

Aus dem Department für Pathobiologie der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Mikrobiologie

(Leiterin: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. rer. Nat. Monika Ehling-Schulz)

**Phänotypische und genotypische Eigenschaften von Mykoplasmen-Isolaten aus
Humboldt-Pinguinen (*Spheniscus humboldti*)**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Veronika Finsterbusch

Wien, im Jänner 2021

Betreuer:

Priv.-Doz. Dr. med. vet. Joachim Spergser Dipl. ECVM

Department für Pathobiologie

Institut für Mikrobiologie

Veterinärplatz 1, 1210 Wien Österreich

Joachim.Spergser@vetmeduni.ac.at

Danksagung

Primär möchte ich mich bei Dr. Joachim Spergser für die Betreuung meiner Arbeit und bei den MitarbeiterInnen des mikrobiologischen Instituts für ihre Unterstützung bedanken,

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mich immer bedingungslos unterstützt haben und mir, so wie auch meine Brüder, stets mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch meine Freunde und Studienkollegen, die zu solchen geworden sind. Veronika, Jacob, Anna und Leo waren insbesondere auch während dem Verfassen dieser Arbeit für mich da und haben mich mit der richtigen Mischung aus Ablenkung und Motivation unterstützt.

In guten, sowie auch schwierigen Phasen meines Studiums, war Chia stets meine treue Begleiterin und eine emotionale Stütze.

Schlussendlich möchte ich mich auch bei allen, hier nicht namentlich erwähnten, Freunden bedanken, die mich auf dem Weg, mir diesen Traum zu erfüllen begleiteten und dieses Studium für mich zu einer großartigen Zeit, die ich auch vermissen werde, gemacht haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	1
1.1. Humboldt-Pinguine (<i>Spheniscus humboldti</i>).....	1
1.1.1. Taxonomie.....	1
1.1.2. Morphologie.....	2
1.1.3. Verbreitung.....	2
1.2. Krankheitserreger bei Pinguinen.....	3
1.2.1. Parasitäre Krankheitserreger.....	3
1.2.2. Virale Krankheitserreger.....	4
1.2.3. Bakterielle Krankheitserreger und Pilze.....	4
1.3. Mykoplasmen.....	6
1.3.1. Taxonomie.....	6
1.3.2. Biologie.....	7
1.4. Aviäre Mykoplasmen.....	8
1.5. Mykoplasmen bei Pinguinen.....	10
2. Material und Methode.....	11
2.1. Mykoplasmen-Isolate.....	11
2.2. Kultivierung.....	12
2.3. MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	13
2.4. DNA-Extraktion.....	13
2.5. Gensequenzanalysen.....	14
2.5.1. Amplifikation des 16S rRNA-Gens.....	15
2.5.2. Amplifikation der 16S-23S intergenischen Spacer-Region.....	16
2.5.3. Amplifikation eines <i>rpoB</i> -Genfragments.....	17
2.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.7. Aufreinigung der PCR-Produkte.....	19
2.8. Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse.....	19
2.9. Protein-Analyse.....	20
2.9.1. SDS-PAGE.....	21
2.9.2. Western Blot.....	22
2.10. Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	23
3. Ergebnisse.....	25

3.1.	Koloniemorphologie.....	25
3.2.	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	26
3.3.	Gensequenzanalysen	26
3.4.	Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse.....	29
3.5.	SDS-PAGE.....	41
3.6.	Western Blot.....	45
3.7.	Elektronenmikroskopie	47
4.	Diskussion	49
5.	Zusammenfassung.....	54
5.1.	Zusammenfassung.....	54
5.2.	Summary	56
6.	Abkürzungsverzeichnis	57
7.	Literaturverzeichnis.....	59
8.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	67
8.1.	Tabellenverzeichnis.....	67
8.2.	Abbildungsverzeichnis	68

1. Einleitung

Insgesamt wurden 27 Mykoplasmen-Isolate auf ihre phänotypischen und genotypischen Eigenschaften untersucht. Diese wurden bei pathologischen Untersuchungen von 21, zwischen 2003 und 2013 verendeten Humboldt-Pinguinen (*Spheniscus humboldti*), aus verschiedenen Organen isoliert. Die meisten Isolate wurden aus Organen des Respirationstrakts, wie Lunge, Trachea und Larynx, andere aber auch aus dem Maul, Ösophagus und der Milz gewonnen. Die betroffenen Pinguine stammten aus der Humboldt-Pinguin-Kolonie (*Spheniscus humboldti*) des Tiergartens Schönbrunn, in Wien. Ziel dieser Arbeit war es, die Mykoplasmen-Isolate, die keiner valide beschriebenen Mykoplasmenart zugeordnet werden konnten, durch phänotypische und genotypische Charakterisierung von anerkannten Mykoplasmenarten abzugrenzen und damit eine Basis für etwaige Speziesneubeschreibungen zu schaffen.

1.1. Humboldt-Pinguine (*Spheniscus humboldti*)

1.1.1. Taxonomie

Tabelle 1: Taxonomie der Humboldt Pinguine (Meyen 1834)

Reich	<i>Animalia</i>
Stamm	<i>Chordata</i>
Klasse	<i>Aves</i>
Ordnung	<i>Sphenisciformes</i>
Familie	<i>Spheniscidae</i>
Genus	<i>Spheniscus</i>
Spezies	<i>Spheniscus humboldti</i>

Die Gattung *Spheniscus* umfasst vier nahe verwandte Arten, nämlich die Brillenpinguine (*Spheniscus demersus*), die Magellan-Pinguine (*Spheniscus magellanicus*), die Galápagos-Pinguine (*Spheniscus mendiculus*) und die Humboldt-Pinguine (*Spheniscus humboldti*) (Baker et al. 2005).

Es wird angenommen, dass sich eine frühe Form von *Spheniscus* an der Pazifikküste aufgespalten hat und sich daraus Galápagos-Pinguine (*Spheniscus mendiculus*) und Humboldt Pinguine (*Spheniscus humboldti*) entwickelten (De la Puente et al. 2013).

1.1.2. Morphologie

Humboldt-Pinguine sind mittelgroße Pinguine mit einer Körperlänge von 67-72 cm und einem Körpergewicht von 4,2-5,0 kg (De la Puente et al. 2013). Es bestehen kaum Größenunterschiede zwischen den Geschlechtern, wobei männliche Tiere tendenziell geringfügig größer sind als weibliche (De la Puente et al. 2013, Wallace et al. 2008). Der Kopf ist größtenteils schwarz-grau befiedert mit einem weißen Kinn und einem schmalen weißen Streifen beidseits am Schädel, der das Auge umrandet und sich verbreitert, bevor er in den weißen Brustfleck übergeht. Um die Schnabelbasis befindet sich ein breiter, unbefiederter Rand. Die Körperoberseite, Flossen, Beine und Schwanz sind größtenteils schwarz-grau, im Gegensatz zur weißen Körperunterseite. Adulte Tiere besitzen ein hufeisenförmiges schwarzes Brustband, welches Küken und Jungtieren fehlt (De la Puente et al. 2013).

1.1.3. Verbreitung

Das Verbreitungsgebiet der Humboldt-Pinguine erstreckt sich über die Küstenregionen entlang des Humboldtstroms von Chile (5°12'S) und Peru (42°12'S) (Hays 1984, De la Puente 2013, Schlosser et al 2009). Die Anzahl der Humboldt-Pinguine hat sich in den letzten 200 Jahren drastisch verringert, beginnend mit der intensiven Nutzung der Guanoinseln von Peru Mitte des 19. Jahrhunderts. Intensiver Fischfang führte zu Nahrungsknappheit und dazu, dass Humboldt-Pinguine in Fischernetzen gefangen wurden. Ende des 19. Jahrhunderts ging man von einer Gesamtzahl in den Hunderttausenden aus, 1980 wurde die Population in Peru auf 45.000-60.000 geschätzt (Schlosser et al 2009, Hays 1984). Aktuell wird von einer Gesamtpopulation von etwa 32.000 ausgegangen. Heute ist der Humboldt-Pinguin auf der Roten Liste der *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) als gefährdet gelistet (BirdLife International 2018).

1.2. Krankheitserreger bei Pinguinen

1.2.1. Parasitäre Krankheitserreger

Flöhe und Zecken sind sehr weit verbreitete Ektoparasiten bei wildlebenden Pinguinen. Zecken sind als Vektoren für virale Erkrankungen und Blutparasiten relevant. Zudem können Federlinge auf fast allen subantarktischen sowie antarktischen Pinguinspezies gefunden werden.

Nematoden sind die bei Pinguinen verschiedener Spezies am häufigsten nachgewiesenen gastrointestinalen Parasiten. Aber auch Cestoden, Trematoden und *Acanthocephala* sind weit verbreitet (Clarke und Knowles 2000). Kokzidien konnten in Faeces von wildlebenden Pinguinen verschiedener Spezies nachgewiesen werden (Duignan 2001). Außerdem sind verschiedene Protozoen bei Pinguinen bekannt, wovon aber nur wenige eine klinisch relevante Pathogenität aufweisen. In subantarktischen und antarktischen Regionen konnten keine Blutparasiten nachgewiesen werden, es wird angenommen, dass dies auf ein Fehlen der Vektoren zurückzuführen ist (Clarke und Knowles 2000).

Aviäre Malaria, verursacht durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*, wird durch Stechmücken übertragen. Aviäre Plasmodien sind weit verbreitet und können überall dort wo entsprechende Vektoren vorhanden sind übertragen werden (Grilo et al 2016, Miller et al 2001). Der erste Bericht von Aviärer Malaria bei einem Pinguin betraf einen Königspinguin (*Aptenodytes patagonicus*) im Londoner Zoo im Jahre 1926 (Bak und Park 1984). Pinguine sind sehr empfänglich für die Erkrankung und sie ist insbesondere bei in Zoos gehaltenen Pinguinen eine der häufigsten Todesursachen (Grilo et al 2016). Bei Jungtieren und zuvor nicht exponierten Adulten kann die Mortalität bis zu 50 % betragen (Miller et al 2001). Aufgrund des Vektoraufkommens sind Krankheitsausbrüche in der nördlichen Hemisphäre auf den Zeitraum zwischen Juni und Oktober konzentriert. Klinische Symptome sind sehr unspezifisch und plötzliche Todesfälle ohne vorangehende Klinik sind häufig (Grilo et al 2016).

1.2.2. Virale Krankheitserreger

Serumantikörper gegen das Newcastle-Disease-Virus (NDV) und andere Aviäre Paramyxoviren konnten in verschiedenen Pinguinspezies nachgewiesen werden. Aviäre Influenzaviren sind bei Wildvögeln weit verbreitet und Serumantikörper konnten auch in wildlebenden Pinguinen gefunden werden. Bei Untersuchungen auf Flaviviren konnte eine sehr geringe Prävalenz festgestellt werden. Dies könnte auf eine niedrige Infektionsrate hinweisen oder darauf, dass es nur bei wenigen Individuen zu einer Serokonversion und Überleben kommt. Serumantikörper gegen das Infectious-Bursal-Disease-Virus (IBDV) wurden bei Pinguinen in der Antarktis nachgewiesen, möglicherweise wurde das Virus über kontaminierte Geflügelprodukte eingeschleppt (Clarke und Knowles 2000, Duignan 2001). Krankheitsfälle, die der Infektiösen Laryngotracheitis bei Geflügel ähnelten und möglicherweise auf eine Herpesvirus-Infektion zurückzuführen waren, wurden in einem Zoo in Nordamerika beschrieben (Kincaid et al 1988). Von ähnlichen Fällen bei in Zoos gehaltenen Humboldt-Pinguinen (*Spheniscus humboldti*) und Brillenpinguinen (*Spheniscus demersus*) konnte ein Alphaherpesvirus isoliert werden (SpAHV-1) (Pfaff et al 2017).

1.2.3. Bakterielle Krankheitserreger und Pilze

Bei Untersuchungen zur Darmflora verschiedener wildlebender Pinguine konnte eine Vielzahl der im Darmtrakt gesunder Pinguine auftretender Bakterien, wie *Escherichia (E.) coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp. und *Pseudomonas* spp. identifiziert werden. Enteritiden verursacht durch *E. coli* und *Klebsiella* spp. wurden bei in menschlicher Obhut gehaltenen Pinguinen beschrieben. Ein Todesfall bei einem Goldschopfpinguin (*Eudyptes chrysolophus*), verursacht durch *Pseudomonas pseudomallei* ereignete sich in einem Zoo in Hong Kong (Clarke und Knowles 2000). Im Dresdener Zoo konnte *Pseudomonas aeruginosa* als hauptsächlicher Erreger schwerer Infektionen in einer Gruppe von Humboldt-Pinguine (*Spheniscus humboldti*) festgestellt werden (Widmer et al. 2016). Obwohl Salmonellen aus wildlebenden antarktischen Pinguinen isoliert werden konnten, waren diese Nachweise nicht mit Krankheiten assoziiert und es ist unklar ob die Erreger von anderen Vogelarten oder Menschen eingeschleppt wurden. *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Anatis sind als Krankheitserreger bei in menschlicher Obhut gehaltenen Pinguinen bekannt. Bei in Zoos gehaltenen Felsenpinguinen (*Eudyptes*

chrysocome) wurde von chronischen Enteritiden, verursacht durch *Edwardsiella tarda*, berichtet (Clarke und Knowles 2000). In verschiedenen wildlebenden Pinguinkolonien wurden Antikörper gegen Chlamydien nachgewiesen (Clarke und Knowles 2000, Duignan 2001). Im San Francisco Zoo kam es 2005 zu einem *Chlamydia psittaci*-Ausbruch bei Magellan-Pinguinen (*Spheniscus magellanicus*) (Jencek et al. 2012). *Pasteurella multocida*, der Erreger der Geflügelcholera, wurde aus plötzlich verstorbenen Felsenpinguinen (*Eudyptes chrysocome*) isoliert (de Lisle et al. 1990). Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* konnten in Königspinguinen (*Aptenodytes patagonicus*) ermittelt werden (Duignan 2001).

Die Aspergillose ist eine infektiöse, nicht-ansteckende Mykose, die eine häufige Todesursache bei in menschlicher Obhut lebenden Vögeln darstellt und seltener bei wildlebenden Vögeln auftritt. Es wird angenommen, dass hohe Sporenkonzentrationen in der Umgebung und Immunschwäche wichtige prädisponierende Faktoren sind (Beernaert et al. 2010). *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus flavus* sind bei in Zoos lebenden Pinguinen weit verbreitet und Krankheitsausbrüche werden fast immer nach Stresssituationen oder bei bereits vorliegenden Krankheiten, meist kurz nach dem Einfangen und dem Verbringen in einen Zoo, beobachtet. Die respiratorische Form der Erkrankung ist dabei häufiger als die zentralnervöse (Clarke und Knowles 2000).

1.3. Mykoplasmen

1.3.1. Taxonomie

Tabelle 2: Taxonomie der Mykoplasmen (Brown 2010)

Reich	<i>Bacteria</i>
Stamm	<i>Tenericutes</i>
Klasse	<i>Mollicutes</i>
Ordnung	<i>Mycoplasmatales</i>
Familie	<i>Mycoplasmataceae</i>
Genus	<i>Mycoplasma</i>

Mykoplasmen sind Bakterien, die taxonomisch dem Stamm *Tenericutes* (*tener*, zart; *cutis*, Haut) angehören, dem nur eine Klasse, *Mollicutes* (*mollis*, weich; *cutis*, Haut), zugeordnet wird.

Vertreter dieser Klasse, sind Bakterien mit sehr kleinen Genomen (0,58-2,2 Mbp), die einen geringen Guanin und Cytosin (G+C) Gehalt von ca. 23 bis 40 Mol% aufweisen. Das wichtigste Charakteristikum, das sie von anderen Prokaryoten unterscheidet, ist das Fehlen einer Zellwand, da sie weder Peptidoglykan noch dessen Vorstufen synthetisieren können. Der Klasse *Mollicutes* gehören vier Ordnungen an, nämlich *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* und *Anaeroplasmatales*. Die der Ordnung *Mycoplasmatales* zugehörige Familie der *Mycoplasmataceae* enthält die beiden Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma* (Razin und Tully 1983, Brown 2010, Tully et al. 1993).

Vergleichende phylogenetische Analysen legten nahe, dass Mykoplasmen sich durch degenerative Evolution aus der *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Gruppe der *Firmicutes* entwickelt haben (Woese et al. 1980, Woese 1987, Brown 2010).

