war dem Bovis-Cluster zuzuordnen und nah mit *M. lipofaciens* verwandt. Mit den im Rahmen dieser Arbeit isolierten Mykoplasmen zeigte die 16S-rRNA-Gensequenz des Isolates Sp22 eine sehr geringe Homologie von 89,9-90,8% zu den Isolaten der „*M. pullorum*-ähnlichen“ Gruppe, 85,4-85,7% zu den Isolaten der „*M. gypis*-ähnlichen“ Gruppe sowie 86,3-86,7% zu den Isolaten der „*M. spumans*-ähnlichen“ Gruppe.

## ERGEBNISSE

Tabelle 19: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich des 16S-rRNA-Gens zwischen den „*Mycoplasma spumans*-ähnlichen“ und „*Mycoplasma gypis*-ähnlichen“ Mykoplasmen-Isolaten sowie Mykoplasmen des Hominis-Clusters

Mykoplasmen- spezies bzw. -isolat	Homologie %								
	ST 102-2	ST 101	ST 26-2	ST 26-1	ST 71-2	ST 71-1	ST 56-2	ST 39-2	ST 24-2
<i>M. alkalescens</i>	<u>95,5</u>	<u>96,1</u>	<u>96,1</u>	<u>96,1</u>	90,7	91,0	90,9	90,9	90,8
<i>M. anseris</i>	<u>94,6</u>	<u>95,3</u>	<u>95,1</u>	<u>95,1</u>	90,9	91,2	91,1	91,0	91,0
<i>M. arginini</i>	<u>95,7</u>	<u>96,2</u>	<u>96,4</u>	<u>96,4</u>	90,2	90,5	90,5	90,3	90,3
<i>M. arthritis</i>	<u>94,9</u>	<u>95,4</u>	<u>94,5</u>	<u>94,4</u>	89,7	90,1	90,0	89,9	89,8
<i>M. auris</i>	<u>96,0</u>	<u>96,6</u>	<u>96,7</u>	<u>96,6</u>	90,3	90,6	90,5	90,4	90,4
<i>M. buccale</i>	<u>94,3</u>	<u>95,1</u>	<u>94,2</u>	<u>94,1</u>	89,7	90,0	90,1	89,9	89,9
<i>M. canadense</i>	<u>95,5</u>	<u>96,0</u>	<u>96,2</u>	<u>96,2</u>	90,6	90,9	91,0	90,8	90,7
<i>M. cloacale</i>	<u>94,1</u>	<u>94,7</u>	<u>94,4</u>	<u>94,3</u>	90,8	91,1	91,0	90,9	90,9
<i>M. equirhinis</i>	<u>95,6</u>	<u>96,2</u>	<u>95,7</u>	<u>95,8</u>	89,3	89,6	89,6	89,5	89,5
<i>M. falconis</i>	<u>95,7</u>	<u>96,1</u>	<u>96,3</u>	<u>96,2</u>	90,3	90,6	90,5	90,4	90,4
<i>M. faucium</i>	<u>94,3</u>	<u>94,9</u>	<u>94,1</u>	<u>94,0</u>	89,7	90,0	90,0	89,9	89,8
<i>M. gateae</i>	<u>95,8</u>	<u>96,3</u>	<u>96,5</u>	<u>96,5</u>	90,5	90,8	90,8	90,6	90,6
<i>M. gypis</i>	90,7	91,0	90,7	90,6	<u>97,0</u>	<u>97,3</u>	<u>97,2</u>	<u>97,1</u>	<u>97,0</u>
<i>M. hominis</i>	<u>94,5</u>	<u>95,2</u>	<u>95,0</u>	<u>95,0</u>	90,3	90,6	90,5	90,4	90,2
<i>M. hyosynoviae</i>	93,3	<u>94,1</u>	93,3	93,3	89,0	89,3	89,2	89,1	89,1
<i>M. indiense</i>	93,4	93,9	93,1	93,1	89,4	89,7	89,7	89,6	89,5
<i>M. orale</i>	93,6	<u>94,1</u>	93,1	93,2	89,4	89,7	89,7	89,6	89,5
<i>M. phocicerebrale</i>	<u>95,5</u>	<u>96,0</u>	<u>96,0</u>	<u>95,9</u>	90,1	90,4	90,3	90,2	90,2
<i>M. phocidae</i>	<u>95,2</u>	<u>95,7</u>	<u>95,8</u>	<u>95,7</u>	89,2	89,6	89,5	89,4	89,2
<i>M. spumans</i>	<b>98,4</b>	<b>98,9</b>	<b>97,2</b>	<b>97,6</b>	88,8	89,3	89,1	89,0	88,6
<i>M. subdolum</i>	<u>94,0</u>	<u>94,8</u>	93,9	93,8	89,7	90,1	90,0	89,9	89,8
<b>ST24-2<sup>#</sup></b>	90,4	90,3	90,5	90,2	<b>99,6</b>	<b>99,9</b>	<b>99,8</b>	<b>99,7</b>	***
<b>ST39-2<sup>#</sup></b>	90,5	90,5	90,2	90,4	<b>99,7</b>	<b>99,8</b>	<b>99,9</b>	***	
<b>ST56-2<sup>#</sup></b>	90,5	90,6	90,3	90,5	<b>99,8</b>	<b>99,9</b>	***		
<b>ST71-1<sup>#</sup></b>	90,5	90,7	90,4	90,3	<b>99,9</b>	***			
<b>ST71-2<sup>#</sup></b>	90,4	90,5	90,1	90,3	***				
<b>ST26-1*</b>	<b>99,0</b>	<b>99,6</b>	<b>99,8</b>	***					
<b>ST26-2*</b>	<b>99,0</b>	<b>99,5</b>	***						
<b>ST101*</b>	<b>99,0</b>	***							
<b>ST102-2*</b>	***								

Unterstrichen: Sequenzhomologie 94,0%-98,8%; Fettdruck: Sequenzhomologie 98,9%-100%,  
*M.* = *Mycoplasma*, \* = „*M. spumans*-ähnliche Isolate“, # = „*M. gypis*-ähnliche“ Isolate

## 4.2.2 ITS-Sequenzvergleiche und phylogenetischer Stammbaum

Mit der ITS-PCR (siehe 3.2.3.3.2) wurden DNA-Amplikons verschiedener Längen zwischen ca. 400 und 550 bp erzielt (Abbildung 11, Tabelle 17). Anhand der unterschiedlichen Länge der Amplikons war eine erste Differenzierung der untersuchten Isolate möglich (siehe 4.1), die sich bei der Sequenzierung bestätigte.

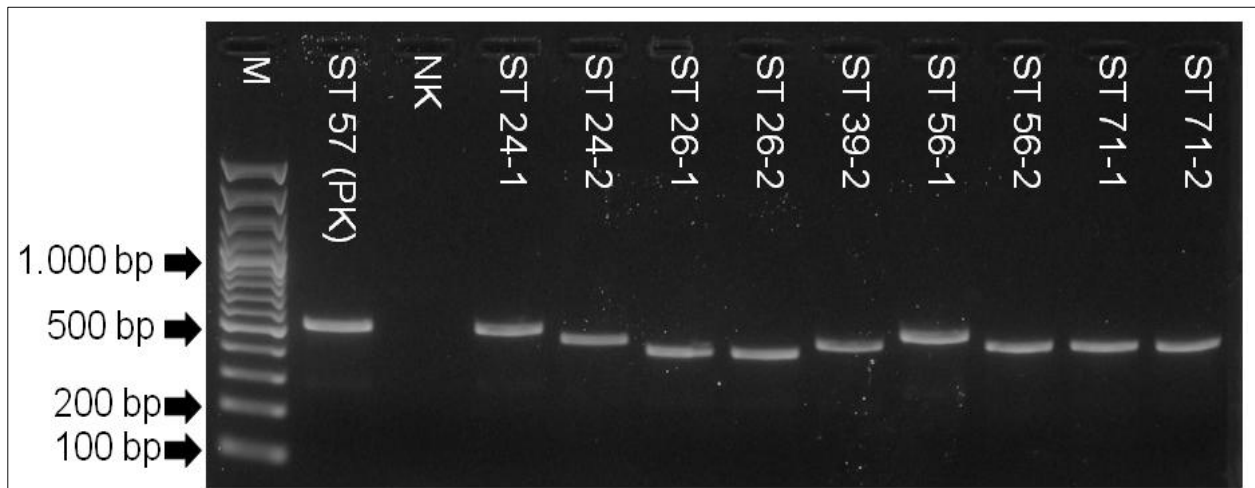
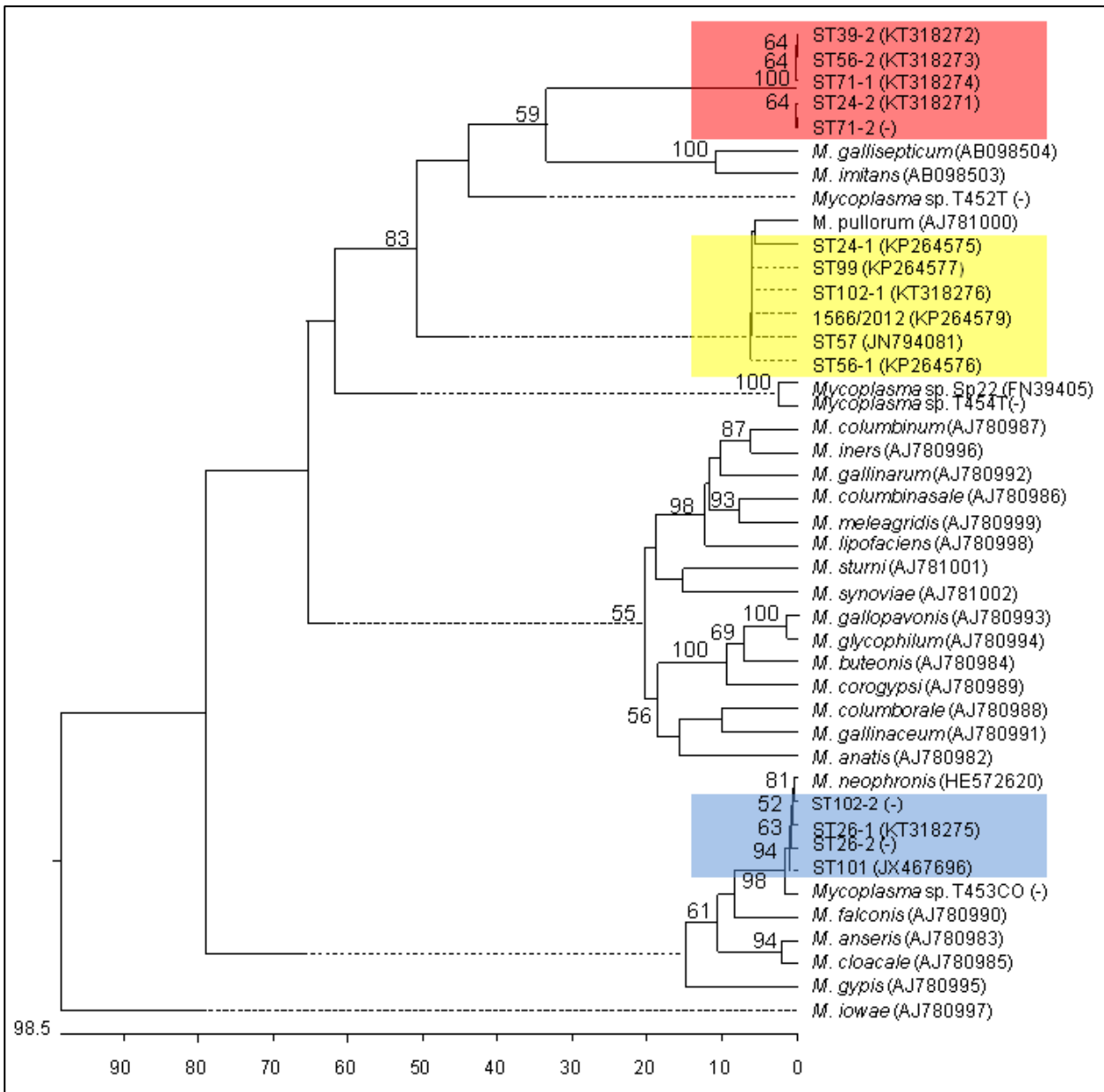


Abbildung 11: 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS)-PCR nach RAMÍREZ (2008): DNA-Amplikons verschiedener Isolate in drei verschiedenen Längen (400-600 bp). Agarosegel 2%, Färbung GelRed™

M = 100 bp-DNA-Molekulargewichtsmarker; PK = Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); bp = base pairs (Basenpaare)

Auf Basis der Sequenzhomologien der ITS bildeten fünf Isolate (ST24-1, ST56-1, ST57, ST99-1 und ST102-1), sowie das Isolat 1566/2012, die „*M. pullorum*-ähnliche“ Gruppe innerhalb des Synoviae-Clusters (Tabelle 20). Der Vergleich der ITS-Sequenz der „*M. pullorum*-ähnlichen“ Isolate mit allen Mykoplasmen des Synoviae-Clusters (Tabelle 20) ergab eine Homologie von unter 88,67%, welche in der Literatur als Speziesgrenze beschrieben ist (VOLOKHOV et al. 2012). Die Homologie zu den auf Basis der 16S-rRNA-Gensequenz am nächsten verwandten Spezies *M. anatis* und *M. pullorum* lag bei 70,8% bzw. 83,1%. Die Isolate der Gruppe wiesen untereinander eine Homologie von 100% auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ST57 als Typstamm für die Beschreibung einer neuen Mykoplasmenspezies (*M. ciconiae* sp. nov.) ausgewählt.



**Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS): Aviäre Mykoplasmen des Genus *Mycoplasma* und Weißstorch-Isolate (Algorithmus: Clustal W): Vergleich der Sequenzen der *Mycoplasma*-Isolate von Weißstorchnestlingen und eines adulten Weißstorches (1566/2012) aus dieser Arbeit mit bekannten Sequenzen aviärer Mykoplasmen des Genus *Mycoplasma*.**

Zahlen an den Knotenpunkten stellen Bootstrapping-Werte dar. Alle Werte sind auf ganze Zahlen gerundet, nur Werte über 50 sind dargestellt. Die Zahlenleiste stellt Nukleotid-Substitutionen pro 100 Residuen dar. Die Bezeichnungen in Klammern sind die Zugangsnummern, unter denen die Sequenzen in der Datenbank GenBank öffentlich zugänglich sind. *M.* = *Mycoplasma*; Farblöcke: Gelb = „*M. synoviae*-ähnliche“ Isolate; Blau = „*M. spumans*-ähnliche“ Isolate; Rot = „*M. gypis*-ähnliche“ Isolate.



Die weiteren Isolate bildeten wiederum zwei Gruppen innerhalb des Hominis-Clusters (Tabelle 21): Vier Isolate (ST26-1, ST26-2, ST101 und ST102-2) bildeten die „*M. spumans*-ähnliche“ **Gruppe** mit einer Sequenzhomologie von 93,8%-94,4% zu *M. spumans*. Bei dieser Gruppe war zudem die Sequenzhomologie zu einer Reihe von Spezies über 88,67%, welche in der Literatur als Speziesgrenze beschrieben ist (VOLOKHOV et al. 2012). Bei den fünf weiteren Isolaten der „*M. gypis*-ähnlichen“ **Gruppe** (ST24-2, ST39-2, ST56-2, ST71-1 und ST71-2) zeigte die nach 16S-rRNA-Sequenz am nächsten verwandte Spezies *M. gypis* eine Homologie von 82,9%. Die höchsten Sequenzhomologien zeigten sich zu den Spezies *M. spumans* (84,9-85,5%) und *M. gateae* (84,7-85,3%). Bei dieser Gruppe lag somit die Sequenzhomologie keiner Spezies über 88,67%, welche in der Literatur als Speziesgrenze beschrieben ist (VOLOKHOV et al. 2012).

Der Vergleich der ITS-Sequenzen mit denen anderer Mykoplasmen-Isolate von Weißstörchen (SPERGSER und HÖFLE HANSEN 2009a; SUÁREZ-PÉREZ 2011) zeigte eine deutliche Homologie des Isolates T453CO zur „*M. spumans*-ähnlichen“ Gruppe (99,4-100%). Die weiteren Isolate wiesen nur geringe Homologien zu den Isolaten aus dieser Arbeit auf. Die Sequenzen zweier Isolate, T454T und Sp22, waren zu 95% identisch. Das Isolat T452T zeigte keine deutliche Homologie zu allen anderen Weißstorch-Isolaten. Die Gruppeneinteilung der Isolate anhand der Homologien der 16S-rRNA-Gensequenzen, der Länge der Amplikons der ITS-PCR und auf Basis der Homologien der ITS-Sequenzen war identisch.

## ERGEBNISSE

Tabelle 20: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) der "M. pullorum-ähnlichen" Isolate mit Mykoplasmen des Synoviae-Clusters

Mykoplasmen- spezies bzw. -isolat	Homologie %					
	ST24-1	ST56-1	ST57	ST99-1	ST102-1	1566/2012
<i>M. alligatoris</i>	85,6	85,9	85,8	86,0	84,8	85,8
<i>M. anatis</i>	70,5	70,8	70,8	70,8	70,8	70,8
<i>M. bovirhinis</i>	86,3	86,7	86,3	86,7	85,5	86,3
<i>M. buteonis</i>	70,3	70,3	70,3	70,3	70,3	70,3
<i>M. canis</i>	86,3	86,8	86,1	86,5	85,4	86,1
<i>M. citelli</i>	84,6	85,0	84,6	85,0	83,9	84,6
<i>M. columborale</i>	72,3	72,6	72,6	72,6	72,6	72,6
<i>M. corogypsi</i>	64,8	64,8	64,8	64,8	64,8	64,8
<i>M. crocodyli</i>	85,6	86,0	85,9	86,0	84,9	85,9
<i>M. cynos</i>	87,6	88,0	87,7	88,0	86,8	87,7
<i>M. gallinaceum</i>	75,5	75,8	75,8	75,8	75,8	75,8
<i>M. gallopavonis</i>	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4
<i>M. glycyphilum</i>	72,1	72,1	72,1	72,1	72,1	72,1
<i>M. edwardii</i>	85,0	85,4	85,1	85,5	84,3	85,1
<i>M. felis</i>	87,1	87,4	87,3	87,3	87,3	87,3
<i>M. leonicaptivi</i>	84,9	85,3	84,9	85,4	84,2	84,9
<i>M. mustelae</i>	87,3	87,7	87,4	87,7	86,5	87,4
<i>M. oxoniensis</i>	83,1	83,4	83,0	83,5	82,4	83,0
<i>M. verecundum</i>	86,5	86,8	86,5	86,9	85,7	86,5
<i>M. pullorum</i>	82,8	83,1	83,1	83,1	83,1	83,1
<i>M. sturni</i>	78,8	78,8	78,8	78,8	78,8	78,8
<i>M. synoviae</i>	61,5	61,5	61,5	61,5	61,5	61,5
<b>1566/2012</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>***</b>
<b>ST102-1</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>***</b>	
<b>ST99-1</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>***</b>		
<b>ST57</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>***</b>			
<b>ST56-1</b>	<b>100</b>	<b>***</b>				
<b>ST24-1</b>	<b>***</b>					

Fettdruck: ITS-Sequenzhomologie 100%, M. = *Mycoplasma*

## ERGEBNISSE

Tabelle 21: Vergleich der Sequenzhomologien bezüglich der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) der „*M. spumans*-ähnlichen“ und „*M. gypis*-ähnlichen“ Isolate sowie Mykoplasmen des Hominis-Clusters

Mycoplasmen- spezies bzw. -isolat	Homologie %								
	ST 24-2	ST 39-2	ST 56-2	ST 71-1	ST 71-2	ST 26-1	ST 26-2	ST 101	ST 102-2
<i>M. alkalescens</i>	82,2	82,8	82,8	82,8	82,8	90,4	90,7	90,6	90,1
<i>M. anseris</i>	70,7	70,7	70,7	70,7	70,7	87,6	87,6	88,8	88,8
<i>M. arginini</i>	83,2	83,8	83,8	83,8	83,8	91,0	91,3	90,7	90,1
<i>M. arthritidis</i>	81,3	81,8	81,8	81,8	81,8	89,4	88,3	87,9	87,3
<i>M. auris</i>	83,1	83,7	83,7	83,7	83,7	91,6	92,1	91,6	91,3
<i>M. buccale</i>	79,7	80,2	80,2	80,2	80,2	90,9	91,1	91,4	90,3
<i>M. canadense</i>	84,3	84,9	84,9	84,9	84,9	91,6	92,1	91,9	91,0
<i>M. cloacale</i>	69,2	69,2	69,2	69,2	69,2	83,4	83,3	83,9	83,9
<i>M. equirhinis</i>	83,9	84,5	84,5	84,5	84,5	93,5	93,8	94,1	93,5
<i>M. falconis</i>	68,7	68,7	68,7	68,7	68,7	83,7	83,7	84,2	84,2
<i>M. faucium</i>	80,5	81,0	81,0	81,0	81,0	91,5	91,7	92,1	91,3
<i>M. gateae</i>	84,7	85,3	85,3	85,3	85,3	91,8	92,3	91,8	91,2
<i>M. gypis</i>	82,9	82,9	82,9	82,9	82,9	72,5	72,5	73,0	73,0
<i>M. hominis</i>	82,9	83,5	83,5	83,5	83,5	93,5	93,5	93,2	92,6
<i>M. hyosynoviae</i>	80,6	81,2	81,2	81,2	81,2	91,5	91,7	91,4	90,9
<i>M. indiense</i>	77,0	77,5	77,5	77,5	77,5	89,1	89,3	89,1	88,5
<i>M. orale</i>	77,1	77,7	77,7	77,7	77,7	88,2	88,2	87,5	87,0
<i>M. phocicerebrale</i>	82,0	82,6	82,6	82,6	82,6	90,8	91,1	91,3	90,8
<i>M. phocidae</i>	82,4	83,0	83,0	83,0	83,0	91,8	92,0	92,4	91,8
<i>M. spumans</i>	84,9	85,5	85,5	85,5	85,5	94,1	94,3	94,4	93,8
<i>M. subdolum</i>	81,6	82,2	82,2	82,2	82,2	92,3	92,3	92,4	91,8
<b>ST24-2<sup>#</sup></b>	<b>***</b>	<b>99,3</b>	<b>99,3</b>	<b>99,3</b>	<b>99,6</b>	83,7	82,4	80,6	80,6
<b>ST39-2<sup>#</sup></b>		<b>***</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	84,0	83,2	80,6	80,6
<b>ST56-2<sup>#</sup></b>			<b>***</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	84,0	83,2	80,6	80,6
<b>ST71-1<sup>#</sup></b>				<b>***</b>	<b>99,8</b>	84,0	83,2	80,6	80,6
<b>ST71-2<sup>#</sup></b>					<b>***</b>	84,3	82,9	80,6	80,6
<b>ST26-1*</b>						<b>***</b>	<b>98,8</b>	<b>98,9</b>	<b>98,3</b>
<b>ST26-2*</b>							<b>***</b>	<b>98,8</b>	<b>98,3</b>
<b>ST101*</b>								<b>***</b>	<b>99,7</b>
<b>ST102-2*</b>									<b>***</b>

Fettdruck: ITS-Sequenzhomologie 98,3-100%, *M.* = *Mycoplasma*, \* = „*M. spumans*-ähnliche Isolate“, # = „*M. gypis*-ähnliche“ Isolate

## 4.3 Serologische und zusätzliche phänotypische Untersuchungen

### 4.3.1 Biochemische Eigenschaften

#### 4.3.1.1 Fermentation von Glucose

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse des Versuchs zur Fermentation von Glucose dargestellt. Durchgeführt wurde der Versuch in jeweils einem mikroaerophilen (O<sub>2</sub> „+“) und anaeroben (O<sub>2</sub> „-“) Milieu. Das Isolat ST57 (*M. ciconiae* sp. nov.) verstoffwechselte Glucose, das Isolat ST101 hingegen nicht. Dieses Ergebnis erhärtet die Annahme, dass es sich bei diesen beiden Isolaten um Vertreter unterschiedlicher Mykoplasmenspezies handelt.

Tabelle 22: Ergebnisse des Versuchs zur Fermentation von Glucose der Isolate ST57 und ST101 im Vergleich zu *M. gallisepticum* und *M. arthritis* unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C

Spezies und Stamm bzw. Isolat	Medium	O <sub>2</sub>	pH-Wert	Ergebnis
ST57	<b>+ Glucose</b>	<b>+</b>	5,25	Glucose positiv
	<b>+ Glucose</b>	-	5,53	Glucose positiv
	- Glucose	<b>+</b>	6,67	
	- Glucose	-	6,75	
ST101	<b>+ Glucose</b>	<b>+</b>	7,03	Glucose negativ
	<b>+ Glucose</b>	-	7,07	Glucose negativ
	- Glucose	<b>+</b>	7,07	
	- Glucose	-	7,04	
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> Referenzstamm 75969	<b>+ Glucose</b>	<b>+</b>	4,82	Glucose positiv
	<b>+ Glucose</b>	-	4,89	Glucose positiv
	- Glucose	<b>+</b>	6,70	
	- Glucose	-	6,77	
<i>Mycoplasma arthritis</i> Referenzstamm NCTC10162	<b>+ Glucose</b>	<b>+</b>	7,06	Glucose negativ
	<b>+ Glucose</b>	-	7,16	Glucose negativ
	- Glucose	<b>+</b>	7,06	
	- Glucose	-	7,19	
Medium- kontrolle	<b>+ Glucose</b>	<b>+</b>	6,84	
	<b>+ Glucose</b>	-	6,94	
	- Glucose	<b>+</b>	6,89	
	- Glucose	-	6,93	

+ Glucose = Medium mit Glucose, - Glucose = Medium ohne Glucose, + O<sub>2</sub> = aerob, - O<sub>2</sub> = anaerob. Ergebnis: Das Isolat wurde als Glucose fermentierend („Glucose positiv“) gewertet, wenn der pH-Wert des Testmediums mit Glucose bei der Messung an Tag 14 des Versuches um ≥ 0,5 pH-Einheiten niedriger war als das Medium der Mediumkontrolle.

### 4.3.1.2 Hydrolyse von Arginin

Der Versuch zur Hydrolyse von Arginin wurde analog zu dem Versuch zur Fermentation von Glucose in mikroaerophilem (O<sub>2</sub> „+“) und anaerobem (O<sub>2</sub> „-“) Milieu durchgeführt. Das Isolat ST101 verstoffwechselte Arginin, das Isolat ST57 (*M. ciconiae* sp. nov.) hingegen nicht (Tabelle 23). Auch dieses Ergebnis erhärtet die Annahme, dass es sich bei diesen Isolaten um Vertreter zwei verschiedener Spezies handelte.

Tabelle 23: Ergebnisse des Versuchs zur Hydrolyse von Arginin der Isolate ST57 und ST101 im Vergleich zu *M. gallisepticum* und *M. arthritidis* unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C

Spezies und Stamm bzw. Isolat	Medium	O <sub>2</sub>	pH-Wert	Ergebnis
ST57	<b>+ Arginin</b>	<b>+</b>	6,31	Arginin negativ
	<b>+ Arginin</b>	<b>-</b>	6,37	Arginin negativ
	- Arginin	<b>+</b>	6,37	
	- Arginin	<b>-</b>	6,38	
ST101	<b>+ Arginin</b>	<b>+</b>	7,33	Arginin positiv
	<b>+ Arginin</b>	<b>-</b>	7,34	Arginin positiv
	- Arginin	<b>+</b>	6,89	
	- Arginin	<b>-</b>	6,93	
<i>Mycoplasma arthritidis</i> Referenzstamm NCTC10162	<b>+ Arginin</b>	<b>+</b>	7,94	Arginin positiv
	<b>+ Arginin</b>	<b>-</b>	8,00	Arginin positiv
	- Arginin	<b>+</b>	6,92	
	- Arginin	<b>-</b>	6,96	
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> Referenzstamm 75969	<b>+ Arginin</b>	<b>+</b>	6,33	Arginin negativ
	<b>+ Arginin</b>	<b>-</b>	6,44	Arginin negativ
	- Arginin	<b>+</b>	6,38	
	- Arginin	<b>-</b>	6,40	
Medium- kontrolle	<b>+ Arginin</b>	<b>+</b>	6,62	
	<b>+ Arginin</b>	<b>-</b>	6,64	
	- Arginin	<b>+</b>	6,64	
	- Arginin	<b>-</b>	6,68	

+ Arginin = Medium mit Arginin, - Arginin = Medium ohne Arginin, + O<sub>2</sub> = aerob, - O<sub>2</sub> = anaerob. Ergebnis: Das Isolat wurde als Arginin hydrolysierend („Arginin positiv“) gewertet, wenn der pH-Wert des Testmediums mit Arginin bei der Messung an Tag 14 des Versuches um ≥ 0,5 pH-Einheiten höher war als das Medium der Mediumkontrolle.

### 4.3.1.3 Hydrolyse von Harnstoff

Der Versuch zur Hydrolyse von Harnstoff zeigte, dass die Isolate ST57 (*M. ciconiae* sp. nov.) und ST101 keinen Harnstoff hydrolysierten (Tabelle 24). Somit handelt es sich bei beiden nicht um Vertreter des Genus *Ureaplasma*.

Tabelle 24: Ergebnisse des Versuchs zur Hydrolyse von Harnstoff der Isolate ST57 und ST101 im Vergleich zu *U. felinum* und *M. arthritidis* unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C

Spezies und Stamm bzw. Isolat	Medium	O <sub>2</sub>	pH-Wert	Ergebnis
ST57	+ Harnstoff	+	6,52	Harnstoff negativ
	+ Harnstoff	-	6,40	Harnstoff negativ
	- Harnstoff	+	6,41	
	- Harnstoff	-	6,39	
ST101	+ Harnstoff	+	6,81	Harnstoff negativ
	+ Harnstoff	-	6,90	Harnstoff negativ
	- Harnstoff	+	6,84	
	- Harnstoff	-	6,83	
<i>Ureaplasma felinum</i> Referenzstamm FT2-B	+ Harnstoff	+	8,62	Harnstoff positiv
	+ Harnstoff	-	8,71	Harnstoff positiv
	- Harnstoff	+	6,51	
	- Harnstoff	-	6,55	
<i>Mycoplasma arthritidis</i> Referenzstamm NCTC10162	+ Harnstoff	+	6,78	Harnstoff negativ
	+ Harnstoff	-	6,82	Harnstoff negativ
	- Harnstoff	+	6,77	
	- Harnstoff	-	6,85	
Medium- kontrolle	+ Harnstoff	+	6,51	
	+ Harnstoff	-	6,56	
	- Harnstoff	+	6,50	
	- Harnstoff	-	6,58	

+ Harnstoff = Medium mit Harnstoff, - Harnstoff = Medium ohne Harnstoff + O<sub>2</sub> = aerob, - O<sub>2</sub> = anaerob. Ergebnis: Das Isolat wurde als Harnstoff hydrolysierend („Harnstoff positiv“) gewertet, wenn der pH-Wert des Testmediums mit Harnstoff bei der Messung an Tag 14 des Versuches um ≥ 0,5 pH-Einheiten höher war als das Medium der Mediumkontrolle.

### 4.3.2 Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur

Die Isolate ST57 und ST101 waren bei Inkubationstemperaturen von 23°C bis 44°C in SP4-Medium kultivierbar. Dabei war das Wachstum des Isolates ST101, im Vergleich zu ST57, bei höheren Temperaturen deutlicher ausgeprägt. Bei 10°C, 20°C und 46°C war keines der beiden Isolate kultivierbar. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse des Versuches bei dem Isolat ST57, aufgeschlüsselt nach Inkubationstemperaturen und Verdünnungsstufen, dargestellt. In Tabelle 26 sind analog die Ergebnisse für ST101 darge-

## ERGEBNISSE

stellt. Aufgeführt sind jeweils der Zeitraum nach Beginn des Versuches, den es dauerte bis der Indikator Phenolrot im Medium der jeweiligen Verdünnung bei einer bestimmten Temperatur nach gelb (ST57) bzw. rotviolett (ST101) umfärbte. Die Verdünnungsstufen  $1:10^{10}$ ,  $1:10^{11}$  und  $1:10^{12}$  färbten bis zum Ende des Untersuchungszeitraums bei keiner der untersuchten Temperaturen um.

**Tabelle 25: Ergebnisse zur optimalen Wachstumstemperatur und zum Wachstumstemperaturbereich bei der Anzucht des *Mycoplasma*-Isolates ST57 in SP4-Flüssigmedium, 5% CO<sub>2</sub>**

Temperatur	Zeitdauer bis zum Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb (Angaben in Stunden)								
	Verdünnungsstufen der Keimsuspension								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23°C	24	48	48	48	72	72	120	-	-
28°C	24	24	24	48	48	48	72	-	-
37°C	6	6	8	12	24	24	24	24	24
42°C	6	24	24	24	-	-	-	-	-
44°C	24	-	-	-	-	-	-	-	-
46°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Verdünnungsstufen: 1 =  $10^{-1}$ ; 2 =  $10^{-2}$ ; 3 =  $10^{-3}$  usw.; Ein Farbumschlag von rot nach gelb des Indikators Phenolrot im SP4-Medium erfolgt, sobald eine konstante Bakterienmenge im Testansatz erreicht ist.

**Tabelle 26: Ergebnisse zur optimalen Wachstumstemperatur und zum Wachstumstemperaturbereich bei der Anzucht des *Mycoplasma*-Isolates ST101 in SP4-Flüssigmedium, 5% CO<sub>2</sub>**

Temperatur	Zeitdauer bis zum Farbumschlag des Mediums von rot nach rotviolett (Angaben in Stunden)								
	Verdünnungsstufen der Keimsuspension								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23°C	48	72	72	72	96	96	-	-	-
28°C	24	48	48	48	72	72	-	-	-
37°C	8	10	12	24	24	24	48	-	-
42°C	24	24	24	24	24	48	48	-	-
44°C	8	12	24	24	24	24	-	-	-
46°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Verdünnungsstufen: 1 =  $1:10$ ; 2 =  $1:10^2$ ; 3 =  $1:10^3$  usw.; Ein Farbumschlag von rot nach gelb des Indikators Phenolrot im SP4-Medium erfolgt, sobald eine konstante Bakterienmenge im Testansatz erreicht ist.

