

Aus dem
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Veterinärinstitut Oldenburg
des LAVES Niedersachsen

Untersuchungen zur Stammdifferenzierung von
Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Martina Schulze, geb. Meier
Tierärztin aus Basel

Berlin 2009

Journal.-Nr.: 3292

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gerd Schlenker

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

paratuberculosis, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, genotypes, strain differences, molecular epidemiology, bacterial typing techniques (MeSH), polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, phenotypes, Germany, Europe

Tag der Promotion: 30.04.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-604-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

meinen Großvätern

Inhalt

Einleitung	1
Schrifttum	2
1. Paratuberkulose	2
1.1. Historischer Überblick	2
1.2. <i>M. paratuberculosis</i>	2
1.2.1. Taxonomie und Morphologie.....	2
1.2.2. Antigene.....	3
1.2.3. Genetische Charakterisierung.....	3
1.3. Erkrankung	3
1.3.1. Krankheitsbild	3
1.3.2. Pathologie und Histologie	4
1.3.3. Pathogenese und Immunologie.....	4
1.3.4. Wirtschaftliche Bedeutung.....	5
1.4. Epidemiologie	5
1.4.1. Wirtsspektrum.....	5
1.4.2. Geografische Verbreitung	6
1.4.3. Erregerausscheidung	6
1.4.4. Übertragung.....	7
1.4.5. Tenazität.....	7
1.4.6. <i>M. paratuberculosis</i> als potentieller Zoonoseerreger	8
1.5. Diagnose der Paratuberkulose.....	8
1.5.1. Direkter Erregernachweis.....	9
1.5.2. Indirekter Erregernachweis	10
1.6. Bekämpfung	11
1.6.1. Behandlung.....	11
1.6.2. Impfung.....	11
1.6.3. Sanierung	12
2. Stammdifferenzierung.....	13
2.1. Phänotypische Differenzierungsverfahren.....	14
2.2. Genotypische Differenzierungsverfahren	15
2.2.1. Strukturen im Genom	15
2.2.1.1. Repetitive Elemente	15
2.2.1.2. Single nucleotide polymorphism (SNP)	16
2.2.2. Restriktionsverdaubasierte Differenzierungsverfahren	17

2.2.2.1. Plasmidtypisierung oder Plasmid(profil)-Analyse	17
2.2.2.2. Restriktionsfragmentanalyse (REA).....	17
2.2.2.3. Southern Blot und Hybridisierung oder Restriktionsfragment- Längenpolymorphismus (RFLP).....	18
2.2.2.4. Verwendung selten schneidender Enzyme: PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese), LFP (large fragment polymorphism) oder Makrorestriktionsanalyse	19
2.2.2.5 Vermehrung und Nachweis ausgewählter Fragmente: AFLP (Amplified fragment length polymorphism).....	19
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion	20
2.2.3.1. Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) oder multilocus short sequence repeat Typisierung (MLSSR-Typisierung)	21
2.2.3.2. PCR-basierter locus-spezifischer RFLP oder PCR-REA	21
2.2.3.3. Multilocus sequence typing (MLST).....	21
2.2.3.4. RAPD (random amplified polymorphic DNA); AP-PCR (arbitrarily primed PCR).....	22
2.2.3.5. Rep-PCR.....	23
2.2.4. Vergleichende oder komparative Genomik.....	23
2.2.4.1. SNP-Analyse.....	23
2.2.4.2. Sequenzierung	24
2.2.4.3. Mikroarray oder DNA-Chip	24
2.2.4.4. Subtraktive Hybridisierung (SH)	25
2.3. Differenzierung von <i>M. paratuberculosis</i>	26
2.4. Stammdifferenzierung bei <i>M. paratuberculosis</i>	28
2.4.1. Phänotypische Differenzierung	28
2.4.2. Genotypische Differenzierung	28
2.4.2.1 Genutzte Strukturen im Genom	28
2.4.2.2. Verwendete Verfahren	29
2.4.3. Subtypen von <i>M. paratuberculosis</i>	34
Material und Methoden.....	38
1. Material.....	38
1.1. Bakterienstämme.....	38
1.2. Kennzeichnung der Isolate.....	39
2. Methoden	39
2.1. Erfassen von Informationen zu Betrieben und einzelnen Isolaten	39
2.2. Untersuchung der Organproben	39
2.2.1. Probengewinnung	39