1.3.2. Biologie

Mykoplasmen sind die kleinsten selbst-replizierenden Prokaryoten. Sie sind pleomorph mit einem Durchmesser von 300-800 nm und Genomgrößen zwischen 0,58-2,20 Mbp (Weisburg et al 1989, Brown 2010). Die Zellwandlosigkeit ist verantwortlich für die meisten für Mykoplasmen typischen Eigenschaften, einschließlich ihrer Morphologie, Plastizität und osmotischer Fragilität (Razin und Tully 1983, Brown 2010, Miles 1992). In ihrer Form sehr variabel, können sie sphärisch, ovoid, flaschenförmig, helikal oder filamentös sein, mit Längen zwischen 50 und 500 nm. Durch das Fehlen einer Zellwand sind sie nur von einer Plasmamembran umgeben, was sie in der Gramfärbung gramnegativ erscheinen lässt. Manche Mykoplasmen besitzen eine spezielle *tip*-Struktur, die ihnen Adhäsion an die Wirtszelle und andere Oberflächen ermöglicht (Brown 2010). Die Bindung der Mykoplasmen an die Wirtszellen ist Voraussetzung für Kolonisierung und Infektion (Razin und Jacobs 1992). Mykoplasmen sind in der Regel unbeweglich, bei manchen Spezies konnte aber gleitende Motilität nachgewiesen werden. Sie sind aerob oder fakultativ anaerob und die Temperatur für optimales Wachstum ist für die Spezies, die in endothermen Wirten auftreten, 37°C, für aus ektothermen Wirten (Fische, Reptilien) isolierte Spezies 20-28°C. Bezüglich der von ihnen benötigten Nährstoffe gehören sie zu den anspruchsvollsten Prokaryoten. Aufgrund ihres reduzierten Genoms sind sie in ihren Biosyntheseleistungen sehr eingeschränkt und stark von einer exogenen Nährstoffzufuhr vom Wirt/Kulturmedium abhängig. Sie besitzen keinen Tricarbonsäurezyklus, für ihr Wachstum benötigte Sterole und Fettsäuren können sie nicht selbst synthetisieren und müssen diese aus ihrer Umgebung beziehen (Razin und Tully 1983, Brown 2010). Als Energiequelle dient Mykoplasmen ATP, das sie vorrangig aus Substratkettenphosphorylierung gewinnen (Wieslander und Rosén 2002). Einige Mykoplasmen sind in der Lage durch Glykolyse Glukose und andere Kohlenhydrate abzubauen. Bei anderen Spezies erfolgt die Energiegewinnung durch Hydrolyse von Arginin oder Harnstoff (Ureaplasmen) oder durch Oxidierung von organischen Säuren wie Pyruvat oder Laktat (Miles 1992). Als Pathogene, Kommensale und Saprophyten sind sie weit verbreitet und können in verschiedensten Wirten gefunden werden. Trotz ihrer ubiquitären Verbreitung zeigen die meisten Mykoplasmenarten hohe Wirtsspezifität (Razin und Tully 1983). Verschiedene Berichte von Mykoplasmen, die aus für sie unüblichen Wirten isoliert wurden, lassen darauf schließen, dass die Wirtsspezifität bei einigen Mykoplasmenarten

möglicherweise weniger stark ausgeprägt ist als bisher angenommen (Pitcher und Nicholas 2004). Vorrangig besiedeln sie die Schleimhäute des Respirations- und Urogenitaltrakts, aber auch in Gelenken, den Augen, auf serösen Häuten und in der Milchdrüse können Mykoplasmen nachgewiesen werden (Razin und Tully 1983, Levisohn und Kleven 2000).

1.4. Aviäre Mykoplasmen

Aviäre Mykoplasmen mit der größten veterinärmedizinischen Bedeutung sind die vier Geflügelpathogene *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* und *Mycoplasma iowae*. Wie auch viele andere Mykoplasmen spezialisiert besitzen sie die Fähigkeit ihre Oberflächenantigene zu verändern. Man nimmt an, dass dieser Mechanismus es ihnen ermöglicht, sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen und somit zu persistieren.

Als Pathogene spielen *M. gallisepticum* und *M. synoviae* bei Hühnern und Puten und *M. meleagridis* und *M. iowae* bei Puten eine große Rolle und verursachen vor allem respiratorische Symptome und Gelenksentzündungen, aber auch zentralnervöse Störungen. Dazu kommt eine verminderte Produktionsleistung, wie geringere Gewichtszunahmen und Legeleistung, was zu erheblichen wirtschaftlichen Folgen führt. Trotz großangelegter Eradikationsprogramme sind Mykoplasmeninfektionen, insbesondere die mit *M. gallisepticum* und *M. synoviae* weltweit in der Geflügelproduktion präsent. Die Besiedelung des Respirationstrakts erfolgt über das Inhalieren von infektiösen Aerosolen. Große Populationen auf engem Raum fördern diesen Übertragungsweg. Zusätzlich ist die Übertragung vertikal und bei *M. meleagridis* und *M. iowae* über den Deckakt möglich (Bradbury 2005). *M. gallisepticum* konnte als Erreger von Konjunktividen bei Finken, wie Hausgimpeln (*Carpodacus mexicanus*) nachgewiesen werden. Die schweren Infektionen sind ursächlich für einen starken Populationsrückgang von Hausgimpeln (*Carpodacus mexicanus*) im Osten Nordamerikas (Ley et al. 1995, Hartup et al. 2001). Außerdem konnte *M. gallisepticum* gelegentlich aus Perlhühnern, Fasanen, Rebhühnern und Wachteln isoliert werden (Jordan 1975). Weitere Mykoplasmen konnten von verschiedenen domestizierten, aber auch Wildvögeln isoliert werden und damit gibt es bis heute 29 anerkannte aviäre Mykoplasmen spezialisiert (Siegman und Neumann 2012, Gyuranecz et al. 2020, Spersger et al.

2020, Ziegler et al. 2019, Volokhov et al. 2020, Möller Palau-Ribes et al. 2016, Yavari et al. 2017). Diese sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Mykoplasmen bei Vögeln (Siegman und Neumann 2012, Gyuranecz et al. 2020, Spersger et al. 2020, Ziegler et al. 2019, Volokhov et al. 2020, Möller Palau-Ribes et al. 2016, Yavari et al. 2017)

Spezies	Hauptwirte
<i>M. anatis</i>	Ente
<i>M. anseris</i>	Gans
<i>M. buteonis</i>	Bussarde u.a.
<i>M. cloacale</i>	Pute, Gans
<i>M. columbinasale</i>	Taube
<i>M. columbinum</i>	Taube
<i>M. columborale</i>	Taube
<i>M. corogypsy</i>	Geier
<i>M. falconis</i>	Falke
<i>M. gallinaceum</i>	Huhn u.a.
<i>M. gallinarum</i>	Huhn, Pute, u.a.
<i>M. gallisepticum</i>	Huhn, Pute u.a.
<i>M. gallopavonis</i>	Pute
<i>M. glycyphilum</i>	Huhn u.a.
<i>M. gypis</i>	Geier
<i>M. iners</i>	Huhn, Pute u.a.
<i>M. iowae</i>	Pute, Huhn
<i>M. imitans</i>	Gans, Ente u.a.
<i>M. lipofaciens</i>	Huhn, Pute
<i>M. meleagridis</i>	Pute u.a.
<i>M. pullorum</i>	Huhn u.a.
<i>M. sturni</i>	Stare
<i>M. synoviae</i>	Huhn, Pute u.a.
<i>M. anserisalpinitidis</i>	Gans
<i>M. hafezii</i>	Wanderfalke
<i>M. nasistruthionis</i>	Strauß
<i>M. struthionis</i>	Strauß
<i>M. ciconiae</i>	Weißstorch
<i>M. tullyi</i>	Humboldtpinguin

Aus den Choanen von Brillenpinguinen (*Spheniscus demersus*), die wiederkehrenden mukös-käsigen Choanenausfluss aufwiesen wurde eine neue Mykoplasmenspezies, die *Mycoplasma sphenisci* genannt wurde, isoliert (Frasca et al. 2005). Die Speziesbeschreibung erfüllte jedoch

nicht die Kriterien zur Neubeschreibung von Mykoplasmen (Brown et al. 2007), die Namensgebung ist somit nicht anerkannt (Yavari 2010).

1.5. Mykoplasmen bei Pinguinen

Aus dem Choanenabstrich eines Brillenpinguins (*Spheniscus demersus*) wurde, wie schon erwähnt, eine zuvor noch nicht beschriebene Mykoplasmenspezies, *Mycoplasma sphenisci*, isoliert. Der betroffene Pinguin wurde in einem Zoo-Aquarium, gemeinsam mit Felsenpinguinen (*Eudyptes cretatus*) und Zwergpinguinen (*Eudyptula minor*) gehalten. Er zeigte Halitosis und wiederkehrend mukösen, käsigen Ausfluss der Choanen (Frasca et al. 2005).

Mycoplasma tullyi wurde aus der Leber eines verendeten Humboldt-Pinguin (*Spheniscus humboldti*), der in einer Kolonie im Chester Zoo gehalten wurde, isoliert und beschrieben. Weitere Isolate dieser neuen Mykoplasmenspezies konnten in den Tracheen von 20 Humboldt-Pinguinen in verschiedenen Standorten in Großbritannien und Irland nachgewiesen werden (Yavari et al. 2017).

Aus der Lunge eines wildlebenden Fjordlandpinguins (*Eudyptes pachyrhynchus*), in Neuseeland wurde *Mycoplasma lipofaciens* isoliert. Der Vogel wies eine ausgeprägte Bronchopneumonie auf (Buckle et al. 2013). Im Rahmen einer Studie zur Evaluierung des Gesundheitszustands von Brillenpinguinen (*Spheniscus demersus*) in Südafrika wurden in wildlebenden Individuen Antikörper gegen *Mycoplasma gallisepticum* und *Mycoplasma synoviae* nachgewiesen (Parsons et al. 2016).

Bei Untersuchungen zum Darmmikrobiom von Pinguinen, konnte in Faeces wildlebender Königspinguine (*Aptenodytes patagonicus*), Eselspinguine (*Pygoscelis papua*), Goldschopfpinguine (*Eudyptes chrysolophus*) und Zwergpinguine (*Eudyptula minor*) Mykoplasmen-DNA nachgewiesen werden, die aber nicht genauer differenziert wurde (Dewar et al. 2013).

2. Material und Methode

2.1. Mykoplasmen-Isolate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 27 Mykoplasmen-Isolate untersucht. Die Isolate wurden aus 22 verschiedenen Humboldt-Pinguinen (*Spheniscus humboldti*) und unterschiedlichen Organen, vorrangig dem Respirationstrakt, gewonnen. Die Isolate waren in SP4-Flüssigmedium bei -80 °C kryokonserviert.

Tabelle 4: Mykoplasmen-Isolate (Bezeichnung, Isolationsjahr, Habitat, Gruppierung/Artbestimmung mittels MALDI-TOF)

Nummer	Jahr	Habitat	Art (MALDI-TOF)
1802A	2003	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
2068K1	2003	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
1173	2008	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
1914B	2008	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
3380	2011	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
1939	2011	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
1669	2010	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
350	2013	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
2499	2017	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
12B	2013	Larynx	<i>Mycoplasma</i> sp. A
2564B	2018	Trachea	<i>Mycoplasma</i> sp. A
2855A	2018	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. A
2068K2	2003	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. B
1052	2003	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. B
1123	k.A.	Ösophagus	<i>Mycoplasma</i> sp. B
2303	2018	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. B
2607	2018	Trachea	<i>Mycoplasma</i> sp. B
2855C	2018	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. B
12A	2013	Larynx	<i>Mycoplasma</i> sp. C

2606	2017	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. C
2564A	2018	Trachea	<i>Mycoplasma</i> sp. C
2855B	2018	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. C
1821K1	2008	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. C
T	k.A.	Trachea	<i>Mycoplasma</i> sp. D
2562	2006	Lunge	<i>Mycoplasma</i> sp. E
M	k.A.	Maul	<i>Mycoplasma</i> sp. F
2609	2018	Milz	<i>M. tullyi</i>

k.A keine Angaben

2.2. Kultivierung

Eine kleine Menge von etwa 100 µl der kryokonservierten Isolate wurde in 4 ml SP4 Flüssigmedium (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) verbracht und bei 37°C aerob bebrütet. Das Wachstum der Mykoplasmen wurde durch Farbumschlag des Medium kontrolliert. Die Inkubationszeiten bis zum sichtbaren Farbumschlag variierten zwischen 24 und 48 Stunden. Zu einem roten Farbumschlag kam es bei *Mycoplasma* sp. A, *Mycoplasma* sp. B, *Mycoplasma* sp. D, und *Mycoplasma* sp. F. *Mycoplasma* sp. A zeigte eine kräftigere Rotfärbung als die anderen Arten. *Mycoplasma* sp. C und *M. tullyi* hingegen zeigten einen Farbumschlag zu gelb und *Mycoplasma* sp. E zu orange. Ein Farbumschlag des Phenolrot Indikators im SP4-Medium zu orange oder gelb zeigt einen sauren pH an, welcher für Glukose Fermentation spricht. Arginin Hydrolyse führt zu einem basischen pH und wird durch einen Farbumschlag zu kräftigem Rot sichtbar (Masover und Becker, 1998).

Aliquots von jeweils 100 µl wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Beurteilung der Koloniemorphologie wurden ausgewählte Isolate (1802A, 1052, 2606, T, 2562, M, 2609) auf SP4 Agar (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) angezüchtet. 100 µl Flüssigkultur wurden auf einer SP4-Agarplatte passagiert und anschließend für drei bis vier Tage bei 37 °C in 7%iger CO₂-Atmosphäre bebrütet und die Kulturen anschließend bei 40-facher Vergrößerung mit einem Stereomikroskop (Olympus, Deutschland) untersucht.

2.3. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Um die Isolate einer Art zuzuordnen und um zu überprüfen, ob es sich um Reinkulturen handelt wurden diese mittels MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*) Massenspektrometrie untersucht. Dazu wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur in einem Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und bei 20000 x g sieben Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das zurückgebliebene Pellet in 100 µl Wasser (HPLC-Grad, Sigma-Aldrich, Österreich) gelöst. Diese Suspension wurde wiederum bei 20000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und das zurückgebliebene Pellet in 15 µl 70%iger Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Österreich) und 15 µl Acetonitril (100%ig, Sigma-Aldrich, Österreich) gelöst und bei 20000 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde 1 µl der Suspension auf eine MALDI-Trägerplatte aus Edelstahl (Bruker Daltonik, Deutschland) pipettiert und luftgetrocknet. Danach wurde die Probe mit 1 µl α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure-Matrixlösung (Bruker Daltonik, Deutschland) überschichtet und wieder luftgetrocknet. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit dem Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics, Deutschland) durchgeführt und die FlexControl 3.4 und MTB Compass Explorer 4.1 Software wurden verwendet, um die generierten Spektren mit der systemintegrierten und der In-House Referenzspektren-Datenbank zu vergleichen. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

2.4. DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden erst Pellets hergestellt, indem 1 ml Flüssigkultur bei 20000 x g für sieben Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert wurde. Die Pellets wurden bis zur DNA-Extraktion bei -20°C gelagert.

Zur Extraktion der DNA wurde ein kommerzielles Kit, *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma- Aldrich, USA), verwendet und die Extraktion nach Herstellerangaben durchgeführt.

Das Vorbereiten der Filterröhrchen erfolgte, indem die Filter mit 500 µl Filterpräparationslösung befüllt und eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert wurden, dann wurde der Filter in ein neues Röhrchen überführt. Die Pellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Zum Resuspendieren der Zellen wurde das Pellet in 200 µl Resuspensionslösung

gründlich gelöst. Für die Zell-Lyse wurden der Suspension 20 µl Proteinase K-Lösung und 200 µl Lyse-Lösung hinzugefügt, für 15 Sekunden gevortext und anschließend für zehn Minuten bei 70 °C im Thermoblock (Eppendorf AG, Deutschland) inkubiert. Danach wurden dem Lysat 200 µl Ethanol (95-100 %) hinzu pipettiert und für zehn Sekunden gevortext. Anschließend wurde das gesamte Lysat in das Filtrerröhrchen übergeführt und für eine Minute bei 6500 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Für den folgenden Waschschrift wurden 500 µl der zuvor mit Ethanol verdünnten Waschlösung in das Filtrerröhrchen gegeben und bei 6500 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Der zweite Waschschrift wurde ebenso durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, dass diesmal für drei Minuten mit 14000 x g zentrifugiert wurde. Nach Überführen des Filters in ein frisches Röhrchen wurde die DNA nun eluiert, indem 200 µl Elutionslösung zugegeben, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 6500 x g für eine Minute zentrifugiert wurde. Die gewonnen DNA wurde anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

2.5. Gensequenzanalysen

Von den in Tabelle 4 gelisteten Mykoplasmenisolaten wurden folgende repräsentative Stämme für die Gensequenzanalyse ausgewählt: *Mycoplasma* sp. A – 1802A, 1173, 1669, 350, 2499, 2855A, *Mycoplasma* sp. B – 2068K2, 1052, 1123, 2303, 2607, 2855C, *Mycoplasma* sp. C – 12A, 2606, 2564A, 2855B, 1821K1, *Mycoplasma* sp. D – T, *Mycoplasma* sp. E – 2562, *Mycoplasma* sp. F – M, *M. tullyi* – 2609.

Zur Durchführung der PCR wurde OneTaq®Quick-Load® DNA-Polymerase (OneTaq) (New England BioLabs®, USA) und je nach Zielsequenz verschiedene Primer (Thermo Scientific, Österreich), die in Tabelle 5 gelistet sind, verwendet. Ein Mastercycler® Nexus (Eppendorf, Deutschland) wurde verwendet, um die thermozyklischen Bedingungen zu gewährleisten.

Tabelle 5: Für die PCR verwendete Primer (Zielsequenz, Primer ID, Primer-Sequenz, Referenz)

Zielsequenz	Primer ID	Primer-Sequenz	Referenz
16S rRNA-Gen	27f	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	(Lane 1991)
	1492r	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	
16S-23S intergenische Spacer-Region	ITSavian-F	5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3'	(Ramírez et al. 2008)
	ITSavian-R	5'-CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3'	
<i>rpoB</i> -Genfragment	rpoB-F-MYC	5'-AGT TAT CAC AAT TTA TGG ATC AAA-3'	(Volokhov et al. 2007)
	rpoB-R-MYC	5'-GCT CAH ACT TCC ATT TCH CCA AA-3'	
	MPF1	5'-GAY ATT GAT CAC TTA GGT AA-3'	(Kim et al. 2003)
	MPF2	5'-AGA TGA TGA YCC NGA TTC A-3'	

2.5.1. Amplifikation des 16S rRNA-Gens

Zur taxonomischen Einordnung der verschiedenen Mykoplasmenisolate wurde das 16S rRNA-Gen mittels PCR amplifiziert und anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen.

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-Genamplifikation.