## ERGEBNISSE

Nach Regressionsanalyse der Versuchsergebnisse (Tabelle 25, Tabelle 26) wurde die niedrigste Verdopplungszeit, und damit das schnellste Wachstum, bei dem Isolat ST57 bei einer Temperatur von 37°C erreicht. Das Isolat ST101 erreichte die niedrigste Verdopplungszeit bei 44°C (siehe Abbildung 13). Die genauen Werte der Verdopplungszeiten sowie weitere Daten der Regressionskurve, die als Basis dieser Berechnung dienten, finden sich in Anhang VI.I „Temperaturoptimum“.

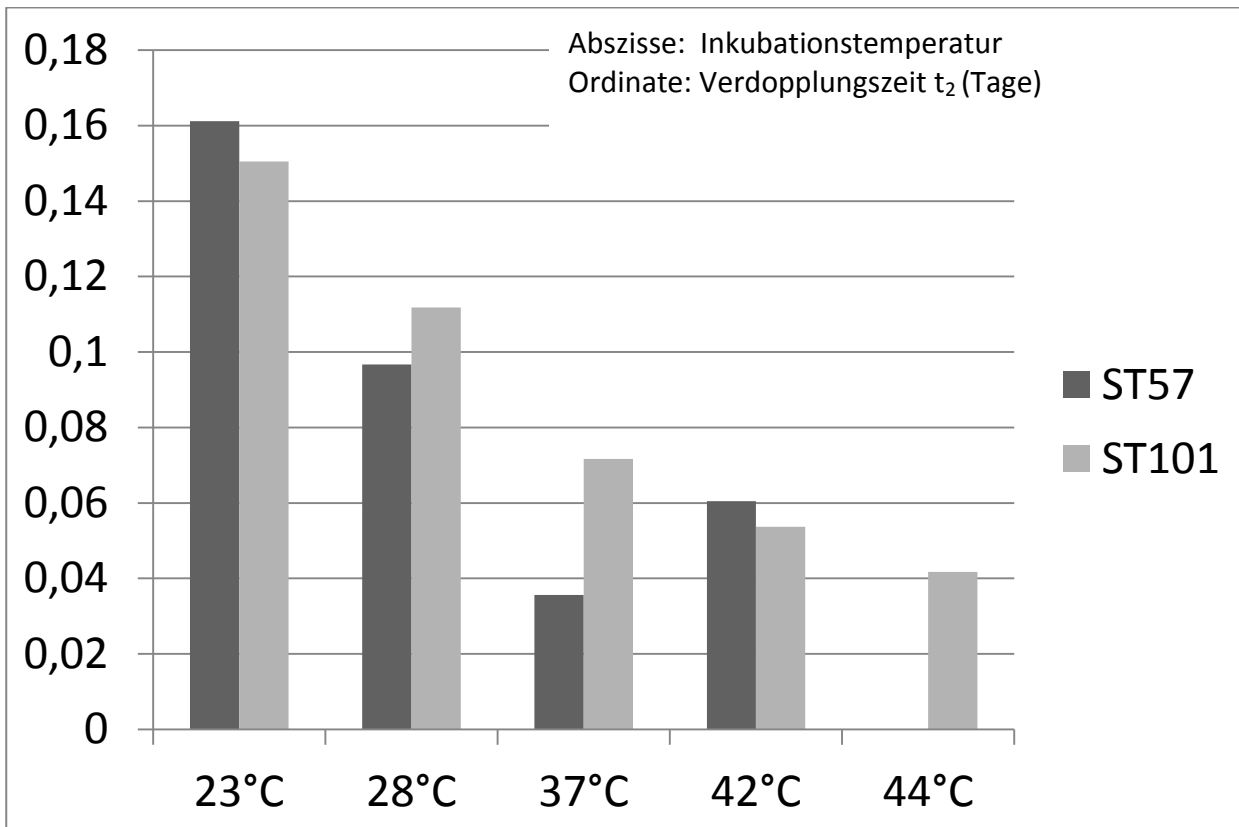


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Verdopplungszeiten  $t_2$  (Tage) der *Mycoplasma*-Isolate ST57 und ST101 in SP4-Flüssigmedium in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Ordinate: Die Zahl 1 entspricht 1 Tag (1 h  $\approx$  0,04 Tage; 30 min  $\approx$  0,02 Tage); Die niedrigste Verdopplungszeit ( $>0$ ) stellt somit das schnellste Wachstum dar. Die niedrigste Verdopplungszeit wird bei ST57 bei 37°C und bei ST101 bei 44°C erreicht. Temperaturen, bei denen kein Wachstum der Isolate nachgewiesen wurde, sind nicht dargestellt.

### 4.3.3 Ultrafiltration

Die Isolate ST57 (Typstamm von *M. ciconiae* sp. nov.) und ST101 waren durch Filter mit Porendurchmessern von 0,8  $\mu$ m und 0,45  $\mu$ m, das Isolat ST101 zusätzlich durch einen 0,22  $\mu$ m-Filter filtrierbar (siehe Tabelle 27 und Abbildung 14). Das Filtrat des Isolates ST57 wies bei der Filtration durch einen 0,8  $\mu$ m Filter eine Reduktion um ca. den Faktor 10 bzw. eine Zehnerpotenz ( $10^1$ ) und bei 0,45  $\mu$ m um ca. den Faktor  $10^6$  auf.



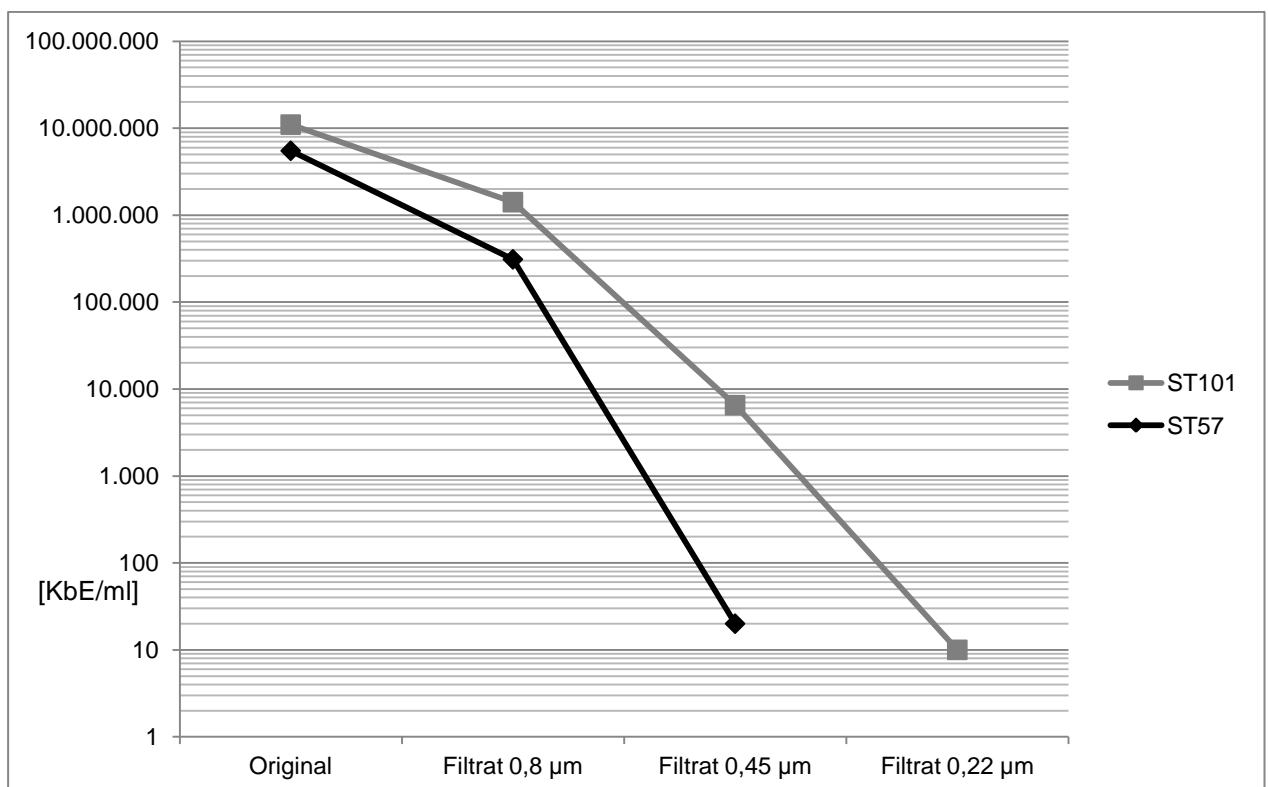
## ERGEBNISSE

Das Isolat ST101 zeigte insgesamt geringere Reduktionsraten. Bei der Filtration durch einen 0,8 µm Filter wurde die Keimzahl um ca. den Faktor 5, bei 0,45 µm um ca.  $10^3$  und bei 0,22 µm um ca. den Faktor  $10^6$  reduziert (siehe Tabelle 27 und Abbildung 14).

**Tabelle 27: Ergebnisse der Keimzahlbestimmung der Keimsuspension der Isolate ST57 und ST101 vor und nach Filtration durch Filter mit verschiedenen Porendurchmessern; Kultivierung in SP4-Medium, Inkubation bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub>**

Keimsuspension	Keimzahl [KbE/ml]	
	Isolat	
	ST57	ST101
vor Filtration	$5,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$
Filtrat 0,8 µm	$3,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
Filtrat 0,45 µm	20	$6,5 \times 10^3$
Filtrat 0,22 µm	<1	10

KbE = Koloniebildende Einheiten



**Abbildung 14: Ergebnisse der Keimzahlbestimmung der Keimsuspension der Isolate ST57 und ST101 vor („Original“) und nach Filtration durch Filter mit verschiedenen Porendurchmessern in halblogarithmischer Darstellung; Kultivierung in SP4-Medium, Inkubation bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub>**

KbE = Koloniebildende Einheiten

### 4.3.4 Lichtmikroskopie

Alle Isolate waren auf den Agarplatten makroskopisch bzw. lichtmikroskopisch als kleine, spiegeleiförmige Kolonien darstellbar (siehe Abbildung 3 und Abbildung 15). Die Kolonien unterschieden sich in ihrem Durchmesser und der Abgrenzung des Zentrums von der Peripherie. Bei dem Isolat ST57 (Abbildung 15) und anderen Isolaten von *M. ciconiae* sp. nov. fiel auf, dass diese, im Gegensatz zu anderen bei Weißstorch-nestlingen vorkommenden Isolaten, einen größeren Durchmesser und eine weniger deutliche Abgrenzung zwischen Zentrum und Peripherie der Kolonien hatten. Eine morphologische Unterscheidung anderer Isolate war nicht möglich.

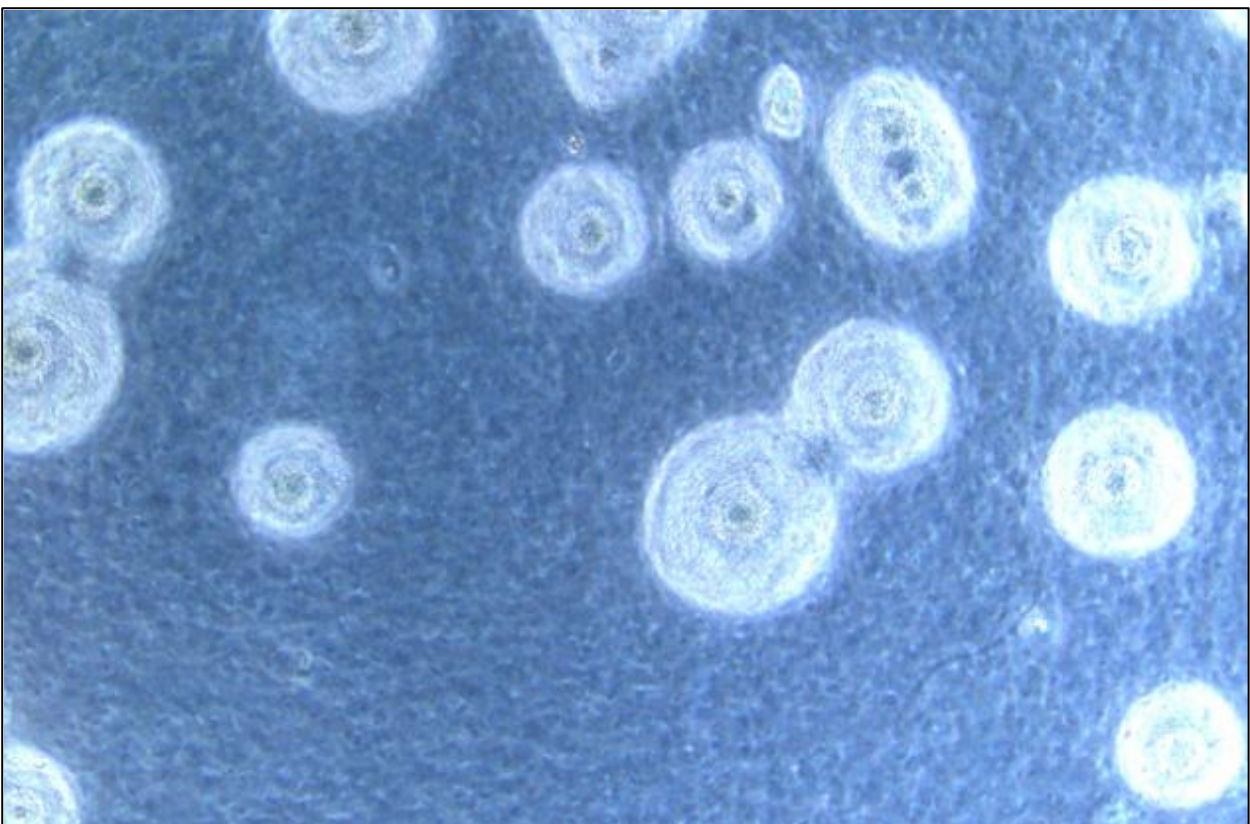


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme der spiegeleiförmigen Mykoplasmen-Kolonien (*M. ciconiae* sp. nov., Typstamm ST 57) auf SP4-Agarmedium (Phasenkontrast), 100x.

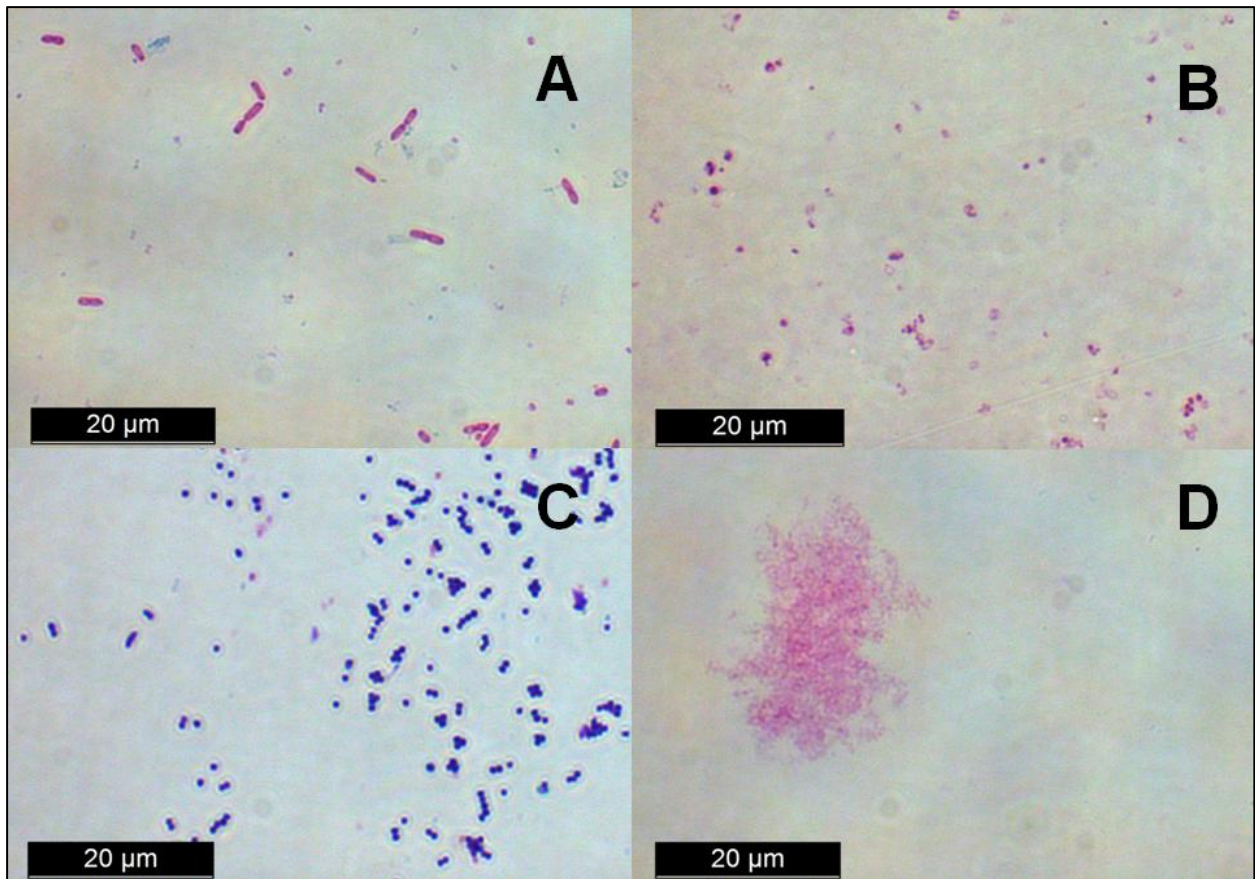


Abbildung 16: Färbung nach GRAM. (A) *Proteus mirabilis*, gramnegative Stäbchen; (B) Isolat ST57, gramnegative pleomorphe Partikel; (C) *Staphylococcus aureus*, grampositive Kokken; (D) Isolat ST101, gramnegative Aggregate und fadenartige Strukturen

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung der Zellmorphologie sind in Abbildung 16 dargestellt. Im Grampräparat stellten sich die Isolate ST57 (B) und ST101 (D) als gramnegative kleine polymorphe Partikel dar, wobei das Isolat ST101 Zellaggregate und fadenartige Strukturen bildete. Als Kontrollorganismen wurden *Proteus mirabilis* als gramnegative Stäbchen (A) und *Staphylococcus aureus* als grampositive Kokken (C) verwendet, welche sich erwartungsgemäß rot (A) bzw. blau (C) anfärbten.

### 4.3.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Isolates ST57 mittels Negativkontrastierung zeigten das heterogene Bild polymorpher Zellen. Die Bakterienzellen präsentierten sich sphärisch, ovoid und flaschenförmig mit verlängerten kopfartigen Strukturen und bildeten Aggregate. Der Durchmesser der Zellen lag zwischen 0,9 und 1,2  $\mu\text{m}$  (Abbildung 17).

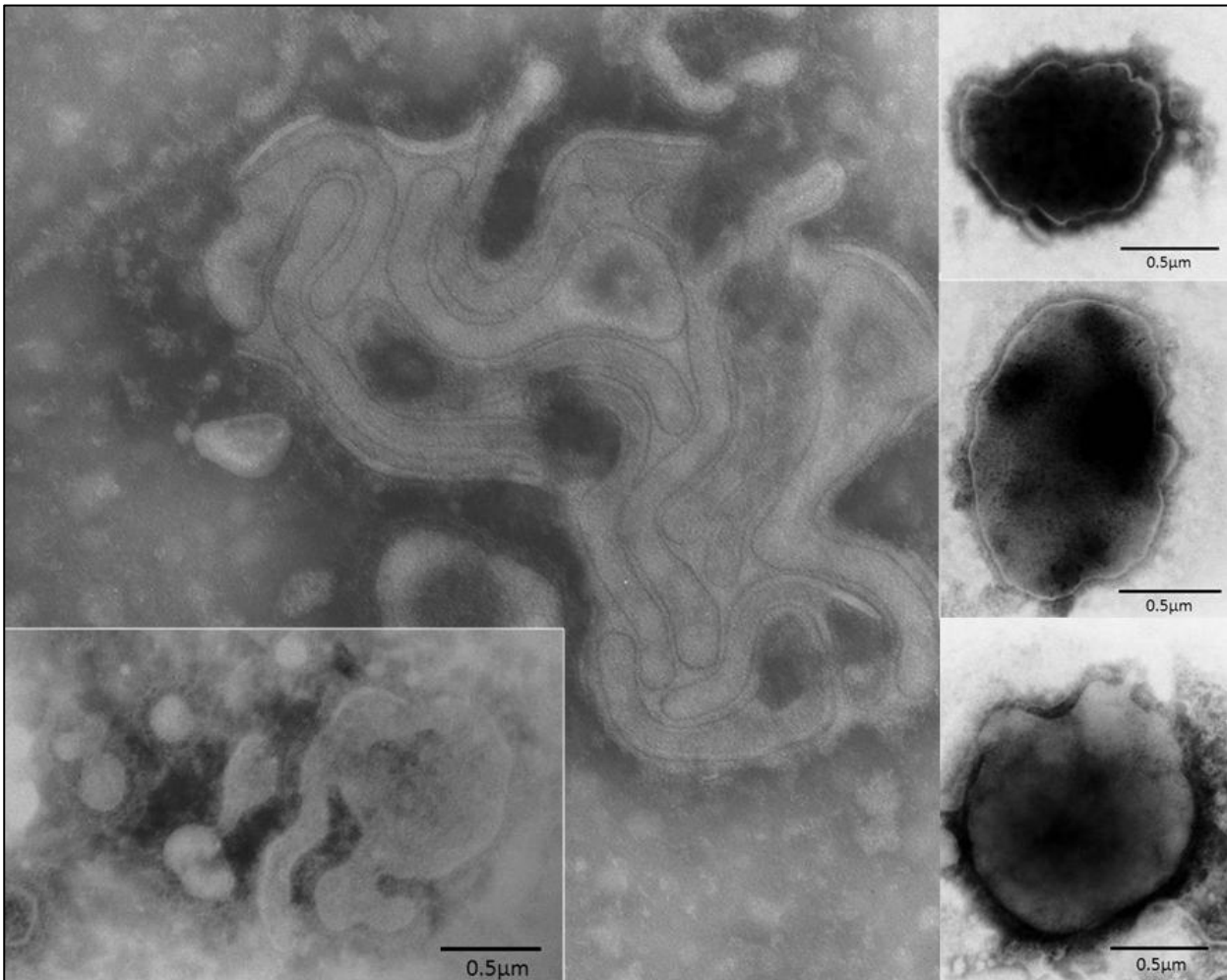


Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Isolates ST57, Färbung: Negativkontrastierung mit 2%iger Phosphorwolframsäure

### 4.3.6 Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin

Beim Digitonin-Hemmtest (Aufbau siehe Abbildung 8) zeigte sich bei dem Isolat dem cholesterin-unabhängigen *Acholeplasma laidlawii* Stamm PG8 kein Hemmhof, also betrug der Abstand der nächstgelegenen Kolonie zu dem Digitonin-getränkten Antibiotika-Testplättchen 0 mm. Der cholesterin-abhängige Stamm H/T1 der Spezies *M. falconis* wies hingegen einen Abstand zwischen dem Digitonin-getränkten Antibiotika-Testplättchen und der nächstgelegenen Kolonie einen Abstand von 5 mm auf. Um die nicht Digitonin-getränkten Antibiotika-Testplättchen bildeten sich bei beiden Isolaten keine Hemmhöfe. Da das Isolat ST57 einen Abstand zwischen dem Digitonin-getränkten Antibiotika-Testplättchen und der nächstgelegenen Kolonie von 6 mm aufwies, jedoch keinen Hemmhof um das nicht getränkte Testplättchen, wurde dessen Wachstum folglich als cholesterin-abhängig klassifiziert.

### 4.3.7 Serologische Eigenschaften

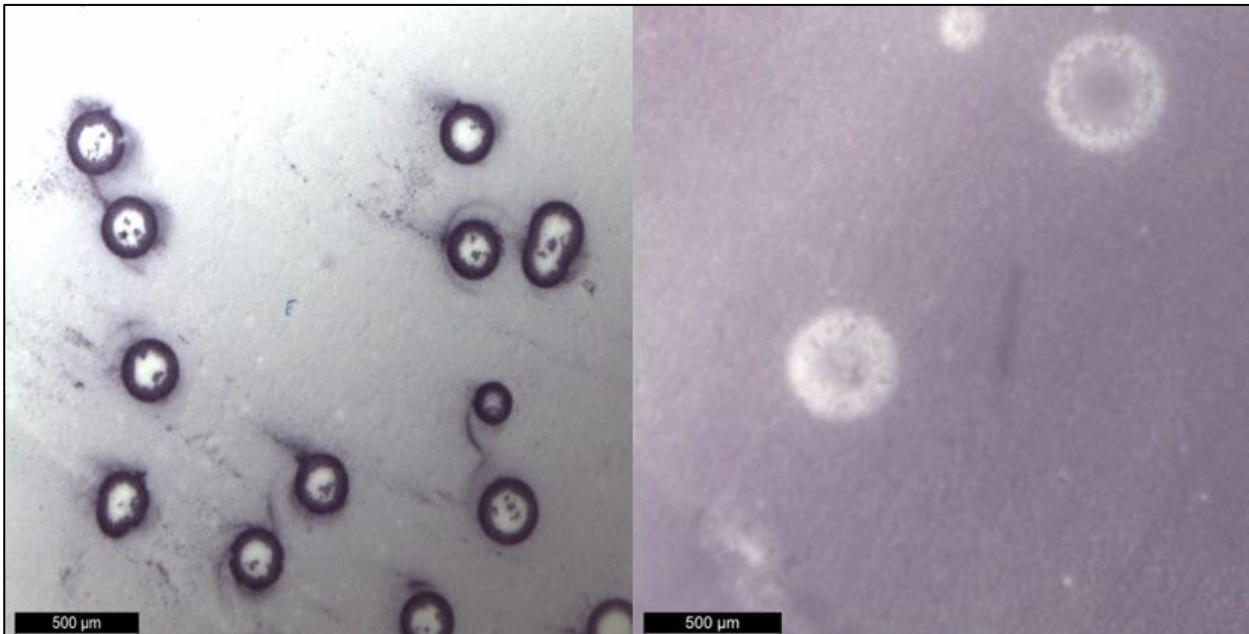
Serologische Untersuchungen mittels Immunobinding Assay (IBA) wurden mit dem Isolat ST57 im Hinblick auf dessen Beschreibung als Typstamm der neuen Mykoplasmen-spezies *M. ciconiae* sp. nov. durchgeführt. Dazu erfolgte eine serologische Abgrenzung von allen Spezies, die eine Sequenzhomologie des 16S-rRNA-Gens von über 94% aufwiesen (BROWN et al. 2007). Zusätzlich wurden Untersuchungen mit allen vorliegenden aviären Mykoplasmen durchgeführt, um mögliche Reagenten zu identifizieren.

Vor der Herstellung eines spezifischen Kaninchen-Hyperimmunserums gegen das Isolat ST57 (ST57-Antiserum) wurden zunächst mittels Immunobinding Assay (IBA) anhand von Präimmunseren von 10 Kaninchen zwei Tiere (New Zealand White Rabbits, Firma BioGenes GmbH, Berlin) identifiziert, deren Präimmunseren nicht mit *M. falconis* (H/T1), *M. buteonis* (Bb/T2g) und dem Isolat ST57 reagierten (siehe Abbildung 18 rechts). Dabei handelte es sich um die Kaninchen Nr. 75 (24332) und 82 (24333). Bei der Entblutung des Kaninchens Nr. 75 wurden 60 ml Hyperimmunserum und bei der Entblutung des Kaninchens Nr. 83 insgesamt 55 ml Hyperimmunserum gewonnen. Die aus diesen Kaninchen gewonnene Hyperimmunseren gegen das Isolat ST57 (ST57-Antiserum) zeigten eine deutlich positive Reaktion mit dem Isolat ST57 (siehe Abbildung 18 links), reagierten jedoch mit keinem Referenzstamm aviärer Mykoplasmen oder den

## ERGEBNISSE

---

*M. canis*- und *M. felis*-Referenzstämmen. Das Isolat ST57 zeigte eine schwach positive Reaktion (leichte Blaufärbung der Kolonien) mit dem Referenzantiserum gegen *M. sturni*, hingegen keine Reaktionen mit allen weiteren Referenzantisera (siehe Tabelle 28). Vier Isolate (ST24-1, ST56-1, ST99-1, ST102-1), die im Vorfeld anhand ihrer 16S-rRNA-Gen- (Abbildung 10) und ITS-Sequenzen (Abbildung 12) sowie der Fermentation von Glucose als mögliche Isolate derselben Spezies wie ST57 identifiziert wurden, reagierten mit den ST57-Antisera ebenfalls deutlich positiv.



**Abbildung 18: Immunobinding Assay.** Links: positive Reaktion (dunkelblaue Farbreaktion) von Kaninchen-Hyperimmunserum (Nr. 82) gegen das Isolat ST57 mit Kolonien des Isolates ST57; Rechts: negative Reaktion (keine Farbreaktion = weiß) von Kaninchen-Präimmunserum (Nr. 82) mit Kolonien des Isolates ST57. Lichtmikroskopische Aufnahmen, 16x.

## ERGEBNISSE

Tabelle 28: Ergebnisse der serologischen Untersuchungen im Immunobinding-Assay (IBA)

Isolat bzw. Stamm	ST57-Antiserum + Stamm bzw. Isolat	Isolat ST57 + Antiserum gegen die entsprechende Spezies
<b>ST57</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>M. anatis</i> PG8	negativ	negativ
<i>M. anseris</i> 1219	negativ	negativ
<i>M. buteonis</i> Bb/T2g	negativ	negativ
<i>M. canis</i> PG 14	negativ	negativ
<i>M. corogyphi</i> BV1	negativ	negativ
<i>M. cloacale</i> 383	negativ	negativ
<i>M. columbinasale</i> 694	negativ	negativ
<i>M. columborale</i> MMP4	negativ	negativ
<i>M. falconis</i> H/T1	negativ	negativ
<i>M. felis</i> CO	negativ	negativ
<i>M. gallopavonis</i> 1197	negativ	negativ
<i>M. gallinarum</i> PG 16	negativ	negativ
<i>M. gallisepticum</i> 75969	negativ	negativ
<i>M. gallinaceum</i> 887	negativ	negativ
<i>M. glycyphilum</i> 486	negativ	negativ
<i>M. imitans</i> 4229	negativ	negativ
<i>M. pullorum</i> CKK	negativ	negativ
<i>M. sturni</i> UCMF	negativ	<b>schwach positiv</b>
<i>M. synoviae</i> NVU 1853	negativ	negativ

positiv = deutliche blaue Farbreaktion der reaktiven Kolonien, schwach positiv = leichte blaue Farbreaktion der reaktiven Kolonien, negativ = keine Farbreaktion (siehe Abbildung 18)

## 4.4 Formale Beschreibung von *Mycoplasma ciconiae* sp. nov.

Mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen konnte das Isolat ST57 als neue Spezies der Klasse Mollicutes bei Weißstörchen beschrieben werden. Für die neue Spezies wird der Name *Mycoplasma ciconiae* (ci.coni´ae. L. gen. fem. n. *ciconiae* eines (Weiß-) Storches) vorgeschlagen. Die Zellen sind pleomorph mit kokkoiden und flaschenartigen Formen und durch Filter einer Porengröße von 450 nm filtrierbar. Auf Agarmedium bilden sich typische, spiegeleiförmige Kolonien mit undeutlichen Zentren. Die Spezies wächst bei 37°C unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen in SP4-Medium und Hayflick-Medium. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37°C, wobei bei Temperaturen von 23°C bis 42°C ein Wachstum *in vitro* gezeigt werden konnte. Das Wachstum dieser Spezies wird durch Digitonin gehemmt. Die Spezies verstoffwechselt Glucose, jedoch kein Arginin oder Harnstoff und ist serologisch von nahe verwandten Mykoplasmen abgrenzbar. Der Typstamm wurde aus der Trachea eines gesunden Weißstorchnestlings in Nielitz, Mecklenburg-Vorpommern (Deutschland), isoliert. Die Spezies ist wahrscheinlich apathogen für Weißstörche. *M. ciconiae* sp. nov. wurde auch aus der Trachea eines verunfallt aufgefundenen Weißstorches isoliert, welcher jedoch keine respiratorischen Symptome zeigte. Der Typstamm ST 57<sup>T</sup>, sowie vier weitere Isolate mit identischer 16S-rRNA-Gensequenz und positiver Reaktion mit Kaninchen-Hyperimmunseren gegen das Isolat ST 57, wurden bei der DSMZ, der Typstamm zudem bei der ATCC, hinterlegt. Die 16S-rRNA-Gen- sowie ITS-Sequenzen wurde bei GenBank hinterlegt (siehe Tabelle 17) und diese Beschreibung in der Zeitschrift „International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology“ veröffentlicht (MÖLLER PALAU-RIBES et al. 2016)



## 4.5 Prävalenzstudie zu *Mycoplasma ciconiae* sp. nov.

Die Prävalenzstudie zum Vorkommen der Spezies *M. ciconiae* sp. nov. (Typstamm ST 57<sup>T</sup>) bei gesunden Weißstorchnestlingen wurde durchgeführt, um das Vorkommen von *M. ciconiae* sp. nov. in der Weißstorchpopulation zu schätzen und die Bedeutung zu evaluieren. Für diese Studie wurden 83 Mykoplasmenkulturen und eine Probe mit extrahierter DNA (= 84 Proben) aus der Studie von HAGEN et al. (2004) verwendet.

### 4.5.1 Speziesspezifische PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR)

Das Isolat ST57 wurde als Typstamm für die potentielle neue Spezies *M. ciconiae* sp. nov. ausgewählt. Um die Prävalenz von *M. ciconiae* sp. nov. bei Weißstorchnestlingen zu evaluieren, wurde eine speziesspezifische PCR (ST57-PCR) etabliert. Es wurde ein geeignetes Primerpaar in der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS) gefunden (Tabelle 29) sowie ein PCR-Protokoll entwickelt, das im positiven Fall zu einem DNA-Amplikon mit einer Größe von 203 bp führte (Tabelle 31). Die 16S-rRNA-Gensequenz erwies sich aufgrund der hohen Homologien zwischen den *Mycoplasma*-Spezies des Synoviae-Clusters zu diesem Zweck als ungeeignet.

Tabelle 29: Selbstentwickelte Oligonukleotide (Primer) für die speziesspezifische PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von *M. ciconiae* sp. nov. (ST57-PCR)

Bezeichnung der Primer	Polarität	Primersequenz
ST57-ITS-fo4a	vorwärts (forward)	5'-acg aca ttt aca act gac tta-3'
ST57-ITS-re1	rückwärts (reverse)	5'-aaa aat aac tcg gta aat ca-3'

Der Reaktionsansatz (Mastermix) sowie das Temperatur-Zeit-Profil wurde basierend auf Herstellerangaben berechnet und experimentell anhand verschiedener Zusammenstellungen (Primerkombinationen und -verdünnungen, Mastermix mit/ohne Q-Solution), Annealingtemperaturen (47, 48, 50, 53°C) und Zyklen (30, 35) optimiert, bis ein Amplikon anhand von Banden erwarteter Länge in der Agarosegelelektrophorese nachweisbar war. Der Reaktionsansatz für eine Probe (Tabelle 30) sowie das Temperatur-Zeit-

## ERGEBNISSE

---

Profil (Tabelle 31), bei denen ein spezifisches Amplikon entsteht, sind tabellarisch dargestellt. Bei allen anderen Ansätzen entstand kein Amplikon.

Die niedrigste DNA-Konzentration des Isolates ST57, bei der das Amplikon in der Gelelektrophorese deutlich darstellbar war, lag bei 1 pg/ $\mu$ l DNA (Abbildung 19) bzw.  $10^3$  KbE/ml (=1 KbE/ $\mu$ l) (Abbildung 20). Bei 3  $\mu$ l DNA in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz lag folglich die Sensitivität dieser PCR bei 3 pg DNA bzw. 3 KbE/Reaktionsansatz. Die PCR war spezifisch für *M. ciconiae* sp. nov., denn alle anderen untersuchten Stämme aviärer *Mycoplasma* spp. (n = 26; Tabelle 9) und eine Auswahl von Stämmen häufig beim Vogel vorkommender zellwandbildender Bakterien (n = 7, Tabelle 10) wurden nicht detektiert. Ein Amplikon wurde bei dieser PCR ausschließlich mit der DNA des Isolates ST57 erhalten. Zur Überprüfung der PCR wurden DNA-Amplikons einer zufällig ausgewählten Stichprobe von 10 positiven Kulturen aus der epidemiologischen Studie (siehe unten) sequenziert (ST3, ST12, ST20, ST26, ST29, ST36, ST43, ST54, ST58 und ST68). Die Sequenzen der Amplikons stimmten zu 100% mit der korrespondierenden Sequenz des Referenzstammes überein.

**Tabelle 30: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (Mastermix) für die speziesspezifische PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von *M. ciconiae* sp. nov. (ST57-PCR).**

<b>Substanz</b>	<b>Eingesetztes Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
RNase freies H <sub>2</sub> O	29,5
10x HotStarTaq DNA Puffer	5
dNTP-Mix	5
Q-Solution	5
Forward-Primer 100 pmol/ $\mu$ l (ST57-ITS-fo4a)	1
Reverse Primer 100 pmol/ $\mu$ l (ST57-ITS-re1)	1
HotStarTaq-DNA-Polymerase	0,5
Probe (DNA)	3
Gesamtvolumen	50

DNA = Desoxyribonukleinsäure, dNTP-Mix = Deoxynukleotidtriphosphat-Mischung, H<sub>2</sub>O = Wasser, MgCl<sub>2</sub> = Magnesiumchlorid, M = Molar, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, Q-Solution = Substanz der Firma Qiagen, Zusammensetzung nicht bekannt, RNase = Ribonuklease

## ERGEBNISSE

Tabelle 31: Temperatur-Zeit-Profil für die speziesspezifische PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von *M. ciconiae* sp. nov. (ST57-PCR).

Zyklus	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	Denaturierung	95°C	10 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94°C	1 min	35
	Anlagerung (Annealing)	50°C	1 min	
	Verlängerung (Elongation)	72°C	30 s	
3	Verlängerung	72°C	5 min	1
4	Kühlung	4°C	Unbegrenzt	1

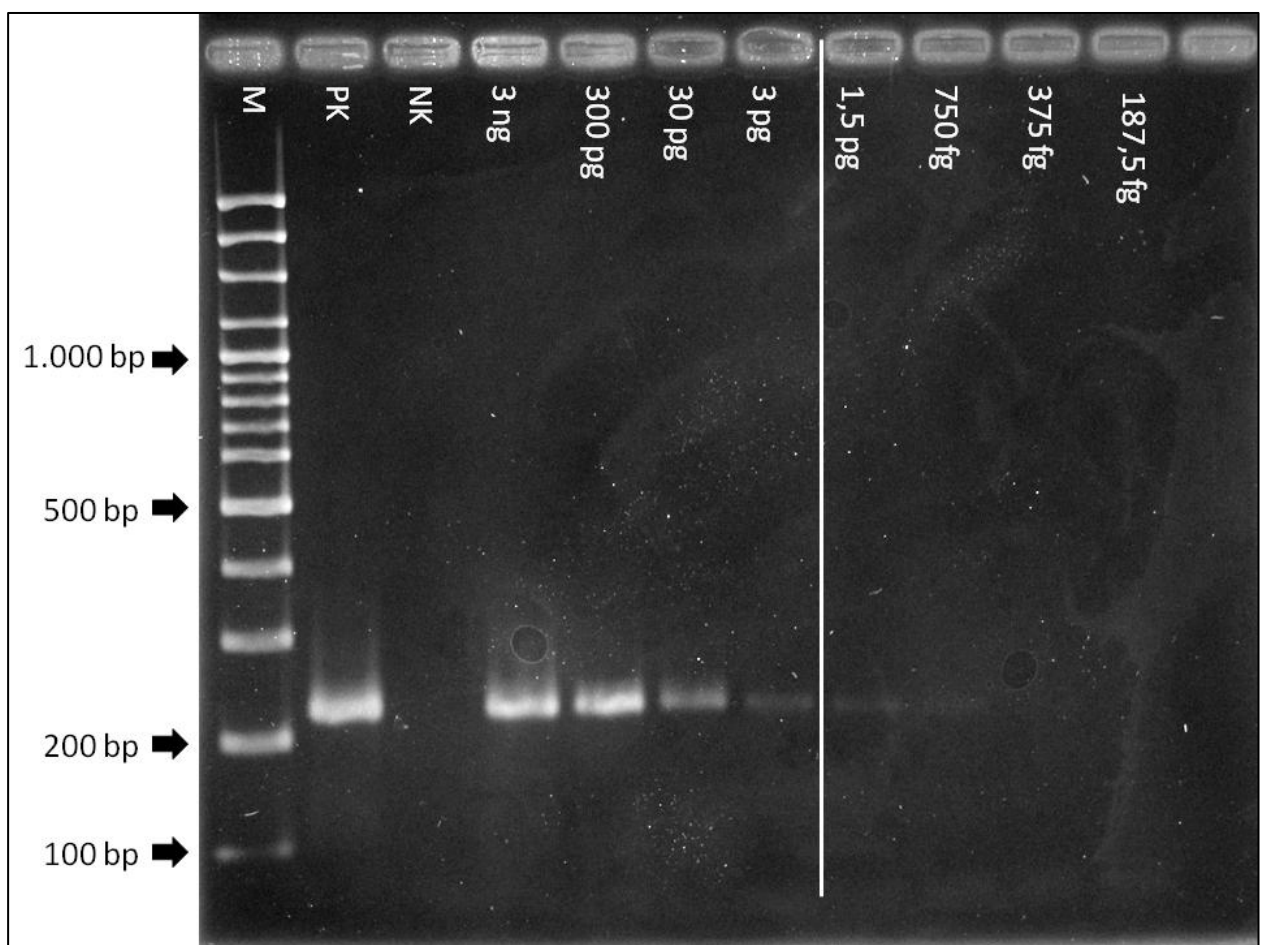
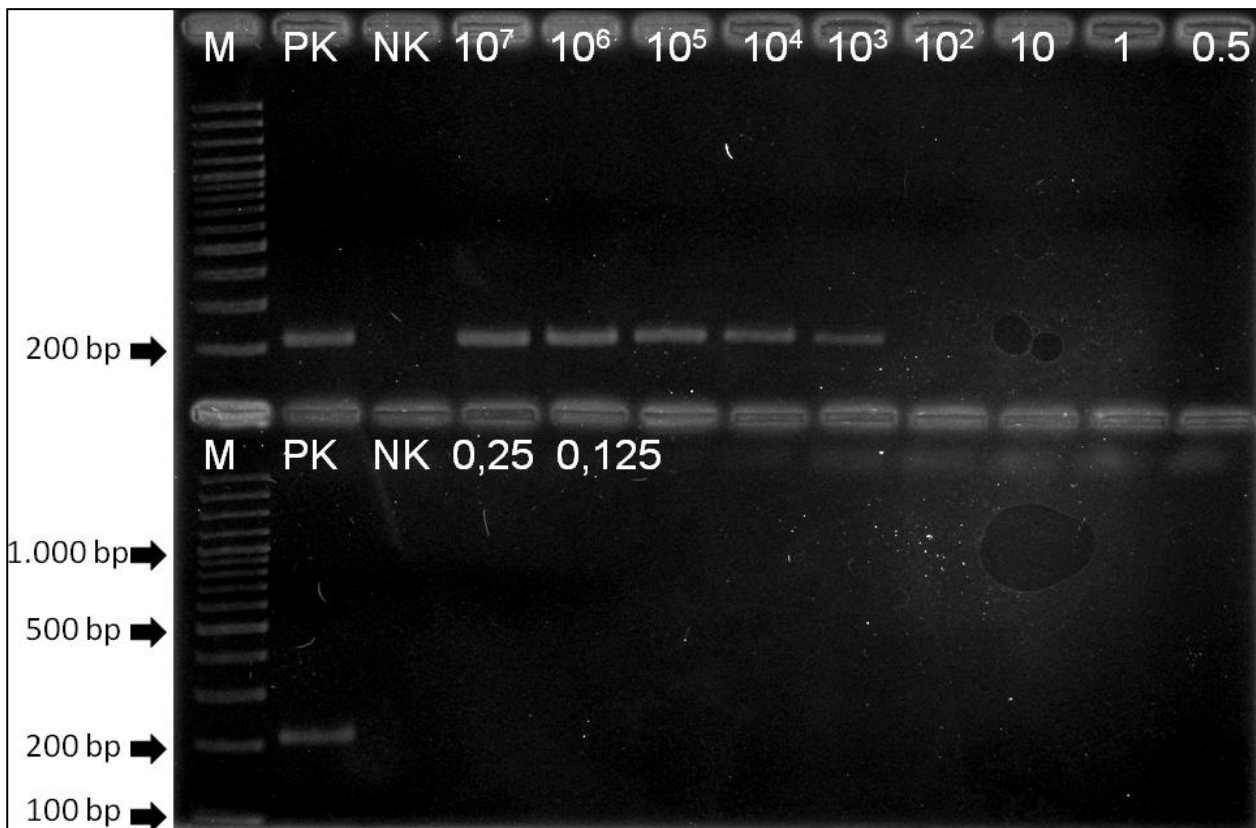


Abbildung 19: Ergebnis der speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) in Abhängigkeit von der im Reaktionsansatz eingesetzten Menge an genomischer DNA aus dem Isolat ST57, Agarosegel 2%, Färbung Ethidiumbromid

Balken: Nachweisgrenze, M = 100 bp-DNA-Molekulargewichtsmarker; PK = Positivkontrolle (ST57-DNA); NK = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

## ERGEBNISSE

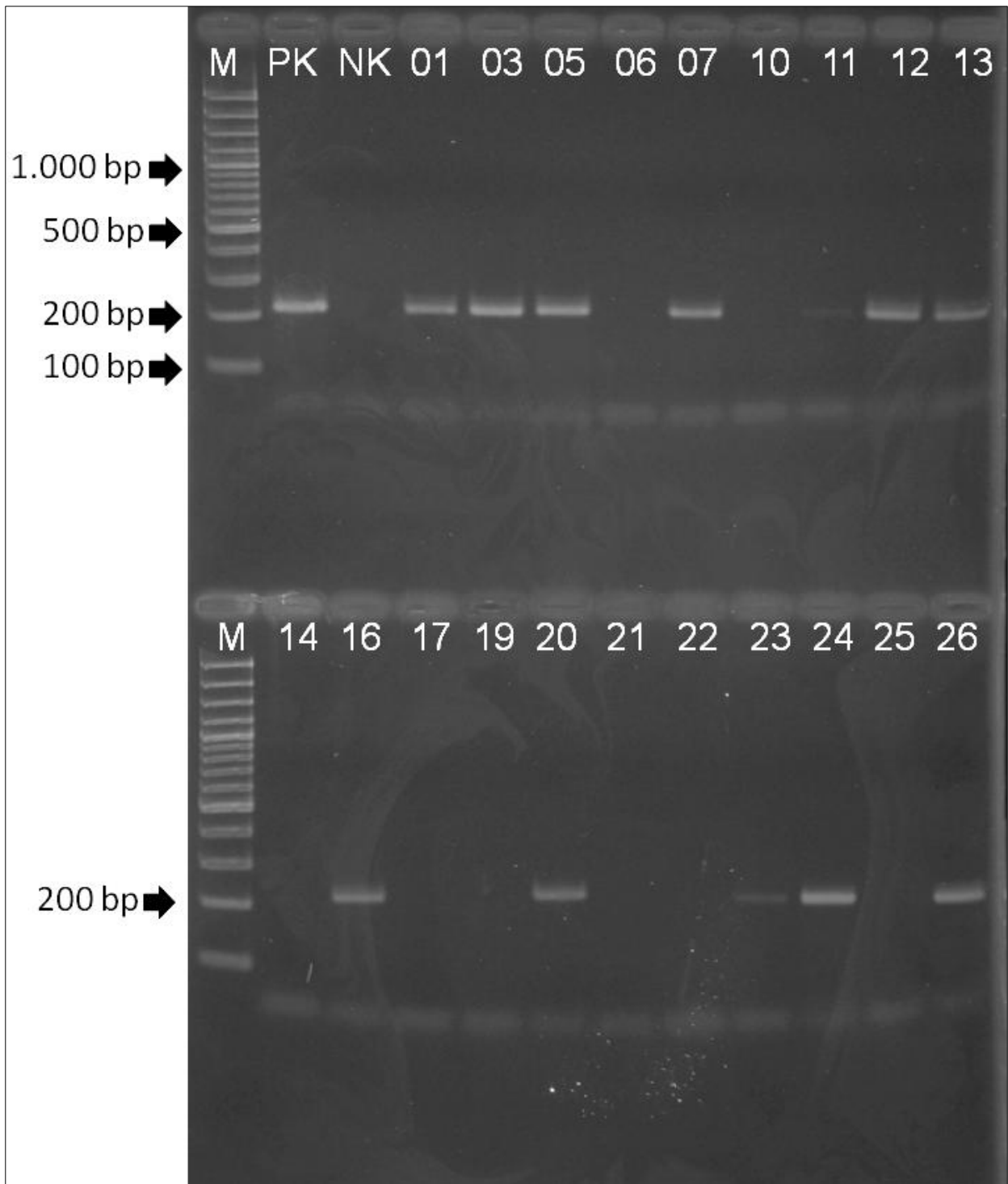


**Abbildung 20:** Ergebnis der speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) in Abhängigkeit von der im Reaktionsansatz verwendeten Keimzahlen [KbE] des Isolates ST57, Agarosegel 2%, Färbung Ethidiumbromid

Angaben in KbE/ml, M = 100 bp-DNA-Molekulargewichtsmarker; PK = Positivkontrolle (ST57-DNA); NK = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

Von 83 untersuchten Kulturen und einer extrahierten DNA-Probe von insgesamt 84 Weißstorchnestlingen wiesen 49 in der ST57-PCR ein spezifisches Amplikon auf, welches einem Anteil von 58,3% der untersuchten Nestlinge entsprach. Es handelte sich dabei um die Kulturen mit den Bezeichnungen ST1, 3, 5, 7, 12, 13, 16, 20, 23, 24, 26, 29, 36, 37, 38, 39, 41, 43, 44, 46, 47, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 64, 68, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 99, 102, 103, 104 und 108. Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der Proben ST1 bis ST26 sind in Abbildung 21 beispielhaft dargestellt.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 21: Ergebnisse der PCR für das Isolat ST57 (ST57-PCR) für die Mykoplasmenkulturen ST 1 bis ST 26, Agarosegel 2%, Färbung Ethidiumbromid**

M = 100 bp-DNA-Molekulargewichtsmarker; PK = Positivkontrolle (ST57-DNA); NK = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

## 4.5.2 Geographische Verteilung

Die Verteilung der Horste, bei denen Proben von den Weißstorchnestlingen entnommen worden waren, ist kartographisch in Abbildung 22 dargestellt. Die Horste, aus denen die Nestlinge stammten, konnten geographisch zwei deutlich getrennten Regionen zugeordnet werden (siehe Markierungen in Abbildung 22). Diese sind jeweils detaillierter in Abbildung 23 (Region 1: Nord) und Abbildung 24 (Region 2: Süd) dargestellt.

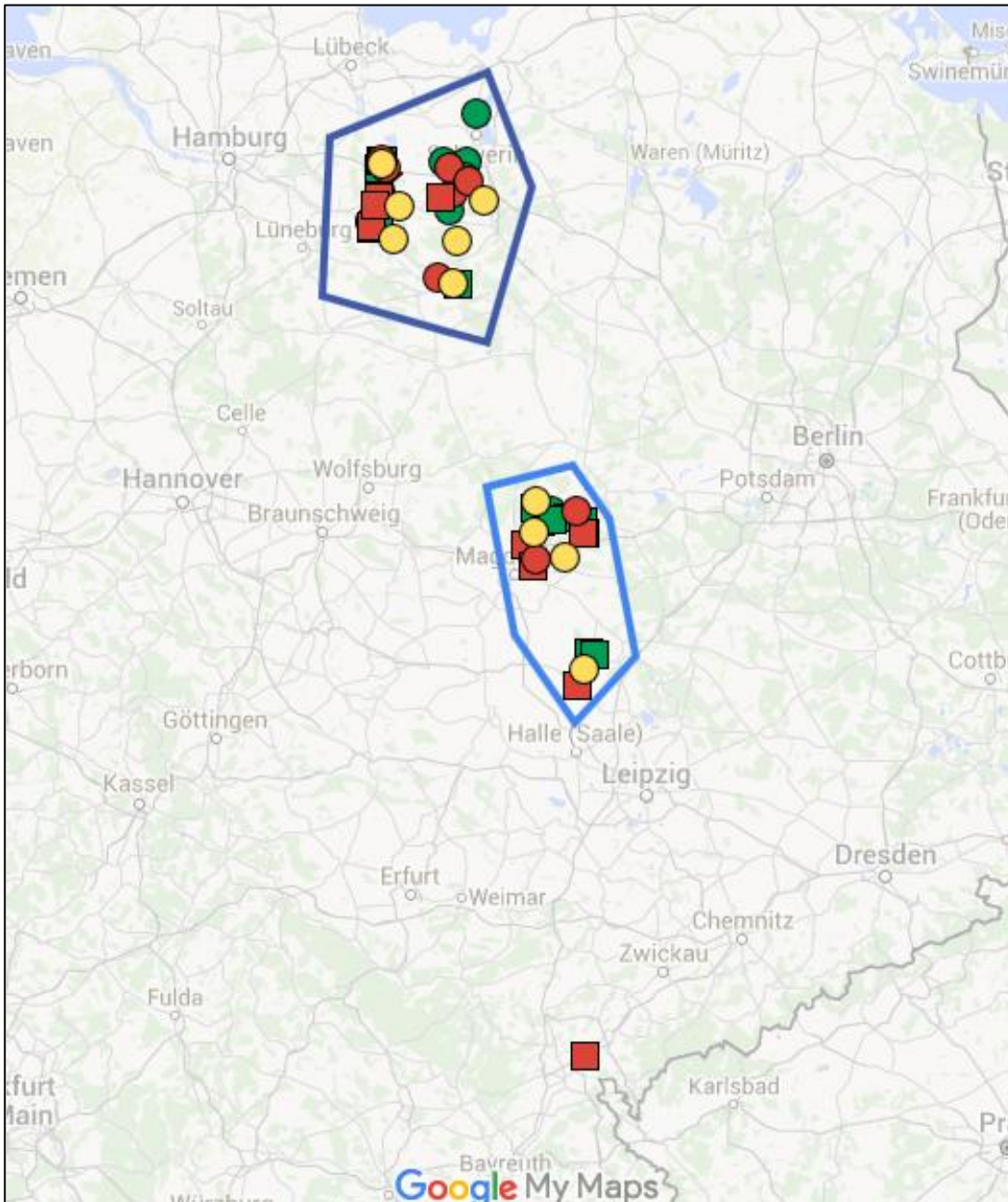
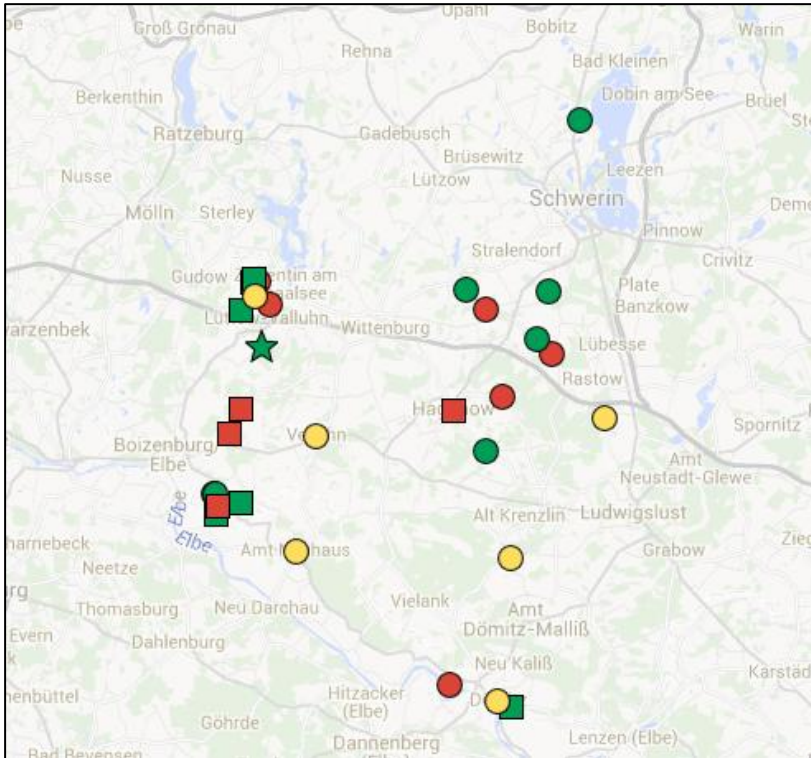


Abbildung 22: Geographische Lage der Weißstorch-Horste aus denen die untersuchten Nestlinge stammten: Übersicht

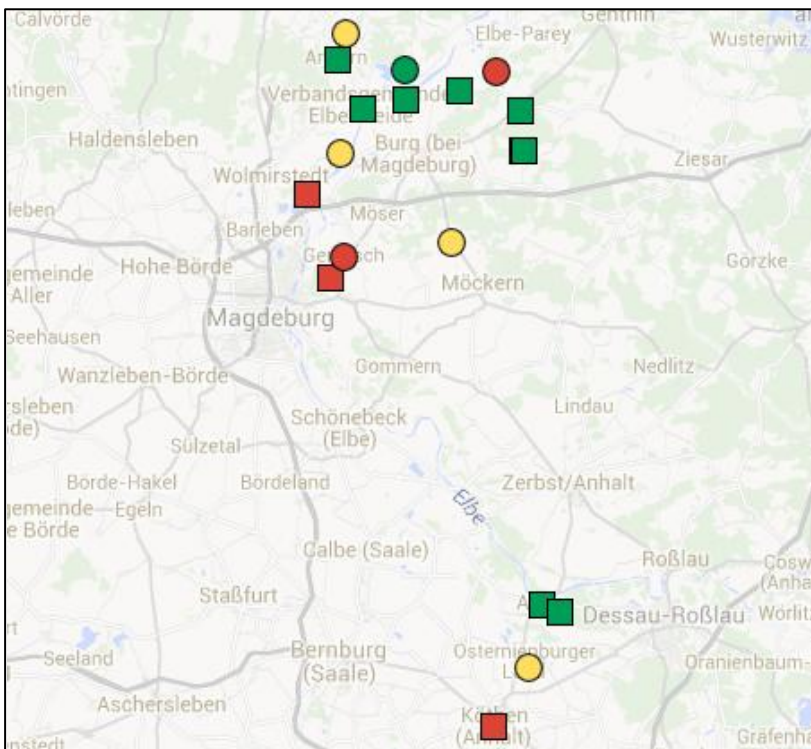
Rot: alle Nestlinge des Horstes negativ; Gelb: Teil der Nestlinge positiv; Grün: alle Nestlinge positiv; Kreis: Horst mit Ergebnissen von mehr als 1 Nestling; Quadrat: Horst mit Ergebnissen von 1 Nestling; Rahmen dunkelblau: Region 1 Nord; Rahmen hellblau: Region 2 Süd.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 23: Geographische Lage der Weißstorch-Horste aus denen die untersuchten Nestlinge stammen: Region 1 Nord**

Rot: alle Nestlinge des Horstes negativ; Gelb: Teil der Nestlinge positiv; Grün: alle Nestlinge positiv; Kreis: Horst mit Ergebnissen von mehr als 1 Nestling; Quadrat: Horst mit Ergebnissen von 1 Nestling; Stern: Horst des Nestlings ST57



**Abbildung 24: Geographische Lage der Weißstorch-Horste aus denen die untersuchten Nestlinge stammen: Region 2 Süd**

Rot: alle Nestlinge des Horstes negativ; Gelb: Teil der Nestlinge positiv; Grün: alle Nestlinge positiv; Kreis: Horst mit Ergebnissen von mehr als 1 Nestling; Quadrat: Horst mit Ergebnissen von 1 Nestling; Stern: Horst des Nestlings ST57

### 4.5.3 Statistische Auswertung

Von 83 untersuchten Kulturen und einer extrahierten DNA-Probe von insgesamt 84 Weißstorchnestlingen wiesen 49 in der ST57-PCR ein spezifisches Amplikon auf, welches einem Anteil von 58,3% der untersuchten Nestlinge entsprach (Prävalenzschätzer). Um die Genauigkeit des Prävalenzschätzers zu überprüfen, wurde das 95%-Konfidenzintervall berechnet, welches zwischen 47,1% und 69% lag. Somit wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% von dem Intervall 47,1% bis 69% die wahre Prävalenz von *M. ciconiae* sp. nov. bei Weißstorchnestlingen überdeckt

Anhand der explorativen Analyse (Chi-Quadrat-Test) war kein Unterschied in der Nachweishäufigkeit von *M. ciconiae* sp. nov. zwischen den Regionen 1 und 2 nachweisbar ( $p = 0,4701$ ). Die Verteilung der Nachweise auf beide Regionen ist in Tabelle 32 dargestellt. Ein Isolat, ST14, stammte von einem Nestling aus einer anderen Region, daher wurde dieses nicht mit in die statistischen Berechnungen einbezogen.

Tabelle 32: Nachweise von *M. ciconiae* sp. nov. bei Weißstorchnestlingen nach Regionen. Ergebnisse der speziesspezifischen PCR zur Detektion des Isolates ST57, Typstamm von *M. ciconiae* sp. nov. (ST57-PCR)

Region	Nachweis (ST57-PCR)		Gesamtzahl untersuchter Proben*
	Positiv	Negativ	
<b>1 (Nord)</b>	34 (61,8%)	21 (38,2%)	55 (100%)
<b>2 (Süd)</b>	15 (53,6%)	13 (46,4%)	28 (100%)
<b>Summe</b>	49 (59,0%)	34 (41,0%)	83* (100%)

\* = Das Isolat ST14 stammte von einem Nestling aus einer anderen Region und wurde daher als Ausreißer nicht in dieser Berechnung berücksichtigt.

Statistisch waren zudem keine signifikanten Einflüsse der Faktoren „Anzahl Nestlinge pro Horst“ ( $p = 0,552$ ) und „Alter der Nestlinge“ ( $p = 0,215$ ) nachweisbar.



# 5 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Vorkommens und der Bedeutung von Mykoplasmen bei Weißstorchnestlingen. Dazu sollten zwei in Vorarbeiten (LIERZ et al. 2011) als mögliche neue Spezies identifizierte Isolate (ST57 und ST101) anhand phänotypischer Eigenschaften näher charakterisiert und ggf. als Spezies beschrieben werden. Die Bedeutung der neuen Spezies sollte durch die Ermittlung der Prävalenz auf Basis der vorliegenden 83 Isolate und einer Probe mit extrahierter DNA aus der Studie von HAGEN et al (2004) evaluiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass das Isolat ST101 sehr hohe Sequenzhomologien des 16S-rRNA-Gens (Tabelle 19) und der ITS (Tabelle 21) mit *M. spumans* und zahlreichen weiteren Spezies des Hominis-Clusters aufwies. Obwohl das Isolat in Voruntersuchungen im Immunobinding Assay nicht mit *M. spumans*-Antiserum reagiert hatte, wären weitere Untersuchungen, u.a. DNA-DNA-Hybridisierung und serologische Untersuchungen mit weiteren *Mycoplasma*-Spezies, für eine Speziesbeschreibung notwendig gewesen (BROWN et al. 2007). Da es nicht möglich war alle 15 hierfür benötigten Kaninchen-Hyperimmunseren zu erhalten (BROWN, persönliche Mitteilung), wäre eine valide Beschreibung der Spezies nicht möglich gewesen. Im Folgenden wurde daher nur ein Teil der phänotypischen Untersuchungen mit dem Isolat ST101 durchgeführt, um die Ergebnisse der Voruntersuchungen zu überprüfen.

## 5.1 Genotypische und phylogenetische Untersuchungen

### 5.1.1 *Mycoplasma ciconiae* sp. nov.

Die neue Mykoplasmenspezies *M. ciconiae* sp. nov. wurde anhand ihres Typstammes ST 57<sup>T</sup> auf Basis der „Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes“ beschrieben (BROWN et al. 2007). Genetische Untersuchungen wurden neben dem Typstamm mit vier weiteren Isolaten aus dieser Arbeit (ST24-1, ST56-1, ST99-1 und ST102-1), sowie einem Isolat von einem verletzt aufgefundenen Weißstorch in Hessen (1566/2012) durchgeführt. Diese Isolate konnten ebenfalls der neuen Spezies zugeordnet werden. Mittels der 16S-rRNA-Gensequenz wurde die Zugehörigkeit von *M. ciconiae* sp. nov. zum Synoviae-Cluster des Genus *Mycoplasma* nachgewiesen (Abbildung 10). Dabei betrug die Sequenzhomologie des 16S-rRNA-Gens zu allen Mykoplasmen weniger als 94%, ausgenommen *M. pullorum* (95,4%) und *M. anatis* (94,3%)(Tabelle 18). Eine Sequenzhomologie von über 94% dient der Identifizierung monophyletischer Gruppen, sodass Spezies dieser Gruppen ausführlicher von der potentiell neuen Spezies abgegrenzt werden müssen (BROWN et al. 2007). Als Speziesgrenze gilt eine 16S-rRNA-Gensequenzhomologie von 97% (STACKEBRANDT und GOEBEL 1994). Neueren Untersuchungen zufolge liegt die durchschnittliche Sequenzhomologie zwischen Spezies des Synoviae-Clusters mit  $93,53\% \pm 1,97\%$  (<95,6%) etwas niedriger (VOLOKHOV et al. 2012). Zu *M. ciconiae* sp. nov. zeigte keine der bislang beschriebenen Mykoplasmenspezies eine Sequenzhomologie von über 95,6%. Da *M. pullorum* und *M. anatis* eine Sequenzhomologie von über 94% zu *M. ciconiae* sp. nov. aufwiesen, wurde eine zusätzliche Sequenz, die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer (ITS)-Region, sequenziert und diese mit anderen Mykoplasmen verglichen. Durchschnittliche Sequenzhomologien der ITS innerhalb des Synoviae-Clusters sind mit  $83,05\% \pm 5,62\%$  deutlich niedriger als bei der 16S-rRNA (VOLOKHOV et al. 2012). Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche der ITS zeigten erwartungsgemäß deutlichere Unterschiede zwischen *M. ciconiae* sp. nov. und den anderen Spezies als bei der 16S-rRNA-Gensequenz. Keine Spezies zeigte eine Sequenzhomologie oberhalb der Grenze von 88,67%. Insbesondere *M. anatis* (70,8% Sequenzhomologie) und *M. pullorum* (83,1% Sequenzhomologie) waren anhand dieser Sequenz deutlicher von *M. ciconiae* sp. nov. abgrenzbar als anhand der 16S-rRNA-Gensequenz. Somit wurde auf gene-

tischer Basis der Nachweis erbracht, dass es sich bei *M. ciconiae* sp. nov. um eine neue Spezies handelt.

### 5.1.2 Weitere Mykoplasmenisolate

Im Rahmen der Auswertung der Isolate fanden sich weitere Mykoplasmenisolate. Diese Isolate wurden anhand ihrer 16S-rRNA-Gensequenz sowie der Sequenz der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer (ITS)-Region typisiert. Eine ausführliche Charakterisierung dieser Isolate war hingegen nicht Gegenstand dieser Studie. Die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen zeigten, dass im Respirationstrakt von Weißstörchen neben *M. ciconiae* sp. nov. wahrscheinlich zwei weitere Mykoplasmenspezies vorkommen, die bislang nicht beschrieben wurden. Beide potentielle Spezies konnten dem Hominis-Cluster zugeordnet werden. Im Folgenden werden diese, aufgrund ihrer am nächsten verwandten Spezies, als „*M. spumans*-“ und „*M. gypis*-ähnliche“ Gruppe bezeichnet.