Bestandteil	Volumen
OneTaq	12,5 µl
Vorwärts-Primer 27f	0,65 µl
Rückwärts-Primer 1492r	0,65 µl
DNA	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 7: Thermozyklische Bedingungen für die 16S rRNA-Genamplifikation

Schritt	°C	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	2 min	30
Annealing	50 °C	1,5 min	
Elongation	72 °C	5 min	
Finale Elongation	72 °C	1 min	1

2.5.2. Amplifikation der 16S-23S intergenischen Spacer-Region

Als ein weiterer phylogenetischer Marker wurde die 16S-23S intergenische Spacer-Region mittels PCR vervielfältigt und analysiert.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Amplifikation der 16S-23S intergenische Spacer-Region

Bestandteil	Volumen
OneTaq	12,5 µl
Vorwärts-Primer ITSavianF	0,5 µl
Rückwärts-Primer ITSavianR	0,5 µl
DNA	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 9: Thermozyklische Bedingungen die Amplifikation der 16S-23S intergenische Spacer-Region

Schritt	°C	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	0,25 min	1
Denaturierung	95 °C	0,25 min	35
Annealing	60 °C	0,5 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

2.5.3. Amplifikation eines *rpoB*-Genfragments

Zur phylogenetischen Klassifizierung wurde außerdem noch ein Teilfragment des *rpoB*-Gens amplifiziert. Für die 21 Isolate wurden die Primer „*rpoB*-F-MYC“ und „*rpoB*-R-MYC“ verwendet. Das *M. tullyi*-Isolat 2609 wurde zusätzlich mit 2 anderen Vorwärts-Primern, „MPF1“ und „MPF2“, amplifiziert, da mit „*rpoB*-F-MYC“ keine Amplifikation erreicht werden konnte.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Amplifikation des *rpoB*-Genfragments

Bestandteil	Volumen
OneTaq	25 µl
Vorwärts-Primer <i>rpoB</i> -F-MYC/MPF1/MPF2	1 µl
Rückwärts-Primer <i>rpoB</i> -R-MYC	1 µl
DNA	3,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 11: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des *rpoB*-Genfragments

Schritt	°C	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	6 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	45
Annealing	50 °C	1 min	
Elongation	68 °C	2 min	
Finale Elongation	68 °C	5 min	1

2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 2%iges Agarose-Gel hergestellt indem 6 g Agarose (Sigma-Aldrich, Österreich) in 300 ml 1 x TBE-Pufferlösung (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) (Roth, Germany) gelöst und erhitzt wurden und anschließend in eine Gelkammer mit Geltaschenkamm gegossen und ausgehärtet wurde. In die Geltaschen wurden je 8 µl des PCR-Produktes und in eine 4,5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (*Gene Ruler 100 Basenpaare plus DNA ladder*, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) gefüllt. Das beladene Gel wurde anschließend bei 220 Volt für etwa 60 Minuten in der Laufkammer des Bio-Rad Powerpac300 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) laufen gelassen. Zur Färbung wurde das Gel anschließend für 20 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (2,5 mg/l) eingelegt und dann in einem Wasserbad entfärbt. Zur Visualisierung wurde ein Transilluminator Gel Doc2000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) verwendet.

2.7. Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden für jede Probe 1 µl Exonuclease I (Sigma-Aldrich, Österreich) und 2 µl rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (Sigma-Aldrich, Österreich) in ein Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und anschließend 10 µl des PCR-Produkts. Im Mastercycler® Nexus (Eppendorf, Deutschland) fand die Aufreinigung dann unter folgenden thermischen Bedingungen statt, 15 Minuten bei 37 °C und abschließend 15 Minuten bei 80 °C. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend 1:1 mit dH₂O verdünnt und jeweils 13 µl der Verdünnung wurden mit 2 µl des entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primers versetzt und zur Sequenzierung versandt.

Acht PCR-Produkte der *rpoB*-Gen-Amplifikation (2499, 2855A, 2855B, 2562, 1173, 2606, 2564A, 2609) und fünf PCR-Produkte der 16S-23S intergenischen Spacer-Region-Amplifikation wurden mit Hilfe des *GeneJet PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) aufgereinigt. Im ersten Schritt wurden 22 µl DNA-Bindungspuffer und 22 µl PCR-Produkt gemischt. Nachdem eine gelbliche Verfärbung erkennbar wurde, wurden nun 22 µl Isopropanol hinzupipettiert. Die Lösung wurde in eine Filtereinheit übergeführt und eine Minute bei 12500 x g zentrifugiert, das Zentrifugat wurde verworfen. Auf den Filter wurden nun 700 µl Waschpuffer pipettiert und wiederum für eine Minute bei 12500 x g zentrifugiert, das Zentrifugat wurde verworfen. Eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 12500 x g wurde durchgeführt, um verbliebene Waschpufferreste zu entfernen. Nachdem die Filtereinheit nun in ein frisches Eppendorf-Röhrchen gesteckt wurde, wurden 50 µl Elutionspuffer hinzugefügt und nach 5 Minuten erneut bei 12500 x g für eine Minute zentrifugiert.

Je 14 µl aufgereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2 µl des entsprechenden Primers versetzt und zur Sequenzierung an LGC Genomics, Berlin, versandt.

2.8. Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse

Zur Klassifizierung der untersuchten Mykoplasmenisolate wurden die übermittelten Sequenzen (16S rRNA-Gene, 16S-23S intergenische Spacer-Region, *rpoB*) mit Einträgen in der öffentlichen GenBank-Datenbank unter Anwendung des BLAST-Algorithmus verglichen

und dabei Sequenzähnlichkeitswerte ermittelt. Durch die erhaltenen Werte konnten die Mykoplasmenisolate den entsprechenden, auf 16S rRNA-Gensequenzen beruhenden, phylogenetischen Clustern zugeordnet werden. Anschließend wurden die Sequenzen (16S rRNA-Gene, *rpoB*) der Typstämme von nächstverwandten Mykoplasmenarten aus dem Genbank-Datenpool extrahiert und mit den ermittelten Sequenzen der untersuchten Mykoplasmenisolate unter Anwendung des ClustalW-Alignments ausgerichtet. Nachfolgend wurden Neighbour-Joining-Distanzanalysen mit Bootstrapping (1000 Replikationen) unter Einsatz des Kimura-2-Parameter-Substitutionsmodells (Dayhoff-Modell für *rpoB*-Aminosäuresequenzen) durchgeführt (MEGA 6 Software) und die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse anhand der konstruierten Stammbäume dargestellt.

2.9. Protein-Analyse

Zur Proteinanalyse der 21 Isolate und der Typstämme der nächstverwandten Mykoplasmenarten wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Für die Isolate die als *Mycoplasma* sp. A identifiziert wurden und die Typstämme der nächstverwandten Mykoplasmenarten wurde außerdem eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die verwendeten Isolate und ihre Vergleichsstämme sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Zur Proteinanalyse herangezogene Isolate (Art, Isolat ID, Vergleichsstämme)

Art	Isolate	Vergleichsstämme
<i>Mycoplasma</i> sp. A	1802A 1173 1669 350 2499 2855A	<i>M. spumans</i> PG13 ^T <i>M. falconis</i> H/T1 ^T <i>M. neophronis</i> G.A. ^T
<i>Mycoplasma</i> sp. B	2068K2 1052	<i>M. felifaucium</i> PU ^T <i>M. adleri</i> G145 ^T

	1123 2303 2607 2855C	
<i>Mycoplasma</i> sp. C	12A 2606 2564A 2855B 1821K1	<i>M. glycyphilum</i> 486 ^T <i>M. gallopavonis</i> WR1 ^T
<i>Mycoplasma</i> sp. D	T	<i>M. maculosum</i> PG15 ^T
<i>Mycoplasma</i> sp. E	2562	<i>M. verecundum</i> 107 ^T
<i>Mycoplasma</i> sp. F	M	<i>M. maculosum</i> PG15 ^T
<i>M. tullyi</i>	2609	<i>M. tullyi</i> 56A97 ^T

2.9.1. SDS-PAGE

Für jedes Isolat, wurde ein zuvor bei -80 °C gelagertes Aliquot aufgetaut, in SP4-Flüssigmedium übertragen und bei 37 °C für 48 Stunden aerob bebrütet. Von jeder Probe wurden 3 ml bei 20000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, die Überstände verworfen, und die dabei entstandenen Pellets in 100 µl PBS-Lösung (Sigma-Aldrich, Österreich) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden den Proben 20 µl Spaltpuffer (SDS 5x) zugegeben und bei 95 °C für fünf Minuten aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Zur Herstellung des Trenngels (9%iges SDS-Gel) wurden 10,8 ml 30 % Acrylamide/0,8 % BIS (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich), 0,32 ml 10 % SDS (Roth, Deutschland), 8,2 ml 1.5M TRIS-HCl pH 8,8 (Sigma-Aldrich, Österreich), 30 µl TEMED (Sigma-Aldrich, Österreich), 300 µl Ammoniumpersulfat 10% (Sigma-Aldrich, Österreich) und 16,4 ml dH₂O verwendet. Eine Gelkassette wurde zusammgebaut und die Glasplatten und der Probenkamm mit Ethanol 70 % gereinigt. Das Trenngel wurde in die

Gelkassette gefüllt und für etwa eine Stunde mit Ethanol 90 % überschichtet. Nach Abgießen des Ethanols wurde es über Nacht zum Aushärten stehen gelassen und mit dH₂O überschichtet.

Das Sammelgel wurde aus 2,4 ml 30 % Acrylamide/0,8 % BIS (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich), 0,2 ml 10 % SDS (Roth, Deutschland), 5 ml 0.5M TRIS-HCl pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Österreich), 0,01 ml TEMED (Sigma-Aldrich, Österreich), 0,2 ml Ammoniumpersulfat 10 % (Sigma-Aldrich, Österreich) und 12,2 ml dH₂O hergestellt. Nachdem das Wasser aus dem Rahmen abgegossen wurde, wurde das Sammelgel auf das ausgehärtete Trenngel gegossen und ein 15er Kamm eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ausgehärtet war, wurden die Geltaschen mit LEB-Puffer gespült und anschließend mit 10 µl Marker (*Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder*, Thermo Scientific, Österreich), beziehungsweise 20 µl Probe beladen. Die Elektrophorese wurde bei maximalen Watt und Volt und bei 5 mA pro Gel in einer Elektrophorese-Kammer für zwölf Stunden durchgeführt. Als Puffer für die Elektrophorese wurde ein Elektroden Puffer nach Laemmli 1x hergestellt, dafür wurden 100 ml LEB 10x, 900 ml dH₂O und 10 ml SDS 10 % verwendet. (Laemmli 1970) Nach dem elektrophoretischen Trennvorgang wurde das Gel in einer Lösung mit Coomassie-Brillant-Blau für etwa zwölf Stunden unter ständigem Schwenken gefärbt. Zum Entfärben des Gels wurde eine 10%ige Essigsäure, aus 900 ml dH₂O und 100 ml 100%iger Essigsäure (Merck, Deutschland), hergestellt. Unter ständigem Schwenken wurde das Gel für eine Stunde in Essigsäure entfärbt, wobei die Säure in dieser Zeit drei Mal erneuert wurde. Anschließend wurde das Gel in H₂O für ein paar Minuten von der Essigsäure gereinigt und anschließend zur Visualisierung ein *Transilluminator Gel Doc2000* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) verwendet.

2.9.2. Western Blot

Für die *Mycoplasma* sp. A-Isolate (1802A, 1173, 1669, 350, 2499, 2855A) und die entsprechenden Vergleichsstämme (*M. spumans* PG13^T, *M. falconis* H/T1^T, *M. neophronis* G.A.^T) wurde ein Western Blot durchgeführt. Von einem Gel, auf dem die Proteine zuvor mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Antikörpern sichtbar gemacht. Zwei Liter Blotting-Puffer wurden aus 200 ml LEB 10x, 400 ml Methanol und 1400 ml dH₂O hergestellt.

Die Blotkassette wurde aufgebaut indem auf der Seite der Kathode beginnend erst ein Schwamm, zwei Lagen Filterpapier, das Gel, die Nitrozellulosemembran, wiederum zwei Lagen Filterpapier und ein weiterer Schwamm und die Anode angeordnet wurden, gründliches Ausstreichen wurde durchgeführt, um Luftblasen auszupressen. Eine *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (Bio Rad Laboratories, Deutschland) wurde verwendet und eine Spannung von 100 Volt und eine Stromstärke von 2 Ampere für eine Stunde angelegt. Mit einer temporären Färbung der Membran mit Ponceau-Rot-Lösung wurde die erfolgreiche Übertragung der Proteine überprüft. Im Anschluss wurde sie zum Entfärben zuerst in Leitungswasser geschwenkt, für etwa fünf Minuten, dann in TBS (*Tris buffered Saline*, Sigma-Aldrich, Österreich). Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit einer 3%igen Milchpulver-Lösung geblockt. Zur Herstellung der Milchpulver-Lösung wurden 3 g Magermilchpulver (Roth, Deutschland) in 100 ml TBS 1 % eingerührt, bis eine homogene Lösung entstand. Darin wurde die Membran für eine Stunde geschwenkt und anschließend noch zwei Mal für je 10 Minuten in TBS 1 %. Als primärer Antikörper wurde ein im Kaninchen hergestelltes *M. eudypsis* Antiserum 1802^T verwendet, 30 ml einer 1:100 Verdünnung mit TBS 1 % wurden hergestellt und die Membran über Nacht, bei 4 °C, darin geschwenkt. Zwei Waschschrte zu jeweils zehn Minuten, in TBS-Tween (*Tris Buffered Saline, with Tween 20, pH 8.0*, Merck, Deutschland) wurden durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Kaninchen IgG (Sigma-Aldrich, Österreich) verwendet und eine 1:2000 Verdünnung wurde hergestellt, in der die Membran wieder über Nacht bei 4 °C geschwenkt wurde. Zwei Waschschrte für jeweils zehn Minuten in TBS-Tween und einmal in TBS wurden durchgeführt. Um die Antikörper-Protein-Bindung sichtbar zu machen wurde eine Lösung mit Chlornaphthol verwendet, zur Herstellung dieser wurden 60 mg *HRP Color Development Reagent, 4CN* (Bio Rad, Deutschland) in 20 ml Methanol (Sigma-Aldrich, Österreich) gelöst und davon 8 ml mit 40 ml TBS-Puffer und 40 µl H₂O₂ 30 % (Sigma-Aldrich, Österreich) vermischt. In dieser Lösung wurde die Membran anschließend gefärbt und mit Leitungswasser abgespült.

2.10. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Isolate 1802A, 1052, 2606, 2562, T und M wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Dafür wurden Pellets gewonnen, indem jeweils 3 ml Flüssigkultur bei 20000 x g für 5 min

abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Pellets gewaschen, indem sie einmal in 100 μ l PBS-Lösung (Roth, Deutschland) gelöst und erneut zentrifugiert wurden. Die gewaschenen Pellets wurden mit 50 μ l PBS überschichtet und die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde am Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Koloniemorphologie

Bei der Beurteilung der Koloniemorphologie konnten für die Isolate 1802A1, 1052, 2606, T, 2562, M und 2609, die für Mykoplasmen typisch spiegeleiförmigen Kolonien mit einer dunkleren, zentralen Zone beobachtet werden.

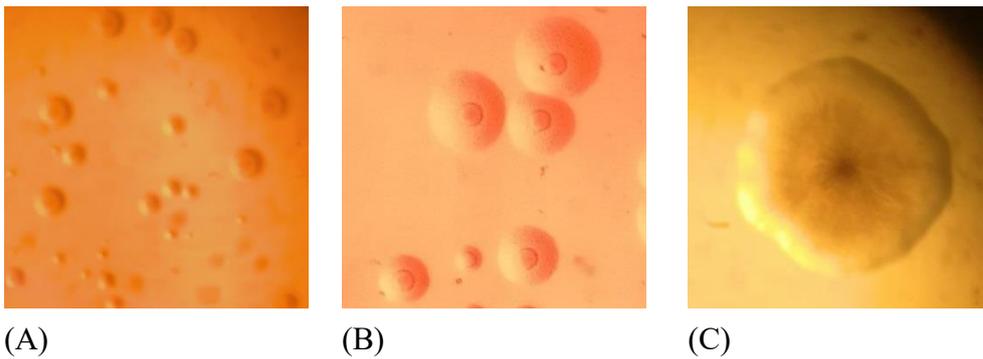


Abb. 1: Kolonien von (A) 1802A, (B) 1052 und (C) 2606 auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, mit 40-facher Vergrößerung

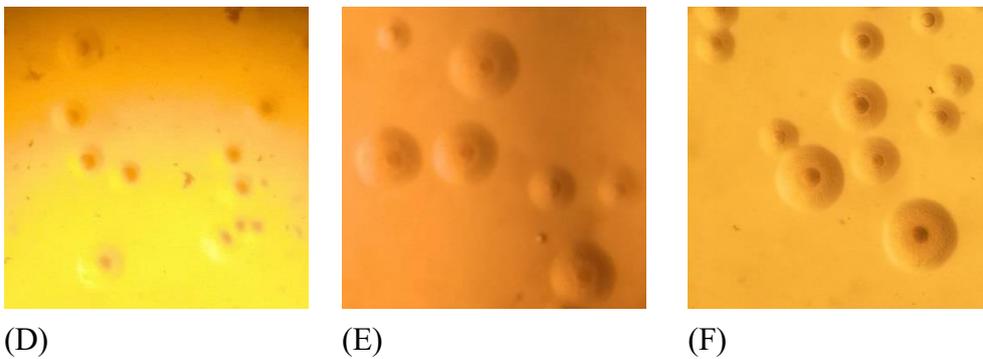


Abb. 2: Kolonien von (D) 2562, (E) T und (F) M auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, mit 40-facher Vergrößerung



Abb. 3: Kolonie von 2609 auf SP4-Agar nach
Bebrütung über vier Tage, mit 40-facher Vergrößerung

3.2. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die durch massenspektrometrische Analyse generierten Spektren der 27 Mykoplasmen Isolate wurden mit einer systemintegrierten und der In-House Referenzspektren-Datenbank verglichen. Dadurch konnten die Isolate sieben verschiedenen Arten zugeordnet werden. Abgesehen von Isolat 2609, welches als *M. tullyi* identifiziert wurde, handelt es sich bei allen anderen Isolaten um bislang unbeschriebene Mykoplasmenarten. Als *Mycoplasma* sp. A wurden folgende zwölf Isolate erkannt: 1802A, 2068K1, 1173, 1914B, 3380, 1939, 1669, 350, 2499, 12B, 2564B, 2855A. Sechs Isolate, 2068K2, 1052, 1123, 2303, 2607 und 2855C, wurden der Art *Mycoplasma* sp. B zugeordnet. Als *Mycoplasma* sp. C wurden fünf Isolate, 12A, 2606, 2564A, 2855B und 1821K1, identifiziert. Isolat T wurde *Mycoplasma* sp. D, 2562 *Mycoplasma* sp. E und M *Mycoplasma* sp. F zugeordnet.