Die durchschnittliche Sequenzhomologie der 16S-rRNA zwischen Spezies des Hominis-Clusters liegt bei  $94,58\% \pm 2,56\%$  ( $<97,14\%$ ), der ITS bei  $83,61\% \pm 7,74\%$  ( $<91,35\%$ ) (VOLOKHOV et al. 2012). Die „*M. spumans*-ähnliche“ Gruppe wies mit über 98,4 bis 99,5% sehr hohe 16S-rRNA-Gen- und mit 93,8% bis 94,4% ebenfalls sehr hohe ITS-Sequenzhomologien mit *M. spumans* auf, die oberhalb der angenommenen Speziesgrenze liegen. Die 16S-rRNA-Gensequenz der Isolate untereinander war hingegen mit 99,0% bis 100%, im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, etwas variabler. In Voruntersuchungen reagierte das Isolat ST101 im Immunobinding Assay (IBA) nicht mit Antiserum gegen *M. spumans* (LIERZ, unveröffentlichte Daten), welches wiederum gegen eine Zugehörigkeit zu dieser Spezies spricht. Eine Identifizierung als bzw. Abgrenzung von *M. spumans* wäre in diesem Fall wahrscheinlich nur anhand einer DNA-DNA-Hybridisierung möglich (BROWN et al. 2007). Es kann sich bei dieser Gruppe möglicherweise auch um eine Subspezies von *M. spumans* handeln. Bislang wurde *M. spumans* ausschließlich bei Hunden als Kommensale des Nasopharynx, aber auch in Verbindung mit Pneumonien und Arthritiden beschrieben (EDWARD 1955). Vereinzelt Nachweise von *M. spumans* bei Störchen wären z. B. durch eine indirekte Übertragung von Hunden über kontaminierte Gegenstände erklärbar. Es ist auch möglich, dass Hunde nicht die einzigen natürlichen Wirte dieser Spezies sind. Weitere Untersuchungen zur exakten taxonomischen Zuordnung der Isolate der „*M. spumans*-ähnlichen“ Gruppe sind notwendig.

## DISKUSSION

---

In der dritten, „*M. gypis*-ähnlichen“ Gruppe, wiesen die Isolate eine 16S-rRNA-Gensequenzhomologie von 99,6 bis 99,9% untereinander auf. *M. gypis* war mit 97,0 bis 97,3% die am nächsten verwandte Spezies. Zu allen weiteren Spezies dieses Clusters wiesen sie Homologien unter 94% auf. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Gruppe von Isolaten aber ebenfalls um Vertreter einer bisher unbekanntem Spezies bzw. Subspezies von *M. gypis*. Unterstützt wird diese These durch die ITS-Sequenzhomologie von nur 82,9% zwischen *M. gypis* und den Isolaten der „*M. gypis*-ähnlichen“ Gruppe. Weitere Informationen könnten serologische Untersuchungen geben. *M. gypis* wurde bislang bei klinisch unauffälligen und klinisch kranken Greifvögeln verschiedener Spezies sowie Trielen nachgewiesen (LIERZ et al. 2008b; SCHMIDT et al. 2009). Aufgrund dieser geringen Wirtsspezifität scheint ein Vorkommen dieser bzw. nahe verwandter Spezies auch bei Weißstörchen möglich. Da diese Isolate aus den gleichen gesunden Weißstorchnestlingen stammen wie die Isolate der beiden anderen Gruppen, erscheint auch hier die klinische Bedeutung fraglich und eine Speziesbeschreibung nicht primär relevant.

Der Vergleich mit 16S-rRNA-Gen- bzw. ITS-Sequenzen von Mykoplasmen-Isolaten anderer Arbeiten (SPERGSER und HÖFLE HANSEN 2009b; SUÁREZ-PÉREZ 2011) zeigte nur geringe Homologien zu den Isolaten aus dieser Arbeit. Die Sequenzen der Isolate T454T und Sp22 waren dem Bovis-Cluster zuzuordnen und nahezu identisch. Ein Isolat (T453CO) hatte deutliche Homologie mit den „*M. spumans*-ähnlichen“ Isolaten, ein weiteres Isolat (T452T) eine geringe Homologie mit *M. ciconiae* sp. nov.. Ein Isolat aus einem verletzt aufgefundenen Weißstorch in Hessen konnte hingegen als *M. ciconiae* sp. nov. identifiziert werden. Die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen legen somit nahe, dass neben den mutmaßlich drei verschiedenen Spezies aus dieser Arbeit, vermutlich mindestens zwei weitere noch nicht beschriebene Spezies bei Weißstörchen vorkommen. Die Isolate T453CO und T452T stammen aus der Trachea geschwächt aufgefunder Störchen ohne respiratorische Symptomatik, sodass auch deren klinische Bedeutung fraglich ist (SUÁREZ-PÉREZ 2011). Ein Isolat stammt aus der Lunge eines Weißstorches, weitere Details waren zu diesem Isolat jedoch nicht erhältlich (persönliche Mitteilungen HÖFLE HANSEN und SPERGSER).

## 5.2 Nachweis von Mykoplasmen

Als Goldstandard für die Diagnostik aviärer Mykoplasmen gilt bis heute die Kultivierung, da nur anhand daraus gewonnener Isolate weiterführende Untersuchungen, wie beispielsweise für die Beschreibung neuer Spezies notwendig, möglich sind (BRADBURY 1998; RAVIV und LEY 2013). Zu Beginn dieser Studie wurden daher zunächst alle 83 Kulturen von Weißstorchnestlingen aufgetaut und erneut kultiviert. Aus allen gelang die Kultivierung von Mykoplasmen, welche die Basis dieser Studie darstellen. Eine Differenzierung bzw. Einzelkolonie-Subkultivierung mit Gewinnung von Isolaten erfolgte zu diesem Zeitpunkt nicht. Für eine Differenzierung wurden gezielt sieben Isolate ausgewählt, die mittels der speziesspezifischen ST57-PCR positiv getestet worden waren. Ziel war hier die Gewinnung weiterer Isolate von *M. ciconiae* sp. nov. Insgesamt wurden aus 4/7 Kulturen Isolate von *M. ciconiae* sp. nov. gewonnen, aus 3/7 hingegen nicht. Die Diskrepanz der Ergebnisse von speziesspezifischer PCR und Anzucht könnte an falschpositiven Ergebnissen der PCR liegen. Die speziesspezifische ST57-PCR aus dieser Arbeit wurde jedoch einer Qualitätskontrolle unterzogen, bei welcher alle sequenzierten Amplikons der gewählten Stichprobe *M. ciconiae* sp. nov.-spezifische Sequenzen aufwiesen. Somit ist das Vorliegen falschpositiver PCR-Ergebnisse unwahrscheinlich. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass *M. ciconiae* sp. nov. in diesen Proben aufgrund der langen Lagerung zwischen der Probenentnahme 2003 und der Untersuchung 2010-2014 nicht mehr vital war. Während mittels PCR auch die DNA geschädigter bzw. abgestorbener Mykoplasmen erfasst wird, können mittels Anzucht nur lebende und vermehrungsfähige Mykoplasmen nachgewiesen werden. Durch die Lagerung sowie Einfrier- und Auftauprozesse treten in Mykoplasmenkulturen Keimzahlverluste von mehreren Zehnerpotenzen auf (FURR et al. 1990). Die Lebensfähigkeit bei -70°C gelagerter Flüssigkulturen lässt nach einer Lagerung über Zeiträume von 5 bis 16 Jahren bei den meisten Spezies nicht, bei wenigen Spezies hingegen deutlich nach (FURR und TAYLOR-ROBINSON 1990). Um insbesondere eine Schädigung durch wiederholte Auftau- und Einfrierprozesse zu vermeiden, wurden alle Kulturen aus dem Jahr 2003 einmalig für die Vitalitätsprüfung und DNA-Isolierung, die Kulturen für die Gewinnung von *M. ciconiae* sp. nov.-Isolaten sodann ein zweites Mal aufgetaut. Beim Vorliegen niedriger Ausgangskeimzahlen von *M. ciconiae* sp. nov. in einer Kultur kann dies jedoch trotzdem zu einem negativen Ergebnis in der Anzucht geführt haben. Da es sich bei den vorliegenden Proben um Mischkulturen handelte, ist es zudem möglich, dass

*M. ciconiae* sp. nov. zwar in geringen Keimzahlen vermehrungsfähig vorlag, jedoch von anderen Mykoplasmen überwachsen wurde. In der Literatur wird beschrieben, dass vor allem langsamer wachsende Spezies von schneller wachsenden verdrängt werden (BUNTZ et al. 1986; RAVIV und LEY 2013). Langsamer wachsende Spezies können somit leicht übersehen werden, sodass es zu falschnegativen Ergebnissen in der Anzucht kommt (KEMPF 1998). Ohne zusätzliche molekularbiologische Untersuchung wäre die Prävalenz von *M. ciconiae* sp. nov. in dieser Arbeit wahrscheinlich fälschlicherweise deutlich niedriger geschätzt worden. Als Goldstandard bei der Untersuchung von Proben aus Wildvogelspezies mit unbekannter Mykoplasmenflora gilt daher eine parallele Untersuchung mittels Anzucht und der sensitiveren PCR (LIERZ et al. 2007b).

Bei einigen Studien zu Mykoplasmen bei Wildvögeln werden genuspezifische PCR als Alternative zur aufwändigen Kultivierung eingesetzt (ASSUNÇÃO et al. 2007). Während diese Methode deutlich sensitiver als die Kultivierung ist (LIERZ et al. 2008b), stellt vor allem das parallele Vorkommen verschiedener Mykoplasmenpezies in einem Individuum einen limitierenden Faktor dar (POVEDA et al. 1990a). Im Rahmen der Subkultivierung und Differenzierung der Kulturen fanden sich in dieser Arbeit bei 3/7 Weißstorchnestlingen (ST24, ST56, ST102) jeweils zwei verschiedene Mykoplasmenisolate (siehe 4.1). Werden Proben aus solchen Individuen ohne Kultivierung bzw. anschließende Gewinnung von Isolaten mittels genuspezifischer PCR untersucht, kann die DNA mehrerer Mykoplasmenpezies gleichzeitig amplifiziert werden. Dies würde zu einer Überlagerung von Signalen bei der Sequenzierung und somit zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen. Ist eine Spezies in einer Probe in einer höheren Konzentration vorhanden, kann zudem die zweite Spezies, aufgrund einer deutlich stärkeren Amplifikation der DNA der ersten Spezies, übersehen werden. Eine ausschließlich auf genuspezifischer PCR basierende Diagnostik wäre daher bei Weißstörchen, trotz höherer Sensitivität der Methode, nicht zielführend. Eine genuspezifische PCR aus Feldproben eignet sich folglich um in einem ersten Schritt das Vorkommen von Mykoplasmen zu detektieren, jedoch nicht für die sichere Identifikation vorhandener, insbesondere unbekannter, Spezies. Wird gezielt nach einer bestimmten Spezies gesucht, sollte daher eine speziesspezifische PCR durchgeführt werden (BRADBURY et al. 2001a). Bei dieser Fragestellung bietet eine speziesspezifische PCR aufgrund ihrer höheren Sensitivität sowie rascheren und kostengünstigeren Durchführung deutliche Vorteile gegenüber der Anzucht. Nur mittels Anzucht können jedoch, wie eingangs erwähnt, Isolate unbekann-

ter Spezies gewonnen und anschließend weiter charakterisiert werden (BRADBURY 1998).

Für die Durchführung serologischer Tests zur Erfüllung der Mindeststandards für die Beschreibung neuer Spezies der Klasse Mollicutes (BROWN et al. 2007) wurden spezifische polyklonale Kaninchen-Hyperimmunseren gegen den Typstamm ST 57<sup>T</sup> von *M. ciconiae* sp. nov. hergestellt. Für die Herstellung der Hyperimmunseren erwiesen sich nur zwei von zehn vorab getesteten Kaninchen als geeignet. Bei den anderen Tieren zeigte bereits das Präimmunserum im Immunobinding Assay (IBA) unspezifische Reaktionen mit verschiedenen Mykoplasmenpezies. Kaninchen werden für die Herstellung von Hyperimmunseren verwendet, da bei diesen, im Gegensatz zu vielen anderen Tierarten, keine natürlichen Mykoplasmeninfektionen beschrieben sind. Unspezifische Reaktionen kommen dennoch regelmäßig vor, daher wird die Testung von Präimmunseren mit dem anschließend verwendeten Testsystem (hier: IBA) empfohlen (CLYDE 1983). In dieser Arbeit wurde ein Medium mit reduzierten Inhaltsstoffen und IgG-reduziertem Fetalem-Kälberserum (IgG stripped FKS) zur Kultivierung des Isolates ST57 eingesetzt. Unspezifische Reaktionen bei Kaninchen-Hyperimmunseren entstehen vor allem dadurch, dass Mykoplasmen Serumproteine aus dem Kulturmedium adsorbieren und Kaninchen Antikörper gegen diese Proteine bilden (SETERFIT 1983). Die Serumkomponente des Kulturmediums sollte daher kein Serum von Tierarten enthalten, deren Serum in Anzucht- bzw. Testmedien des Labors Verwendung finden. Optimal wäre Kaninchenserum, da die Tiere gegen homologes Serum wenig oder sogar keine Antikörper bilden. Kaninchenserum wird jedoch nicht verwendet, da dieses wiederum zu einem schlechten Wachstum der Mykoplasmenisolate führt (SETERFIT 1983). Die Antigengewinnung erfolgte aus „AS2,5-Medium“, welches 2,5% IgG-reduziertes fetales Kälberserum (IgG stripped FKS) enthielt. Analog zu der Beschreibung anderer Autoren (YAVARI 2010), konnte auch in dieser Arbeit in „AS1-Medium“, welches 1% IgG stripped FKS enthält, kein ausreichendes Mykoplasmenwachstum für eine angemessene Antigenausbeute erreicht werden.

Nach Vorgabe der „Minimal Standards for the description of new species of the class Mollicutes“ (BROWN et al. 2007), wurden serologische Untersuchungen aller Mykoplasmenpezies, mit denen die Isolate von *M. ciconiae* sp. nov. 16S-rRNA-Gensequenzhomologien von über 94% aufwiesen, durchgeführt. Zusätzlich wurden alle

## DISKUSSION

---

Referenzstämme der zu dem Zeitpunkt der Untersuchungen als valide Spezies beschriebenen und verfügbaren aviären Mykoplasmen serologisch untersucht, da diese potentiell im gleichen Habitat vorkommen können. Unspezifische serologische Reaktionen mit diesen Spezies könnten somit möglicherweise zur Fehlidentifizierung bzw. Fehldiagnosen führen. Das Isolat ST57 reagierte im IBA schwach positiv mit Antiserum gegen *M. sturni*, jedoch mit keinem der weiteren untersuchten Antiseren (siehe Tabelle 28). Serologische Untersuchungen ermöglichen im Gegensatz zu molekularbiologischen Untersuchungen eine Differenzierung der Mykoplasmen aufgrund struktureller Membranproteine (POVEDA 1998). Unspezifische Reaktionen werden jedoch häufig beschrieben und treten sowohl bei nah als auch entfernt verwandten Spezies regelmäßig auf (BEN ABDELMOUMEN und ROY 1995). Als alleiniges Diagnostikum zur sicheren Differenzierung von Spezies sind sie daher wenig geeignet. Besonders bei der Untersuchung von Mykoplasmen bei Wildvögeln finden sich regelmäßig unbekannte Mykoplasmenspezies, deren Kreuzreaktivitäten mit Antiseren beschriebener Spezies unbekannt sind (ROSENGARTEN und YOGEV 1996). Neben richtig positiven Reaktionen besteht daher immer ein Risiko der Fehltypisierung durch kreuzreagierende Antigene. Bei positiven Reaktionen müssen reziproke Tests (Hyperimmunserum der fraglichen Spezies mit Referenzstamm der Spezies, deren Hyperimmunserum positiv reagiert) durchgeführt werden. Ist dieser Test negativ, wird die Reaktion als unspezifische Kreuzreaktion eingestuft (BROWN et al. 2007). Die reziproken Tests (*M. ciconiae* sp. nov. Hyperimmunserum und *M. sturni*-Referenzstamm) lieferten ein negatives Ergebnis, weshalb es sich sehr wahrscheinlich um eine unspezifische Kreuzreaktion handelt. Auch die niedrige 16S-rRNA-Gensequenz-homologie von 92,3% zwischen beiden Stämmen untermauert die Vermutung, dass es sich um Vertreter zweier separater Spezies handelt. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Kaninchen-Hyperimmunseren gegen das Isolat ST57 reagierten in den durchgeführten Untersuchungen deutlich mit dem Isolat ST57 selbst, hingegen nicht mit den Referenzstämmen der 23 anderen untersuchten Mykoplasmenspezies (siehe Tabelle 28).

Eine nicht unerhebliche Fehlerquelle falschpositiver Reaktionen bildete auch das Testsystem selbst. In dieser Arbeit wurde der IBA als einfaches und schnelles Verfahren verwendet. Für diese Methode wird mit 0,3 µl Kaninchen-Hyperimmunserum pro Probe (300 µl Endvolumen, Verdünnung 1:10<sup>3</sup>) im Gegensatz zu anderen Methoden nur wenig Material benötigt. Eine Volumenreduktion auf 0,2 µl Antiserum (200 µl Endvolumen) pro



Probe führte zu einer mangelnden Benetzung des Zentrums der Nitrozellulosemembranen und damit zu Trocknungsartefakten. Fehlerquellen bei diesem Test waren zudem die Wahl der PBS-Lösung. Ein Magnesiumzusatz führte zu Fällung des in der Substratlösung enthaltenen Chlornaphthols und Bildung von dunkelblauen Präzipitaten auf den Nitrocellulosemembranen. Auch eine Porenweite der Nitrozellulose-Membran unter 0,45 µm führte zu einer mangelnden Adsoption der Kolonien.

Eine organisatorische Herausforderung für serologische Untersuchungen bei Mykoplasmen ist die eingeschränkte Verfügbarkeit notwendiger Kaninchen-Hyperimmunseren, die gegen die entsprechenden Referenzstämme gerichtet sind. Diese waren zu Beginn dieser Arbeit nicht erhältlich. Seit 2014 können wieder einzelne Antiseren aus dem bestehenden Restbestand über die Stammsammlung „The Mollicutes Collection“ (TMC) der IOM (Standort: University of Florida, USA) bezogen werden. Aufgrund von EU-Einfuhrbeschränkungen für tierische Produkte ist eine Einfuhr aus den USA problematisch. Die vorhandenen Antiseren wurden außerdem häufig ausschließlich zum Zeitpunkt der Beschreibung der Spezies hergestellt. Einzelne Kaninchen-Hyperimmunseren sind damit bis zu 65 Jahre alt (siehe Tabelle 2) und insgesamt von variabler Qualität. Aktuell werden, trotz formeller Vorschriften zur Beschreibung neuer Spezies, von keiner Stammsammlung neue Kaninchen-Hyperimmunseren entgegenommen oder hergestellt (D. BROWN, persönliche Mitteilung). Dadurch stehen Kaninchen-Hyperimmunseren zurzeit für serologische Untersuchungen nicht oder nur sehr eingeschränkt zur Verfügung, welches die Bedeutung serologischer Untersuchung bei nicht-geflügelpathogenen Mykoplasmenspezies wahrscheinlich weiter reduzieren wird.

### **5.2.1 Zusätzliche phänotypische Untersuchungen**

Neben genotypischen und phänotypisch-serologischen Untersuchungen bilden weitere phänotypische Untersuchungen einen essentiellen Bestandteil der Speziesbeschreibung bei Mollicutes und wurden daher auch im Rahmen der Beschreibung von *M. ciconiae* sp. nov. durchgeführt (BROWN et al. 2007). Einzelne phänotypische Untersuchungen fanden zusätzlich mit dem Isolat ST101 statt. Mollicutes sind, im Gegensatz zu zellwandbildenden Bakterien, durch Ultrafilter mit Porendurchmessern von 0,45 µm filtrierbar. Diese Eigenschaft traf auch auf den Typstamm ST 57<sup>T</sup> von *M. ciconiae* sp.

nov. (abgekürzt ST57) zu. Im Gegensatz zu dem Isolat ST101 war ST57 jedoch nicht durch Filter einer Porengröße von 0,22 µm filtrierbar. Im Gegensatz zur Literatur, wo nur minimale Reduktionen der Konzentration durch Filtration (max. log 2 bis log 4) beschrieben werden (TULLY 1983), zeigte sich bei ST57 mit log 6 ein wesentlich stärkerer Konzentrationsabfall. In der Literatur werden auch Aggregatbildungen von *Mycoplasma* spp. in Flüssigmedium beschrieben (TULLY 1983), welches eine mögliche Erklärung für die schlechte Filtrierbarkeit des Isolates ST57 ist.

Die Kolonien aller untersuchten Isolate von *M. ciconiae* sp. nov. stellten sich auf SP4-Agarmedium spiegeleiförmig dar, wobei das Zentrum eher undeutlich von der Peripherie abgegrenzt war. Diese spiegeleiförmige Koloniemorphologie ist typisch für *Mycoplasma* spp. (MASOVER und HAYFLICK 1985), kann jedoch abhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Mediums (MIYATA et al. 2000) und nach wiederholter Subkultivierung der Organismen variieren (BROWN et al. 2007). Während die Kolonien des Isolates ST57 in Medium mit reduzierten Inhaltsstoffen (Standard-Festmedium nach POVEDA) insgesamt einen kleineren Durchmesser hatten (Anm: wurde in dieser Arbeit nicht ausgemessen), waren durch Subkultivierung keine morphologischen Veränderungen der Kolonien erkennbar. Die Zellen des Isolates ST57 waren lichtmikroskopisch polymorph und färbten sich in der Gramfärbung negativ (rot) an. Trotz fehlender Zellwand färben sich Mollicutes gramnegativ an, können jedoch anhand ihrer polymorphen Form gut von zellwandbildenden Bakterien und Hefen unterschieden werden, die aufgrund ihrer festen Zellwand gut definierte Formen beibehalten. Aufgrund der Zerstörung der Zellen muss bei Mollicutes der Schritt der Hitze-fixierung, welcher häufig in Protokollen für zellwandbildende Bakterien vorkommt, durch eine Methanolfixierung ersetzt werden (BARILE 1983). Eine genauere Betrachtung der Zellmorphologie des Isolates ST57 erfolgte elektronenmikroskopisch mittels Negativkontrastierung. Dabei stellten sich die Zellen ebenfalls polymorph dar. Auffällig waren bei einigen Zellen kopfähnliche Ausstülpungen der Zellmembran. Ähnliche Strukturen wurden bislang bei den motilen Spezies *M. mobile* (MIYATA et al. 2000), *M. pneumoniae* (KRAUSE 1998) und *M. gallisepticum* (KOROLEV et al. 1994) beschrieben. Diese Strukturen sind an der Zelladhäsion und einem komplexen Mechanismus beteiligt, der eine gleitende Motilität ermöglicht. Es ist jedoch umstritten, ob alle motilen Mykoplasmaspezies ähnliche Mechanismen verwenden, da es eine deutliche Variabilität bei den Strukturproteinen gibt (MIYATA 2010). Bei den beobachteten Ausstülpungen der Zellmembran handelt es sich

hingegen wahrscheinlich eher um Artefakte durch Zelllyse infolge der Fixation oder Scherkräften oder Trocknungsartefakte (COLE 1983).

Neben der Morphologie haben Spezies des Genus *Mycoplasma* bestimmte Wachstumseigenschaften, die eine gezielte Zuordnung ermöglichen. *M. ciconiae* sp. nov. ST 57<sup>T</sup> zeigte ein cholesterinabhängiges Wachstum, welches im Digitonin-Test anhand einer deutlichen Wachstumshemmung nachgewiesen wurde. Digitonin führt zu einer Fällung von Cholesterin und somit indirekt zu einer Wachstumshemmung von *Mycoplasma* spp., da dieses nicht mehr zur Zellwandsynthese zur Verfügung steht (FREUNDT et al. 1973). Anhand dieses Tests werden die Genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Spiroplasma* und *Anaeroplasma* von den nicht cholesterinabhängigen Mollicutes der Genera *Mesoplasma*, *Acholeplasma* und *Asteroleplasma* differenziert. Abgegrenzt werden konnte *M. ciconiae* sp. nov. auch zum Genus *Ureaplasma*, da es keinen Harnstoff (Urea) hydrolysierte (POVEDA 1998). Neben genetischen Unterschieden war *M. ciconiae* sp. nov. u.a. aufgrund des aeroben Wachstums von den strikt anaeroben Anaeroplasmen, anhand der Morphologie von den Spiroplasmen (MIYATA et al. 2000) (Abbildung 17) und aufgrund der Unterschiede in der optimalen Wachstumstemperatur von den Entomoplasmen abgrenzbar (Tabelle 1).

Zur Energiegewinnung oxidiert und fermentiert *M. ciconiae* sp. nov. Glucose, welches anhand des Typstamms ST 57<sup>T</sup> nachgewiesen wurde. Diese Eigenschaft unterscheidet *M. ciconiae* sp. nov. von allen anderen Mykoplasmenspezies, die bislang bei Weißstörchen isoliert wurden. Das Isolat ST101, Vertreter der „*M. spumans*-ähnlichen Gruppe“, hydrolysierte Arginin, bei der „*M. gypis*-ähnlichen“ Gruppe wurden keine biochemischen Tests durchgeführt. Bei letzterer Gruppe kann die Hydrolyse von Arginin jedoch aufgrund der rotvioletten Färbung des SP4-Mediums bei Wachstum der Reinkulturen angenommen werden. Im SP4-Medium entsteht bei der Hydrolyse von Arginin das alkalische Ammonium, welches zur Erhöhung des pH-Wertes und einer rotvioletten Färbung durch den darin enthaltenen Indikator Phenolrot führt. Wird hingegen Glucose oxidiert, entstehen Säuren, die zu einer Senkung des pH-Wertes führen und eine Gelbfärbung hervorrufen (ALUOTTO 1970). Da das Medium neben diesen beiden Komponenten zahlreiche weitere Stoffe enthält, ist ein sicherer Nachweis der pH-Änderung nur in speziellen Testmedien möglich (POVEDA 1998). Weitere biochemische Tests, die durchgeführt werden können, sind Phosphatase Aktivität, „Film and Spots“-Bildung, Reduk-

tion von Tetrazolium, Verflüssigung von koaguliertem Serum, Hämagglutination, Hämadsorption und Hämolyse bei Erythrozyten verschiedener Tierarten, Hydrolyse von Äskulin und Arbutin sowie die Hydrolyse von Casein (RAZIN et al. 1983; POVEDA 1998). Da die Ergebnisse dieser Untersuchungen bei vielen Mykoplasmenspezies nicht bekannt sind sowie Aufwand und Kosten der Durchführung dieser Tests gegenüber der molekularbiologischen Identifizierung in keinem Verhältnis zum Nutzen stehen, beschränkten sich die biochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit auf die drei wichtigsten Tests: Glucose, Arginin und Urea.

Für Untersuchung des Temperaturoptimums wurde die Methode nach KONAI et al. (1996) eingesetzt, wobei „Medium azifizierende bzw. alkalisierende Einheiten“ bestimmt wurden. Als alternative Methode wäre eine KbE-Zählung infrage gekommen. Zu jedem Untersuchungszeitraum bei jeder Temperatur müssten hier die Röhrchen der Flüssigkulturen aus den Brut- bzw. Kühlschränken entnommen, geöffnet und ein Aliquot auf Agarmedium subkultiviert werden. Aufgrund des hohen Kontaminationsrisikos durch eine wiederholte Öffnung der Röhrchen sowie die Verfälschung der Verdopplungszeiten aufgrund von Temperaturschwankungen durch Entnahme der Kulturen aus der zu untersuchenden Temperatur wurde diese Methode nicht gewählt. Bei der verwendeten Methode nach KONAI et al. (1996) bleiben aufgrund der optischen Beurteilung des Farbumschlages von außen die Röhrchen geschlossen und die Inkubation erfolgt bei gleichbleibender Temperatur. Der Temperaturbereich, bei denen der Typstamm ST 57<sup>T</sup> von *M. ciconiae* sp. nov. und das Isolat ST101 *in vitro* kultivierbar waren, lag zwischen 23°C und 44°C. Das Temperaturoptimum lag bei dem Isolat ST57 bei 37°C, bei ST 101 hingegen mit 44°C deutlich höher. Die meisten Mykoplasmenarten wachsen bei 37°C *in vitro* zuverlässig, da sie an homoiotherme Vertebraten angepasst sind (TULLY et al. 1993). Die Kultivierung aviärer Mykoplasmen erfolgt daher routinemäßig mikroaerob bei 37°C (BRADBURY 1998). Während das optimale Wachstum von ST57 im erwarteten Temperaturbereich lag, ist das hohe Temperaturoptimum des Isolates ST101 ungewöhnlich. Es wäre ratsam diese Messung mit weiteren Isolaten derselben Spezies zu wiederholen, um dieses Ergebnis zu bestätigen bzw. zu widerlegen (SUÁREZ-PÉREZ et al. 2012). Eine Anpassung an bestimmte Umgebungsbedingungen, beispielsweise hohe Temperaturen, kann Mikroorganismen Selektionsvorteile bieten. Die normale Körpertemperatur bei Störchen in Ruhe und bei niedriger Aktivität liegt zwischen 39°C und 41°C. Bei hoher Aktivität kann diese bis über 44°C ansteigen (PRINZINGER et al.

## DISKUSSION

---

1991). Da die Trachea bzw. Respirationstrakt in Kontakt zur Umgebungsluft stehen und an der Thermoregulation beteiligt sind (Scheid 1983), werden hier Temperaturen von 44°C wahrscheinlich nicht erreicht. Beide Isolate zeigten ein Wachstum bei 44°C, womit diese an die Körperinnentemperatur von Weißstörchen angepasst zu sein scheinen. Zur Bedeutung des Temperaturoptimums von 44°C bei dem Isolat ST101 kann bislang nur spekuliert werden. Möglicherweise hat das Temperaturoptimum Einfluss auf die Pathogenität dieser Mykoplasmen, die neben gesunden auch aus geschwächt aufgefundenen Weißstörchen isoliert wurden (SUÁREZ-PÉREZ 2011).

## 5.3 Prävalenzstudie

### 5.3.1 Etablierung einer speziesspezifischen PCR für das Isolat ST57, Typstamm von *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. (ST57-PCR)

Ziele der Entwicklung der speziesspezifischen PCR waren eine hohe Sensitivität und Spezifität. Entwickelt wurde die PCR anhand des Isolates ST 57<sup>T</sup>, welches der Typstamm der neu beschriebenen Spezies *M. ciconiae* sp. nov. ist. Für eine hohe Spezifität ist zunächst die Auswahl der Oligonukleotide (Primer) von Bedeutung. Ein spezifisches Primerpaar für die ST57-PCR fand sich in der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS). Als Zielsequenzen kommen bei Mykoplasmen hauptsächlich die Sequenzen des 16S-rRNA-Gens, der ITS und des RNA-Polymerase-Beta-Subunit (*rpoB*)-Gens infrage, da diese Sequenzen neben hochkonservierten Regionen auch Regionen mit niedrigeren Homologien bei nah verwandten Mykoplasmen spezieis enthalten. Zudem sind diese Sequenzen von allen bislang beschriebenen Mykoplasmen unter anderem über die Nukleotiddatenbank GenBank<sup>2</sup> (NCBI, USA) öffentlich zugänglich (RAMÍREZ et al. 2008; VOLOKHOV et al. 2012). Aufgrund der hohen Homologien der Mykoplasmen spezieis des Synoviae-Clusters untereinander fand sich in der 16S-rRNA-Gensequenz kein spezifisches Primerpaar für die ST57-PCR. Die Sequenz der ITS weist im Vergleich zum 16S-rRNA-Gen eine geringere Homologie zwischen den verschiedenen Mykoplasmen spezieis auf (RAMÍREZ et al. 2008). Neben einer möglichst spezifischen Sequenz sollten Primerpaare für die optimale PCR eine Länge von jeweils 18-30 Basen, bei einem Anteil von 40-60% Guanidin und Cytosin (G+C), aufweisen. Es sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander folgen, da dies häufiger zu Fehlhybridisierungen führt (MÜLHARDT 2009). Zudem sollten Primer möglichst wenig Ähnlichkeiten an ihren 3'-Enden aufweisen, da dies zu Reaktionen der Primer miteinander, sogenannten Primerdimeren, führt. Primer sollten weiter keine internen Sekundärstrukturen enthalten, beispielsweise Haarnadelstrukturen (Hairpins), da diese ebenfalls die Hybridisierung reduzieren können (MÜLHARDT 2009). Das Vorliegen von Sekundärstrukturen und Primerdimeren wurde bei den Primern, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zunächst mithilfe des Programmes PrimerSelect berechnet und sodann Primer ohne Dimere sowie möglichst wenigen (0-1) Hairpin ausgewählt. Die Primer für die ST57-PCR lagen mit

---

<sup>2</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

einer Länge von 21 bzw. 20 bp im Optimalbereich, mit einen G+C-Gehalt von 33% bzw. 25% hingegen unter den empfohlenen Gehalten von 40-60%. Die Temperatur für die Anlagerung (Annealingtemperatur) der ST57-PCR war mit 50°C im Vergleich zu der anderer speziesspezifischer Mykoplasmen-PCR (53°C-62°C) eher niedrig (RAMÍREZ et al. 2006; HAGEN 2007; RAVIV et al. 2007). Allgemein sollte die Annealingtemperatur möglichst hoch gewählt werden, um durch Instabilisierung falsch hybridisierter Primer eine hohe Spezifität zu erreichen. Die Spezifität der ST57-PCR wurde experimentell anhand der DNA der Typstämme verschiedener Spezies der Klasse Mollicutes sowie zellwandbildender Bakterien ermittelt. Dabei zeigte sich eine hohe Spezifität, da keine dieser Spezies zu einem Amplikon führte. Zusätzlich wurde die Spezifität durch die Sequenzierung einer Stichprobe von Amplikons aus der Prävalenzstudie bestätigt. Dabei stimmten die Sequenzen der Amplikons zu 100% mit der Sequenz von ST57 überein, welches ein sehr gutes Ergebnis darstellt. Mit der Wahl einer höheren Annealingtemperatur sinkt im Gegenzug auch die Wahrscheinlichkeit der Anlagerung und somit auch die Ausbeute an Amplikons (MÜLHARDT 2009). Bei schlechterer Anlagerung steht im folgenden Reaktionszyklus weniger Template-DNA für eine Anlagerung zur Verfügung, welches durch eine geringere Zahl von Amplikons wiederum zu einer niedrigeren Sensitivität führt (MÜLHARDT 2009). Da die ST57-PCR mit der ermittelten Annealingtemperatur spezifisch war und damit der Kompromiss einer niedrigeren Sensitivität nicht notwendig war, wurden keine weiteren Versuche mit dem Ziel einer Erhöhung der Annealingtemperatur durchgeführt.

Nach Auswahl des Primerpaares wurde auf Basis des HotStarTaq-DNA-Polymerase-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben ein PCR-Protokoll konzipiert und experimentell optimiert. Für die ST57-PCR wurde aufgrund der einfachen Handhabung die HotStarTaq-DNA-Polymerase verwendet. Taq-Polymerasen haben eine Fehlerrate von  $1/10^5$ , während Polymerasen mit Korrekturlesefunktion (Proofreading) eine 10fach niedrigere Fehlerrate aufweisen (CLINE et al. 1996). Aufgrund des mit einer Länge von 203 bp sehr kurzen Amplikons war diese Fehlerrate akzeptabel. Polymerasen mit Korrekturlesefunktion wurden in dieser Arbeit hingegen bei allen PCR verwendet, auf deren Basis phylogenetische Aussagen getroffen werden sollten. Die Syntheserate der DNA-Taq-Polymerase betrug nach Herstellerangaben 1 kb/min. In dem Protokoll wurde somit eine Elongationszeit von 30 Sekunden verwendet, in der die Polymerase das Amplikon von 203 bp zuverlässig synthetisierte. Wichtig für die Sensitivität und Spezifität der PCR

sind, neben der einzelnen Schritte von Schmelzen (Melting), Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation), auch die Anzahl der Zyklen. Niedrige Zyklenzahlen führen allgemein zu einer geringen Ausbeute und somit zu einer niedrigen Sensitivität. Bei zu vielen Zyklen kann es aufgrund vermehrter Fehlamplifikationen zur Bildung unspezifischer Amplifikate kommen, die als Hintergrundbanden im Agarosegel erkennbar sind (MÜLHARDT 2009). Die ST57-PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt, wobei keine unspezifischen Banden entstanden. Diese Anzahl von Zyklen ist auch bei anderen speziesspezifischen Mykoplasmen-PCR gebräuchlich (HAGEN 2007), andere Autoren verwenden 30 Zyklen (RAMÍREZ et al. 2006; RAVIV et al. 2007).

Die Sensitivität wurde mit jeweils einer DNA- und KbE-Verdünnungsreihe ermittelt und lag bei 3 pg DNA bzw. 3 KbE/Reaktionsansatz. Eine Verbesserung der Sensitivität könnte unter anderem durch eine Veränderung der Länge oder des GC-Gehaltes der Primer erreicht werden, wenn diese zu einer besseren Hybridisierung an DNA-Einzelstränge führt. Dies führt zu einer besseren Amplifikation und somit Ausbeute an Amplikons, die wiederum im nächsten Zyklus zur Verfügung stehen. Eine höhere Sensitivität kann im Gegenzug jedoch auch zu einer niedrigeren Spezifität der Primer führen (MÜLHARDT 2009). Auch eine Erhöhung der Zyklenzahl könnte zu einer Verbesserung der Sensitivität führen. Eine höhere Zyklenzahl als 35 wird aufgrund des Risikos vermehrter Fehlamplifikationen und damit unspezifischer Amplifikate nicht eingesetzt (MÜLHARDT 2009).

In anderen Arbeiten, bei denen speziesspezifische PCR für die Detektion aviärer Mykoplasmen etabliert wurden, gaben die Autoren Sensitivitäten von 100 pg DNA (ZHAO et al. 1993), 1,15-1,55 pg DNA (RAMÍREZ et al. 2006) sowie 50 fg-10 pg DNA bzw. 0,05-10 KbE/Reaktionsansatz (HAGEN 2007) an. RAMÍREZ et al. (2006) konnten MS mit der speziesspezifischen MS-PCR aus Feldproben ohne vorherige Kultivierung gewinnen. Ebenfalls ohne vorherige Kultivierung waren mittels genusspezifischer PCR nach VAN KUPPEVELD et al. (1992), modifiziert nach HAGEN (2007), aus 99,1% (107/108) der Trachealtupferproben klinisch unauffälliger Weißstorchnestlinge Mykoplasmen nachweisbar (HAGEN et al. 2004). Da die Sensitivität beider PCR mit 1 pg DNA der Sensitivität der ST57-PCR (3 pg DNA) sehr ähnlich ist, eignet sich die ST57-PCR sehr wahrscheinlich ebenfalls für die direkte Untersuchung von Trachealtupferproben.



### 5.3.2 Bedeutung von *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. für Weißstörche

Über das Vorkommen und die Bedeutung von Mykoplasmen bei Weißstörchen in Deutschland liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. In einer Studie im Frühsommer 2003 wurden von 106 Weißstorchnestlingen jeweils zwei Trachealtupfer entnommen und mittels genusspezifischer PCR und Kultivierung in SP4-Medium auf das Vorkommen von Mykoplasmen untersucht. Bei zwei Nestlingen wurde nur ein Trachealtupfer entnommen und dieser mittels genusspezifischer PCR untersucht (HAGEN et al. 2004). In dieser Studie gelang bei 99,1% der untersuchten Individuen (107/108) der Nachweis von Mykoplasmen mittels genusspezifischer PCR. Der Trachealtupfer eines Nestlings (0,9%) war PCR-negativ. Bei der Kultivierung des zweiten Trachealtupfers dieses Nestlings fanden sich jedoch Mykoplasmen-verdächtige Kolonien auf der Agarplatte. In der Kultur gelang bei insgesamt 78,3% (83/106) der untersuchten Proben der Nachweis von Mykoplasmen. Insgesamt 19,8% (21/106) waren mit anderen Mikroorganismen (Bakterien, Schimmelpilze) kontaminiert und bei zwei Proben waren keine Mykoplasmen kultivierbar (HAGEN et al. 2004). Nach Ausschluss geflügelpathogener Mykoplasmen mittels speziesspezifischer MG-, MS-, MM- und MI-PCR wurde keine weitere Differenzierung der Isolate durchgeführt. Vorarbeiten zu dieser Studie identifizierten zwei Isolate, ST57 und ST101, als Vertreter möglicher neuer Mykoplasmenpezies. In Spanien wurden im Rahmen einer anderen Studie in 100% (6/6) der geschwächt aufgefundenen Weißstörche Mykoplasmen isoliert. Diese Isolate konnten ebenfalls keiner bekannten Spezies zugeordnet werden (SUÁREZ-PÉREZ 2011).

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine Prävalenzstudie. Mittels dieses Studientyps lassen sich die aktuelle Häufigkeit von Erkrankungen und Risikofaktoren unabhängig vom Zeitpunkt des Eintritts evaluieren (KREIENBROCK et al. 2012). Dieser Studientyp dient der Dokumentation des Ist-Zustandes sowie der Hypothesengewinnung, z.B. zu Infektionswegen und Risikofaktoren. Um anhand epidemiologischer Daten kausale Zusammenhänge von Risikofaktoren besser beurteilen zu können, müssten z.B. Fall-Kontroll-Studien durchgeführt werden, bei denen jeweils kranke und gesunde Tiere bzw. exponierte und nicht exponierte Fälle entgegengestellt werden (KREIENBROCK et al. 2012).

In der vorliegenden Studie war *M. ciconiae* sp. nov. (Typstamm: ST 57) mittels spezies-spezifischer PCR in 49 von 83 Kulturen und einer DNA-Probe (84 Proben) klinisch unauffälliger Weißstorchnestlinge (58,3%) nachweisbar. Da fast ausschließlich Proben in diese Studie gingen, in denen kontaminationsfrei Mykoplasmen kultiviert wurden, bezieht sich diese Nachweisrate nur indirekt auf die Gesamtheit der von HAGEN et al. (2004) beprobten 106 bzw. 108 Nestlinge. Mittels PCR waren jedoch der Studie Mykoplasmen bei fast allen (107/108) Nestlingen nachweisbar (HAGEN et al. 2004).

Die Nachweisrate von 58,3% *M. ciconiae* sp. nov. aus 83 *Mycoplasma*-positiven Kulturen und einer DNA-Probe stellt damit wahrscheinlich auch in Bezug auf die Gesamtheit beprobter Nestlinge eine realistische Schätzung dar. Unterstützt wird diese These dadurch, dass aus der einzigen vorliegenden DNA-Probe, die von einem Nestling stammte dessen Mykoplasmenkultur kontaminiert war, *M. ciconiae* sp. nov. mittels speziesspezifischer PCR nachgewiesen wurde. Da Kontaminationen von Kulturen zufällig erfolgen, handelte es sich folglich bei den untersuchten 83 Kulturen um eine zufällige Selektion aus den ursprünglich 106 Kulturen. Dennoch beziehen sich alle Berechnungen in dieser Arbeit ausschließlich auf die 83 Kulturen und 1 DNA-Probe, die zur Verfügung standen und untersucht wurden. Um die Genauigkeit des Prävalenzschätzers zu überprüfen, wurde das 95%-Konfidenzintervall berechnet, welches zwischen 47,1% und 69% lag. Somit wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% von dem Intervall 47,1% bis 69% die wahre Prävalenz von *M. ciconiae* sp. nov. bei Weißstorchnestlingen überdeckt. Bei der hohen Nachweisrate von *M. ciconiae* sp. nov. in klinisch unauffälligen Weißstorchnestlingen ist eine obligate Pathogenität mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Bei *M. ciconiae* sp. nov. handelt es sich somit um eine apathogene oder fakultativ pathogene Spezies. Ähnliche Nachweisraten wie die von *M. ciconiae* sp. nov. bei Weißstorchnestlingen finden sich in der Literatur bei verschiedenen Vogelarten. Bei 35-66% der Tauben fanden sich die, als kommensal eingeschätzten, Mykoplasmenpezies *M. columborale*, *M. columbinasale* und *M. columbinum* (SHIMIZU et al. 1978). In einer Studie an klinisch unauffälligen Wasservögeln war *M. glycyphilum* bei 68% der Wasserrallen und 60% der Kormorane nachweisbar (STENKAT et al. 2011). Eine Nachweisrate von 98% gab es zudem bei klinisch unauffälligen Pelikanen, wobei keine Speziesdifferenzierung durchgeführt wurde (ASSUNÇÃO et al. 2007). Bei Greifvögeln wurden die Spezies *M. falconis*, *M. buteonis* und *M. gypis* bei gesunden Wildvögeln sehr häufig nachgewiesen und daraus eine Apathogenität bzw. sogar eine kommensale Beziehung

zwischen Greifvögeln und diesen Mykoplasmenspezies hergeleitet (POVEDA et al. 1990b; LIERZ et al. 2000a; LIERZ et al. 2008b; LIERZ et al. 2008d). Die hohe Nachweisrate von *M. ciconiae* sp. nov. bei gesunden wildlebenden Weißstorchnestlingen deutet daher auf eine Apathogenität dieser Mykoplasmenspezies.

Unterstützt wird die These, dass es sich bei *M. ciconiae* sp. nov. um für Weißstörche apathogene Mykoplasmen handelt, auch dadurch, dass sich keine signifikanten Unterschiede in der Nachweishäufigkeit in Abhängigkeit von den zwei untersuchten Regionen fanden. Einschränkend ist hierbei zu berücksichtigen, dass es sich um eine regional begrenzte Beprobung in Gebieten mit ähnlicher Storchendichte handelte, welches zu einer Stichprobenverzerrung (Englisch: selection bias) geführt haben kann. Basierend auf Daten der Weißstorch-Bestandserfassung des NABU im Jahre 2003<sup>3</sup> gab es in Brandenburg 4,5, in Sachsen-Anhalt 2,6 und in Mecklenburg-Vorpommern 4,6 Horstpaare pro 100 m<sup>2</sup>. Für einige Bundesländer liegen diese Daten nicht vor, daher existiert auch kein Durchschnittswert für die Bundesrepublik Deutschland. Die niedrigsten Storchendichten gab es in Bayern mit 0,2 und Schleswig-Holstein mit 1,4 Horstpaaren pro 100 m<sup>2</sup>. Um Unterschiede besser herausarbeiten zu können, wären Fall-Kontrollstudien mit Vergleichen zwischen Gebieten mit einer sehr hohen bzw. niedrigen Populationsdichte sinnvoll. Ein weiterer Punkt ist der Kontakt der Weißstörche untereinander auf ihren Zügen in die Überwinterungsgebiete in Afrika. Die Zugrouten werden dabei in eine östliche und westliche Zugroute eingeteilt (ELLIOT 1992). Interessant im Hinblick auf mögliche Unterschiede wäre es daher auch, in Fall-Kontrollstudien Weißstörche aus diesen beiden Gruppen zu vergleichen.

In unserer Untersuchung fanden sich keine signifikanten Einflüsse der Faktoren „Anzahl Nestlinge pro Horst“ und „Alter der Nestlinge“ bis drei bzw. über drei Wochen auf die Nachweishäufigkeit von *M. ciconiae* sp. nov. Diese beiden Faktoren sind wichtig, da Weißstorchnestlinge bis zu einem Alter von etwa drei Wochen ihre Körpertemperatur nicht selbstständig regulieren können. Somit sind sie in diesem Zeitraum besonders empfindlich gegen Witterungseinflüsse (TORTOSA und CASTRO 2003). Kältestress könnte insbesondere bei Nestlingen unter drei Wochen bzw. in Horsten mit nur einem Nestling zu einer Immunsuppression führen. Eine höhere Nachweishäufigkeit bei diesen Tie-

---

<sup>3</sup> <http://bergenhusen.nabu.de/weissstorch/national/>

ren im Vergleich zu älteren Nestlingen würde folglich dafür sprechen, dass es sich um einen fakultativ pathogenen Erreger handelt. Da die Nachweishäufigkeit bei diesen empfindlicheren Tieren nicht höher war, deuten die Ergebnisse eher auf Apathogenität von *M. ciconiae* sp. nov. für Weißstorchnestlinge hin. Möglicherweise handelt es sich bei *M. ciconiae* sp. nov. sogar um einen kommensales Bakterium und Bestandteil der physiologischen Trachealmikrobiota von Weißstörchen, wie dies analog beispielsweise auch für verschiedene Mykoplasmenarten bei Greifvögeln (LIERZ et al. 2008b), Tauben (SHIMIZU et al. 1978) oder Hühnervögeln (FREUNDT 1955; BENČINA et al. 1987a) angenommen wird. Für die Interpretation der Daten ist jedoch nicht zu vernachlässigen, dass im Zeitraum der Probennahme (21.05.-04.07.2003) in Deutschland überdurchschnittlich viel Sonnenschein, hohe Temperaturen und deutlich zu wenig Niederschläge zu verzeichnen waren (DEUTSCHER WETTERDIENST 2003). Somit war auch diese Tiergruppe wahrscheinlich wenig Stress durch Kälte und Nässe ausgesetzt. Bei Vögeln mit geschwächtem Immunsystem durch Stress, Traumata oder Mangelernährung kann es zu einer Steigerung der Virulenz verschiedener Erreger mit einer stärkeren Replikation oder Invasion kommen (NUNOYA et al. 1995; BROWN et al. 2003). Bei Mykoplasmen sind zudem synergistische Effekte mit anderen, v. a. viralen, Erregern beschrieben (RANCK et al. 1970; MURAKAMI et al. 2002). Gegen eine fakultative Pathogenität von *M. ciconiae* sp. nov. spricht daher zusätzlich, dass diese Spezies aus der Trachea eines verletzt aufgefundenen Weißstorches in Hessen (siehe Anhang V.IV) isoliert werden konnte, dieser Vogel jedoch keine Mykoplasma-verdächtige Symptomatik zeigte.

Nestlinge können sich hauptsächlich direkt bzw. indirekt über die Elterntiere infizieren, da sie flugunfähig sind und somit wenig bis keinen Kontakt zu anderen Tieren haben. Eine mögliche Infektionsquelle stellen Beutetiere dar. Dieser Infektionsweg wurde bei Greifvögeln beschrieben (POVEDA et al. 1990a). Zum Futterspektrum von Weißstörchen gehören mit Insekten, Fischen, Amphibien, Reptilien und Kleinsäugetieren (TRYJANOWSKI und KUŹNIAK 2002) zahlreiche Spezies, die Träger von Mykoplasmen sind. Als Kulturfolger haben Weißstörche zudem Kontakt zu Geflügelhaltungen, Menschen sowie Haus- und Nutztieren. Sporadische, lokalisierte, Nachweise von Mykoplasmen ließen sich durch Infektionen über Futter oder Kontakttiere erklären. Aufgrund der hohen Nachweisraten in den untersuchten Nestlingen aus verschiedenen Regionen sind Futtertiere als Überträger von *M. ciconiae* sp. nov. wahrscheinlich unbedeutend. Da Nestlinge außer zu den Nestgeschwistern fast ausschließlich Kontakt zu den Eltern-

tieren haben, ist eine Übertragung von *M. ciconiae* sp. nov. über die Elterntiere wahrscheinlich. Dabei kommt sowohl eine prä- oder peripartale Übertragung über das Brutei als auch eine postpartale Übertragung durch direkten und indirekten Kontakt, beispielsweise bei der Fütterung, infrage. Die Infektion von Nestlingen über fütternde Elterntiere wurde in einer Studie bei Rötelfalken belegt. Während bei elternaufgezogenen Nestlingen regelmäßig Mykoplasmen nachweisbar waren, fanden sich keine Mykoplasmen bei handaufgezogenen Nestlingen. Da bei den handaufgezogenen Nestlinge keine Mykoplasmen nachweisbar waren, wurde eine vertikale Übertragung auf die Nestlinge als unwahrscheinlich erachtet (LIERZ et al. 2008f). Sehr niedrige Nachweisraten in Eiern zeigten, dass auch bei anderen Greifvögeln die prä- und peripartale Übertragung kommensalisch lebender Mykoplasmen wahrscheinlich eine untergeordnete Bedeutung spielt (LIERZ et al. 2007b). Aufgrund der hohen Nachweisrate bei den Weißstorchnestlingen kann spekuliert werden, dass *M. ciconiae* sp. nov. vermutlich nicht prä- oder peripartal auf die Küken übertragen wird. Insbesondere, da bei prä- oder peripartaler Übertragung nur wenige Eier positiv sind (LIERZ et al. 2007b).

### 5.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der phänotypischen, genotypischen und serologischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei dem Isolat ST57 um einen Vertreter einer bisher nicht beschriebenen Mykoplasmenspezies handelt. Diese Spezies wurde valide unter dem Namen *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. mit dem Typstamm ST 57<sup>T</sup> beschrieben (MÖLLER PALAU-RIBES et al. 2016). Anhand der in dieser Arbeit etablierten spezies-spezifischen PCR war die neue Spezies *M. ciconiae* sp. nov. (Typstamm ST 57<sup>T</sup>) bei 58,3% (49/84) der untersuchten Weißstornestlinge (*Ciconia ciconia*) nachweisbar. Es handelt sich bei *M. ciconiae* sp. nov. sehr wahrscheinlich um eine für Weißstörche apathogene Mykoplasmenspezies, die möglicherweise einen Bestandteil der Trachealmikrobiota darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem weitere Mykoplasmenisolate identifiziert, die keiner beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten. Ähnlich wie beim Greifvögeln scheinen auch bei Weißstörchen physiologischerweise verschiedene *Mycoplasma* spp. Schleimhäute des oberen Respirationstraktes zu besiedeln. Zur Evaluierung der klinischen Bedeutung einzelner Spezies bedarf es weiterer Untersuchungen. Während einige Mykoplasmenspezies bei Weißstörchen wahrscheinlich nicht von klinischer Bedeutung sind, könnten z. B. geflügelpathogene Mykoplasmen durchaus klinische Symptome hervorrufen. Werden Mykoplasmen bei einem kranken Weißstorch nachgewiesen, sollte in einem zweiten Schritt eine Speziesdifferenzierung durchgeführt werden. Der alleinige Nachweis von *Mycoplasma* spp. bei einem kranken Weißstorch lässt hingegen keinesfalls Rückschlüsse auf Mykoplasmen als Ursache der Erkrankung zu.

# 6 ZUSAMMENFASSUNG

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien der Klasse *Mollicutes*, die als bedeutende Krankheitserreger beim Geflügel hohe wirtschaftliche Verluste verursachen. Bei Weißstörchen (*Ciconia ciconia*) gibt es vereinzelt Nachweise von Mykoplasmen bei geschwächt aufgefundenen Individuen. Über die Verbreitung von Mykoplasmen in der klinisch gesunden Weißstorchpopulation ist hingegen wenig bekannt. Diese Kenntnisse werden jedoch benötigt, um die klinische Bedeutung von Mykoplasmen für Weißstörche sowie Weißstörche als Erregerreservoir für geflügelpathogene Mykoplasmen, einschätzen zu können. In Voruntersuchungen an klinisch gesunden, wildlebenden Weißstorchnestlingen in Deutschland wurde eine flächendeckende Verbreitung von Mykoplasmen innerhalb der Storchpopulation festgestellt (HAGEN et al. 2004). Eine Speziesdifferenzierung erfolgte nicht, dennoch wurden zwei Isolate (ST 57 und ST 101) identifiziert, die keiner bislang beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten.

Ziel der Untersuchung war, diese beiden Isolate weiter zu charakterisieren, wenn möglich als Vertreter neu entdeckter Spezies zu beschreiben, und deren Vorkommen und Bedeutung bei Weißstörchen anhand der vorliegenden Proben zu eruieren. Für diese Arbeit standen 83 Mykoplasmenkulturen und eine DNA-Probe aus der Studie von HAGEN et al. (2004) zur Verfügung. Mit ausgewählten Isolaten wurden genetische und phänotypische Untersuchungen durchgeführt. Als Basis der phylogenetischen Untersuchungen dienten die Sequenzen des 16S-rRNA-Gens sowie der 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass das Isolat ST 101 sehr nah mit *M. spumans* und weiteren Mykoplasmenspezies verwandt war, sodass eine Beschreibung als neue Spezies nicht möglich war. Die biochemischen Eigenschaften der Isolate ST 57 und ST 101 wurden anhand der Fermentation von Glucose sowie der Hydrolyse von Arginin und Harnstoff untersucht. Von beiden Isolaten wurde zudem Temperaturoptimum und -toleranz für das Wachstum bestimmt. Beide Isolate wurden durch Membranfilter mit Porendurchmessern von 800 nm, 450 nm und 220 nm filtriert, um durch Passage der Filter indirekt das Fehlen einer Zellwand nachzuweisen. Desweiteren wurde eine Gramfärbung durchgeführt, um ebenfalls die Zellen sichtbar zu machen. Weitere Untersuchungen dienten der Beschreibung einer neuen Mykoplasmenspezies und wurden daher ausschließlich mit dem Isolat ST 57 durchgeführt, darunter eine elektronenmikroskopische Untersuchung und ein Test zum

## ZUSAMMENFASSUNG

---

indirekten Nachweis der Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin (Digitonin-Test). Zusätzlich wurden spezifische Kaninchen-Hyperimmunseren gegen das Isolat ST 57 hergestellt und Immunobinding Assays mit Referenzstämmen und -antisera von nah verwandter Mykoplasmenspezies durchgeführt. Anhand des Typstammes ST 57<sup>T</sup> wurde somit die neue Spezies *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. beschrieben. Zur molekularbiologischen Identifizierung von *M. ciconiae* sp. nov. wurde eine speziesspezifische PCR entwickelt. Alle 83 Mykoplasmenkulturen und die DNA-Probe wurden mit dieser PCR untersucht, um die Prävalenz von *M. ciconiae* sp. nov. in Weißstorchnestlingen zu schätzen.

*M. ciconiae* sp. nov. (ci.coni'ae. L. gen. fem. n. *ciconiae* eines (Weiß-) Storches) ist pleomorph mit kokkoiden und flaschenartigen Formen mit einer terminalen Protrusion und durch Filter einer Porengröße von 450 nm filtrierbar. Auf SP4-Agarmedium bilden sich typische, spiegeleiförmige Kolonien mit undeutlich abgegrenzten Zentren. Die Spezies wächst bei 37°C unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen in SP4-Medium und Hayflick-Medium. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37°C, wobei bei Temperaturen von 23°C bis 42°C ein Wachstum *in vitro* gezeigt werden konnte. Das Wachstum dieser Spezies wird durch Digitonin gehemmt. Die Spezies verstoffwechselt Glucose, jedoch kein Arginin oder Urea und ist serologisch von nah verwandten Mykoplasmen abgrenzbar. Der Typstamm von *M. ciconiae* sp. nov. ist ST 57<sup>T</sup>. Dieser wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen sowie der American Type Culture Collection hinterlegt (DSMZ 25251, ATCC BAA-2401). Die Sequenzen des 16S-rRNA-Gens (KP264571) und der ITS (KP264577) wurden bei GenBank veröffentlicht. Vier zusätzliche Isolate von *M. ciconiae* sp. nov. wurden bei der DSMZ (DSMZ 29908-10, DSM 29054) hinterlegt und die Sequenzen des 16S-rRNA-Gens (KP26469, -70, -72, -73) und der ITS (KP26475-78) bei GenBank, sowie die vollständige Speziesbeschreibung im International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology veröffentlicht (MÖLLER PALAU-RIBES et al. 2016).

Bei den Sequenzanalysen fanden sich weitere Mykoplasmenisolate, die keiner der bislang beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten. Die Isolate wurden anhand der Sequenzen des 16S-rRNA-Gens und ITS zwei Gruppen zugeordnet, die beide zum Hominis-Cluster gehören. Anhand der nächsten verwandten Spezies wurden diese als „*M. gypis*-“ und „*M. spumans*-ähnliche“ Gruppe benannt. Analog zu Greifvögeln gehören



## ZUSAMMENFASSUNG

---

bei Weißstörchen Mykoplasmen möglicherweise zu einer komplexen Trachealmikrobiota.

Im Rahmen der Prävalenzstudie war *M. ciconiae* sp. nov. mittels spezies-spezifischer PCR bei 58,3% (49/84) der untersuchten 83 Kulturen und einer DNA-Probe nachweisbar. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen 47,1%-69%. In der Studie zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Nachweishäufigkeit zwischen geografischen Regionen, unterschiedlichen Anzahlen an Nestlingen pro Horst und unterschiedlich alten Nestlingen. Aufgrund der hohen Nachweisrate und Verteilung bei klinisch unauffälligen Weißstorchnestlingen, ist *M. ciconiae* sp. nov. vermutlich apathogen für Weißstörche. Während einige Spezies wie *M. ciconiae* sp. nov. klinisch ohne Bedeutung zu sein scheinen, könnten andere Spezies, z.B. geflügelpathogene Mykoplasmen, möglicherweise klinische Symptome bei Weißstörchen hervorrufen. Werden bei einem geschwächt oder verletzt aufgefundenen Weißstorch Mykoplasmen nachgewiesen, sollte daher eine Speziesdifferenzierung folgen. Da vermutlich apathogene Spezies in der Trachea gesunder Störche regelmäßig nachgewiesen werden, ist auch bei erkrankten Störchen die Detektion von Mykoplasmen ohne Speziesdifferenzierung nicht ausreichend, um diese als Krankheitsursache zu bewerten.

## 7 SUMMARY

### **Investigations on the occurrence and significance of mycoplasma in white storks (*Ciconia ciconia*, LINNAEUS, 1758) and description of a new species (*Mycoplasma ciconiae* sp. nov.)**

Mycoplasma are bacteria that lack a cell wall and belong to the class Mollicutes. As important pathogens some species cause significant economic loss to the poultry industry worldwide. Occasionally the occurrence of mycoplasma in debilitated or injured white storks (*Ciconia ciconia*) has been reported, but little is known about the occurrence of mycoplasma in the free-ranging white stork population. However this knowledge is essential to evaluate the clinical significance of mycoplasma for white storks, and white storks as possible reservoir for poultry pathogenic mycoplasma. In a previous study of clinically healthy free-ranging white stork nestlings in Germany mycoplasma were found to be widespread in the population (HAGEN et al. 2004). No species differentiation was performed, though two isolates (ST 57 and ST 101) were identified that could not be assigned to any previously described species.

The aim of our study was to further characterize these two isolates, if possible describe them as representatives of novel species, and evaluate their distribution and potential impact in white storks. From the study HAGEN et al. (2004) 83 mycoplasma cultures and one additional DNA sample were available. Genotypic and phenotypic studies were performed with selected isolates. Phylogenetic studies were based on the sequences of the 16S rRNA gene and the 16S-23S intergenic transcribed spacer region (ITS). The results of these studies demonstrated, that the isolate ST 101 was very closely related to *M. spumans* and some other species, which made a description as a representative of a novel species impossible. For biochemical characterization of the isolates ST 57 and ST 101 the fermentation of glucose, and the hydrolysis of arginine and urea were investigated. For both isolates optimal growth temperature and temperature range were determined. Both isolates were filtered through 800 nm, 450 nm and 220 nm membrane filters to indirectly prove the lack of a cell wall with a successful passage. Additionally a gram staining was performed to visualise the cells. Further studies served as a basis for the description of a novel species and were therefore only performed with the isolate ST 57. These included electron microscopy and the digitonine inhibition test, which indirectly proves the cholesterol requirement for growth. Furthermore, specific rabbit

## SUMMARY

---

hyperimmunesera directed against the isolate ST 57 were produced and immunobinding assays with reference strains and -antisera of closely related mycoplasma species were performed. Based on ST 57<sup>T</sup> as type strain we described the novel species *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. For the molecularbiological identification of *M. ciconiae* sp. nov. we developed a species-specific PCR. The PCR was performed using all 83 mycoplasma cultures and one DNA sample to estimate the prevalence of *M. ciconiae* sp. nov. in white stork nestlings.

*M. ciconiae* sp. nov. (ci.coni´ae. L. gen. fem. n. *ciconiae* of a (white) stork) shows a pleomorphic cell morphology; the cells lack a cell wall and range from coccoid to flask shaped forms. The organism is filterable through 450°nm membrane filters. Fried-egg-shaped colonies with a faintly delimited center grow on SP4 agar medium. This organism grows in SP4 and Hayflick media at microaerophilic and anaerobic conditions. Temperature range for growth is 23-44°C, with optimum growth at 37°C. The organism is inhibited by digitonin and acid is produced from glucose. Neither arginine nor urea are hydrolysed. *M. ciconiae* sp. nov. is serologically distinct from all closely related species of the genus *Mycoplasma*. The type strain is ST 57<sup>T</sup>. This strain was deposited at the German Type Culture Collection (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) and the American Type Culture Collection (DSM 25251<sup>T</sup>, ATCC BAA-2401<sup>T</sup>). Sequences from the 16S rRNA gene (KP264571) and the ITS (KP264577) were submitted to GenBank. Four further strains were assigned to this species, deposited at the DSMZ (DSM29908-10, DSM29054) and the 16S rRNA gene (KP26469, -70, -72, -73) and the ITS sequences (KP26475-78) were submitted to GenBank. The species description was published in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (MÖLLER PALAU-RIBES et al. 2016).

During the sequence analyses performed in the present study, further mycoplasma isolates were detected, which could not be identified as representatives of any previously described species. Based on the sequences of the 16S rRNA gene and the ITS, the isolates were assigned to two groups, which both belonged to the hominis cluster. According to the most closely related species, the groups were given the names “*M. gypis-like*” and “*M. spumans-like*”. Similar to birds of prey, white storks seem to have mycoplasma as part of their complex tracheal microbiota.

## SUMMARY

---

In the prevalence study 58,3% (49/84) of the 83 cultures and one DNA-sample were positive for *M. ciconiae* sp. nov. by species-specific PCR. The 95%-confidence interval was between 47,1% and 69%. No significant differences in prevalence were found between geographical regions, different numbers of nestlings per nest and different age of the nestlings. Based on the high percentage of positive samples and distribution in clinically healthy white stork nestlings we conclude that *M. ciconiae* sp. nov. is probably nonpathogenic or potentially facultatively pathogenic for white storks. While some mycoplasma species, like *M. ciconiae* sp. nov., seem not to be of clinical significance, other species, e.g. poultry pathogenic species, might induce clinical symptoms in white storks. If mycoplasma are found in a diseased or debilitated white stork, a species differentiation should be performed. As probably apathogenic mycoplasma species occur frequently in healthy individuals, the detection in diseased individuals is not sufficient to identify mycoplasma as cause of disease.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

ABDUL-WAHAB, O. M., ROSS, G. und BRADBURY, J. M. (1996). Pathogenicity and cytoadherence of *Mycoplasma imitans* in chicken and duck embryo tracheal organ cultures. *Infection and Immunity* **64(2)**: 563-568.

ACKERMANN, H. (2010). BiAS für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 9.08. Hochheim Darmstadt, Epsilon-Verlag.

AGUIRRE, J. I. und VERGARA, P. (2007). Younger, weaker white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings become the best breeders. *Evolutionary Ecology Research* **9**: 355-364.

ALCALÁ, L., ALONSO, C. A., SIMÓN, C., GONZÁLEZ-ESTEBAN, C., ORÓS, J., REZUSTA, A., ORTEGA, C. und TORRES, C. (2015). Wild Birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types. *Microbial Ecology*.

ALUOTTO, B. W., R. G.; WILLIAMS, C. O.; FABER, J. E. (1970). Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasma species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **20(1)**: 35-58.

AMIN, M. M. (1977). Avian Mycoplasmas: studies on isolation, infection and control. PhD Thesis, University of Liverpool.

AMIN, M. M. und JORDAN, F. T. W. (1978). Experimental infection of ducklings with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma anatis*. *Research in Veterinary Science* **25(1)**: 86-88.

ARMOUR, N. K., LAIBINIS, V. A., COLLETT, S. R. und FERGUSON-NOEL, N. (2013). The development and application of a *Mycoplasma gallisepticum* sequence database. *Avian Pathology* **42(5)**: 408-415

ASSUNÇÃO, P., DE PONTE MACHADO, M., DE LA FE, C., RAMÍREZ, A., ROSALES, R. S., ANTUNES, N. T., POVEDA, C. und POVEDA, J. B. (2007). Prevalence of pathogens in Great White Pelicans (*Pelecanus onocrotalus*) from the Western Cape, South Africa. *Journal of Applied Animal Research* **32**: 29-32.

BAKER, A. S., RUOFF, K. L. und MADOFF, S. (1998). Isolation of Mycoplasma species from a patient with seal finger. *Clinical Infectious Disease* **27(5)**: 1168-1170.

BAOS, R., JOVANI, R., FORERO, M. G., TELLA, J. L., GÓMEZ, G., JIMÉNEZ, B., GONZÁLEZ, M. J. und HIRALDO, F. (2006a). Relationships between t-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd and As concentrations in blood of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25(4)**: 1153-1159.

BAOS, R., JOVANI, R., PASTOR, N., TELLA, J. L., JIMÉNEZ, B., GÓMEZ, G., GONZÁLEZ, M. J. und HIRALDO, F. (2006b). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25(10)**: 2794-2803.