3.3. Gensequenzanalysen

Für die Gensequenzanalysen mittels Amplifikation des 16S rRNA-Gens, der 16S-23S intergenischen Spacer-Region, des *rpoB*-Genfragments und weiterführend die phylogenetische Verwandtschaftsanalyse wurden folgende repräsentative Stämme ausgewählt: *Mycoplasma* sp. A – 1802A, 1173, 1669, 350, 2499, 2855A, *Mycoplasma* sp. B – 2068K2, 1052, 1123, 2303, 2607, 2855C, *Mycoplasma* sp. C – 12A, 2606, 2564A, 2855B, 1821K1, *Mycoplasma* sp. D – T, *Mycoplasma* sp. E – 2562, *Mycoplasma* sp. F – M, *M. tullyi* – 2609.

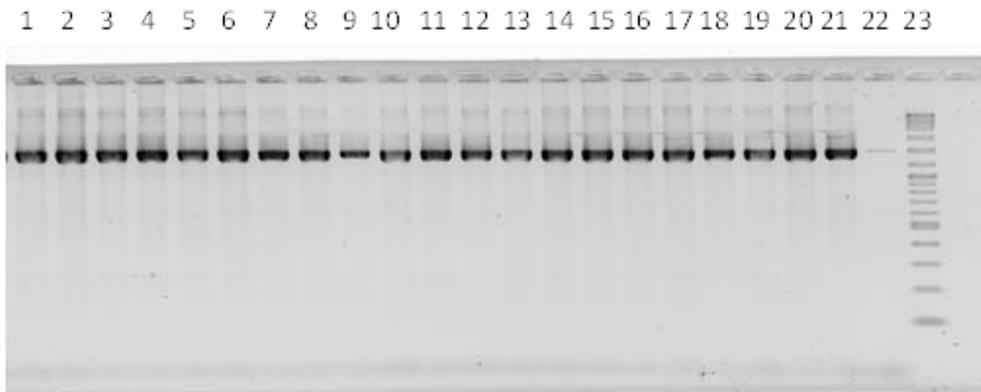


Abb. 4: Gelelektrophorese der Amplifikate des 16S rRNA-Gens: 1802A1 (1), 1173 (2), 1669 (3), 350 (4), 2499 (5), 2855A (6), 2068K2 (7), 1052 (8), 1123 (9), 2303 (10), 2607 (11), 2855C (12), 12A (13), 2606 (14), 2564A (15), 2855B (16), 1821K1 (17), 2562 (18), T (19), M (20), 2609 (21), Negativkontrolle (22), Marker (23)

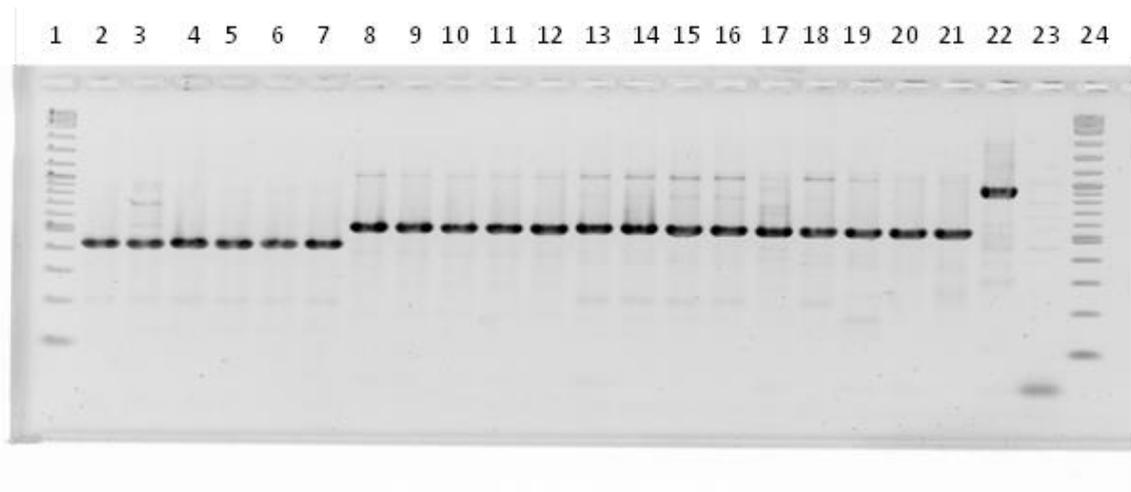


Abb. 5: Gelelektrophorese der Amplifikate der 16S-23S intergenischen Spacer-Region: Marker (1, 24), 1802A1 (2), 1173 (3), 1669 (4), 350 (5), 2499 (6), 2855A (7), 2068K2 (8), 1052 (9), 1123 (10), 2303 (11), 2607 (12), 12A (13), 2606 (14), 2564A (15), 2855B (16), 2855C (17), 1821K1 (18), 2562 (19), T (20), M (21), 2609 (22), Negativkontrolle (23)

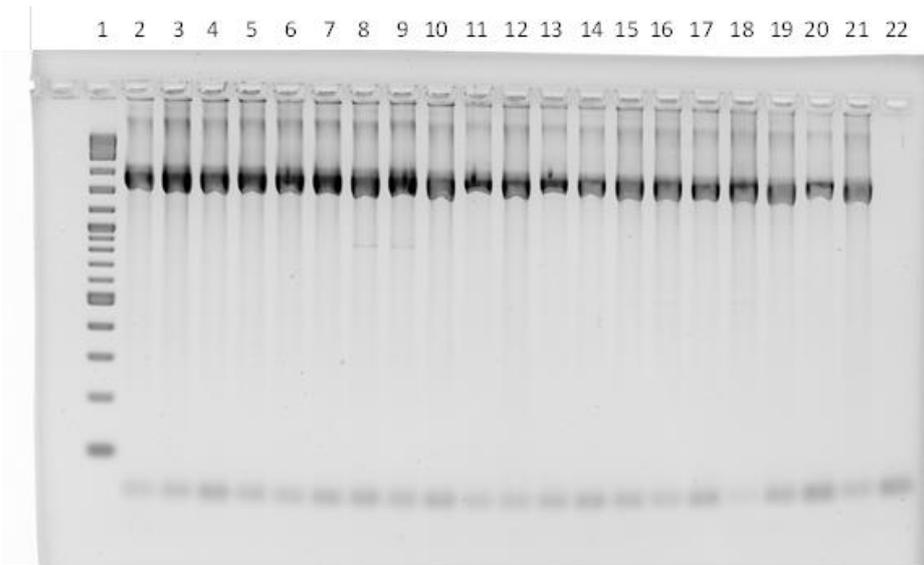


Abb. 6: Gelelektrophorese der Amplifikate des *rpoB*-Genfragments: Marker (1), 1802A1 (2), 1173 (3), 1669 (4), 350 (5), 2499 (6), 2855A (7), 2068K2 (8), 1052 (9), 1123 (10), 2303 (11), 2607 (12), 12A (13), 2606 (14), 2564A (15), 2855B (16), 2855C (17), 1821K1 (18), 2562 (19), T (20), M (21), 2609 (22)



Abb. 7: Gelelektrophorese der Amplifikate des *rpoB*-Genfragments (unter Verwendung des Primers MPF 1): Marker (1), 2609 (2), 2609 (3)

3.4. Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse

Die Klassifizierung der Mykoplasmenisolate erfolgte anhand der ermittelten 16S rRNA-Gen-, 16S-23S intergenischen Spacer-Region- und *rpoB*-Genfragment-Sequenzen. Die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse wurden durch konstruierte Stammbäume dargestellt. Für die 16S-23S intergenische Spacer-Region wurden außerdem Sequenzähnlichkeitswerte zu den nächstverwandten Arten berechnet, diese sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Höchste Sequenzähnlichkeitswerte der 16S-23S intergenischen Spacer-Region zu den nächstverwandten Arten (Art, Nächstverwandte Art, Sequenzähnlichkeit der 16S-23S IGS in Prozent)

Art	Nächstverwandte Art	Sequenzähnlichkeit der 16S-23S IGS in Prozent
Mycoplasma sp. A	<i>M. phocicerebrale</i>	91,7 %
Mycoplasma sp. B	<i>M. felifaucium</i>	93,6 %
Mycoplasma sp. C	<i>M. gallopavonis</i>	87,1 %
Mycoplasma sp. D	<i>M. felifaucium</i>	88,1 %
Mycoplasma sp. E	<i>M. felis</i>	88,9 %
Mycoplasma sp. F	<i>M. lipofaciens</i>	98,1 %
<i>M. tullyi</i>	<i>M. tullyi</i>	91,2 %

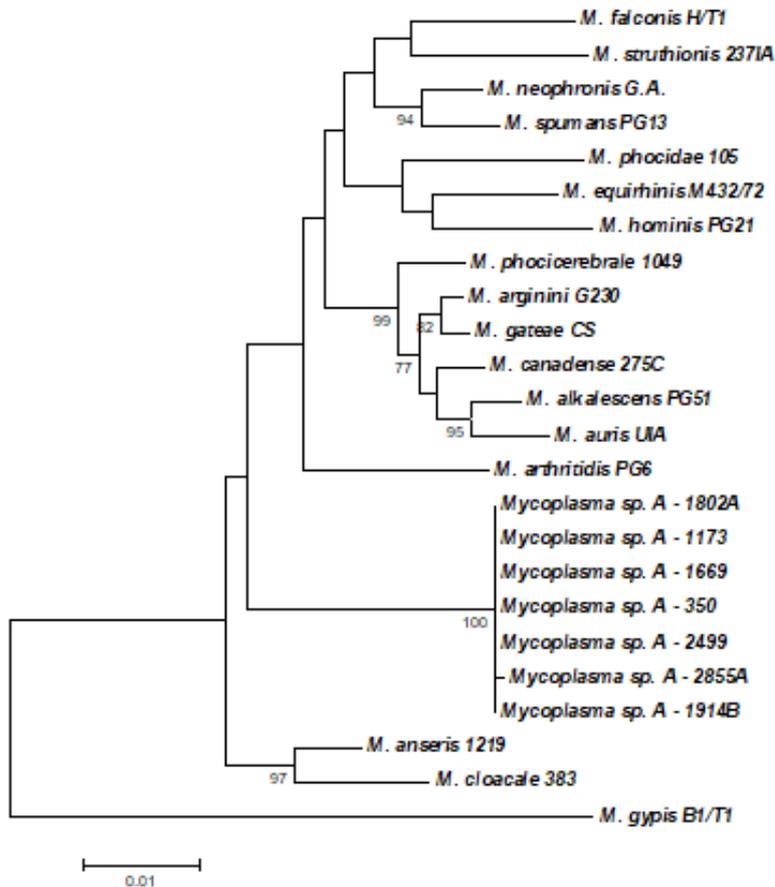


Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. A-Isolate (16S rRNA-Gen). Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. A-Isolate innerhalb des *M. hominis*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

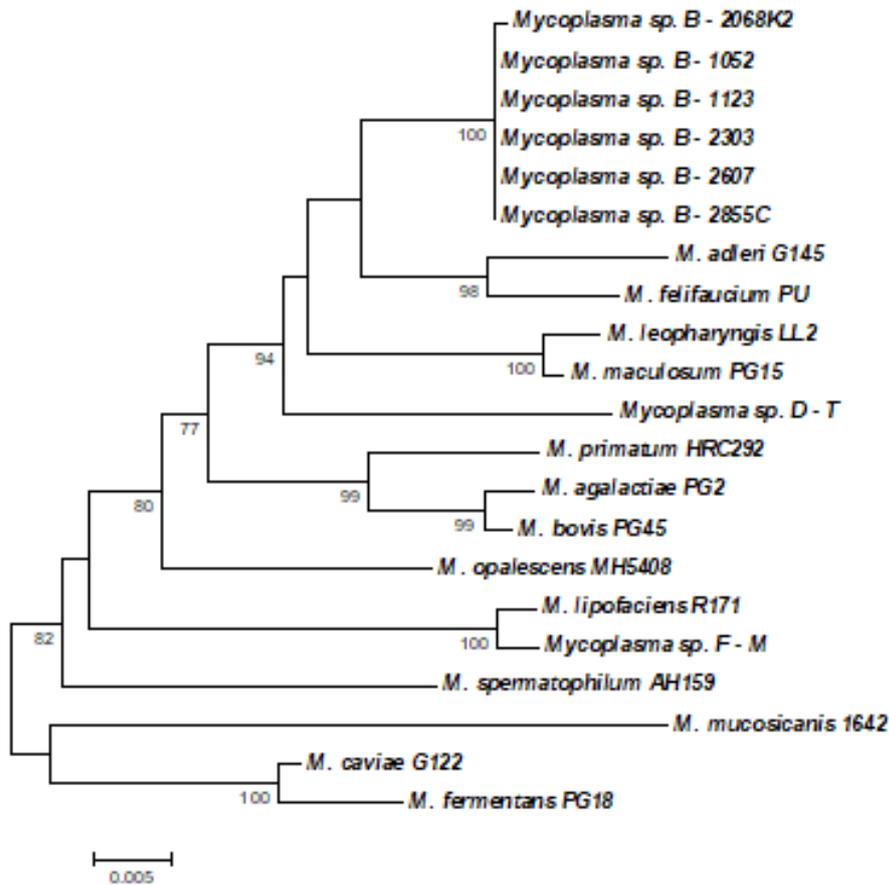


Abb. 9: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. B-Isolate, *Mycoplasma* sp. D- und *Mycoplasma* sp. F-Isolate (16S rRNA-Gen).

Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. B-Isolate und der *Mycoplasma* sp. D- und *Mycoplasma* sp. F-Isolate innerhalb des *M. bovis*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

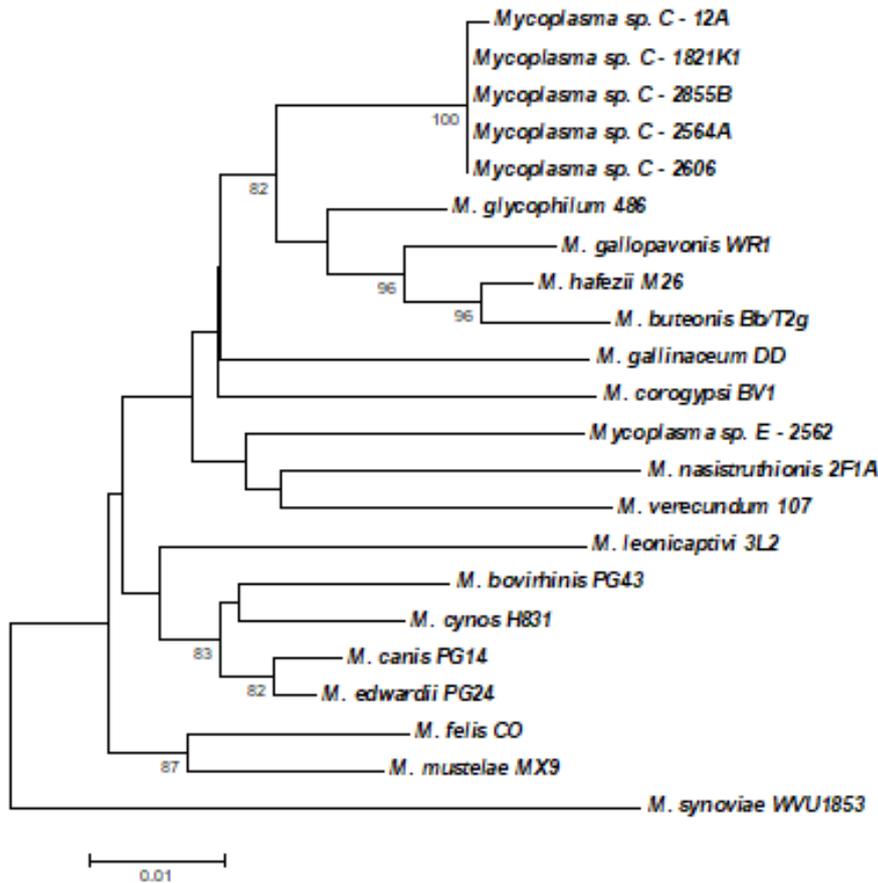


Abb. 10: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. C-Isolate und des *Mycoplasma* sp. E-Isolats (16S rRNA-Gen).

Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. C-Isolate und des *Mycoplasma* sp. E-Isolats innerhalb des *M. synoviae*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstab Balken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

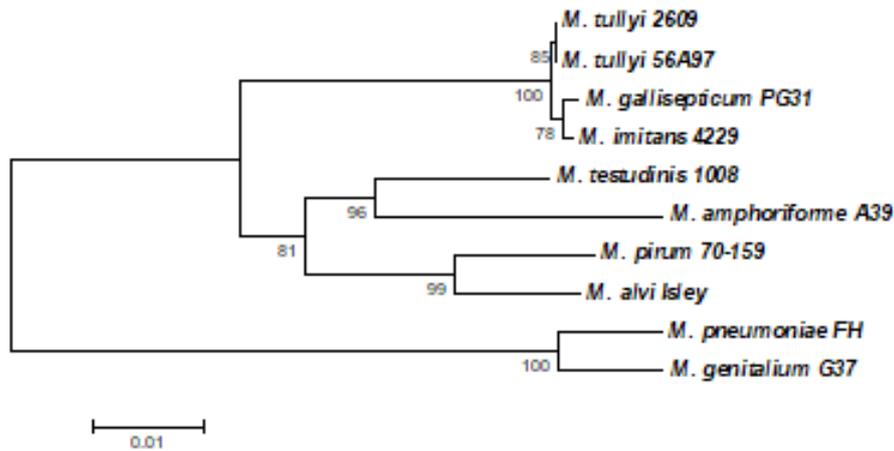


Abb. 11: Phylogenetischer Stammbaum des *M. tullyi*-Isolats (16S rRNA-Gen). Phylogenetische Position *M. tullyi*-Isolats innerhalb des *M. pneumoniae*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

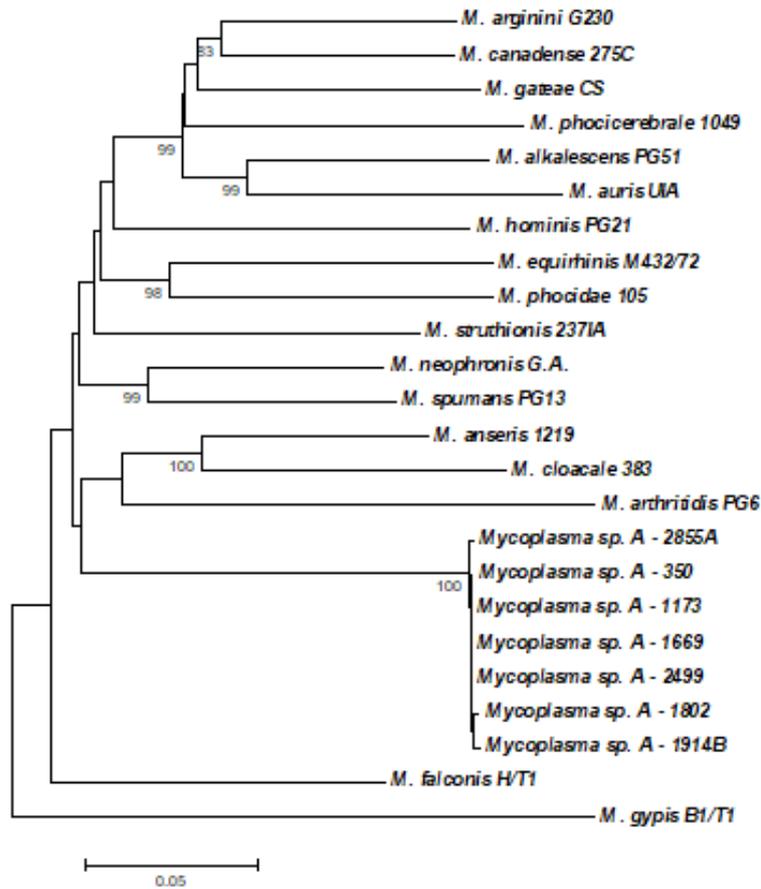


Abb. 12: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. A-Isolate (*rpoB*-Genfragment). Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. A-Isolate innerhalb des *M. hominis*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf *rpoB*-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

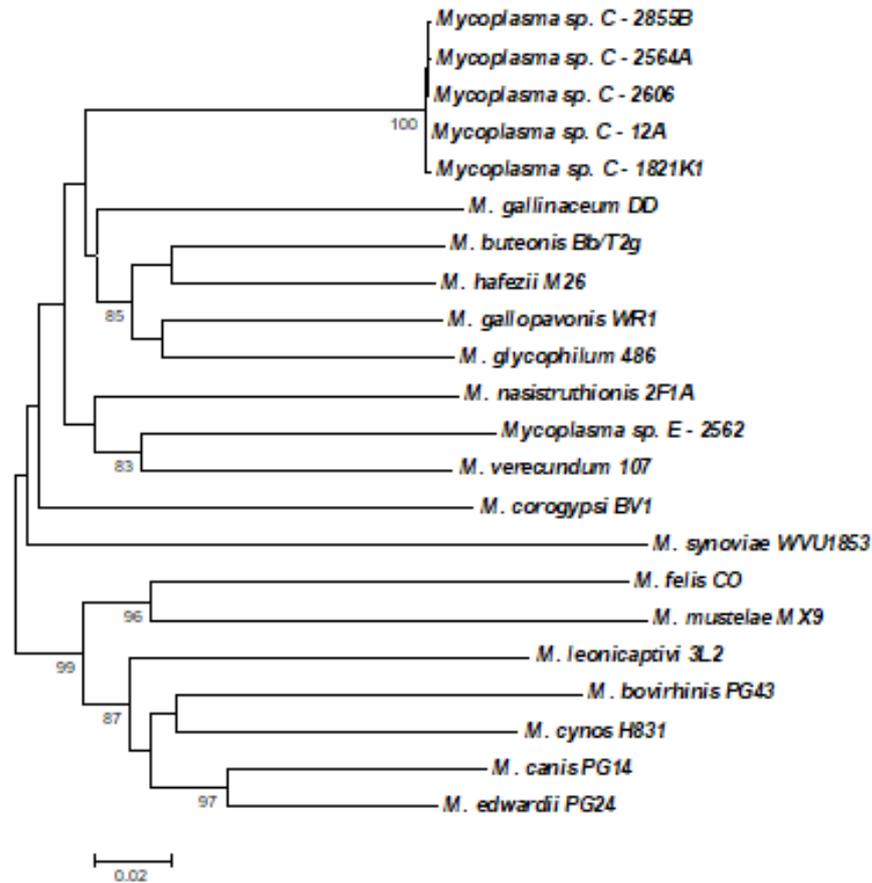


Abb. 14: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. C-Isolate und des *Mycoplasma* sp. E-Isolats (*rpoB*-Genfragment).

Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. C-Isolate und des *Mycoplasma* sp. E-Isolats innerhalb des *M. synoviae*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf *rpoB*-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

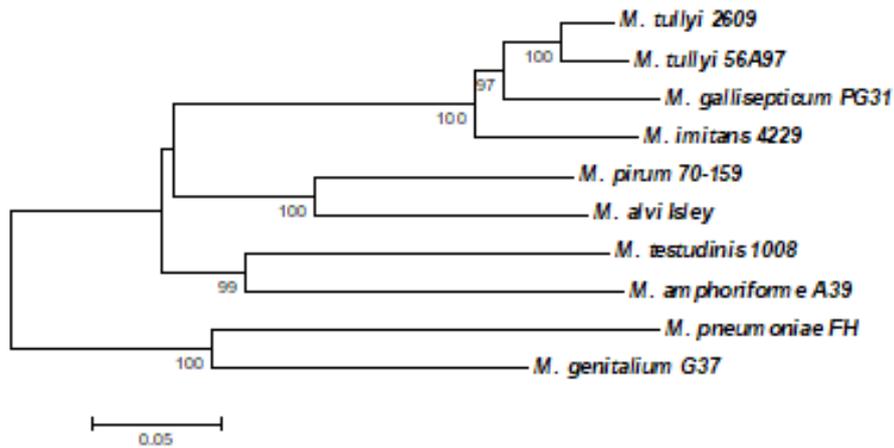


Abb. 15: Phylogenetischer Stammbaum des *M. tullyi*-Isolats (*rpoB*-Genfragment). Phylogenetische Position *M. tullyi*-Isolats innerhalb des *M. pneumoniae*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf *rpoB*-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

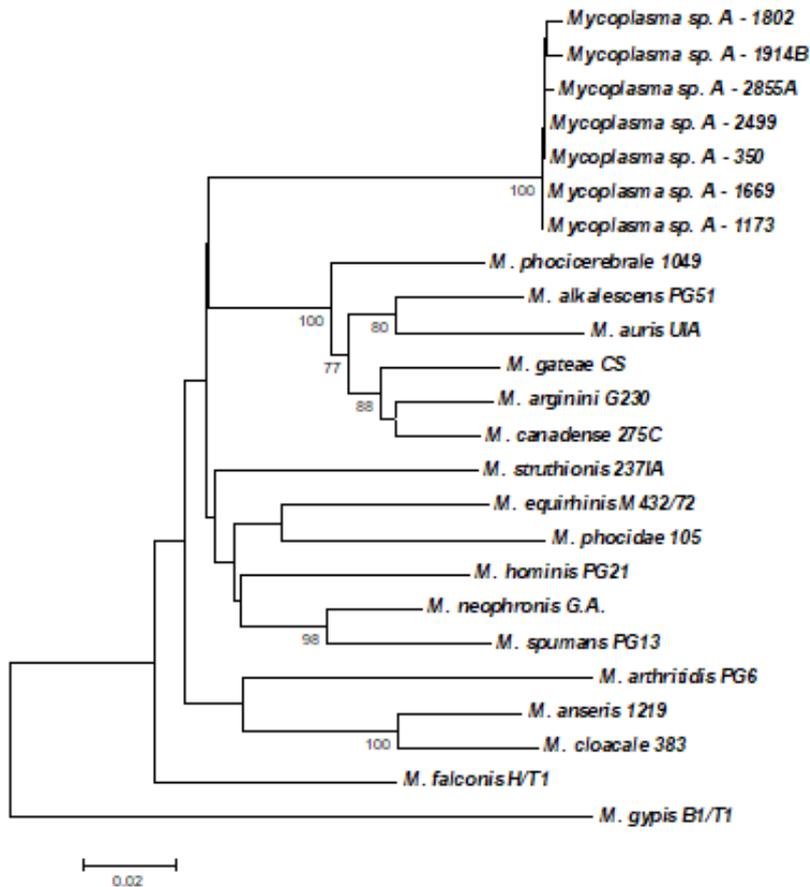


Abb. 16: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. A-Isolate (rpoB-Aminosäuren). Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. A-Isolate innerhalb des *M. hominis*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf rpoB-Aminosäuren. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

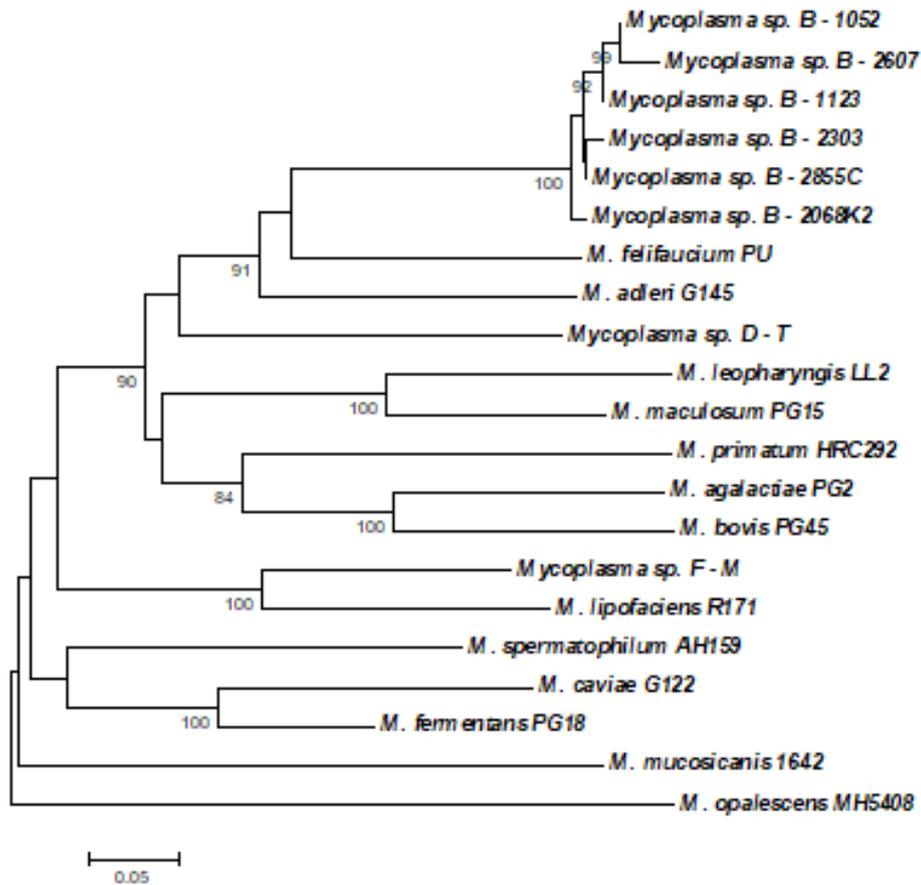


Abb. 17: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. B-Isolate, der *Mycoplasma* sp. D- und *Mycoplasma* sp. F-Isolate (rpoB-Aminosäuren).

Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. B-Isolate und der *Mycoplasma* sp. D- und *Mycoplasma* sp. F-Isolate innerhalb des *M. bovis*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf rpoB-Aminosäuren. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

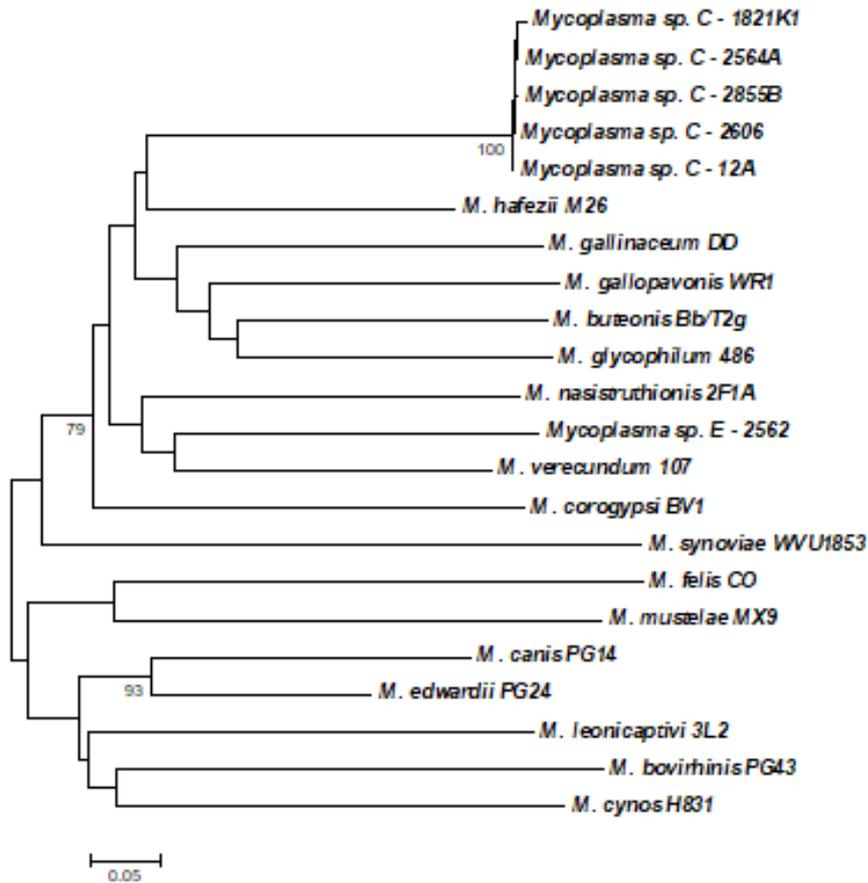


Abb. 18: Phylogenetischer Stammbaum der *Mycoplasma* sp. C-Isolate und des *Mycoplasma* sp. E-Isolats (rpoB-Aminosäuren).

Phylogenetische Position der *Mycoplasma* sp. C-Isolate und des *Mycoplasma* sp. E-Isolats innerhalb des *M. synoviae*-Clusters (Genus *Mycoplasma*), basierend auf rpoB-Aminosäuren. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

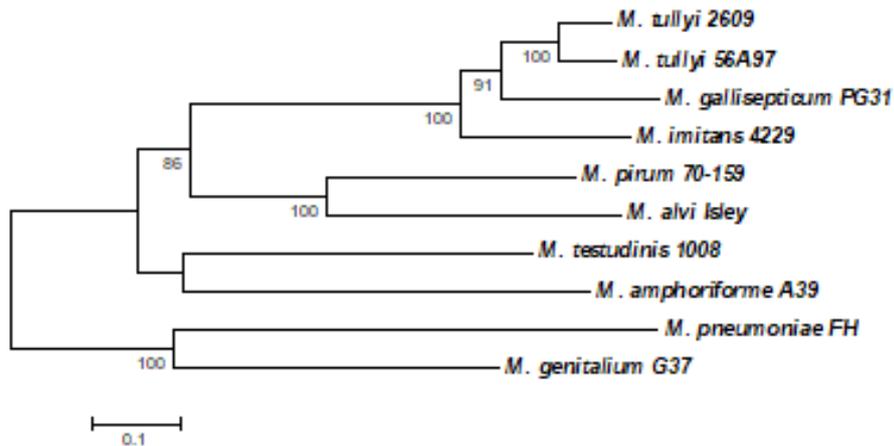


Abb. 19: Phylogenetischer Stammbaum des *M. tullyi*-Isolats (*rpoB*-Aminosäuren). Phylogenetische Position *M. tullyi*-Isolats innerhalb des *M. pneumoniae*-Clusters (Genus *Mycoplasma*) basierend auf *rpoB*-Aminosäuren. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmenstämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt

3.5. SDS-PAGE

Zur Proteinanalyse wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden die sieben verschiedenen in dieser Arbeit beschriebenen Mykoplasmenarten mit den Typstämmen ihrer nächstverwandten Arten verglichen. Die *Mycoplasma* sp. A-Isolate wurden dafür mit *M. falconis* H/T1^T, *M. neophronis* G.A.^T und *M. spumans* PG13^T, die *Mycoplasma* sp. B-Isolate mit *M. felifaucium* PU^T und *M. adleri* G145^T, die *Mycoplasma* sp. C-Isolate mit *M. glycyphilum* 486^T, *M. gallopavonis* WR1^T, das *Mycoplasma* sp. D-Isolat und das *Mycoplasma* sp. F-Isolat mit *M. maculosum* PG15^T, das *Mycoplasma* sp. E-Isolat mit *M. verecundum*107^T und das *Mycoplasma tullyi*-Isolat mit *M. tullyi* 56A97^T verglichen. Die Proteinbanden der Isolate innerhalb einer Art sind identisch und alle Isolate, mit Ausnahme von Isolat 2609, können eindeutig von den Vergleichsstämmen differenziert werden. Da Isolat 2609 als *M. tullyi* identifiziert und mit dem entsprechenden Typstamm verglichen wurde, zeigt es identische Proteinbanden mit dem Vergleichsstamm.