BARILE, M. F. (1983). Gram staining technique. In: Methods in Mycoplasmaology. Auflage, S. RAZIN und J. G. TULLY (Hrsg.). New York, Academic Press. Band 1: 39-41.

BEN ABDELMOUMEN, B. und ROY, R. (1995). Antigenic relatedness between seven avian mycoplasma species as revealed by western blot analysis. Avian Diseases **39(2)**: 250-262.

BENČINA, D., DORRER, D. und TADINA, T. (1987a). *Mycoplasma* species isolated from six avian species. Avian Pathology **16**: 653-664.

BENČINA, D., MRZEL, I., TADINA, T. und DORRER, D. (1987b). *Mycoplasma* species in chicken flocks with different management systems. Avian Pathology **16(4)**: 599-608.

BENČINA, D., TADINA, T. und DORRER, D. (1988a). Natural infection of geese with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and egg transmission of the mycoplasmas. Avian Pathology **17(4)**: 925-928.

BENČINA, D., TADINA, T. und DORRER, D. (1988b). Natural infection of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and Mycoplasma egg transmission. Avian Pathology **17(2)**: 441-449.

BENČINA, D., MRZEL, I., ZORMAN ROJS, O., BIDOVEC, A. und DOVČ, A. (2003). Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. The Veterinary Record **152**: 230-234.

BENSKIN, C. M. H., WILSON, K., JONES, K. und HARTLEY, I. R. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. Biological Reviews **84(3)**: 349-373.

BEZJIAN, M. und BEZJIAN, M. (2014). American kestrel (*Falco sparverius*) fledgling with severe bilateral periorbital swelling and infection with *Mycoplasma buteonis*, *Avibacterium (Pasteurella) gallinarum* and *Staphylococcus pasteuri*. Journal of Avian Medicine and Surgery **28(2)**: 127-131.

BOETTGER, C. M. und DOHMS, J. E. (2006). Separating *Mycoplasma gallisepticum* field strains from nonpathogenic avian mycoplasmas. Avian Diseases **50(4)**: 605-607.

BOUJON, P., HENZI, M., PENSEYRES, J. H. und BELLOY, L. (2005). Enterotoxaemia involving beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in a white stork (*Ciconia ciconia*). The Veterinary Record **156(23)**: 746-747.

BOZEMAN, L. H., KLEVEN, S. H. und DAVIS, R. B. (1984). Mycoplasma challenge studies in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and chickens. Avian Diseases **28(2)**: 426-434.

BRADBURY, J. M., FORREST, M. und WILLIAMS, A. (1983). *Mycoplasma lipofaciens*, a new species of avian origin. International Journal of Systematic Bacteriology **33(2)**: 329-335.

BRADBURY, J. M. und FORREST, M. (1984). *Mycoplasma cloacale*, a new species isolated from a turkey. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **34(4)**: 389-392.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

BRADBURY, J. M., VUILLAUME, A., DUPIELLET, J. P., FORREST, M., BIND, J. L. und GAILLARD-PERRIN, G. (1987). Isolation of *Mycoplasma cloacale* from a number of different avian hosts in great Britain and France. *Avian Pathology* **16(1)**: 183-186.

BRADBURY, J. M., JORDAN, F. T. W., SHIMIZU, T., STIPKOVITS, L. und VARGA, Z. (1988). *Mycoplasma anseris* sp. nov. found in geese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **38(1)**: 74-76.

BRADBURY, J. M. und KELLY, D. F. (1991). *Mycoplasma iowae* infection in broiler breeders. *Avian Pathology* **20(1)**: 67-78.

BRADBURY, J. M., ABDUL-WAHAB, O. M., YAVARI, C. A., DUPIELLET, J. P. und BOVÉ, J. M. (1993). *Mycoplasma imitans* sp. nov. is related to *Mycoplasma gallisepticum* and found in birds. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43(4)**: 721-728.

BRADBURY, J. M. (1998). Recovery of mycoplasmas from birds. In: *Mycoplasma Protocols*. Auflage, R. MILES und R. A. NICHOLAS (Hrsg.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 45-51.

BRADBURY, J. M., DARE, C., YAVARI, C. und FORRESTER, A. (2000). Evidence of *Mycoplasma gallisepticum* in British wild birds. 13th International Congress of the International Organisation for Mycoplasmaology. Fukuoka, Japan: 253.

BRADBURY, J. M., YAVARI, C. A. und DARE, C. M. (2001a). Detection of *Mycoplasma synoviae* in clinically normal pheasants. *The Veterinary Record* **148(3)**: 72-74.

BRADBURY, J. M., YAVARI, C. A. und DARE, C. M. (2001b). Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges. *Avian Pathology* **30(4)**: 391-396.

BRADBURY, J. M. (2005). Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in a simple guise. *British Poultry Science* **46(2)**: 125-136.

BRADBURY, J. M. und MORROW, C. J. (2008). Avian mycoplasmosis. In: *Poultry Diseases*. 6. Auflage, M. PATTISON, P. F. McMULLIN, J. M. BRADBURY und D. J. ALEXANDER (Hrsg.). Edinburgh, Saunders Elsevier: 220-234.

BRADBURY, J. M. und RAVIV, Z. (2013). *Mycoplasma iowae* infection. In: *Diseases of Poultry*. 13. Auflage, D. E. SWAYNE (Hrsg.). Ames, Iowa, Wiley-Blackwell: 907-910.

BROWN, D. R., FARLEY, J. M., ZACHER, L. A., CARLTON, J. M. R., CLIPPINGER, T. L., TULLY, J. G. und BROWN, M. B. (2001a). *Mycoplasma alligatoris* sp. nov., isolated from American alligators. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 419-424.

BROWN, D. R., WHITCOMB, R. F. und BRADBURY, J. M. (2007). Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57(11)**: 2703-2719.

BROWN, D. R., MAY, M., BRADBURY, J. M. und JOHANSSON, K.-E. (2011). Class I. Mollicutes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Auflage, N. R. KRIEG, J. T. STALEY, D. R. BROWN et al. (Hrsg.). New York, Springer. 4: 568-644.

BROWN, M. B., BROWN, D. R., KLEIN, P. A., MCLAUGHLIN, G. S., SCHUMACHER, I. M., JACOBSON, E. R., ADAMS, H. P. und TULLY, J. G. (2001b). *Mycoplasma agassizii* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) and the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**: 413-418.

BROWN, M. J. F., SCHMID-HEMPEL, R. und SCHMID-HEMPEL, P. (2003). Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory. Journal of Animal Ecology **72**: 994-1002.

BUNTZ, B., BRADBURY, J. M., VUILLAUME, A. und ROUSSELOT-PAILLET, D. (1986). Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from geese. Avian Pathology **15(3)**: 615-617.

CANDELA, M. G., BARBERÁ, G. G., SALLEN, A. und LEÓN, L. (2008). Microbiological survey for selected bacterial pathogens in European storm petrel (*Hydrobates pelagicus*, Linnaeus 1758) from Grosa Island (Murcia, Southeastern Spain). European Journal of Wildlife Research **54(2)**: 373-377.

CARPENTER, T. E., HOWITT, R., MCCAPES, R., YAMAMOTO, R. und RIEMANN, H. P. (1981). Formulating a control program against *Mycoplasma meleagridis* using economic decision analysis. Avian Diseases **25(2)**: 260-271.

CATANIA, S., GOBBO, F., BILATO, D., FINCATO, A., BATTANOLLI, G. und IOB, L. (2012). Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. The Veterinary Record **170(4)**: 107-108.

CATANIA, S., GOBBO, F., RODIO, S., FINCATO, A., QUALTIERI, K., SANTONE, C. und NICHOLAS, R. A. (2014). First isolation of *Mycoplasma iowae* in grey partridge flocks. Avian Diseases **58(2)**: 323-325.

CATANIA, S., GOBBO, F., RAMIREZ, A. S., GUADAGNINI, D., BALDASSO, E., MORONATO, M. L. und NICHOLAS, R. A. J. (2016). Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). BMC Veterinary Research **12(1)**: 52.

CHARLTON, K. G. (2000). Antibodies to selected disease agents in translocated wild turkeys in California. Journal of Wildlife Diseases **36(1)**: 161-164.

CHERRY, J. J., LEY, D. H. und ALTIZER, S. (2006). Genotypic Analyses of *Mycoplasma gallisepticum* Isolates from Songbirds by Random Amplification of Polymorphic DNA and Amplified-fragment Length Polymorphism. Journal of Wildlife Diseases **42(2)**: 421-428.

CHIN, R. P. und GOSHGARIAN, M. (2001). Infraorbital sinusitis associated with *Pasteurella multocida* in pen-raised ring-necked pheasants. Avian Diseases **45(2)**: 540-543.

CHIN, R. P. (2013). *Mycoplasma meleagridis* infection. In: Diseases of Poultry. 13. Auflage, D. E. SWAYNE (Hrsg.). Ames, Iowa, Wiley-Blackwell: 893-900.



- CHRISTENSEN, N. H., YAVARI, C. A., MCBAIN, A. J. und BRADBURY, J. M. (1994). Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathology* **23(1)**: 127-143.
- CIZELJ, I., BERČIČ, R. L., SLAVEC, B., NARAT, M., DOVČ, P. und BENČINA, D. (2015). Multilocus sequence analysis for *Mycoplasma synoviae* molecular genotyping. *British Poultry Science* **56(6)**: 658-665.
- CLINE, J., BRAMAN, J. C. und HOGREFE, H. H. (1996). PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **24(18)**: 3546-3551.
- CLYDE, W. A. (1983). Growth inhibition tests. In: *Methods in Mycoplasmaology*. 1. Auflage, S. RAZIN und J. G. TULLY (Hrsg.). New York, Academic Press. Band 1: 405-410.
- COLE, B. C. (1983). Transmission Electron Microscopy: Basic techniques. In: *Methods in Mycoplasmaology*. 1. Auflage, J. G. TULLY und S. RAZIN (Hrsg.). New York, Academic Press. Band 1: 43-50.
- COOKSON, K. C. und SHIVAPRASAD, H. L. (1994). *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants, and peafowl. *Avian Diseases* **38(4)**: 914-921.
- DASZAK, P. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science* **287(5452)**: 443-449.
- DE LA CASA-RESINO, I., HERNÁNDEZ-MORENO, D., CASTELLANO, A., PÉREZ-LÓPEZ, M. und SOLER, F. (2014). Breeding near a landfill may influence blood metals (Cd, Pb, Hg, Fe, Zn) and metalloids (Se, As) in white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings. *Ecotoxicology* **23(8)**: 1377-1386.
- DEEM, S. L., CRUZ, M. B., HIGASHIGUCHI, J. M., PARKER, P. G., KATZNER, T. und ACEVEDO-WHITEHOUSE, K. (2012). Diseases of poultry and endemic birds in Galapagos: implications for the reintroduction of native species. *Animal Conservation* **15(1)**: 73-82.
- DELANEY, N. F., BALENGER, S., BONNEAUD, C., MARX, C. J., HILL, G. E., FERGUSON-NOEL, N., TSAI, P., RODRIGO, A. und EDWARDS, S. V. (2012). Ultrafast evolution and loss of CRISPRs following a host shift in a novel wildlife pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS Genetics* **8(2)**: e1002511.
- DEUTSCHER WETTERDIENST (2003). Übersicht über die klimatologischen Bedingungen im Jahr 2003 in Deutschland. from [http://www.dwd.de/DE/leistungen/besondereereignisse/verschiedenes/20040120\\_klima\\_2003.html](http://www.dwd.de/DE/leistungen/besondereereignisse/verschiedenes/20040120_klima_2003.html).
- DHONDT, A. A., TESSAGLIA, D. L. und SLOTHOWER, R. L. (1998). Epidemic mycoplasmal conjunctivitis in house finches from eastern North America. *Journal of Wildlife Diseases* **34(2)**: 265-280.

DHONDT, A. A., DHONDT, K. V., HAWLEY, D. M. und JENNELLE, C. S. (2007). Experimental evidence for transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches by fomites. *Avian Pathology* **36(3)**: 205-208.

DHONDT, A. A., DECOSTE, J. C., LEY, D. H. und HOCHACHKA, W. M. (2014). Diverse wild bird host range of *Mycoplasma gallisepticum* in eastern North America. *PLoS ONE* **9(7)**: e103553.

DHONDT, A. A., DHONDT, K. V. und HOCHACHKA, W. M. (2015). Response of Black-Capped Chickadees to House Finch *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS ONE* **10(4)**: e0124820.

DIERKS, R. E., NEWMAN, J. A. und POMEROY, B. S. (1967). Characterization of avian mycoplasma. *Annals of the New York Academy of Sciences* **143(1)**: 170-189.

DIJKMAN, R., FEBERWEE, A. und LANDMAN, W. J. M. (2016). Development and evaluation of a multi-locus sequence typing scheme for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathology*: 1-37.

DIXON, W. J. (1993). *BMDP Statistical Software manual*. (Hrsg.). University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

DUCKWORTH, R. A., BADYAEV, A. V., FARMER, K. L., HILL, G. E. und ROBERTS, S. R. (2003). First case of *Mycoplasma gallisepticum* infection in the western range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *The Auk* **120(2)**: 528-530.

DUPIELLET, J. P. (1984). *Mycoplasmes et acholeplasmes des palmipèdes à foie gras: isolement, caractérisation, étude du rôle dans la pathologie*. Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A.), Université de Bordeaux II.

EDWARD, D. G. (1955). A suggested classification and nomenclature for organisms of the pleuropneumonia group. *International Bulletin of Bacterial Nomenclature and Taxonomy* **5(2)**: 85-93.

EDWARD, D. G. und KANAREK, A. D. (1960). Organisms of the pleuropneumonia group of avian origin: their classification into species. *Annals of the New York Academy of Sciences* **79**: 696-702.

EDWARD, D. G. und FREUNDT, E. A. (1967). Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *International Journal of Systematic Bacteriology* **17(3)**: 267-268.

ELLIOT, A. (1992). Order Ciconiiformes - Family Ciconiidae (Storks). In: *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 1. Auflage, J. DE HOYO, A. ELLIOTT und J. SARGATAL (Hrsg.). Barcelona, Lynx Edicions. 1: 436-465.

ERDÉLYI, K., TENK, M. und DÁN, Á. (1999). Mycoplasmosis associated perosis type skeletal deformity in a saker falcon nestling in Hungary. *Journal of Wildlife Diseases* **35(3)**: 586-590.

ESPOSITO, J. F. (2000). Respiratory medicine in pigeons. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice* **3(2)**: 395-402.

EU (2009). Council Directive 2009/158/EC on animal health conditions governing intra-Community trade in, and imports from third countries of poultry and hatching eggs. EU. Official Journal of the European Union: L343/374-113.

FAN, H. H., KLEVEN, S. H., JACKWOOD, M. W., JOHANSSON, K.-E., PETTERSSON, B. und LEVISOHN, S. (1995). Species identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases* **39(2)**: 398-407.

FARMER, K. L., HILL, G. E. und ROBERTS, S. R. (2005). Susceptibility of wild songbirds to the house finch strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Wildlife Diseases* **41(2)**: 317-325.

FEBERWEE, A., MEKKES, D. R., DE WIT, J. J., HARTMAN, E. G. und PIJPERS, A. (2005). Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections. *Avian Diseases* **49(2)**: 260-268.

FEBERWEE, A., DE VRIES, T. S. und LANDMAN, W. J. M. (2008). Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. *Avian Pathology* **37(6)**: 629-633.

FEBERWEE, A., DE WIT, J. J. und LANDMAN, W. J. M. (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology* **38(1)**: 77-85.

FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

FERGUSON-NOEL, N. und NOORMOHAMMADI, A. H. (2013). *Mycoplasma synoviae* infection. In: *Diseases of Poultry*. 13. Auflage, D. E. SWAYNE (Hrsg.). Ames, Iowa, Wiley-Blackwell: 900-906.

FIRRAO, G. und BROWN, D. R. (2013). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes: Minutes of the meetings, July 15th and 19th 2012, Toulouse, France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63(Pt 6)**: 2361-2364.

FISCHER, J. R., STALLKNECHT, D. E., LUTTRELL, P., DHONDT, A. A. und CONVERSE, K. A. (1997). Mycoplasmal conjunctivitis in wild songbirds: the spread of a new contagious disease in a mobile host population. *Emerging Infectious Diseases* **3(1)**: 69-72.

FORREST, M. und BRADBURY, J. M. (1984). *Mycoplasma glycyphilum*, a new species of avian origin. *Journal of General Microbiology* **130(3)**: 597-603.

FORSYTH, M. H., TULLY, J. G., GORTON, T. S., HINCKLEY, L., FRASCA, S., VAN KRUININGEN, H. J. und GEARY, S. J. (1996). *Mycoplasma sturni* sp. nov., from the conjunctiva of a European starling (*Sturnus vulgaris*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **46(3)**: 716-719.

FRAGA, A. P., DE VARGAS, T., IKUTA, N., FONSECA, A. S., CELMER, A. J., MARQUES, E. K. und LUNGE, V. R. (2013). A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. *Brazilian Journal of Microbiology* **44(2)**: 505-510.

FRASCA, S., HINCKLEY, L., FORSYTH, M. H., GORTON, T. S., GEARY, S. J. und VAN KRUIJNINGEN, H. J. (1997). Mycoplasmal conjunctivitis in a european starling. *Journal of Wildlife Diseases* **33(2)**: 336-339.

FRASCA, S., WEBER, E. S., URQUHART, H., LIAO, X., GLADD, M., CECCHINI, K., HUDSON, P., MAY, M., GAST, R. J., GORTON, T. S. und GEARY, S. J. (2005). Isolation and characterization of *Mycoplasma sphenisci* sp. nov. from the choana of an aquarium-reared Jackass Penguin (*Spheniscus demersus*). *Journal of Clinical Microbiology* **43(6)**: 2976-2979.

FREUNDT, E. A. (1955). The classification of the pleuropneumoniae group of organisms (Borreliomycetales). *International Bulletin of Bacterial Nomenclature and Taxonomy* **5**: 67-78.

FREUNDT, E. A., ANDREWS, B. E., ERNO, H., KUNZE, M. und BLACK, F. T. (1973). The sensitivity of Mycoplasmatales to Sodium-Polyanethol-Sulfonate and Digitonin. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitologie, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie.* **225(1)**: 104-112.

FRIEND, M. und TRAINER, D. O. (1969). Aspergillosis in captive herring gulls. *Wildlife Disease* **5**: 271-275.

FURR, P. M. und TAYLOR-ROBINSON, D. (1990). Long-term viability of stored mycoplasmas and ureaplasmas. *Journal of Medical Microbiology* **31(3)**: 203-206.

FURR, P. M. (1998). Cultivation of Ureaplasmas. In: *Mycoplasma Protocols*. 1. Auflage, R. MILES und R. A. NICHOLAS (Hrsg.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 53-59.

GANAPATHY, K. und BRADBURY, J. M. (1998a). Pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans* in red legged partridges (*Alectoris rufa*). *Avian Pathology* **27(5)**: 455-463.

GANAPATHY, K., JONES, R. C. und BRADBURY, J. M. (1998b). Pathogenicity of in vivo passaged *Mycoplasma imitans* in turkey poults in single infection and in dual infection with rhinotracheitis virus. *Avian Pathology* **27(1)**: 80-89.

GANAPATHY, K., SALEHA, A. A., JAGANATHAN, M., TAN, C. G., CHONG, C. T., TANG, S. C., IDERIS, A., DARE, C. M. und BRADBURY, J. M. (2007). Survey of campylobacter, salmonella and mycoplasmas in house crows (*Corvus splendens*) in Malaysia. *The Veterinary Record* **160**: 622-624.

GARDELLA, R. S., DEL GIUDICE, R. A. und TULLY, J. G. (1983). Immunofluorescence. In: *Methods in Mycoplasmaology*. 1. Auflage, S. RAZIN und J. G. TULLY (Hrsg.). New York, Academic Press: 431-439.

- GHARAIBEH, S. und HAILAT, A. (2011). *Mycoplasma gallisepticum* experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows and pigeons. *Avian Pathology* **40(4)**: 349-354.
- GILBERT, N. I., CORREIA, R. A., SILVA, J. P., PACHECO, C., CATRY, I., ATKINSON, P. W., GILL, J. A. und FRANCO, A. M. A. (2016). Are white storks addicted to junk food? Impacts of landfill use on the movement and behaviour of resident white storks (*Ciconia ciconia*) from a partially migratory population. *Movement Ecology* **15(4)**: 1-7.
- GLÜNDER, G. und SIEGMANN, O. (1989). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in wild birds. *Avian Pathology* **18(4)**: 685-695.
- GOLDBERG, D. R., SAMUEL, M. D., THOMAS, C. B., SHARP, P., KRAPU, G. L., ROBB, J. R., KENOW, K. P., KORSCHGEN, C. E., CHIPLEY, W. H. und CONROY, M. J. (1995). The occurrence of mycoplasmas in selected wild North American waterfowl. *Journal of Wildlife Diseases* **31(3)**: 364-371.
- GYLSTORFF, I. und BOVÉ, J. M. (1985). Infektionen durch Mycoplasmatales. 1. Auflage, I. GYLSTORFF (Hrsg.). Enke Verlag, Stuttgart.
- HAESSENDONCK, R., VERLINDEN, M., DEVOS, G., MICHIELS, T., BUTAYE, P., HAESBROUCK, F., PASMANS, F. und MARTEL, A. (2014). High seroprevalence of respiratory pathogens in hobby poultry. *Avian Diseases* **58(2)**: 623-627.
- HAFEZ, H. M., JODAS, S., POPP, C., LIERZ, M. und KORBEL, R. (2006). *Mycoplasma synoviae*-Feldinfektionen bei Puteneltern: Verfolgungsuntersuchungen bei den Nachkommen. *Tierärztliche Praxis (G)* **34(4)**: 259-262.
- HAGEN, N., LIERZ, M. und HAFEZ, H. M. (2004). Das Vorkommen von Mykoplasmen bei Storchennestlingen in Brandenburg und Sachsen-Anhalt. 14. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten. M. SCHWEIKL, S. JODAS und R. T. KORBEL. München, DVG Verlag: 132-137.
- HAGEN, N. (2007). Ein Beitrag zum Vorkommen von Mykoplasmen bei Greifvögeln mittels konventioneller und molekularbiologischer Methoden. Dissertationsschrift (Dr. med. vet.), Freie Universität Berlin.
- HAMMOND, P. P., RAMÍREZ, A. S., MORROW, C. J. und BRADBURY, J. M. (2009). Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vhA* and its value for strain typing. *Veterinary Microbiology* **136(1-2)**: 61-68.
- HARTRUP, B. K., KOLLIAS, G. V. und LEY, D. H. (2000). Mycoplasmal conjunctivitis in songbirds from New York. *Journal of Wildlife Diseases* **36(2)**: 257-264.
- HAWLEY, D. M., GRODIO, J., FRASCA, S., KIRKPATRICK, L. und LEY, D. H. (2011). Experimental infection of domestic canaries (*Serinus canaria domestica*) with *Mycoplasma gallisepticum*: a new model system for a wildlife disease. *Avian Pathology* **40(3)**: 321-327.

HAWLEY, D. M., OSNAS, E. E., DOBSON, A. P., HOCHACHKA, W. M., LEY, D. H. und DHONDT, A. A. (2013). Parallel patterns of increased virulence in a recently emerged wildlife pathogen. *PLoS Biology* **11(5)**: e1001570.

HAYFLICK, L. (1965). Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas reports on biology and medicine* **23(Suppl. 1)**: 285-303.

HENNIGAN, S. L., DRISKELL, J. D., FERGUSON-NOEL, N., DLUHY, R. A., ZHAO, Y., TRIPP, R. A. und KRAUSE, D. C. (2012). Detection and differentiation of avian mycoplasmas by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy based on Silver Nanorod Array. *Applied and Environmental Microbiology* **78(6)**: 1930-1935.

HINZ, K. H., PFUTZNER, H. und BEHR, K. P. (1994). Isolation of mycoplasmas from clinically healthy adult breeding geese in Germany. *Zentralblatt für Bakteriologie Reihe B* **41**: 145-147.

HINZ, K. H. und BEHR, K. P. (2012). Aviäre Mykoplasmen. In: *Kompendium der Geflügelkrankheiten*. 7. Auflage, O. SIEGMANN und U. NEUMANN (Hrsg.). Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft 287-299.

HOCHACHKA, W. M., DHONDT, A. A., DOBSON, A., HAWLEY, D. M., LEY, D. H. und LOVETTE, I. J. (2013). Multiple host transfers, but only one successful lineage in a continent-spanning emergent pathogen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280(20131068)**: 1-7.

HOFFMAN, R. W., LUTTRELL, M. P., DAVIDSON, W. R. und LEY, D. H. (1997). Mycoplasmas in wild turkeys living in association with domestic fowl. *Journal of Wildlife Diseases* **33(3)**: 526-535.

HÖFLE, U., RAMIRO-RUBIO, Y., HERNÁNDEZ, J. M., DIAZ, S. und GUTIERREZ-GUZMAN, A. V. (2012). White Storks (*Ciconia ciconia*) an rubbish dumps, the good the bad and the ugly: Food, pollutants and pathogens. 61. WDA EWDA Conference, 22.-27. Juli 2012. Lyon, France.

HOLLAMBY, S., SIKARSKIE, J. G. und STUHT, J. (2003). Survey of peafowl (*Pavo cristatus*) for potential pathogens at three Michigan zoos. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **34(4)**: 375-379.

HONG, Y., GARCÍA, M., LEITING, V., BENČINA, D., DUFOUR-ZAVALA, L., ZAVALA, G. und KLEVEN, S. H. (2004). Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the Hemagglutinin Encoding Gene v1hA. *Avian Diseases* **48(3)**: 606-616.

IVANICS, E., GLÁVITS, R., TAKÁCS, G., MOLNÁR, E., BITAY, Z. und MEDER, M. (1988). An outbreak of *Mycoplasma anatis* infection associated with nervous symptoms in large-scale duck flocks. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious diseases and veterinary public health* **35**: 368-378.

JAIN, N. C., CHANDIRAMANI, N. K. und SINGH, I. P. (1971). Studies on avian pleuropneumonia-like organisms. Occurrence of mycoplasma in wild birds. *The Indian Journal of Animal Sciences* **41(4)**: 301-305.

JANSEN, L. C., JUSTESEN, U. C., ROOS, S. M., DARGIS, R., JENSEN, J. S., CHRISTENSEN, J. J. und KEMP, M. (2012). Seal finger in Denmark diagnosed by PCR-technique. *Ugeskrift for Laeger* **174(7)**: 426-427.

JEFFERY, N., GASSER, R. B., STEER, P. A. und NOORMOHAMMADI, A. H. (2007). Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. *Microbiology* **153(8)**: 2679-2688.

JERSTAD, A. C., HAMILTON, C. M. und SMITH, V. E. (1959). Egg transmission of infectious sinusitis in naturally infected turkeys. *Avian Diseases* **3**: 28-40.

JOHST, K., BRANDL, R. und PFEIFER, R. (2001). Foraging in a patchy and dynamic landscape: Human land use and the White Stork. *Ecological Applications* **11(1)**: 60-69.

JORDAN, F. T. A. und AMIN, M. M. (1980). A survey of mycoplasma infections in domestic poultry. *Research in Veterinary Science* **28(1)**: 96-100.

JORDAN, F. T. W., ERNO, H., COTTEW, G. S., HINZ, K. H. und STIPKOVITS, L. (1982). Characterisation and taxonomic description of five mycoplasma serovars (serotypes) of an avian origin and their evaluation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of *Mycoplasma synoviae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **32(1)**: 108-115.

JOVANI, R. und TELLA, J. L. (2004). Age-related environmental sensitivity and weather mediated nestling mortality in white storks *Ciconia ciconia*. *Ecography* **27**: 611-618.

KAATZ, C. und KAATZ, M. (2013). The population of the White Stork in Germany with special consideration of the years 2004/2005. K.-M. THOMSEN, L. LACHMANN, R. EVANS und S. LASS-EVANS. Berlin, Naturschutzbund Deutschland (NABU) e.V.: 5.

KAHYA, S., TEMELLI, S., EYIGOR, A. und CARLI, K. T. (2010). Real-time PCR culture and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks. *Veterinary Microbiology* **144(3-4)**: 319-324.

KALETA, E. F. und KUMMERFELD, N. (2012). Isolation of herpesvirus and Newcastle disease virus from White Storks (*Ciconia ciconia*) maintained at four rehabilitation centres in northern Germany during 1983 to 2001 and failure to detect antibodies against avian influenza A viruses of subtypes H5 and H7 in these birds. *Avian Pathology* **41(4)**: 383-389.

KÄMPFER, P., JERZAK, L., WILHARM, G., GOLKE, J., BUSSE, H. J. und GLAESER, S. P. (2015a). *Gemmobacter intermedius* sp. nov., isolated from a white stork (*Ciconia ciconia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**: 778-783.

KÄMPFER, P., JERZAK, L., WILHARM, G., GOLKE, J., BUSSE, H. J. und GLAESER, S. P. (2015b). *Psychrobacter ciconiae* sp. nov., isolated from white storks (*Ciconia ciconia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**: 772-777.

KÄMPFER, P., JERZAK, L., WILHARM, G., GOLKE, J., BUSSE, H. J. und GLAESER, S. P. (2015c). Description of *Corynebacterium trachiae* sp. nov., isolated from a white stork *Ciconia ciconia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **65**: 784-788.

KAWAKUBO, Y., KUME, K. und YOSHIOKA, M. (1980). Histo- and immuno-pathological studies on experimental *Mycoplasma synoviae* infection of the chicken. Journal of Comparative Pathology **90**: 457-465.

KEMPF, I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Avian Pathology **27(1)**: 7-14.

KEMPF, I., CHASTEL, C., FERRIS, S., DUFOUR-GESBERT, F., JOHANSSON, K.-E., PETTERSSON, B. und BLANCHARD, A. (2000a). Isolation of *Mycoplasma columborale* from a fly (*Musca domestica*). The Veterinary Record **147(11)**: 304-305.

KEMPF, I., GESBERT, F., CHASTEL, C., FERRIS, S. und BLANCHARD, A. (2000b). Isolation and characterisation of a mycoplasma from a kittiwake (*Rissa tridactyla*). The Veterinary Record **146(6)**: 168-168.

KEYMER, I. F., LEACH, R. H., CLARKE, R. A., BARDSLEY, M. E. und MCINTYRE, R. R. (1984). Isolation of *Mycoplasma* spp. from racing pigeons (*Columba livia*). Avian Pathology **13**: 65-74.

KIRCHOFF, H., MOHAN, K., SCHMIDT, R., RUNGE, M., BROWN, D. R., BROWN, M. B., FOGGIN, C. M., MUVAVARIRWA, P., LEHMA, H. und FLOSSDORF, J. (1997). *Mycoplasma crocodyli* sp. nov., a new species from crocodiles. International Journal of Systematic Bacteriology **47(3)**: 742-746.

KLEVEN, S. H., KING, D. D. und ANDERSON, D. P. (1972). Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. Avian Diseases **16**: 915-924.

KLEVEN, S. H. und FLETCHER, W. O. (1983). Laboratory infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases **27(1)**: 308-311.

KLEVEN, S. H. (1998). Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. Poultry Science **77(8)**: 1146-1149.

KLEVEN, S. H. (2003). Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry. 11. Auflage, Y. M. SAIF (Hrsg.). Ames, Iowa State Press, Blackwell: 805-864.

KÖHN, S., SPERGSE, J., AHLERS, C., VOSS, M., BARTELS, T., ROSENGARTEN, R. und KRAUTWALD-JUNGHANN, M.-E. (2009). Vorkommen von Mykoplasmen in Legehennenbeständen im Verlauf der Legeperiode. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **122(5/6)**: 186-192.

KONAI, M., CLARK, E. A., CAMP, M., KOEH, A. L. und WHITCOMB, R. F. (1996). Temperature ranges, growth optima, and growth rates of *Spiroplasma* (Spiroplasmataceae, class Mollicutes) species. Current Microbiology **32**: 314-319.



- KOROLEV, E. V., NIKONOV, A. V., BRUDNAYA, M. S., SNIGIREVSKAYA, E. S., SABININ, G. V., KOMISSARCHIK, Y. Y., IVANOV, P. I. und BORCHSENIUS, S. N. (1994). Tubular structures of *Mycoplasma gallisepticum* and their possible participation in cell motility. *Microbiology* **140(3)**: 671-681.
- KOSHIMIZU, K., KOTANI, H., MAGARIBUCHI, T., YAGIHASHI, T., SHIBATA, K. und OGATA, M. (1982). Isolation of ureaplasmas from poultry and experimental infection in chickens. *The Veterinary Record* **110(18)**: 426-429.
- KOSHIMIZU, K., HARASAWA, R., PAN, I.-J., KOTANI, H., OGATA, M., STEPHENS, E. B. und BARILE, M. F. (1987). *Ureaplasma gallorale* sp. nov. from the oropharynx of chickens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **37(4)**: 333-338.
- KOTANI, H. und MCGARRITY, G. J. (1985). Rapid and simple identification of mycoplasmas by immunobinding. *Journal of Immunological Methods* **85(2)**: 257-267.
- KRAUSE, D. C. (1998). *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends in Microbiology* **6(1)**: 15-18.
- KREIENBROCK, L., PIGEOT, I. und AHRENS, W. (2012). Kapitel 3: Epidemiologische Studien. In: *Epidemiologische Methoden*. 5. Auflage, L. KREIENBROCK, I. PIGEOT und W. AHRENS (Hrsg.). Heidelberg, Springer Spektrum: 53-119.
- KULCZYKOWSKA, E., KASPRZAK, M., KALAMARZ, H., KURIATA, M., NIETRZEBA, M., JERZAK, L. und KAMIŃSKI, P. (2007). Melatonin and thyroxine response to pollution in white stork nestlings (*Ciconia ciconia*): Aspects of rhythmicity and age. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146(3)**: 392-397.
- KUMAR, M. C. und POMEROY, B. S. (1969). Transmission of *Mycoplasma meleagridis* in turkeys. *American Journal of Veterinary Research* **30**: 1423-1436.
- KWIECIŃSKA-PIRÓG, J., BOGIEL, T., GOSPODAREK, E., KASPRZAK, M., JERZAK, L. und KAMIŃSKI, P. (2011). The susceptibility of *Proteus mirabilis* strains isolated from white stork (*Ciconia ciconia*). *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia* **63(2)**: 139-144.
- LANDMAN, W. J. M. (2014). Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathology* **43(1)**: 2-8.
- LEY, D. H., BERKOFF, J. E. und LEVISOHN, S. (1997). Molecular epidemiologic investigations of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA analyses. *Emerging Infectious Diseases* **3(3)**: 375-380.
- LEY, D. H., GEARY, S. J., BERKOFF, J. E., MCLAREN, J. M. und LEVISOHN, S. (1998). *Mycoplasma sturni* from blue jays and northern mockingbirds with conjunctivitis in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* **34(2)**: 403-406.
- LEY, D. H., SHEAFFER, D. S. und DHONDT, A. A. (2006). Further western spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection of house finches. *Journal of Wildlife Diseases* **42(2)**: 429-431.

LEY, D. H., MARUSAK, R. A., VIVAS, E. J., BARNES, H. J. und FLETCHER, O. J. (2010). *Mycoplasma iowae* associated with chondrodystrophy in commercial turkeys. Avian Pathology **39(2)**: 87-93.

LEY, D. H., MORESCO, A. und FRASCA, S. J. (2012). Conjunctivitis, rhinitis, and sinusitis in cliff swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*) found in association with *Mycoplasma sturni* infection and cryptosporidiosis. Avian Pathology **41(4)**: 395-401.

LIERZ, M. (1999). Untersuchungen zum Krankheitsspektrum aufgefundenener Greifvögel und Eulen in Berlin und Brandenburg. Dissertationsschrift (Dr. med. vet.), Freie Universität Berlin.

LIERZ, M., SCHMIDT, R., BRUNNBERG, L. und RUNGE, M. (2000a). Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from free-ranging birds of prey in Germany. Journal of Veterinary Medicine B, Infectious diseases and veterinary public health **47(1)**: 63-67.

LIERZ, M., SCHMIDT, R., GOEBEL, T., EHRLEIN, J. und RUNGE, M. (2000b). Detection of *Mycoplasma* spp. in raptorial birds in Germany. In: Raptor Biomedicine III. 1. Auflage, J. T. LUMEIJ, J. D. REMPLE, P. T. REDIG, M. LIERZ und J. E. COOPER (Hrsg.). Lake Worth, Zoological Education Network.: 25-33.

LIERZ, M., SCHMIDT, R. und RUNGE, M. (2002). Mycoplasma species isolated from falcons in the Middle East. The Veterinary Record **151(3)**: 92-93.

LIERZ, M., DEPPENMEIER, S., GRUBER, A. D., BROKAT, S. und HAFEZ, H. M. (2007a). Pathogenicity of *M. lipofaciens* strain ML64 for turkey embryos. Avian Pathology **36(5)**: 389-393.

LIERZ, M., HAGEN, N., HARCOURT-BROWN, N., HERNANDEZ-DIVERS, S. J., LÜSCHOW, D. und HAFEZ, H. M. (2007b). Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction. Avian Pathology **36(2)**: 145-150.

LIERZ, M., STARK, R., BROKAT, S. und HAFEZ, H. M. (2007c). Pathogenicity of *Mycoplasma lipofaciens* strain ML64, isolated from an egg of a Northern Goshawk (*Accipiter gentilis*), for chicken embryos. Avian Pathology **36(2)**: 151-153.

LIERZ, M. und HAFEZ, H. M. (2008a). Occurrence of mycoplasmas in semen samples of birds of prey. Avian Pathology **37(5)**: 495-497.

LIERZ, M., HAGEN, N., HERNANDEZ-DIVERS, S. J. und HAFEZ, H. M. (2008b). Occurrence of mycoplasmas in free-ranging birds of prey in Germany. Journal of Wildlife Diseases **44(4)**: 845-850.

LIERZ, M., HAGEN, N., LUESCHOW, D. und HAFEZ, H. M. (2008c). Use of polymerase chain reactions to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma synoviae* in birds of prey. Avian Pathology **37(5)**: 471-476.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- LIERZ, M., HAGEN, N., LÜSCHOW, D. und HAFEZ, H. M. (2008d). Species-specific Polymerase Chain Reactions for the detection of *Mycoplasma buteonis*, *Mycoplasma falconis*, *Mycoplasma gypis* and *Mycoplasma corogypsi* in captive birds of prey. *Avian Diseases* **52(1)**: 94-99.
- LIERZ, M., JANSEN, A. und HAFEZ, H. M. (2008e). Avian *Mycoplasma lipofaciens* transmission to veterinarian. *Emerging Infectious Diseases* **14(7)**: 1161-1163.
- LIERZ, M., OBON, E., SCHINK, B., CARBONELL, F. und HAFEZ, H. M. (2008f). The role of mycoplasmas in a conservation project of the lesser kestrel (*Falco naumanni*). *Avian Diseases* **52(4)**: 641-645.
- LIERZ, M. (2009). Vorkommen und Bedeutung von Mykoplasmen bei Greifvögeln. Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin.
- LIERZ, M., MÖLLER PALAU-RIBES, F., HAGEN, N., BARTSCH, C., WEIß, M., HAFEZ, H. M. und KIPPER, S. (2011). Role of mycoplasmas in free-ranging white stork (*Ciconia ciconia*) and nightingale (*Luscinia megarhynchos*) populations. European Mycoplasma Meeting. R. A. NICHOLAS, R. D. AYLING und D. MCKEEVER. Chertsey: 21.
- LINNAEUS, C. (1758). *Ciconia ciconia*. *Systema Naturæ per Regna Tria Naturæ, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. Holmiae (Stockholm), Laurentii Salvii. **1**: 142.
- LORIA, G. R., TAMBURELLO, A., LIGA, F., LAWES, J. und NICHOLAS, R. A. J. (2005). Isolation of mycoplasmas from pigeons suffering eye lesions and respiratory disease. *The Veterinary Record* **157(21)**: 664-665.
- LUTTRELL, M. P., ELEAZER, T. H. und KLEVEN, S. H. (1992). *Mycoplasma gallopavonis* in eastern wild turkeys. *Journal of Wildlife Diseases* **28(2)**: 288-291.
- LUTTRELL, M. P., STALLKNECHT, D. E., KLEVEN, S. H., KAVANAUGH, D. M., CORN, J. L. und FISCHER, J. R. (2001). *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. *Avian Diseases* **45(2)**: 321-329.
- MADDEN, D. L., HENDERSON, W. H. und MOSES, H. E. (1967). Case report: isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Diseases* **11(3)**: 378-380.
- MANILOFF, J. (2002). Phylogeny and evolution. In: *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Auflage, S. RAZIN und R. HERRMANN (Hrsg.). New York, Kluwer Academic: 31-43.
- MARÉ, C. J. und SWITZER, W. P. (1965). *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* **60**: 841-845.
- MASOVER, G. K. und HAYFLICK, L. (1985). Fundamental biology of the Class Mollicutes. In: *Infektionen durch Mycoplasmatatales*. 1. Auflage, I. GYLSTORFF (Hrsg.), Enke Verlag: 17-27.

MASSEMIN-CHALLET, S., GENDNER, J.-P., SAMTMANN, S., PICHEGRU, L., WULGUÉ, A. und LE MAHO, Y. (2006). The effect of migration strategy and food availability on White Stork *Ciconia ciconia* breeding success. *Ibis* **148(3)**: 503-508.

MAY, J. D. und BRANTON, S. L. (1997). Identification of mycoplasma isolates by ELISA. *Avian Diseases* **41(1)**: 93-96.

MCCLENAGHAN, M., BRADBURY, J. M. und HOWSE, J. N. (1981). Embryo mortality associated with avian mycoplasma serotype I. *The Veterinary Record* **108(21)**: 459-460.

MEKKES, D. R. und FEBERWEE, A. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathology* **34(4)**: 348-354.

MICHIELS, T., WELBY, S., VANROBAEYS, M., QUINET, C., ROUFFAER, L., LENS, L., MARTEL, A. und BUTAYE, P. (2016). Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathology*: 1-28.

MIKAELIAN, I., LEY, D. H., CLAVEAU, R., LEMIEUX, M. und BÉRUBÉ, J. P. (2001). Mycoplasmosis in evening and pine grosbeaks with conjunctivitis in Quebec. *Journal of Wildlife Diseases* **37(4)**: 826-830.

MILES, R. (1992). Catabolism in Mollicutes. *Journal of General Microbiology* **138(9)**: 1773-1783.

MILES, R. und NICHOLAS, R. A. (1998). Introduction. In: *Mycoplasma Protocols*. 1. Auflage, R. MILES und R. A. NICHOLAS (Hrsg.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 1-5.

MIRSALIMI, S. M., ROSENDAL, S. und JULIAN, R. J. (1989). Colonization of the intestine of turkey embryos exposed to *Mycoplasma iowae*. *Avian Diseases* **33(2)**: 310-315.

MIYATA, M., YAMAMOTO, H., SHIMIZU, T., UENOYAMA, A., CITTI, C. und ROSENGARTEN, R. (2000). Gliding mutants of *Mycoplasma mobile*: relationships between motility and cell morphology, cell adhesion and microcolony formation. *Microbiology* **146(6)**: 1311-1320.

MIYATA, M. (2010). Unique centipede mechanism of mycoplasma gliding. *Annual Review of Microbiology* **64(1)**: 519-537.

MOALIC, P.-Y., KEMPF, I., GESBERT, F. und LAIGRET, F. (1997). Identification of two pathogenic avian mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47(1)**: 171-174.

MOHAMMED, H. O., CARPENTER, T. E. und YAMAMOTO, R. (1987). Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Diseases* **31(3)**: 477-482.

MÖLLER PALAU-RIBES, F., ENDERLEIN, D., BARTSCH, C., VOIGT-HEUCKE, S. L., WEIß, M., HUSSEIN, M., KIPPER, S. und LIERZ, M. (2012). Relevance of mycoplasma in ecologically diverse avian species. 19th Congress of the International Organisation for Mycoplasmaology. C. CITTI. Toulouse, Frankreich: 41.

MÖLLER PALAU-RIBES, F., ENDERLEIN, D., HAGEN, N., HERBST, W., HAFEZ, H. M. und LIERZ, M. (2016). Description and prevalence of *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. isolated from white stork nestlings (*Ciconia ciconia*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: DOI: 10.1099/ijsem.1090.001220 [Epub ahead of print].

MORISHITA, T. Y., AYE, P. P. und BROOKS, D. C. (1997). A survey of diseases of raptorial birds. Journal of Avian Medicine and Surgery **11(2)**: 77-92.

MORISHITA, T. Y., MCFADZEN, M. E., MOHAN, R., AYE, P. P. und BROOKS, D. L. (1998). Serologic survey of free-living nestlings prairie falcons (*Falco mexicanus*) for selected pathogens. Journal of Zoo and Wildlife Medicine **29(1)**: 18-20.

MÜLHARDT, C. (2009). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. 6. Auflage, C. MÜLHARDT (Hrsg.). Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 84-119.

MURAKAMI, S., MIYAMA, M., OGAWA, A., SHIMADA, J. und NAKANE, T. (2002). Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium* sp. infection. Avian Pathology **31(4)**: 363-370.

NADEEM, M., YOUSAF, A., IQBAL, Z., AWAIS, M. M. und PERVEZ, B. A. (2014). Prevalence, diagnosis and treatment of mycoplasmosis in game birds. World's Poultry Science Journal **70(01)**: 69-80.

NAGATOMO, H., KATO, H., SHIMIZU, T. und KATAYAMA, B. (1997). Isolation of mycoplasmas from fantail pigeons. Journal of Veterinary Medical Science **59(6)**: 461-462.

NAWROT, R., BARYLSKI, J., TOMASZEWSKI, L., JERZAK, L., GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A., JĘDRZEJEWSKI, S. und TRYJANOWSKI, P. (2009). Identification of bacterial species in White Stork chicks in Poland using PCR method and sequencing of bacterial 16S rRNA. Polish Journal of Environmental Studies **18(2)**: 301-304.

NEVILLE, S. A., LECORDIER, A., ZIOCHOS, H., CHATER, M. J., GOSBELL, I. B., MALEY, M. W. und VAN HAL, S. J. (2011). Utility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry following Introduction for routine laboratory bacterial identification. Journal of Clinical Microbiology **49(8)**: 2980-2984.

NIXON, K. C. und CARPENTER, J. M. (1993). On outgroups. Cladistics **9(4)**: 413-426.

NOCARD, E. und ROUX, E. R. (1896). Le microbe de la péripneumonie. Annales de l'Institut Pasteur **12**: 240-262.

NOLAN, P. M., HILL, G. E. und STOEHR, A. M. (1998). Sex, size and plumage redness predict house finch survival in an epidemic. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences **265**: 961-965.

NOORMOHAMMADI, A. H. (2013). Transfer of diagnostic technology. XVIIIth Congress of the WVPA. F. BERNARD. Nantes, Frankreich, GF-AVMA: 43-46.

NUNOYA, T., YAGIHASHI, T., TAJIMA, M. und NAGASAWA, Y. (1995). Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. *Veterinary Pathology* **32(1)**: 11-18.

NUNOYA, T., KANAI, K., YAGIHASHI, T., HOSHI, S., SHIBUYA, K. und TAJIMA, M. (1997). Natural case of salpingitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Pathology* **26(2)**: 391-398.

OAKS, J. L., DONAHOE, S. L., RURANGIRWA, F. R., RIDEOUT, B. A., GILBERT, M. und VIRANI, M. Z. (2004). Identification of a novel mycoplasma species from an Oriental White-Backed Vulture (*Gyps bengalensis*). *Journal of Clinical Microbiology* **42(12)**: 5909-5912.

OLIAS, P., GRUBER, A. D., WINFRIED, B., HAFEZ, H. M. und LIERZ, M. (2010). Fungal pneumonia as a major cause of mortality in white stork (*Ciconia ciconia*) chicks. *Avian Diseases* **54(1)**: 94-98.

OLSON, N. O., KERR, K. M. und CAMPBELL, A. (1964). Control of infectious synovitis. The antigen study of three strains. *Avian Diseases* **8**: 209-214.

PALOMO, G., CAMPOS, M. J., UGARTE, M., PORRERO, M. C., ALONSO, J. M., BORGE, C., VADILLO, S., DOMÍNGUEZ, L., QUESADA, A. und PÍRIZ, S. (2013). Dissemination of antimicrobial-resistant clones of *Salmonella enterica* among domestic animals, wild animals and humans. *Foodborne pathogens and disease* **10(2)**: 171-176.

PANANGALA, V. S., STRINGFELLOW, J. S., DYBVIK, K., WOODARD, A., SUN, F., ROSE, D. L. und GRESHAM, M. M. (1993). *Mycoplasma corogypsi* sp. nov., a new species from the footpad abscess of a black vulture (*Coragyps atratus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **43(3)**: 585-590.

PASCUCCI, S., MAESTRINI, N., GOVONI, S. und PRATI, A. (1976). *Mycoplasma synoviae* in the guinea fowl. *Avian Pathology* **5(4)**: 291-297.

PENNYCOTT, T. W., DARE, C. M., YAVARI, C. A. und BRADBURY, J. M. (2005). *Mycoplasma sturni* and *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds in Scotland. *The Veterinary Record* **156(16)**: 513-515.

PETERMANN, S., GLÜNDER, G., HEFFELS-REDMANN, U. und HINZ, K. H. (1989). The "diseased" or "dead" guillemots (*Uria aalge*), three-toed gulls (*Rissa tridactyla*), silver gulls (*Larus argentatus*) and laughing gulls (*Larus ridibundus*) found in the area of the German Bay, 1982-1985. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **96(5)**: 271-277.

PIRIE, H. M. (1973). On being the right size. *Annual Review of Microbiology* **27**: 119-132.

PIROFSKI, L.-A. und CASADEVALL, A. (2012). Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biology* **10(6)**: 1-3.

PITCHER, D. G. und NICHOLAS, R. A. (2005). Mycoplasma host specificity: fact or fiction? *Veterinary Journal* **170(3)**: 300-306.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- POVEDA, C., GIEBEL, J., FLOSSDORF, J., MEIER, J. und KIRCHHOFF, H. (1994). *Mycoplasma buteonis* sp. nov., *Mycoplasma falconis* sp. nov., and *Mycoplasma gypis* sp. nov., 3 species from birds of prey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **44(1)**: 94-98.
- POVEDA, J. B., CARRANZA, J., MIRANDA, A., GARRIDO, A., HERMOSO, M., FERNANDEZ, A. und DOMENECH, J. (1990a). An epizootiological study of avian mycoplasmas in southern Spain. *Avian Pathology* **19(4)**: 627-633.
- POVEDA, J. B., GIEBEL, J., KIRCHHOFF, H. und FERNANDEZ, A. (1990b). Isolation of mycoplasmas from a buzzard, falcons and vultures. *Avian Pathology* **19(4)**: 779-783.
- POVEDA, J. B. (1998). Biochemical characteristics in mycoplasma identification. In: *Mycoplasma Protocols*. 1. Auflage, R. MILES und R. A. NICHOLAS (Hrsg.). Totowa, NJ, Humana Press: 69-78.
- PRINZINGER, R., PREßMAR, A. und SCHLEUCHER, E. (1991). Body temperature in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology* **99(4)**: 499-506.
- RAMÍREZ, A., NAYLOR, C., HAMMOND, P. und BRADBURY, J. (2006). Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Veterinary Microbiology* **118(1-2)**: 76-82.
- RAMÍREZ, A. S., NAYLOR, C. J., PITCHER, D. G. und BRADBURY, J. M. (2008). High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology* **128(3-4)**: 279-287.
- RAMÍREZ, A. S., DARE, C., YAVARI, C. A. und BRADBURY, J. M. (2012). A diagnostic polymerase chain reaction for *Mycoplasma iowae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Avian Pathology* **41(3)**: 317-322.
- RANCK, F. M., GRUMBLES, L. C., HALL, C. F. und GRIMES, J. E. (1970). Serology and gross lesions of turkeys inoculated with an avian influenza A virus, a paramyxovirus, and *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases* **14(1)**: 54-65.
- RANCK, M. F., SCHMIDT, V., PHILIPP, H.-C., VOSS, M., KACZA, J., RICHTER, A., FEHLHABER, K. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (2010). *Mycoplasma synoviae*-assoziierte Eischalenpoldefekte bei Legehennen. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **123(3/4)**: 111-118.
- RANCK, M. F. (2011). *Mycoplasma synoviae* assoziierte Eischalenpoldefekte bei Legehennen. Dissertationsschrift (Dr. med. vet.), Universität Leipzig.
- RAVIV, Z., CALLISON, S., FERGUSON-NOEL, N., LAIBINIS, V., WOOTEN, R. und KLEVEN, S. H. (2007). The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Diseases* **51**: 555-560.
- RAVIV, Z. und KLEVEN, S. H. (2009). The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Diseases* **53**: 103-107.

RAVIV, Z. und LEY, D. H. (2013). *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Diseases of Poultry. 13th Auflage, D. E. SWAYNE (Hrsg.). Ames, Iowa, Wiley-Blackwell: 877-893.

RAZIN, S. (1978). The Mycoplasmas. Microbiological Reviews **42(2)**: 414-470.

RAZIN, S. und TULLY, J. G. (1983). Methods in Mycoplasmology. 1. Auflage, S. RAZIN und J. G. TULLY (Hrsg.). Academic Press, New York.

RAZIN, S. und FREUNDT, E. A. (1984). Division Tenericutes div. nov. (q.v. p. 36); Class I. Mollicutes Edward and Freundt 1967, 267AL; Order I. Mycoplasmatales Freundt 1955, 71AL. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 1. Auflage, N. R. KRIEG und J. HOLT (Hrsg.). Baltimore, Williams & Wilkins. 1: 740-742.

RAZIN, S., YOGEV, D. und NAOT, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Reviews **62(4)**: 1094-1156.

REBELO, A. R., PARKER, L. und CAI, H. Y. (2011). Use of high-resolution melting curve analysis to identify mycoplasma species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **23(5)**: 932-936.

REECE, R. L., IRELAND, L. und BARR, D. A. (1986a). Infectious sinusitis associated with *Mycoplasma gallisepticum* in game-birds. Australian Veterinary Journal **63(5)**: 167-168.

REECE, R. L., IRELAND, L. und SCOTT, P. C. (1986b). Mycoplasmosis in racing pigeons. Australian Veterinary Journal **63(5)**: 166-167.

REIS, R. und YAMAMOTO, R. (1971). Pathogenesis of single and mixed infections caused by *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma gallisepticum* in turkey embryos. American Journal of Veterinary Research **32(1)**: 63-74.

ROBERTS, D. H. (1964). The isolation of an Influenza A virus and a mycoplasma associated with duck sinusitis. The Veterinary Record **76(470-473)**.

ROSENGARTEN, R. und YOGEV, D. (1996). Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. Journal of Clinical Microbiology **34(1)**: 149-158.

RUDER, M. G., FELDMAN, S. H., WÜNSCHMANN, A. und MCRUER, D. L. (2009). Association of *Mycoplasma corogypsi* and polyarthritis in a Black Vulture (*Coragyps atratus*) in Virginia. Journal of Wildlife Diseases **45(3)**: 808-816.

SACHS, L. und HEDDERICH, J. (2006). Schätzen. Angewandte Statistik. L. SACHS und J. HEDDERICH. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 235-302.

SAMUEL, M. D., GOLDBERG, D. R., THOMAS, C. B. und P., S. (1995). Effects of *Mycoplasma anatis* and cold stress on hatching success and growth of mallard ducklings. Journal of Wildlife Diseases **31(2)**: 172-178.

SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science USA **74(12)**: 5463-5467.



## LITERATURVERZEICHNIS

---

- SASVÁRI, L. und HEGYI, Z. (2001). Condition-dependent parental effort and reproductive performance in the White Stork *Ciconia ciconia*. *Ardea* **89(2)**: 281-291.
- SCHEID (1983). Atmung und Gasaustausch. In: Handbuch der Geflügelphysiologie Teil 1. 1. Auflage, A. MEHNER und W. HARTFIEL (Hrsg.), Karger Verlag.
- SCHMIDT, V., SPERGSER, J., CRAMER, K., DI SOMMA, A., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. und BAILEY, T. (2009). Mycoplasmas isolated from Stone Curlews (*Burhinus oedicnemus*) used in falconry in the United Arab Emirates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **40(2)**: 316-320.
- SELBITZ, H.-J. (2015). Zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 10. Auflage, H.-J. SELBITZ, U. TRUJEN und P. VALENTIN-WEIGAND (Hrsg.). Stuttgart, Enke Verlag: 315-324.
- SENERFIT, L. B. (1983). Preparation of Antigens and Antisera. In: Methods in Mycoplasmaology. 1. Auflage, S. RAZIN und J. G. TULLY (Hrsg.). New York, Academic Press. Band 1: 401-404.
- SEVOIAN, M., SNOEYENBOS, G. H., BASCH, H. I. und REYNOLDS, J. M. (1958). Infectious synovitis: I. Clinical and pathological manifestations. *Avian Diseases* **2**: 499-513.
- SHAHID, M. A., MARKHAM, P. F., MARENDA, M. S., AGNEW-CRUMPTON, R. und NOORMOHAMMADI, A. H. (2014). High-Resolution Melting-Curve Analysis of obg gene to differentiate the temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H from non-temperature-sensitive strains. *PLoS ONE* **9(3)**: 11.
- SHIMIZU, T., ERNO, H. und NAGTOMO, H. (1978). Isolation and characterisation of *Mycoplasma columbinum* and *Mycoplasma columborale*, two new species from pigeons. *International Journal of Systematic Microbiology* **28**: 538-546.
- SHIMIZU, T., NUMANO, K. und UCHIDA, K. (1979). Isolation and identification of mycoplasmas from various birds: An ecological study. *Japanese Journal of Veterinary Science* **41**: 273-282.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. und KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85.
- SPERGSER, J. und HÖFLE HANSEN, U. (2009a). *Mycoplasma sp.* Sp22 16S rRNA gene (partial), ITS1 and 23S rRNA gene (partial). Isolated from the lung of a white stork. GenBank Accession No. FN394056.1
- SPERGSER, J. und HÖFLE HANSEN, U. (2009b). *Mycoplasma sp.* Sp22 partial 16S rRNA gene. Isolated from the lung of a white stork. GenBank Accession No. FN394055.1.
- SPRYGIN, A. V., ANDREYCHUK, D. B., KOLOTILOV, A. N., VOLKOV, M. S., RUNINA, I. A., MUDRAK, N. S., BORISOV, A. V., IRZA, V. N., DRYGIN, V. V. und PEREVOZCHIKOVA, N. A. (2010). Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. *Avian Pathology* **39(2)**: 99-109.

STACKEBRANDT, E. und GOEBEL, B. M. (1994). Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44(4)**: 846-849.

STACKEBRANDT, E. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52(3)**: 1043-1047.

STENKAT, J., SCHMIDT, V., SPERGSEER, J., EILERS, A. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (2011). Untersuchungen zur aeroben bakteriellen Rachen- und Kloakenflora freilebender Wildvögel. 2. DVG-Tagung über Vogel- und Reptilienkrankheiten. M. FEHR, N. KUMMERFELD und K. MATHES. Hannover, Verlag der DVG Service GmbH: 292-294.

STIPKOVITS, L., RASHWAN, A. und SABRY, M. Z. (1978). Studies on pathogenicity of turkey *Ureaplasma*. *Avian Pathology* **7(4)**: 577-582.

STIPKOVITS, L., BROWN, P. A., GLAVITS, R. und JULIAN, R. J. (1983). The possible role of ureaplasma in a continuous infertility problem in turkeys. *Avian Diseases* **27(2)**: 513-523.

STIPKOVITS, L., VARGA, Z., CZIFRA, G. und DOBOS-KOVÁCS, M. (1986). Occurrence of mycoplasmas in geese affected with inflammation of the cloaca and phallus. *Avian Pathology* **15(2)**: 289-299.

STIPKOVITS, L. (1992). Mykoplasmosen. In: *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels*. 1. Auflage, G. HEIDER, G. MONREAL und J. MESZAROS (Hrsg.). Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. 2: 237-261.

STIPKOVITS, L., GLAVITS, R., IVANICS, E. und SZABO, E. (1993). Additional data on mycoplasma disease of goslings. *Avian Pathology* **22(1)**: 171-176.

STRUGNELL, B. W., DAGLEISH, M. P., BAYNE, C. W., BROWN, M., AINSWORTH, H. L., NICHOLAS, R. A. J., WOOD, A. und HODGSON, J. C. (2011). Investigations into an outbreak of corvid respiratory disease associated with *Pasteurella multocida*. *Avian Pathology* **40(3)**: 329-336.

SUÁREZ-PÉREZ, A. (2011). *Mycoplasmas en aves silvestres*. PhD-Thesis, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

SUÁREZ-PÉREZ, A., RAMIREZ, A., ROSALES, R. S., CALABUIG, P., POVEDA, C., ROSSELLÓ-MÓRA, R., NICHOLAS, R. A. und POVEDA, J. B. (2012). *Mycoplasma neophronis* sp. nov., isolated from upper respiratory tract of Canarian Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus majorensis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62(6)**: 1321-1325.

TAYLOR-ROBINSON, D. und DINTER, Z. (1968). Unexpected serotypes of mycoplasmas isolated from pigs. *Journal of General Microbiology* **53**: 221-229.

TEBYANIAN, H., MIRHOSSEINY, S. H., KHEIRKHAH, B., HASSANSHAHIAN, M. und FARHADIAN, H. (2014). Isolation and identification of *Mycoplasma synoviae* from suspected ostriches by Polymerase Chain Reaction, in Kerman Province, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* **7(9)**: e19262.

- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. und HIGGINS, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. In: Current Protocols in Bioinformatics. Auflage, A. D. BAXEVANIS (Hrsg.).
- THOMSEN, K.-M. (2013). Results of the 6th International White Stork Census 2004/2005. K.-M. THOMSEN, L. LACHMANN, R. EVANS und S. LASS-EVANS. Berlin, Naturschutzbund Deutschland (NABU) e.V.: 36.
- TIONG, K. K. (1990). Mycoplasmas and Acholeplasmas isolated from ducks and their possible association with Pasteurellas. The Veterinary Record **127(3)**: 64-66.
- TORTOSA, F. S. und CASTRO, F. (2003). Development of thermoregulatory ability during ontogeny in the white stork *Ciconia ciconia*. Ardeola **50**: 1.
- TRACHTENBERG, S. (1998). Mollicutes - Wall-less bacteria with internal cytoskeletons. Journal of Structural Biology **124**: 244-256.
- TRYJANOWSKI, P. und KUŹNIAK, S. (2002). Population size and productivity of the White Stork *Ciconia ciconia* in relation to Common Vole *Microtus arvalis* density. Ardea **90(2)**: 213-217.
- TULLY, J. G. (1983). Cloning and filtration techniques for mycoplasmas. In: Methods in Mycoplasmaology. Auflage, S. RAZIN und J. G. TULLY (Hrsg.). New York, Academic Press. Band 1: 173-177.
- TULLY, J. G., BOVÉ, J. M., LAIGRET, F. und WHITCOMB, R. F. (1993). Revised Taxonomy of the Class Mollicutes: Proposed elevation of a monophyletic cluster of Arthropod-Associated Mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the Order Mycoplasmatales, Family Mycoplasmataceae. International Journal of Systematic Bacteriology **43(2)**: 378-385.
- USDA (2011). National poultry improvement plan and auxiliary provisions.: APHIS 91-55-088.
- VAN DE PEER, Y. (2009). Phylogeny inference based on distance methods. Theory. In: The Phylogenetic Handbook. 2. Auflage Auflage, P. LEMEY, M. SALEMI und A. M. VANDAMME (Hrsg.). Cambridge, Cambridge University Press: 142-159.
- VAN KUPPEVELD, F. J. M., VAN DER LOGT, J. T. M., ANGULO, A. F., VAN ZOEST, M. J., QUINT, W. G. V., NIESTERS, H. G. M., GALAMA, J. M. D. und MELCHERS, W. J. G. (1992). Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Applied and Environmental Microbiology **58(8)**: 2606-2615.
- VAN WETTERE, A. J., LEY, D. H., SCOTT, D. E., BUCKANOFF, H. D. und DEGERNES, L. A. (2013). *Mycoplasma corogypsi* associated polyarthritits and tenosynovitis in black vultures (*Coragyps atratus*). Veterinary Pathology **50(2)**: 291-298.
- VERGARA, P., AGUIRRE, J. I., FARGALLO, J. A. und DÁVILA, J. A. (2006). Nest-site fidelity and breeding success in White Stork *Ciconia ciconia*. Ibis **148**: 672-677.

VOLOKHOV, D. V., GEORGE, J., LIU, S. X., IKONOMI, P., ANDERSON, C. und CHIZHIKOV, V. (2006). Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71(5)**: 680-698.

VOLOKHOV, D. V., NEVEROV, A. A., GEORGE, J., KONG, H., LIU, S. X., ANDERSON, C., DAVIDSON, M. K. und CHIZHIKOV, V. (2007). Genetic analysis of housekeeping genes of members of the genus *Acholeplasma*: Phylogeny and complementary molecular markers to the 16S rRNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44(2)**: 699-710.

VOLOKHOV, D. V., SIMONYAN, V., DAVIDSON, M. K. und CHIZHIKOV, V. E. (2012). RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmataceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62(1)**: 515-528.

WAITES, K. B., RIKIHISA, Y. und TAYLOR-ROBINSON, D. (2003). *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 1. Auflage, R. G. E. MURRAY und E. J. BARON (Hrsg.), American Society for Microbiology: 972-990.

WAKENELL, P. S., DAMASSA, A. J. und YAMAMOTO, R. (1995). In ovo pathogenicity of *Mycoplasma iners* strain Oz. *Avian Diseases* **39(2)**: 390-397.

WEISBURG, W. G., TULLY, J. G., ROSE, D. L., PETZEL, J. P., OYAIZU, H., YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J., LAWRENCE, T. J., VAN ETEN, J., MANILOFF, J. und WOESE, C. R. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology* **171(12)**: 6455-6467.

WELLEHAN, J. F. X., CASAMIGLIA, M., LEY, D. H., ZENS, M. S., AMONSIN, A. und KAPUR, V. (2001). Mycoplasmosis in captive crows and robins from Minnesota. *Journal of Wildlife Diseases* **37(3)**: 547-555.

WHALIN, R. C. (2009). The detection of mycoplasmas in migratory birds. Bachelor Thesis (B. A.), Miami University.

WHITCOMB, R. F., TULLY, J. G., BOVÉ, J. M., BRADBURY, J. M., CHRISTIANSEN, G., KAHANE, I., KIRKPATRICK, B. C., LAIGRET, F., LEACH, R. H., NEIMARK, H. C., POLLACK, J. D., RAZIN, S., SEARS, B. B. und TAYLOR-ROBINSON, D. (1995). Revised minimum standards for description of new species of the class Mollicutes (Division Tenericutes). *International Journal of Systematic Bacteriology* **45(3)**: 605-612.

WIESNER, E. und RIBBECK, R. (2000). *Lexikon der Veterinärmedizin*. 4. Auflage, E. WIESNER und R. RIBBECK (Hrsg.). Enke Verlag, Stuttgart.

WITWER, C. T., REED, G. H., GUNDRY, C. N., VANDERSTEEN, J. G. und PRYOR, R. J. (2003). High-resolution genotyping by Amplicon Melting Analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* **49(6)**: 853-860.

WOBESER, G. A. (2006). *Essentials of disease in wild animals*. G. A. WOBESER. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell.