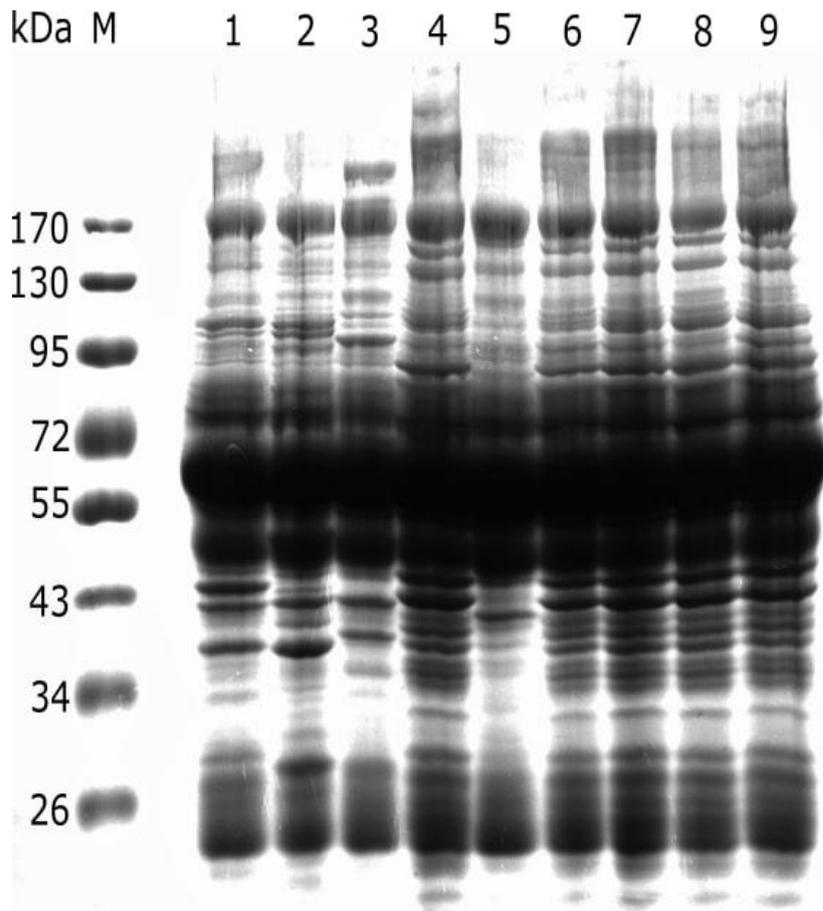


Abb. 20: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE der Isolate der *Mycoplasma* sp. A-Gruppe und der entsprechenden Vergleichsstämme.

Die Banden 4 bis 9 zeigen die Isolate der *Mycoplasma* sp. A-Gruppe, weisen ein identisches Bandenmuster auf und unterscheiden sich von den Bandenmustern der Vergleichsstämme (Banden 1 bis 3). Marker (M), *M. falconis* H/T1^T (1), *M. neophronis* G.A.^T (2), *M. spumans* PG13^T (3), 1802A (4), 1173 (5), 1669 (6), 350 (7), 2499 (8), 2855 (A).

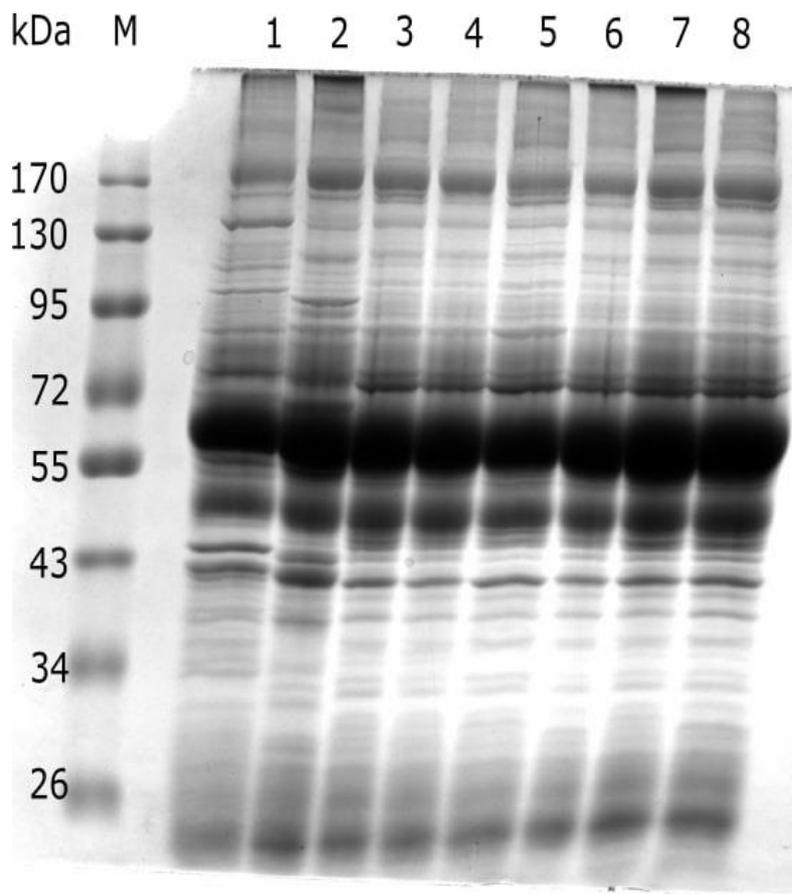


Abb. 21: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE der Isolate der *Mycoplasma* sp. B-Gruppe und der entsprechenden Vergleichsstämme.

Die Banden 3 bis 8 zeigen die Isolate der *Mycoplasma* sp. B-Gruppe, weisen ein identisches Bandenmuster auf und unterscheiden sich von den Bandenmustern der Vergleichsstämme, Banden 1 und 2. Marker (M), *M. adleri* G145^T (1), *M. felifaucium* PU^T (2), 1052 (3), 2068K2 (4), 1123 (5), 2303 (6), 2607 (7), 2855C (8)

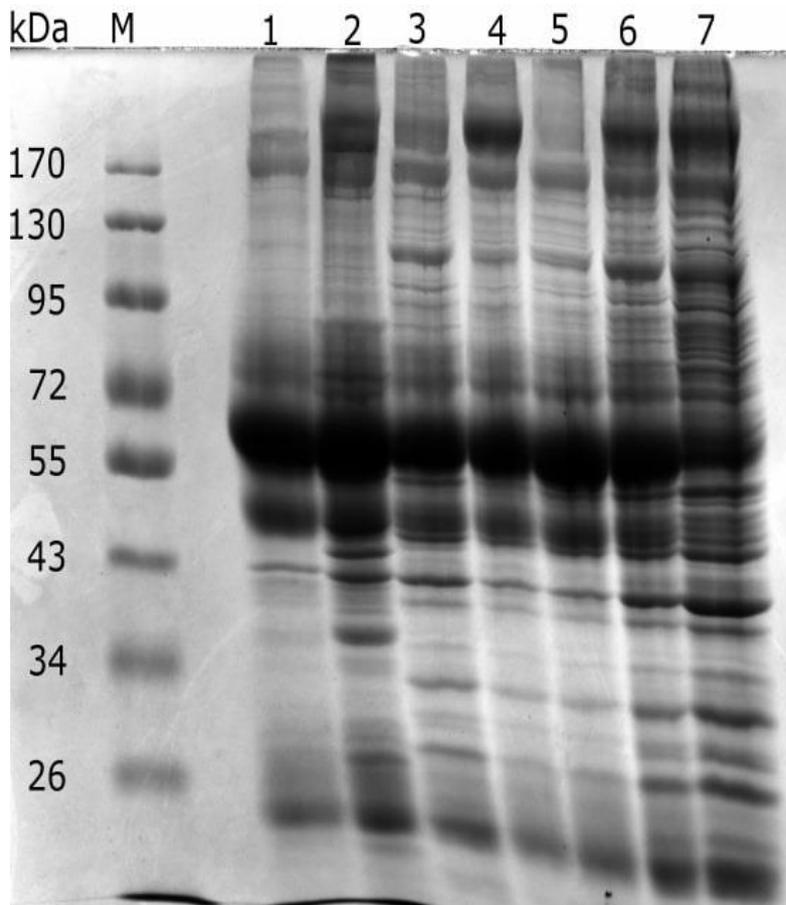


Abb. 22: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE der Isolate der *Mycoplasma* sp. C-Gruppe und der entsprechenden Vergleichsstämme.

Die Banden 3 bis 7 zeigen die Isolate der *Mycoplasma* sp. C-Gruppe, weisen ein identisches Bandenmuster auf und unterscheiden sich von den Bandenmustern der Vergleichsstämme, Banden 1 und 2. Marker (M), *M. gallopavonis* WR1^T (1), *M. glycyphilum* 486^T (2), 2606 (3), 12A (4), 2564A (5), 2855B (6), 1821K1 (7)

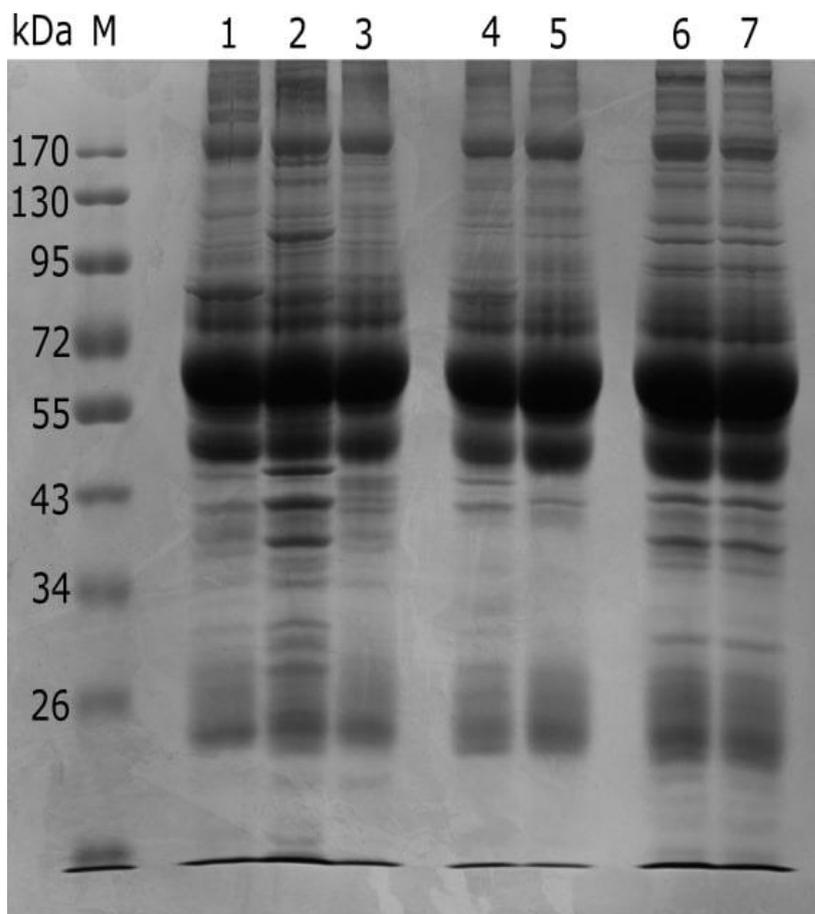


Abb. 23: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE von *Mycoplasma* sp. D, *Mycoplasma* sp. E, *Mycoplasma* sp. F und *M. tullyi*, sowie die entsprechenden Vergleichsstämme.

Die Isolate M (2), T (3) und 2562 (5) weisen individuelle Bandenmuster auf, die sich auch von jenen ihrer Vergleichsstämme unterscheiden. Isolat 2609 weist ein identisches Bandenmuster mit dem Vergleichsstamm auf. Marker (M), *M. maculosum* PG15^T (1), M (2), T (3), *M. verecundum*107^T (4), 2562 (5), *M. tullyi* 56A97^T (6), 2609 (7)

3.6. Western Blot

Für die *Mycoplasma* sp. A-Isolate 1802A, 1173, 1669, 350, 2499, 2855A und die entsprechenden Vergleichsstämme, *M. spumans* PG13^T, *M. falconis* H/T1^T, *M. neophronis* G.A.^T wurde ein Western Blot durchgeführt. Ein anti-*Mycoplasma* sp. *eudypitis* 1802^T

Antiserum wurde verwendet. Die Bandenprofile der sechs *Mycoplasma* sp. A-Isolate sind identisch und unterscheiden sich deutlich von jenen der Vergleichsstämme.

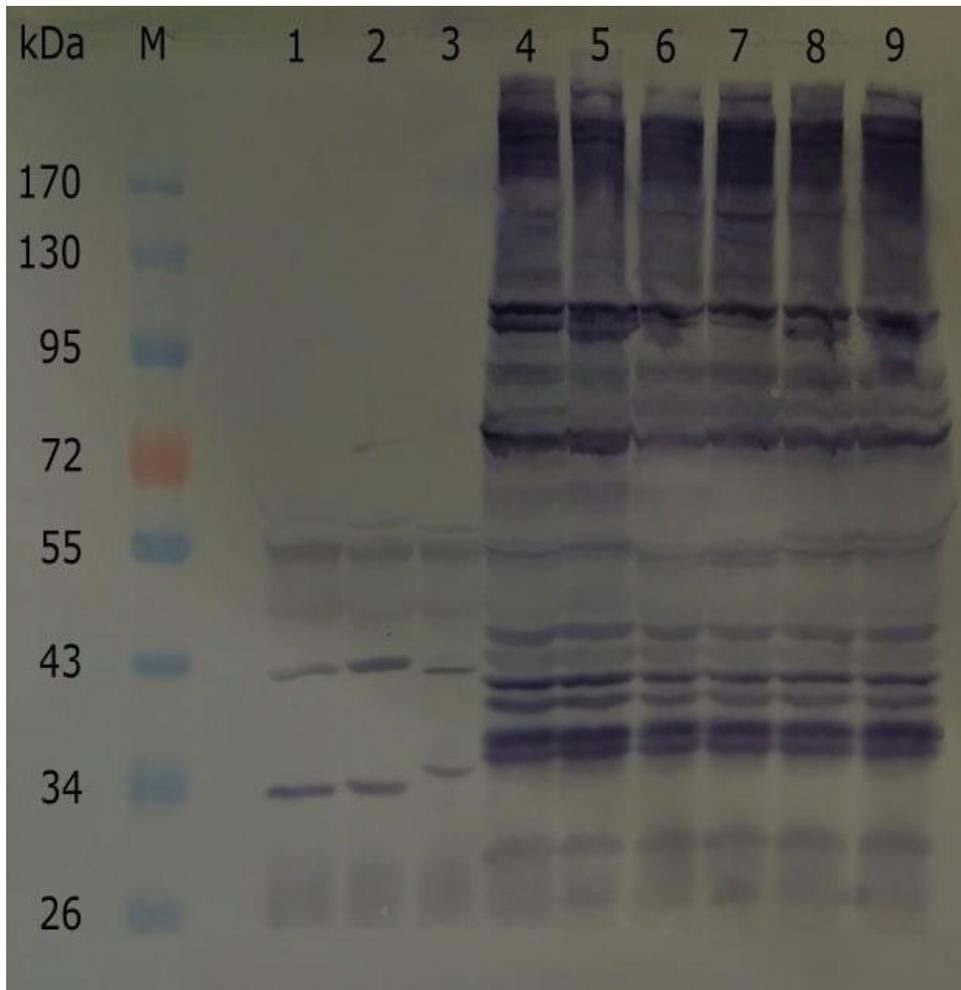


Abb. 24: Western Blot der *Mycoplasma* sp. A-Isolate und Vergleichsstämme nach Inkubation mit anti-*Mycoplasma* sp. *eudyptis* 1802^T Antiserum.

Die Bandenprofile der Isolate 4 bis 9 sind identisch und können eindeutig von den Profilen 1 bis 3 unterschieden werden. Marker (M), *M. falconis* H/T1^T (1), *M. neophronis* G.A.^T (2), *M. spumans* PG13^T (3), 1802A (4), 1173 (5), 1669 (6), 350 (7), 2499 (8), 2855A (9).

3.7. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Isolate wurde am Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt. Für alle Isolate konnte nachgewiesen werden, dass diese keine Zellwand besitzen und nur von einer Plasmamembran umgeben sind. Die Zellen zeigten sich pleomorph, sphärisch bis ovoid und bei Isolat 1052 und M teilweise flaschenförmig. Isolat 2606 zeigte filamentös-verzweigte Zellen.

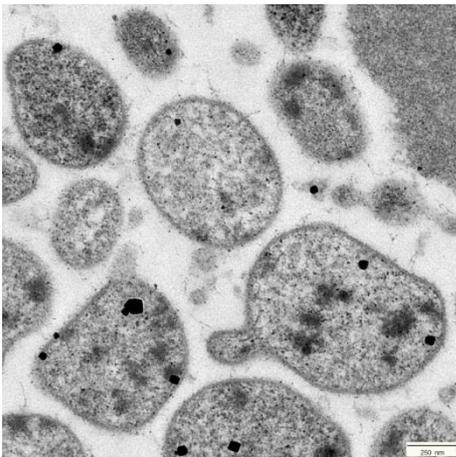


Abb. 25: Elektronenmikroskopie von Isolat 1802A. Die Zellen sind pleomorph und sphärisch bis ovoid.

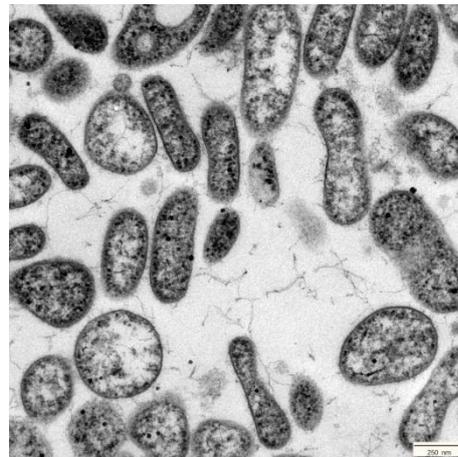


Abb. 26: Elektronenmikroskopie von Isolat 1052. Die Zellen sind pleomorph, sphärisch bis ovoid und vereinzelt flaschenförmig.

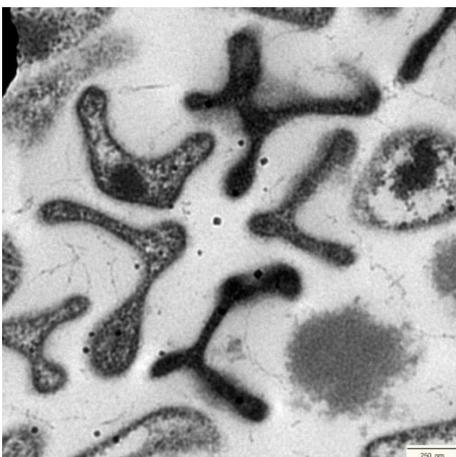


Abb. 27: Elektronenmikroskopie von Isolat 2606. Die Zellen sind filamentös-verzweigt.

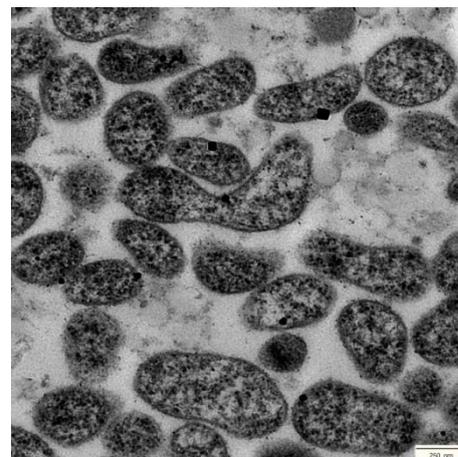


Abb. 28: Elektronenmikroskopie von Isolat M. Die Zellen sind pleomorph, größtenteils ovoid und vereinzelt flaschenförmig.

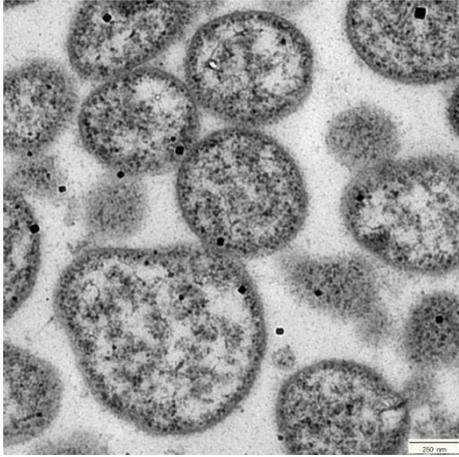


Abb. 29: Elektronenmikroskopie von Isolat T. Die Zellen sind sphärisch.

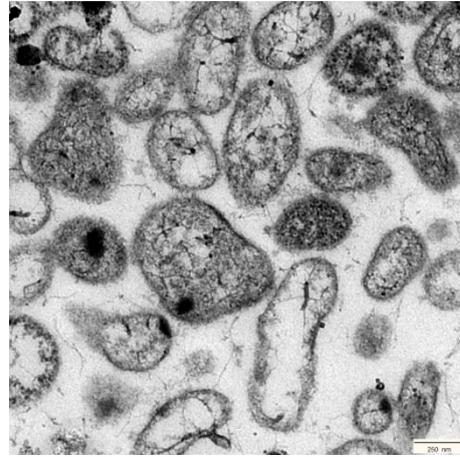


Abb. 30: Elektronenmikroskopie von Isolat 2562. Die Zellen sind pleomorph.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es 27 Mykoplasmenisolate, die aus verschiedenen Organen von 22 Humboldt-Pinguinen (*Spheniscus humboldti*) isoliert wurden, mit verschiedenen Methoden auf ihre phänotypischen und genotypischen Eigenschaften zu untersuchen. Da es sich bei den untersuchten Isolaten um mögliche neue Spezies handelte, sollte eine Basis für etwaige Speziesneubeschreibungen geschaffen werden.

Im Bereich der aviären Mykoplasmen liegt der Fokus der Forschung besonders bei den geflügelpathogenen Spezies, die in der Haltung von Wirtschaftsgeflügel von Bedeutung sind (Bradbury 2005). Zum Vorkommen und der Pathogenität von Mykoplasmen bei Wildvögeln ist relativ wenig bekannt. Isolate stammen oft von verendeten Vögeln und werden meist in Kombination mit anderen Erregern gefunden, was Interpretationen bezüglich ihrer Bedeutung erschwert (Möller Palau-Ribes 2016). Die Pathogenität von Mykoplasmen ist sehr variabel, so sind neben obligat pathogenen Mykoplasmen auch viele als Kommensale oder Opportunisten bekannt (Razin und Tully 1983). Außerdem kann die Pathogenität durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Haltungs- und Umweltfaktoren, die Stress bei den Wirtstieren verursachen, erhöht werden (Möller Palau-Ribes 2016).

Lange wurde angenommen, dass es sich bei Mykoplasmen um obligat extrazelluläre Bakterien handelt. Inzwischen konnte die Fähigkeit in nicht-phagozytäre, eukaryotische Zellen einzudringen bei verschiedenen Mykoplasmenspezies nachgewiesen werden. Auch für *M. gallisepticum* konnte Zell Invasivität in vitro bei HeLa-Zellen und Fibroblasten von Hühnerembryonen, sowie in vitro und in vivo bei roten Blutkörperchen von Hühnern nachgewiesen werden (Fürnkranz et al. 2013). *M. gallisepticum* konnte gelegentlich aus verschiedenen inneren Organen von infizierten Vögeln isoliert werden. In experimentell über den Respirationstrakt infizierten Tieren bewiesen Funde dieser Art die Fähigkeit von *M. gallisepticum*, die Schleimhautbarriere des Respirationstrakts zu überwinden, in die Blutbahn zu gelangen und sich im Körper auszubreiten. So konnte *M. gallisepticum* aus Organen wie Gehirn, Herz, Leber, Nieren und Milz von Hühnern, die zuvor über den Respirationstrakt infiziert wurden, isoliert werden (Much et al. 2002).

M. tullyi zeigte in der indirekten Immunfluoreszenz eine deutliche serologische Kreuzreaktion mit *M. gallisepticum* und auch die phylogenetische Analyse zeigt eine nahe Verwandtschaft der beiden Spezies (Yavari et al. 2017). Der von Yavari et al. 2017 beschriebene *M. tullyi*-Stamm wurde aus der Leber eines verendeten Humboldt Pinguins (*Spheniscus humboldti*) isoliert, konnte aber auch als Kommensale in Tracheen von gesunden Pinguinen nachgewiesen werden (Yavari et al. 2017). Zwei Eigenschaften von *M. tullyi*, die auf eine mögliche Pathogenität hinweisen, sind das Vorhandensein einer *tip*-Struktur und Hämadsorption. In einer Pilot-Studie zur Pathogenität verursachte *M. tullyi* Ziliostase bei trachealen Organkulturen von Hühnerembryonen. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Studie sieben Tage alte embryonierte Hühnereier, über den Dottersack mit *M. tullyi* beimpft, was innerhalb von 19 Tagen Inkubationszeit zum Absterben und Kümmern der Embryos führte und eine Ausbreitung des Erregers in Leber und Gehirn der Embryos konnte nachgewiesen werden (Yavari 2010, Yavari et al. 2017).

Von allen in dieser Arbeit untersuchten Mykoplasmen-Isolaten, war das Isolat, welches als *M. tullyi* identifiziert wurde, das Einzige, das nicht aus dem Respirationstrakt, sondern aus der Milz eines Humboldt-Pinguins (*Spheniscus humboldti*) isoliert wurde. Das Vorhandensein von Pathogenitätsfaktoren, wie eine *tip*-Struktur und Hämadsorption, die Ergebnisse, der von Yavari 2010 durchgeführten Pilot-Studie zur Pathogenität und dass *M. tullyi* aus Organen, wie Leber und Milz isoliert werden konnte, lässt darauf schließen, dass es sich um eine potenziell pathogene, invasive Art handelt. Die nahe Verwandtschaft zu *M. gallisepticum* legt außerdem nahe, dass die Pathogenitätsmechanismen und Eigenschaften der beiden Arten sich sehr ähnlich sind.

Über das Vorkommen und die Bedeutung von Mykoplasmen bei Pinguinen, sowohl bei Wildlebenden, als auch bei solchen, die in menschlicher Obhut gehalten werden, gibt es noch kaum Informationen. Humboldt-Pinguine (*Spheniscus humboldti*) sind eine der am stärksten gefährdeten Pinguinarten. Weltweit sind sie aber auch als Zootiere sehr beliebt. Der Handel mit wildlebenden Humboldt-Pinguinen ist, seitdem diese auf der Roten Liste der *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) als gefährdet gelistet werden, verboten. (Blay und Côté 2001, BirdLife International 2018). Die Erforschung von potenziell pathogenen Erregern dieser Spezies kann damit zum einen für die Arterhaltung von Interesse sein. Zum anderen

sind Zoos, neben dem generellen Interesse an der Gesunderhaltung ihrer Tiere, aufgrund des Exportverbots besonders auf eigene Zucht angewiesen, um ihre Kolonien zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit, wurden die unbekanntenen Mykoplasmen-Isolate, zur Beurteilung ihrer Koloniemorphologie kultiviert und zeigten die für Mykoplasmen typischen spiegeleiförmigen Kolonien. Die Zellmorphologie wurde elektronenmikroskopisch untersucht.

Durch die mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie generierten Spektren konnte eines der Isolate als *M. tullyi* identifiziert werden. Die phylogenetischen Untersuchungen und die Protein-Analyse mittels SDS Page bestätigten, dass es sich bei Isolat 2609 um *M. tullyi* handelt. Die anderen Isolate konnten durch die MALDI-TOF Massenspektrometrie in sechs verschiedene Arten unterteilt werden, keines davon konnte einer bereits beschriebenen Art zugeordnet werden.

Ausgewählte Isolate wurden phylogenetisch untersucht. Anhand des 16S rRNA-Gens, der 16S-23S intergenetischen Spacer-Region und des *rpoB*-Gens konnte *Mycoplasma* sp. A dem *M. hominis*-Cluster, *Mycoplasma* sp. B, *Mycoplasma* sp. D und *Mycoplasma* sp. F dem *M. bovis*- und *Mycoplasma* sp. C und *Mycoplasma* sp. E dem *M. synoviae*-Cluster zugeordnet werden.

Durch SDS-PAGE wurden Protein-Bandenmuster generiert, um sie mit nahe verwandten Mykoplasmenarten zu vergleichen. Für alle untersuchten Isolate konnten Protein-Bandenmuster generiert werden, die sich deutlich von denen der verwendeten Vergleichsstämme unterscheiden, innerhalb der Gruppen aber identisch sind.

Eine Western-Blot Untersuchung wurde für die Isolate aus der Gruppe *Mycoplasma* sp. A und drei ausgewählten nahe verwandten Vergleichsstämmen durchgeführt und auch hier zeigten die untersuchten Isolate identische Bandenmuster innerhalb ihrer Gruppe und können von ihren Vergleichsstämmen abgegrenzt werden.

Die gesammelten Ergebnisse erhärten die Annahme, dass es sich bei den untersuchten Isolaten um neue Spezies handelt. Es konnten sechs Spezies, die sich von bisher beschriebenen Mykoplasmenarten unterscheiden, identifiziert werden.

Die Mindeststandards für die Beschreibung neuer Spezies der Klasse *Mollicutes* (Brown et al. 2007) beinhalten Hinterlegung eines Typstamms in zwei anerkannten Kultursammlungen, die in zwei unterschiedlichen Ländern lokalisiert sein müssen, die Hinterlegung der 16S rRNA-Gensequenz in einer öffentlichen Datenbank und eine phylogenetische Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der 16S rRNA Sequenz der neuen Spezies und ihrer nahen Verwandten. Der Nachweis, dass sich der Typstamm signifikant von allen bereits beschriebenen Spezies unterscheidet, soll unter Verwendung der 16s rRNA Sequenz Analyse, serologischer Untersuchungen und zusätzlichen phänotypischen Daten erbracht werden. Damit kann die Spezies mit einem spezifischen, passenden Epitheton einer Ordnung, einer Familie und einem Genus zugeordnet werden (Brown et al. 2007).

Die Verwendung von 16S-23S rRNA IGS und *rpoB* Gensequenzanalyse, um die phylogenetischen Stammbäume mit denen der 16S rRNA Gensequenz zu vergleichen, erwies sich als effektive taxonomische Methode, um die Spezies innerhalb der *Mycoplasmataceae* zu differenzieren (Vолоkov et al. 2012).

In der Studie von Spergser et al. (Spergser et al. 2019) wurde die Anwendung von MALDI-TOF, zur Identifikation und Differenzierung von Mykoplasmen untersucht. Dabei wurden Spektren von 114 bekannten und 23 unbeschriebenen Mykoplasmen in eine In-house Datenbank aufgenommen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass MALDI-TOF MS eine vielversprechende, zuverlässige Methode darstellt, um aus Tieren isolierte Mykoplasmen zu identifizieren, differenzieren und sie taxonomisch einzuordnen (Spergser et al. 2019).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische und phänotypische Charakterisierung der unbeschriebenen Mykoplasmenspezies bildet eine solide Basis für deren Neubeschreibung. Weitere Untersuchungen zur Vervollständigung ihrer Charakterisierung sollten die Anforderungen, die in den Mindeststandards für die Beschreibung neuer Spezies der Klasse *Mollicutes* (Brown et al. 2007) beschrieben werden, erfüllen.

Sterolabhängigkeit des Wachstums sollte untersucht werden. Biochemische Tests, können Auskunft über die Stoffwechsellleistungen der Spezies geben. Untersucht werden kann die Fähigkeit Substrate wie, Arabinose, Dulcitol, Fruktose, Galaktose, Glukose, Inositol, Laktose,

Maltose, Mannitol, Mannose, Rhamnose, Salicin, Sorbit, Trehalose und Xylose, zu metabolisieren, Arginin Aesculin, Casein, Gelatine und Harnstoff zu hydrolysieren und Metylenblau, Tetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit zu reduzieren. Weitere biochemische Tests sind zum Beispiel die Aktivität der alkalischen Phosphatase, „*Film and Spots*“-Bildung und Hämadsorption und Hämolyse (Spergser et al. 2020). Von größter Bedeutung für die Neubeschreibung einer Spezies sind dabei die Fähigkeit zur Fermentation von Glukose und die Hydrolyse von Arginin und Urea (Brown et al. 2007).

Die Analyse von Polar Lipiden und Fettsäureprofilen erwies sich auch als sinnvolle Methode zur Klassifizierung von Mykoplasmen (Worliczek et al. 2007).

DNA-DNA Hybridisierung ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn die genotypischen Untersuchungen hohe Sequenzhomologien mit anderen Spezies aufweisen (Brown et al. 2007, Möller Palau-Ribes 2016).

DNA *fingerprinting* mit random amplification polymorphic DNA (RAPD) ermöglicht die Typisierung von DNA und kann dazu verwendet werden, sehr nahe verwandte Spezies zu differenzieren, Stämme innerhalb einer Spezies zu unterscheiden und Klone auszuschließen (Rawadi 1998, Spergser et al. 2020).

Im Rahmen weiterer Untersuchungen zur genauen Charakterisierung der neuen Mykoplasmenspezies, sollte außerdem ein Typstamm ausgewählt werden und eine Gesamtgenomsequenzierung durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung

Insgesamt wurden 27 Mykoplasmen-Isolate, die aus 22 Humboldt-Pinguinen (*Spheniscus humboldti*) isoliert wurden und keiner valide beschriebenen Art zugeordnet werden können, in dieser Arbeit untersucht. Die Isolate stammen vorrangig aus dem Respirationstrakt von verendeten Exemplaren der Humboldt-Pinguin-Kolonie des Tiergartens Schönbrunn, Wien. Die für alle Isolate, mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie generierten Spektren, ergaben für 26 Isolate keine Übereinstimmungen mit bekannten Mykoplasmenarten und konnten in sechs mögliche neue Arten unterteilt werden. Ein Isolat wurde als *M. tullyi* identifiziert. Zur Untersuchung der Kolonie- und Zellmorphologie der unbekannteren Arten, wurden einzelne Isolate ausgewählt. Aufgrund der Ergebnisse der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Isolate der Gattung *Mycoplasma* zugeordnet. Die phylogenetische Positionierung wurde durch 16S rRNA-Gen, 16S-23S intergenetische Spacer- und partielle *rpoB*-Gensequenzanalyse bestimmt und Sequenzähnlichkeitswerte durch den Vergleich mit Einträgen in der öffentlichen GenBank-Datenbank unter Anwendung des BLAST-Algorithmus ermittelt. Die Isolate wurden den entsprechenden, auf den 16S rRNA-Gensequenzen beruhenden phylogenetischen Clustern zugeordnet und anschließend wurden die ermittelten Sequenzen mit den aus dem Genbank-Datenpool extrahierten Sequenzen der Typstämme, unter Anwendung des ClustalW-Alignments ausgerichtet. *Neighbour-Joining*-Distanzanalysen mit Bootstrapping (1000 Replikationen) unter Einsatz des Kimura-2-Parameter-Substitutionsmodells (Dayhoff-Modell für *rpoB*-Aminosäuresequenzen) wurden durchgeführt (MEGA 6 Software) und die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse anhand der konstruierten Stammbäume dargestellt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um neue Spezies handelt. Die Protein-Analyse mittels SDS PAGE wurde für die Isolate und ihre nächst verwandten Mykoplasmenarten durchgeführt. Diese Untersuchung ergab identische Bandenprofile für die Isolate innerhalb einer Gruppe, welche sich deutlich von den Bandenprofilen der Vergleichsstämme unterscheiden. Isolate der *Mycoplasma* sp. A-Gruppe zeigten auch in der Western-Blot-Analyse identische Reaktionsmuster, die sich von denen der nächst verwandten Mykoplasmenarten unterscheiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die untersuchten Mykoplasmen-Isolate keiner valide beschriebenen Art angehören. Es konnte eine solide Basis für die Speziesneubeschreibung geschaffen werden.