- WOESE, C. R., MANILOFF, J. und ZABLEN, L. B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **77(1)**: 494-498.
- WYRZYKOWSKI, B., ALBARIC, O., MOREAU, S., NGUYEN, F., FLEURANCE, R., BELLUCO, S., WYERS, M. und COLLE, M. A. (2013). Retrospective study of *Mycoplasma gallisepticum* meningoencephalitis in six turkey flocks in Western France. *Journal of Comparative Pathology* **148**: 173-177.
- YAMADA, S. und MATSUO, K. (1983a). Experimental infection of ducks with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases* **27(3)**: 762-765.
- YAMADA, S. und MATSUO, K. (1983b). Experimental infection of ducks with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases* **27(2)**: 405-408.
- YAMAMOTO, R., BIGLAND, C. H. und ORTMAYER, H. B. (1965). Characteristics of *Mycoplasma meleagridis* sp. nov. isolated from turkeys. *Journal of Bacteriology* **90**: 47-49.
- YAMAMOTO, R. und ORTMAYER, H. B. (1967). Hatcher and intraflock transmission of *Mycoplasma meleagridis*. *Avian Diseases* **11**: 288-295.
- YANG, S., RAMACHANDRAN, P., ROTHMAN, R., HSIEH, Y. H., HARDICK, A., WON, H., KEKOJEVIC, A., JACKMAN, J. und GAYDOS, C. (2009). Rapid identification of biothreat and other clinically relevant bacterial species by use of universal PCR coupled with High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **47(7)**: 2252-2255.
- YAVARI, C. (2010). Studies on a *Mycoplasma gallisepticum*-like organism isolated from the Humboldt Penguin (*Spheniscus humboldti*). PhD Thesis, University of Liverpool.
- ZHAO, S. und YAMAMOTO, R. (1993). Detection of *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. *Avian Pathology* **22(3)**: 533-542.
- ZHOU, L., WANG, L., PALAIS, R., PRYOR, R. J. und WITTWER, C. T. (2005). High-Resolution DNA Melting Analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clinical Chemistry* **51(10)**: 1770-1777.
- ZIEGLER, L., MÖLLER PALAU-RIBES, F., SCHMIDT, L. und LIERZ, M. (2014). Vorkommen und Bedeutung von Mykoplasmen bei Krähenvögeln. *Tierärztliche Praxis (K)* **42(4)**: A39.

## 9 ANHANG

### Anhang I: Geräte und Verbrauchsmaterial

#### I.I Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<b>Anaerobentopf</b> 2,5 L	Merck, Darmstadt
<b>Brutschränke</b> Sanyo CO <sub>2</sub> Incubator CO <sub>2</sub> Auto Zero Kelvitron®t	Sanyo, München Heraeus Instruments, Hanau Heraeus Instruments, Hanau
<b>Digitalkameras</b> BioDocAnalyze Digital Canon Power Shot G5 Mikroskopkamera DFC 425C	Biometra, Göttingen Canon Deutschland, Krefeld Leica, Wetzlar
<b>Elektrophorese</b> Electrophoresis Power Supply    EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, SWE
Elektrophorese-Stromquelle Unipack 250 Power Supply, UNIEQUIP	Armin Baack Labortechnik, Schwerin
Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer	Keutz, Reiskirchen
Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
<b>Henkellocheisen</b> 15 mm, rund	Lux, Wermelskirchen
<b>Messgeräte</b> Feinwaage Modell SI-234 NanoDrop 2000c	Denver Instrument, Göttingen Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<b>Membranfilter</b> Modell SM16263 Modell SM16621	Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen
<b>Membran-Vakuumpumpe</b>	Vacuubrand, Wertheim
<b>Mikroskope</b> Elektronenmikroskop EM 10/CR Lichtmikroskop Modell 471202 Lichtmikroskop Modell KL 1500 Lichtmikroskop Modell DM 2500 pH-Meter Modell InLab®Expert Pro	Carl Zeiss, Oberkochen Carl Zeiss, Oberkochen Leica, Wetzlar Leica, Wetzlar Mettler-Toledo, Schwerzenbach, CH

### **Rühren, Schütteln & Erhitzen**

Magnetrührer Modell MR 3000	Heidolph, Kelkheim
Schüttler Modell Polymax 1040	Heidolph, Kelkheim
Schüttler Modell Reax 2000	Heidolph, Kelkheim
Thermoblock	FALC Instruments, Treviglio, IT
Thermocycler	MJ Research, Basel, CH
PTC-2000 Peltier Thermal Cycler	
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Schüttler	Heidolph, Kelkheim
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen

### **DNA Extraktion**

QIAcube	Qiagen, Hilden
---------	----------------

<b>UV-Transilluminator</b> Biometra TI 5	Biometra, Göttingen
--	---------------------

### **Werkbänke**

PCR-/UV-Arbeitsstation	Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA
Clean Spot PCR/UV Work Station	Lake, USA
Sterile Werkbank Cellguard	Nunc, Wiesbaden
Class II Biological Safety Cabinet	
Sterile Werkbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
Sterile Werkbank S@felow 1.2	Nunc, Wiesbaden

### **Zentrifugen**

Hettrich Mikro 12-24	Hettrich, Tuttlingen
Hettrich Mikro 20	Hettrich, Tuttlingen
Hettrich Rotanta/T	Hettrich, Tuttlingen
Hettrich Universal 32R, r = 97 mm	Hettrich, Tuttlingen
J2-21 Centrifuge (Rotor: JA-14)	Beckmann, Palo Alto, USA

## I.II Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<b>Antibiotika-Testblättchen</b> Ø 6 mm, 280g/m <sup>2</sup>	Hahnemühle, Dassel
<b>Elektronenmikroskopie</b> Formovar/Kohle-Film auf 3,05 mm Cu-Netzchen 400 mesh	PLANO, Wetzlar
<b>Filter</b> Amicon Ultra 15, Zentrifugen- Filter-Einheit (50 kDa) Millex® AA Filter Unit (0,8 µm) Millex® HA Filter Unit (0,45 µm) Millex® GS Filter Unit (0,22 µm)	Merck Millipore, Bedford, USA (alle Filter)
<b>Glasware</b> Laborflaschen Duran (200-5000 ml) Pasteurpipetten Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL Typ No 104.002-QX Schichtdicke 10 mm	Schott Glas, Mainz Karl Hecht AG, Sondheim Hellmann Optik, Jena
<b>Kunststoffware</b> Gewebekulturschalen Ø 60 mm Gewebekulturschalen (24-Well; steril) Polystyrolgefäße (50 ml, steril) Polystyrolgefäße (10 ml, steril)  Reaktionsgefäße PP(1,5 ml/2 ml, steril)  Zentrifugenbecher, 250 ml (Centrifuge Bottles PP with Noryl Cap)	Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen Becton-Dickinson Franklin Lakes, USA Sarstedt, Nümbrecht und Qiagen, Hilden Beckmann, Palo Alto, USA
<b>Mikrobiologie</b> Anaerocult A Anaerocult C Columbia Schafblutagarplatten	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Oxoid, Wesel
<b>Nitrocellulosemembran</b> 0,45 µm Whatman™ Protran BA85	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, GB



## Anhang II: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<b>Agarosegelelektrophorese</b>	
GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10 <sup>4</sup> x	Biotium, Hayward, USA
Ladepuffer (6x DNA Loading Dye)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Molekulargewichtsmarker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<b>Dulbecco´s PBS</b>	PAA Laboratoires, Pasching, A
<b>Mykoplasmen-Anzucht</b>	
Bacto Pepton	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Calbiochem® DNA Sodium Salt, Salmon Testes	Merck Millipore, Bedford, USA
Frischhefe	Wonnemeyer, Dissen (Aldi)
PPLO Broth	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Sera</b>	
Anti-Rabbit IgG-(whole molecule)- Peroxidase, antibody produced in Goat	Sigma, Taufkirchen
Foetal bovine serum GOLD (FKS)	PAA Laboratoires, Pasching, A
Foetal bovine serum IgG Stripped	PAA Laboratoires, Pasching, A
Pferdeserum (Donor Horse Serum)	PAA Laboratoires, Pasching, A
Schweineserum (Porcine Serum)	PAA Laboratoires, Pasching, A

Nicht gesondert in dieser Liste bzw. im Text vermerkte Substanzen und Chemikalien wurden als analysereine Reagenzien von den Firmen Difco (Augsburg), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

## Anhang III: Lösungen und Puffer

Nicht gesondert im Text vermerkte Substanzen wurden von den Firmen Difco (Augsburg), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) als analysereine Reagenzien bezogen. Lösungen, die als Komponenten der Medien für die Mykoplasmen-Anzucht dienen, finden sich in Anhang IV.

### Agarosegelelektrophorese

#### **Agarosegel 1% / 2%**

Agarose NEEO Ultra-Qualität	2 g / 4 g
TBE	ad 200 ml

#### **Ethidiumbromidlösung 1%**

Ethidiumbromid	10 g
Aqua dest.	ad 1.000 ml

#### **Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10x) (autoklavierbar)**

Tris Base (1,32M)	161,12 g
Borsäure (600 mM)	37,1 g
EDTA (100 mM)	37,22 g
Aqua dest.	ad 1.000 ml

pH 8,8

### Antigenpräparation

#### **Phosphatpuffer (autoklavierbar)**

Natrium-Dihydrogen-Orthophosphat	21,8 g
Di-Natrium-Hydrogen-Orthophosphat	6,6 g
Aqua dest.	ad 1.000 ml

pH 7,4

### Elektronenmikroskopie

#### **Phosphorwolframsäure-Lösung 2%**

Phosphorwolframsäure	0,2 g
PBS (Phosphate buffered saline)	ad 10 ml

pH 8,0

**Immunobinding Assay**

**Chlornaphthol-Lösung**

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

**Chlornaphthol-Substratlösung für Farbreaktion**

Chlornaphthol-Lösung	4 ml
Dulbeccos PBS	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% v/v)	20 µl

## Anhang IV: Medien für Mykoplasmen-Anzucht

Nicht gesondert im Text vermerkte Substanzen wurden von den Firmen Difco (Augsburg), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) als analysereine Reagenzien bezogen. Die Frischhefe wurde im Lebensmitteleinzelhandel bezogen.

### IV.I SP4-Medium nach BRADBURY (1998)

#### Lösungen für Flüssig- und Agarmedium

##### **Ampicillin-Lösung 1%**

Ampicillin	1 g
Aqua dest.	ad 100 ml

##### **Arginin-Lösung 10%**

Arginin	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml

##### **Frischhefeextrakt**

Frischhefe	500 g
Aqua dest.	500 ml

Suspension bis zum Siedepunkt erhitzen und 20 min bei 3.000×g zentrifugieren. Überstand einfrieren und nach Auftauen 20 min bei 3.000g zentrifugieren, pH 8 einstellen und erneut 20 min bei 3.000×g zentrifugieren. Überstand mit 0,8 µm Vorfilter und 0,45 µm Sterilfilter filtrieren.

##### **Glucose-Lösung 10%**

Glucose	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml

##### **NAD-Lösung 1%**

NAD	1 g
Aqua dest.	ad 100 ml
Sterilfiltration	

##### **Penicillin-Lösung (100.000 IU/ml)**

Penicillin G	10.000.000 U
Aqua dest.	ad 100 ml

##### **Phenolrot-Lösung 0,1%**

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

### Schweineserum

Schweineserum 500 ml  
45 min bei 56°C inaktivieren

### Thalliumacetat-Lösung 5%

Thalliumacetat 5 g  
Aqua dest. ad 100 ml

## IV.I.I SP4-Flüssigmedium

### Teil A (autoklavierbar):

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

### Teil B:

Schweineserum 60 ml  
Frischhefeextrakt 40 ml  
Arginin-Lösung 10% 4 ml  
Ampicillin-Lösung 1% 4 ml  
Glucose-Lösung 10% 4 ml  
NAD-Lösung 1% 4 ml  
Penicillin-Lösung 100.000 U/ml 4 ml  
Phenolrot-Lösung 0,1% 8 ml  
Thalliumacetat-Lösung 5% 4 ml

## IV.I.II SP4-Agarmedium

### Teil A:

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

### Teil B:

Schweineserum 60 ml  
Frischhefeextrakt 40 ml  
Arginin-Lösung 10% 4 ml  
Ampicillin-Lösung 1% 4 ml  
Glucose-Lösung 10% 4 ml  
NAD-Lösung 1% 4 ml  
Penicillin-Lösung 100.000 U/ml 4 ml  
Thalliumacetat-Lösung 5% 4 ml

## IV.II Mykoplasmen-Standardmedium nach POVEDA (1998)

### Lösungen für Flüssig- und Agarmedium

#### **DNA-Lösung 0,2%**

DNA 0,2 g  
Aqua dest. ad 100 ml

#### **Heart Infusion Broth (HIB)-Lösung 2,5% (autoklavierbar)**

dehydrierte HIB 25 g  
Aqua dest. ad 1.000 ml

#### **Heart Infusion Agar (HIA)-Lösung 4% (autoklavierbar)**

dehydrierter HIA 40 g  
Aqua dest. ad 1.000 ml

#### **Hefeextrakt-Lösung 10%**

Dehydriertes Hefeextrakt 20 g  
Aqua dest. ad 200 ml  
pH 7,6

#### **Pferdeserum**

Pferdeserum 750 ml  
30 min bei 56°C inaktivieren, sterilfiltrieren

### IV.II.I Standard-Flüssigmedium mit 20% Serum

HIB-Lösung 2,5% 296 ml  
DNA-Lösung 0,2% 4 ml  
Pferdeserum 80 ml  
Hefeextrakt-Lösung 10% 20 ml

### IV.II.II Standard-Flüssigmedium mit 10% Serum

HIB-Lösung 2,5% 336 ml  
DNA-Lösung 0,2% 4 ml  
Pferdeserum 40 ml  
Hefeextrakt-Lösung 10% 20 ml

### IV.II.III Standard-Festmedium

HIA-Lösung 4% 296 ml  
DNA-Lösung 4 ml  
Pferdeserum 80 ml  
Hefeextrakt-Lösung 10% 20 ml

## IV.III Biochemie-Test- und Kontrollmedien nach POVEDA (1998)

### Lösungen für Test- und Kontrollmedien

#### Phenolrot-Lösung 0,5%

Phenolrot-Pulver	0,25 g
NaOH 0,1M	1,4 ml
Aqua dest.	ad 50 ml

#### Harnstoff/Urea-Lösung 10%

Harnstoff	2 g
Aqua dest.	ad 20 ml

### IV.III.I Glucose-, Arginin- und Urea-Testmedium

HIB-Lösung 2,5%	146 ml
DNA-Lösung 0,2%	2 ml
Pferdeserum	20 ml
Hefeextrakt-Lösung 10%	10 ml
Phenolrot-Lösung 0,5%	2 ml
Glucose-Lösung 10%	20 ml
ODER Arginin-Lösung 10%	
ODER Urea-Lösung 10%	

Medium: pH 7,6 (Glucose), pH 7,0 (Arginin, Urea), sterilfiltrieren

### IV.III.II Biochemie-Kontrollmedium

HIB-Lösung 2,5%	166 ml
DNA-Lösung 0,2%	2 ml
Pferdeserum	20 ml
Hefeextrakt-Lösung 10%	10 ml
Phenolrot-Lösung 0,5%	2 ml

Medium: pH 7,6 (Glucose), pH 7,0 (Arginin, Urea), sterilfiltrieren

## IV.IV *Ureaplasma*-Flüssig- und Agarmedium (DSMZ 1076b)

### Lösungen für *Ureaplasma*-Medium

#### Fetales Kälberserum

45 min bei 56°C inaktivieren

#### Yeastolate-Lösung 2%

Yeastolate 2 g  
Aqua dest. ad 100 ml  
sterilfiltrieren

### IV.IV.I *Ureaplasma*-Flüssigmedium

#### Teil A (autoklavierbar)

PPLO Broth 0,7 g  
Trypton 2 g  
Bacto-Pepton 1 g  
DNA 0,04 g  
Aqua dest. ad 130 ml  
pH 7,4

#### Teil B

CMRL-1066 Medium 10 ml  
Yeastolate-Lösung 2% 20 ml  
Fetales Kälberserum 17 ml  
Schweineserum 17 ml  
Urea 80 mg

Die Komponenten aus **Teil B** werden aseptisch zu der autoklavierten Lösung (**Teil A**) hinzugefügt.

### IV.IV.II *Ureaplasma*-Agarmedium

#### Teil A (autoklavierbar)

PPLO Broth 0,7 g  
Trypton 2 g  
Bacto-Pepton 1 g  
DNA 0,04 g  
Aqua dest. ad 126 ml

Die Lösung (**Teil A**) auf pH-Wert von 7,4 einstellen, autoklavieren. Nach Abkühlung auf 55°C: 2 g Bacto-Agar hinzufügen.



### Teil B

CMRL-1066 Medium	10 ml
Yeastolate-Lösung 2%	20 ml
Fetales Kälberserum	17 ml
Schweineserum	17 ml
Urea	80 mg

Die Komponenten aus **Teil B** aseptisch zu der autoklavierten Lösung (**Teil A**) hinzufügen.

## IV.V Flüssigmedium modifiziert nach HAYFLICK

Die Rezepte des modifizierten Hayflick-Mediums stammen aus der Arbeit von YAVARI (2010). In der vorliegenden Arbeit werden diese Medien als „AS-Medium“ bezeichnet.

### Lösungen für AS-Medium

**Fetales Kälberserum (FKS) „Ultra Low IgG“**  
45 min bei 56°C inaktivieren

### IV.V.I AS-Flüssigmedium (10%, 5%, 2,5%, 1%)

#### Teil A (autoklavierbar)

Heart Infusion Broth (HIB)	50 g
Bacto Peptone	10 g
Natriumchlorid (NaCl)	10 g
Phenolrot 0,1%	10 ml
Aqua dest.	ad 850 ml
pH 7,8	

#### Teil B (für 10% FKS)

„Ultra Low IgG“ FKS	100 ml
Frischhefeextrakt	50 ml

Für das Flüssigmedium mit 5%, 2,5% und 1% „Ultra Low IgG“ FKS werden folgende Komponenten variiert:

<b>5% FKS:</b>	<b>Teil A:</b> ad 900 ml Aqua dest.,	<b>Teil B:</b> 50 ml FKS
<b>2,5% FKS:</b>	<b>Teil A:</b> ad 925 ml Aqua dest.,	<b>Teil B:</b> 25 ml FKS
<b>1% FKS:</b>	<b>Teil A:</b> ad 940 ml Aqua dest.,	<b>Teil B:</b> 10 ml FKS

## Anhang V: Sequenzen für phylogenetische Untersuchungen

### V.I Verwendete Nukleotidsequenzen aviärer Mykoplasmen

Die 16S-rRNA-Gensequenzen sowie die 16S-23S-Intergenic-Transcribed-Spacer-Region (ITS)-Sequenzen sind unter folgenden Zugangsnummern (Accession Numbers) in der Nukleotid-Datenbank des NCBI (GenBank)<sup>4</sup> öffentlich zugänglich:

**Tabelle 33: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz und der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) aller in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidsequenzen aviärer Mykoplasmenpezies**

Spezies	GenBank Accession No.	
	16S-rRNA-Gen	ITS
<i>M. anatis</i>	NR_113689 (NR_025176)	AJ780982
<i>M. anseris</i>	NR_024977	AJ780983
<i>M. buteonis</i>	NR_025177	AJ780984
<i>M. corogypsi</i>	NR_025896	AJ780989
<i>M. cloacale</i>	NR_024985	AJ780985
<i>M. columbinasale</i>	NR_025062	AJ780986
<i>M. columbinum</i>	NR_025063	AJ780987
<i>M. columborale</i>	NR_025179	AJ780988
<i>M. falconis</i>	NR_024984	AJ780990
<i>M. gallopavonis</i>	NR_025183	AJ780993
<i>M. gallinaceum</i>	NR_025913	AJ780991
<i>M. gallinarum</i>	NR_044638	AJ780992
<i>M. gallisepticum</i>	NR_104952	AB098504
<i>M. glycyphilum</i>	NR_025184	AJ780994
<i>M. gypis</i>	NR_024982	AJ780995
<i>M. imitans</i>	NR_025912	AB098503
<i>M. iners</i>	NR_025064	AJ780996
<i>M. iowae</i>	NR_044669	AJ780997
<i>M. lipofaciens</i>	NR_025065	AJ780998
<i>M. meleagridis</i>	NR_025914	AJ780999
<i>M. pullorum</i>	NR_026017	AJ781000
<i>M. sturni</i>	NR_025968	AJ781001
<i>M. synoviae</i>	NR_044811	AJ781002
<i>M. vulturis</i>	NR_115162	FJ655917

<sup>4</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

## V.II Sequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenspezies des Synoviae-Clusters

Tabelle 34: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz und der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) aller in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidsequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenspezies des Synoviae-Clusters

Spezies	GenBank Accession No.	
	16S-rRNA-Gen	ITS
<i>M. alligatoris</i>	NR_118838	AY973559
<i>M. bovirhinis</i>	NR_025986	AY729933
<i>M. canis</i>	NR_028813	FJ666136
<i>M. citelli</i>	NR_025178	DQ847427
<i>M. crocodyli</i>	NR_074301	AY4778881
<i>M. cynos</i>	NR_025181	DQ847425
<i>M. edwardii</i>	NR_104953	AY741675
<i>M. felis</i>	NR_029174	AY274255
<i>M. leonicaptivi</i>	NR_025965	AY755603
<i>M. mustelae</i>	NR_025187	AY800344
<i>M. oxoniensis</i>	NR_025188	AY781780
<i>M. verecundum</i>	NR_125608	AY781781

## V.III Sequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenspezies des Hominis-Clusters

Tabelle 35: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz und der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) aller in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidsequenzen nicht-aviärer Mykoplasmenspezies des Hominis-Clusters

Spezies	GenBank Accession No.	
	16S-rRNA-Gen	ITS
<i>M. alkalescens</i>	NR_025984	AY816348
<i>M. arginini</i>	NR_041743	AY737013
<i>M. arthritidis</i>	NR_113688	AY973560
<i>M. auris</i>	NR_026035	AY772217
<i>M. buccale</i>	NR_024979	AY796064
<i>M. canadense</i>	NR_025988	DQ847418
<i>M. equirhinis</i>	NR_024978	DQ847421
<i>M. faucium</i>	NR_024983	AY800342
<i>M. gateae</i>	NR_029180	DQ847420
<i>M. hominis</i>	NR_113679	AY738737
<i>M. hyosynoviae</i>	NR_029183	AY973563
<i>M. indiense</i>	NR_024986	AY762640
<i>M. orale</i>	NR_113660	AY737010
<i>M. phocicerebrale</i>	NR_025133	AY766092
<i>M. phocidae</i>	NR_025133	AY840492
<i>M. spumans</i>	NR_024980	AY762642
<i>M. subdolum</i>	NR_024981	AY780803

## V.IV Sequenzen anderer Mykoplasmen

Tabelle 36: GenBank-Zugangsnummern (Accession No.) der 16S-rRNA-Gensequenz von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, der Isolate 1566/2012 und Sp22 sowie Zugangsnummern der 16S-23S-Intergenic-Spacer-Region (ITS) der Isolate 1566/2012 und Sp22.

Spezies / Isolat	GenBank Accession No.	
	16S-rRNA-Gen	ITS
<i>Mycoplasma mycoides</i> Subspezies <i>mycoides</i>	NR_074703	
<i>Mycoplasma</i> sp. Isolat 1566/2012	KP264574	KP264979
<i>Mycoplasma</i> sp. Strain Sp22	FN394055	FN394056

Das Isolat 1566/2012 stammt von einem Weißstorch, der in Ranstadt, Hessen, mit einer alten, offenen Humerusfraktur flugunfähig aufgefunden, und am 30.07.2012 in die Klinik für Vögel (KVRAF) der JLU Gießen vorgestellt wurde. Das Isolat Sp22 stammt aus der Lunge eines Weißstorches, aus dem Jahr 2002. Es war nicht möglich von den Autoren weitere Informationen zu diesem Fall zu erhalten.

## V.V ITS-Sequenzen der Mykoplasmen-Isolate aus der PhD-Arbeit von SUÁREZ-PÉREZ (2011)

Zusätzlich wurden folgende Vergleichssequenzen verwendet, die nicht über die NCBI-Datenbank zugänglich sind:

**T452T:** ITS-Sequenz eines nicht identifizierten Mykoplasmenisolates aus einem geschwächt aufgefundenen Weißstorch (SUÁREZ-PÉREZ 2011)

```
TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCTGGTAATGCCCGAAGTCGGTTTGTAGTCA
ACTACGGAGACAACCTGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA
GGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTTCTACGGAGTACACATAA
ACAATTTTATTGTTACTTAATTACCTTATTTTATGAATAATTTAGTCATGGGATATAT
CTAGTTTTGAGAGAATTTTCTCTCTATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAGATATTA
ATATAACAACGACATCAAAAATAAATTAGTCAATTTGTTTTGTGATACCGAGATTAT
TAGAAATAATAATTCGTTAAAATGTCTTTGAATACATCAACAATAGGAAAATATTGTT
ACAACTTTTAAATAAGTAAGAGTGTGTGGTGGATGCCTTGGGTCTGAAAGTCGATG
AAGGAC
```

**T453CO:** ITS-Sequenz eines nicht identifizierten Mykoplasmenisolates aus einem geschwächt aufgefundenen Weißstorch (SUÁREZ-PÉREZ 2011)

```
GGTTTGCTAACCTCGGAGGCGACCGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA
GTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTACGG
AGTACACTTAGTTATGGAACGAATATTTGTATCCAGTTTTGAGAGATTTATCTCTCTT
CTGTTCTTTGAAAACCTGAATATCGACATTGATATATTAATAATTTCAAAGTTT
AGATCAACCTATAGAATATTTATAAAAAAAGACAACAATAGGTCATACAACAAACA
AAATATAACGAAACAACCTATAACAAGATAAGAGTTT
```

**T454T:** ITS-Sequenz eines nicht identifizierten Mykoplasmenisolates aus einem geschwächt aufgefundenen Weißstorch (SUÁREZ-PÉREZ 2011)

```
CCCGAAGTCGGTTTATAAAGAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTTAA
GTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTTCTACGGA
GTACAAAACAGTCTATTTAATAGACTTTTTAAACCAAACCTTACTAGACCTGTACAAACA
TTTTTGTCATGTGACTTTTTATGGTCGGAGTCTTATATCTAGTTTTGAGAGGACAAA
ACTTCTCAATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAATATTTTTCGATATTTACAACGAC
ATCAAACAATAAATTAATTTGGTTAATTTGTTTTGATTCATCGAGTAATCATTATTAT
ATGATTCATTGAAATGTCTTAAAATACACATCTTAAAAACATAACAATAGGAAAATA
CTACTTT
```

## Anhang VI: Statistische Auswertung

### VI.I Berechnung der optimalen Wachstumstemperatur der Isolate ST57 und ST101

Tabelle 37: Berechnete Verdopplungszeiten (in Tagen) der Isolate ST57 und ST101 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Die Isolate wurden in SP4-Medium, 5% CO<sub>2</sub> bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert.

Temperatur	Verdopplungszeit (Tage)	
	Isolat	
	ST57	ST101
23°C	0,1612	0,1505
28°C	0,0967	0,1118
37°C	<u>0,0356</u>	0,0717
42°C	0,0605	0,0537
44°C	0	<u>0,0417</u>

Unterstrichen: niedrigste Verdopplungszeit (= schnellstes Wachstum)

### VI.II Prävalenzstudie

Tabelle 38: Datensatz für statistische Berechnungen der Nachweishäufigkeit von von *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. mittels ST57-PCR in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren: Verteilung der untersuchten Weißstorchnestlinge und zugehörigen Horste nach Regionen, der Anzahl Nestlinge pro Horst sowie dem Alter der Nestlinge pro Horst.

Region	Horst	Nestling	Nachweis	Nestlinge/ Horst	Alter
2	1	ST 1	1	2	2
2	1	ST 11	0	2	
2	2	ST 3	1	3	
2	3	ST 5	1	4	
2	4	ST 6	0	3	
2	4	ST 7	1	3	1
2	5	ST 10	0	3	2
2	6	ST 12	1	2	
2	6	ST 13	1	2	
*	7	ST 14	0	3	
2	8	ST 16	1	2	
2	9	ST 17	0		
2	10	ST 19	0	2	
2	10	ST 21	0	2	
2	11	ST 20	1		
2	12	ST 22	0	2	
2	13	ST 23	1	3	2
2	14	ST 24	1	mind. 3	
2	14	ST 25	0	mind. 3	

## ANHANG

Tabelle 38: Fortsetzung

Region	Horst	Nestling	Nachweis	Nestlinge/ Horst	Alter
2	14	ST 26	1	mind. 3	
2	15	ST 27	0	2	2
2	15	ST 28	0	2	2
2	16	ST 29	1	3	1
2	17	ST 34	0	3	2
1	18	ST 36	1	3	2
1	19	ST 37	1	3	1
1	20	ST 38	1	2	1
1	20	ST 39	1	2	1
1	21	ST 40	0	2	2
1	22	ST 41	1	4	2
1	22	ST 42	0	4	2
1	22	ST 43	1	4	2
1	23	ST 44	1	3	2
1	23	ST 45	0	3	2
1	24	ST 46	1	3	2
1	24	ST 47	1	3	2
1	25	ST 48	0	3	2
1	26	ST 51	0	3	2
1	26	ST 53	0	3	2
1	27	ST 54	1	3	2
1	27	ST 55	1	3	2
1	28	ST 56	1	2	2
1	28	ST 57	1	2	2
1	29	ST 58	1	1	2
1	30	ST 59	1	3	2
1	30	ST 60	0	3	2
1	31	ST 61	1	1	2
1	32	ST 62	0	3	2
1	32	ST 63	0	3	2
1	33	ST 64	1	3	2
1	34	ST 65	0	2	1
1	34	ST 66	0	2	1
1	35	ST 67	0	2	2
1	35	ST 68	1	2	2
1	36	ST 69	1	2	
1	37	ST 71	1	4	2
1	37	ST 72	1	4	2
1	37	ST 73	1	4	2
1	37	ST 74	0	4	2
1	38	ST 75	1	4	

## ANHANG

Tabelle 38: Fortsetzung

Region	Horst	Nestling	Nachweis	Nestlinge/ Horst	Alter
1	38	ST 76	1	4	
1	38	ST 77	1	4	
1	38	ST 78	1	4	
1	39	ST 79	0	3	
1	39	ST 81	0	3	
1	40	ST 82	0	3	
1	41	ST 84	0	mind. 2	
1	41	ST 85	0	mind. 2	
1	42	ST 87	1	1	1
1	42	ST 88	1	1	2
1	43	ST 90	1	mind. 2	
1	43	ST 91	1	mind. 2	
1	44	ST 92	1	2	1
1	44	ST 93	1	2	1
1	45	ST 94	0	3	2
1	45	ST 95	0	3	2
1	46	ST 99	1	3	2
1	46	ST 101	0	3	2
1	46	ST 102	1	3	2
2	47	ST 103	1	2	2
2	48	ST 104	1	3	2
2	49	ST 105	0	2	2
2	50	ST 107	0	mind. 2	
2	50	ST 108	1	mind. 2	
	50	84	49		

**Region:** 1 = Nord, 2 = Süd, \*= Isolat ST 14 stammte aus einer anderen Region und wurde als Ausreißer nicht in Berechnung einbezogen; **Nachweis:** 1 = ST57-PCR positiv, 0 = ST57-PCR negativ; **Nestlinge/Horst:** 1-4, zum Teil keine Angaben vorhanden, wenn Proben mehrerer Nestlinge vorlagen wurde auf dieser Basis mind. 2, 3 etc. eingetragen; **Alter** (geschätzt): 1 = bis 3 Wochen, 2 = über 3 Wochen



### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die das Entstehen und Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben, meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Michael Lierz möchte ich für Überlassung des Themas, Bereitstellung von Arbeitsplatz, Material und Literatur, die jederzeit gewährte, stets unkomplizierte und freundliche Unterstützung bei Fragen und Problemen, die konstruktiven Korrekturen der Dissertationsschrift sowie seinen stetigen Optimismus, herzlich danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Ralf Dörr (Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, JLU Gießen) für die unermüdliche Herstellung verschiedenster Medien, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Janet Bradbury und Frau Cynthia Dare (University of Liverpool) für die fachliche Unterstützung, insbesondere bei der Herstellung von Kaninchen-Hyperimmunseren, die Einladung nach Liverpool, und die Bereitstellung von Referenzstämmen und -antisera.

Sehr bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Daniel Brown (University of Florida, The Mollicutes Collection) für die Bereitstellung von Referenzstämmen und -antisera sowie die Unterstützung bei deren Import nach Deutschland. Bei Frau Dr. Sabine Gronow (DSMZ) bedanke ich mich insbesondere für die kompetente Beratung bei der Hinterlegung der Stämme und die hilfreichen Tipps für die Anzucht von Ureaplasmen.

Herrn Dr. Werner Herbst (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen) danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung der Elektronenmikroskopie und die Überlassung der Fotos. Weiterhin danke ich Herrn AkadD Dr. Klaus Failing und Herrn Andreas Schaubmar (AG Biomathematik und Datenverarbeitung, JLU Gießen) für die Unterstützung bei Erstellung und Interpretation der Statistik. Herrn Dr. Nils Hagen (Institut für Geflügelkrankheiten, FU Berlin) und allen an dem Projekt beteiligten Personen möchte ich für die Entnahme und Bearbeitung der Weißstorchproben danken, die den Grundstein für diese Arbeit gelegt haben.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische danke ich für das angenehme und häufig lustige Arbeitsklima. Herrn Dr. Dirk Enderslein danke ich für die Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen.

## DANKSAGUNG

---

Herrn AkadD a. D. Dr. Thomas Redmann, Frau Dr. Dagmar Sommer, Liane Schmidt, Björn Oberländer und Andreas Bublat vom „rasenden Geflügelgesundheitsdienst“ danke ich für ein offenes Ohr, viele nützliche Ratschläge und Unterstützung in allen Lebenslagen.

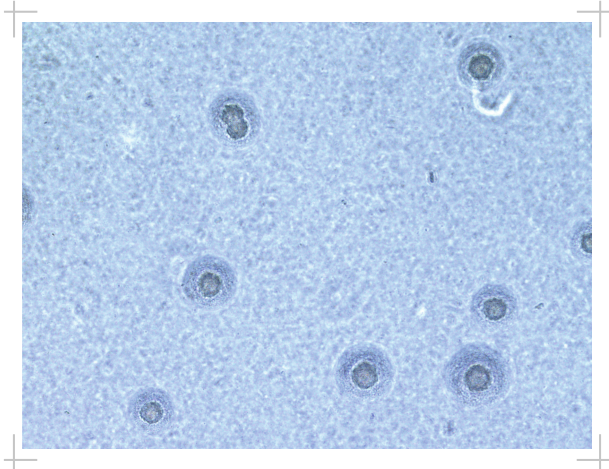
Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung und Benedikt für seine Geduld und dafür, trotz meiner vielen verrückten Ideen und chronischer Abwesenheit, immer für mich da zu sein.

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in dieser Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Aussagen beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter Wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Franca Möller Palau-Ribes



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6491-4



Picture front cover: © Zos Zwarts und Ardea  
(Official journal of the Netherlands Ornithologists' Union)