5.2. Summary

In total, 27 *Mycoplasma* isolates, which have been isolated from 22 Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) and can't be identified as a valid described species, were investigated in this study. The majority of the isolates were retrieved from the respiratory tract of dead specimen of the Humboldt-penguin-colony of the Zoo Vienna. Using MALDI-ToF Mass spectrometry, spectra were generated and 26 of them couldn't be assigned to a known *Mycoplasma* species and seemed to represent six new species. One of the isolates was identified as *M. tullyi*. Individual isolates were chosen to examine their colony and cell morphology. The results of the MALDI-ToF MS enabled the isolates to be assigned to the genus *Mycoplasma*. The phylogenetic positioning was achieved through 16S rRNA-gene, 16S-23S intergenic Spacer and partial *rpoB*-gene sequence analysis and sequence similarity values were investigated by comparing them to sequences in the GenBank database using the BLAST-Algorithm. The isolates were assigned to their phylogenetic clusters based on the 16S rRNA gene sequences and further on the sequences were aligned with sequences of the type strains, extracted from the GenBank data pool, by using ClustalW-Alignments. Neighbour Joining Distance analysis with bootstrapping (1000 replications), using Kimura 2-parameter Substitution model (Dayhoff model for *rpoB* amino acids) were executed and the phylogenetic relations depicted by the constructed phylogenetic trees. The results indicate that the isolates represent new *Mycoplasma* species. Protein analysis was performed by SDS PAGE for the isolates and their closely related *Mycoplasma* species. The generated banding patterns of the isolates within one group are identical and can be clearly differentiated from those of the type strains used for comparison. Isolates of the *Mycoplasma* sp. A group showed identical banding patterns in the western blot analysis as well and could again be differentiated from the closely related *Mycoplasma* species.

The results of this study confirm that the examined *Mycoplasma* isolates do not belong to a valid described species. A solid base for their further description was provided.

6. Abkürzungsverzeichnis

IUCN = *International Union for Conservation of Nature*

NDV = Newcastle-Disease-Virus

IBDV = Infectious-Bursal-Disease-Virus

SpAHV-1 = Spheniscid-Alphaherpesvirus-1

E. = *Escherichia*

Mbp = Megabasenpaare

M. = *Mycoplasma*

MALDI-TOF = *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*

k.A = keine Angaben

MS = Massenspektrometrie

rpoB = RNA -Polymerase β -Subunit-Gen

IGS = intergenic spacer

TBE = TRIS-Borat-EDTA-Puffer

rSAP = Shrimp-Alkaline-Phosphatase

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

MEGA 6 = *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*

SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS = *Phosphate buffered saline*

TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

SDS = Natriumdodecylsulfat

TEMED = Tetramethylethylendiamin

LEB = *Laemmli electrode buffer*

TBS = *TRIS buffered saline*

HeLa = *Henrietta Lacks*

RAPD = Random amplification of polymorphic DNA

7. Literaturverzeichnis

- Bak UB, Park JC. 1984. An outbreak of malaria in penguins at the Farmland Zoo. *The Korean Journal of Parasitology* 22(2): 267-272.
- Baker A, Luiz Pereira S, Haddrath O, Edge K. 2005. Multiple gene evidence for expansion of extant penguins out of Antarctica due to global cooling. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 11-17.
- Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, Martel A. 2010. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathology* 39(5): 325-331.
- BirdLife International. 2018. *Spheniscus humboldti*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T22697817A132605004. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22697817A132605004.en>. (Zugriff 03.01.2020).
- Blay N, Côté IM. 2001. Optimal conditions for breeding of captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*): A survey of British zoos. *Zoo Biology* 20: 545–555.
- Botes A, Peyrot BM, Olivier AJ, Burger WP, Bellstedt DU. 2005. Identification of three novel mycoplasma species from ostriches in South Africa. *Veterinary Microbiology* 111: 159-169.
- Bradbury JM. 2005. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. *British Poultry Science* 46(2): 125–136.
- Brown DR. 2010. Phylum XVI *Tenericutes* Murray 1984a, 356VP (Effective publication: Murray 1984b, 33). In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Whitman WL, Whitman WB, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Second edition. New York: Springer, Vol 4, 567–723.
- Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. 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.

- Buckle K, Draper J, Humphrey S, Hunter S. 2013. First isolation in New Zealand of *Mycoplasma lipofaciens*, from the lung of a Fiordland crested penguin/Tawaki with pneumonia. *Surveillance* 40(2): 5-7.
- Clarke JR, Knowles RK. 2000. Diseases and parasites of penguins. *Penguin Conservation*, 13:5-24
- De la Puente S, Bussalleu A, Cardeña M, Valdés-Velásquez A, Majluf P, Simeone A. 2013. Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). In: Garcia Borboroglu P, Dee Boersma P, Hrsg. *Penguins: Natural History and Conservation*. Erste Aufl. Seattle: University of Washington Press, 269-287.
- De Lisle GW, Stanislawek WL, Moors PJ. 1990. *Pasteurella multocida* Infections in rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome*) from Campbell Island, New Zealand. *Journal of Wildlife Disease* 26(2): 283-285.
- Dewar ML, Arnould JPY, Dann P, Trathan P, Groscolas R, Smith S. 2013. Interspecific variations in the gastrointestinal microbiota in penguins. *MicrobiologyOpen* 2(1): 195–204.
- Duignan P J. 2001. Diseases of penguins. *Surveillance*, 28(4): 5-11.
- Frasca S Jr, Scott Weber E, Urquhart H, Liao X, Gladd M, Cecchini K, Hudson P, May M, Gast RJ, Gorton TS, Geary S J. 2005. Isolation and characterisation of *Mycoplasma sphenisci* sp. nov. from the choana of an aquarium-reared Jackass penguin (*Spheniscus demersus*). *Journal of Clinical Microbiology* 43 (6): 2976-2979.
- Fürnkranz U, Siebert-Gulle K, Rosengarten R, Szostak MP. 2013. Factors influencing the cell adhesion and invasion capacity of *Mycoplasma gallisepticum*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(63).
- Grilo ML, Vanstreels RET, Wallace R, García-Párraga D, Braga ÉM, Chitty J, Catão-Dias JL, Madeira de Carvalho LM. 2016. Malaria in penguins – current perceptions. *Avian Pathology* 45(4): 393-407.

- Gyuranecz M, Mitter A, Kovács AB, Gróznér D, Kreizinger Z, Bali K, Bányai K, Morrow CJ. Isolation of *Mycoplasma anserisalpingitidis* from swan goose (*Anser cygnoides*) in China. 2020. BMC Veterinary Research 16(178).
- Hartup BK, Bickal JM, Dhont AA, Ley DH, Kollias GV. 2001. Dynamics of conjunctivitis and *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches. The Auk 118(2): 327–333
- Hays C. 1984. The Humboldt penguin in Peru. Oryx 18 (2): 92-95.
- Jencek, JE, Beaufrère H, Tully TN, Garner MM, Dunker FH, Baszler TV. 2012. An outbreak of *Chlamydophila psittaci* in an outdoor colony of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). Journal of Avian Medicine and Surgery 26(4): 225-231.
- Jordan FTW. 1975. Avian mycoplasma and pathogenicity - A review. Avian Pathology 4(3): 165-174.
- Kim K-S, Ko KS, Chang M-W, Hahn TW, Hong SK, Kook Y-H. 2003. Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species. FEMS Microbiology Letters, 226(2): 299–305.
- Kincaid AL, Bunton TE, Cranfield M. 1988. Herpesvirus-like infection in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). Journal of Wildlife Diseases 24(1): 173-175.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680–685.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: Wiley, 115–175.
- Levisohn S, Kleven SH. 2000. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). Revue Scientifique et Technique 19(2): 425-442.
- Ley DH, Berkhoff JE, McLaren JM. 1996. *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. Avian Diseases 40(2): 480-483.

Masover GK, Becker FA. 1998. Detection of Mycoplasmas in Cell Cultures by Cultural Methods. In: Miles RJ, Nicholas RAJ, eds. Methods in Molecular Biology Vol 104: Mycoplasma Protocols. 1. Edition. Totowa: Humana Press, 207-215.

Meyen F. 1834. The Integrated Taxonomic Information System (ITIS). https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=174463 (Zugriff 03.01.2020).

Miles RJ, Nicholas RAJ. 1998. Introduction. In: Miles RJ, Nicholas RAJ, eds. Methods in Molecular Biology Vol 104: Mycoplasma Protocols. First Edition. Totowa: Humana Press, 1-5.

Miles RJ. 1992. Catabolism in *Mollicutes*. Journal of General Microbiology 138(9):1773-1783.

Miller GD, Hofkin BV, Snell H, Hahn A, Miller RD. 2001. Avian malaria and Marek's Disease: potential threats to Galapagos penguins *Spheniscus mendiculus*. Marine Ornithology 29(1):43-46.

Möller Palau-Ribes F. 2016. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von Mykoplasmen bei Weißstörchen (*Ciconia ciconia*, LINNAEUS, 1758) und Beschreibung einer neuen Spezies (*Mycoplasma ciconiae* sp. nov.) [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität.

Möller Palau-Ribes F, Enderlein D, Hagen N, Herbst W, Hafez HM, 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 66: 3477-3484.

Much P, Winner F, Stipkovits L, Rosengarten R, Citti C. 2002. Mycoplasma gallisepticum: influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. FEMS Immunology and Medical Microbiology 34: 181-186.

Nowak JI. 1929. The Integrated Taxonomic Information System (ITIS). https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=957646#null (Zugriff 10.03.2020).

Parsons NJ, Gous TA, Schaefer AM, Vanstreels RET. 2016. Health evaluation of African penguins (*Spheniscus demersus*) in southern Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 83(1) DOI: 10.4102/ojvr.v83i1.1147.

Pfaff F, Schulze C, König P, Franzke K, Bock S, Hlinak A, Kämmerling J, Ochs A, Schüle A, Mettenleiter TC, Höper D, Beer M. 2017. A novel alphaherpesvirus associated with fatal diseases in banded Penguins. Journal of General Virology 98: 89–95.

Pitcher DG, Nicholas RAJ. 2004. Mycoplasma host specificity: Fact or fiction? The Veterinary Journal 170: 300-306.

Ramírez AS, Naylor CJ, Pitcher DG, Bradbury JM. 2008. High inter-species and low intraspecies 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.

Rawadi GA. 1998. Characterization of Mycoplasmas by RAPD Fingerprinting. In: Miles RJ, Nicholas RAJ, eds. Methods in Molecular Biology Vol 104: Mycoplasma Protocols. 1. Edition. Totowa: Humana Press, 179-187.

Razin S, Jacobs E. 1992. Mycoplasma adhesion. Journal of General Microbiology 138: 407-422.

Razin S, Tully JG, eds. 1983. Methods in Mycoplasmaology Vol 1: Mycoplasma Characterization. First edition. New York: Academic Press.

Schlosser JA, Dubach JM, Garner TWJ, Arya B, Bernal M, Simeone A et al. 2009. Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. Conservation Genetics 10 (4): 839–849.

Siegman O, Neumann U, Hrsg. 2012. Kompendium der Geflügelkrankheiten. Siebente Aufl. Hannover: Schlütersche Verlag, 288-289.

Smith KM, Karesh WB, Majluf P, Paredes R, Zavalaga C, Hoogesteijn Reul A, Stetter M, Braselton E, Puche H, Cook RA. 2008. Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. *Avian Diseases* 52(1): 130-135.

Spergser J, Botes A, Nelb T, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Langer S, Ries S, Dinhopf N, Szostak M, Loncaric I, Busse HJ. 2020. *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. and *Mycoplasma struthionis* sp. nov. isolated from ostriches with respiratory disease. *Systematic and Applied Microbiology* 43(1).

Spergser J, Hess C, Igor Loncaric I, Ramírez AS. 2019. MALDI-ToF mass spectrometry is a superior diagnostic tool for the identification and differentiation of mycoplasmas isolated from animals. *Journal of Clinical Microbiology* 57 (9).

Tully JG, Bové JM, Laigret F, Whitcomb RF. 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.

Volokhov DV, George J, Liu SX, Ikonomi P, Anderson C, 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 DV, Gróznér D, Gyuranecz M, Ferguson-Noel N, Gao Y, Bradbury JM, Whittaker P, Chizhikov VE, Szathmary S, Stipkovits L. 2020. *Mycoplasma anserisalpingitidis* sp. nov., isolated from European domestic geese (*Anser anser domesticus*) with reproductive pathology). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70 (4).

Volokhov DV, Neverov AA, George J, Kong H, Liu SX, Anderson C, Davidson MK, 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 DV, Simonyan V, Davidson MK, Chizhikov VE. 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.

Wallace RS, Dubach J, Michaels MG, Keuler NS, Diebold ED, Grzybowski K, Teare JA, Willis MJ. 2008. Morphometric determination of gender in adult Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *Waterbirds: The International Journal of Waterbird Biology* 31(3): 448-453.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J, Maniloff J, Woese CR. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 171(12): 6455-6467.

Widmer D, Ziemssen E, Schade B, Kappe E, Schmitt F, Kempf H, Wibbelt G. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* infection in a group of captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 30(2): 187-195.

Wieslander Å, Rosén M. 2002. The Cell Membrane and Transport. In: Razin S, Herrmann R, eds. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. First Edition. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 131-161.

Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51(2): 221-271.

Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(1): 494-498.

Worliczek HL, Kämpfer P, Rosengarten R, Tindall BJ, Busse HJ. 2007. Polar lipid and fatty acid profiles – Re-vitalizing old approaches as a modern tool for the classification of mycoplasmas?. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 355-370.

Yavari CA. 2010. Studies on a *Mycoplasma gallisepticum*-like organism isolated from the Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) [Dissertation]. Liverpool: University of Liverpool.

Yavari CA, Ramírez AS, Nicholas RAJ, Radford AD, Darby AC, Bradbury JM. 2017. *Mycoplasma tullyi* sp. nov., isolated from penguins of the genus *Spheniscus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 3692-3698.

Ziegler L, Möller Palau-Ribes F, Enderlein D, Herbst W, Schmidt L, Lierz M. 2019. *Mycoplasma hafezii* sp. nov., isolated from the trachea of a peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69: 773–777.

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

8.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Humboldt Pinguine

Tabelle 2: Taxonomie der Mykoplasmen

Tabelle 3: Mykoplasmen bei Vögeln

Tabelle 4: Mykoplasmen-Isolate (Bezeichnung, Isolationsjahr, Habitat, Gruppierung/Artbestimmung nach MALDI-ToF)

Tabelle 5: Für die PCR verwendete Primer (Zielsequenz, Primer ID, Primer-Sequenz, Referenz)

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-Genamplifikation

Tabelle 7: Thermozyklische Bedingungen für die 16S rRNA-Genamplifikation

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Amplifikation der 16S-23S intergenetische Spacer-Region

Tabelle 9: Thermozyklische Bedingungen die Amplifikation der 16S-23S intergenetische Spacer-Region

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Amplifikation des rpoB-Gens

Tabelle 11: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des rpoB-Gen

Tabelle 12: Zur Proteinanalyse herangezogene Isolate (Art, Isolat ID, Vergleichsstämme)

Tabelle 13: Höchste Sequenzähnlichkeitswerte der 16S-23S intergenischen Spacer-Region zu den nächstverwandten Arten (Art, Nächstverwandte Art, Sequenzähnlichkeit der 16S-23S IGS in Prozent)

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kolonien von (A) 1802A, (B) 1052 und (C) 2606 auf SP4 Agar nach Bebrütung über vier Tage, mit 40-facher Vergrößerung

Abb. 2: Kolonien von (D) 2562, (E) T und (F) M auf SP4 Agar nach Bebrütung über vier Tage, mit 40-facher Vergrößerung

Abb. 3: Kolonie von 2609 auf SP4 Agar nach Bebrütung über vier Tage, mit 40-facher Vergrößerung

Abb. 4: Gelelektrophorese 16 S RNA

Abb. 5: Gelelektrophorese 16S-23S IGS

Abb. 6: Gelelektrophorese rpoB

Abb. 7: Gelelektrophorese rpoB mit Primer MPF 1

Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. A Isolate (16S rRNA-Gen)

Abb. 9: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. B Isolate, Mycoplasma sp. D und Mycoplasma sp. F Isolate (16S rRNA-Gen)

Abb. 10: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. C Isolate und des Mycoplasma sp. E Isolats (16S rRNA-Gen)

Abb. 11: Phylogenetischer Stammbaum des M. tullyi Isolats (16S rRNA-Gen)

Abb. 12: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. A Isolate (rpoB-Gen)

Abb. 13: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. B Isolate, der Mycoplasma sp. D und Mycoplasma sp. F Isolate (rpoB-Gen)

Abb. 14: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. C Isolate und des Mycoplasma sp. E Isolats (rpoB-Gen)

Abb. 15: Phylogenetischer Stammbaum des M. tullyi Isolats (rpoB-Gen)

Abb. 16: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. A Isolate (rpoB-Aminosäuren)

Abb. 17: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. B Isolate, der Mycoplasma sp. D und Mycoplasma sp. F Isolate (rpoB-Aminosäuren)

Abb. 18: Phylogenetischer Stammbaum der Mycoplasma sp. C Isolate und des Mycoplasma sp. E Isolats (rpoB-Aminosäuren)

Abb. 19: Phylogenetischer Stammbaum des *M. tullyi* Isolats (rpoB-Aminosäuren)

Abb. 20: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE der Isolate der Mycoplasma sp. A Gruppe und der entsprechenden Vergleichsstämme

Abb. 21: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE der Isolate der Mycoplasma sp. B und der entsprechenden Vergleichsstämme

Abb. 22: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE der Isolate der Mycoplasma sp. C Gruppe und der entsprechenden Vergleichsstämme

Abb. 23: Coomassie-Brillantblau-Färbung der SDS PAGE von Mycoplasma sp. D, Mycoplasma sp. E, Mycoplasma sp. F und *M. tullyi*, sowie die entsprechenden Vergleichsstämme

Abb. 24: Western Blot der Mycoplasma sp. A Isolate und Vergleichsstämme nach Inkubation mit anti-*Mycoplasma sp. eudypsis* 1802T Antiserum

Abb. 25: Elektronenmikroskopie von Isolat 1802A

Abb. 26: Elektronenmikroskopie von Isolat 1052

Abb. 27: Elektronenmikroskopie von Isolat 2606

Abb. 28: Elektronenmikroskopie von Isolat M

Abb. 29: Elektronenmikroskopie von Isolat T

Abb. 30: Elektronenmikroskopie von Isolat 2562