2.2.2. Mikroskopischer und kultureller Erregernachweis	40
2.2.3. Histologische Untersuchung der Organproben.....	41
2.3. Lyophilisieren.....	41
2.4. Molekulargenetische Charakterisierung	41
2.4.1. Untersuchung mit der Loci-PCR (Bull et al., 2000)	41
2.4.2. IS900 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	44
2.5. Kulturmorphologische Untersuchung der Isolate.....	46
2.6. Statistische Auswertung der Daten	47
2.6.1. Berechnung der Assoziationen zwischen einzelnen Merkmalen	47
2.6.2. Cluster-Analyse.....	48
2.7. Berechnung der Diskriminierungsindices.....	48
Ergebnisse	49
1. Informationen zu den Isolaten.....	49
1.1. Weitergehende Informationen zu den Betrieben und Isolaten	49
1.2. Untersuchung der Organproben	49
1.2.1. Pathologisch-anatomische Untersuchung	49
1.2.2. Pathologisch-histologische Untersuchung.....	49
1.2.3. Mikroskopische Untersuchung	49
1.2.4. Kulturelle Untersuchung.....	49
2. Molekulargenetische Charakterisierung.....	50
2.1. Loci-PCR nach Bull et al. (2000).....	50
2.2. IS900 RFLP	54
2.3. Kombination von Loci-PCR und IS900 RFLP.....	58
3. Kulturmorphologische Untersuchung.....	61
3.1. Wachstum von <i>M. paratuberculosis</i> in Reinkultur auf Herrold's Egg-Yolk-Agar.....	61
3.2. Erfasste Merkmale der kulturmorphologischen Untersuchung	61
3.3. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Merkmalen der kulturellen Untersuchung	63
4. Zusammenhänge zwischen den genotypischen und phänotypischen Eigenschaften....	63
4.1. Kulturmorphologie – Loci-PCR.....	63
4.2. Kulturmorphologie – IS900 RFLP.....	63
5. Zusammenhänge zwischen der Herkunft der Isolate und den Ausprägungen unterschiedlicher Merkmale	64
5.1. Loci-PCR	64
5.2. IS900 RFLP	64
5.3. Kulturmorphologische Untersuchung	64
6. Diskriminierungsindices	65

Diskussion	66
Zusammenfassung	80
Summary	81
Literatur	82
Anhang	115
1. Erfassung der Informationen zu den <i>M. paratuberculosis</i> -Isolaten.....	115
2. Durchführung des IS900 RFLP	116
2.1. PCR zur Herstellung der DNA-Sonde innerhalb des IS900.....	117
3. Verwendete Lösungen und Nährmedien.....	118
3.1. Loci-PCR	118
3.2. IS900 RFLP	118
3.3. Kulturmorphologische Untersuchung	120
4. Primer und PCR-Produktgrößen.....	121
4.1. Loci-PCR nach Bull et al., 2000	121
4.2. Herstellung der DNA-Sonde innerhalb des IS900	123
5. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	123
5.1. Chemikalien	123
5.2. Kits	125
5.3. Verbrauchsmaterialien	125
6. Geräteverzeichnis.....	125
7. Informationen zu den <i>M. paratuberculosis</i> -Isolaten.....	126
8. Ergebnisse der Untersuchung der Organproben.....	133
9. Statistische Zusammenhänge.....	134
10. Zusammenfassung eng verwandter Loci-PCR-Muster durch Reduktion der berücksichtigten Loci	136
11. Darstellung der Ergebnisse der Stammdifferenzierung der einzelnen <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate.....	138
12. Abbildungen	143
13. Tabellen.....	144
14. Abkürzungen	146

Einleitung

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, im Folgenden *M. paratuberculosis* genannt, ist der Erreger der Paratuberkulose, einer chronischen, stets tödlich verlaufenden Durchfallerkrankung der Wiederkäuer. Die Paratuberkulose verursacht hohe wirtschaftliche Verluste und wurde seit ihrer Erstbeschreibung 1895 weltweit nachgewiesen. Viele Fragen beispielsweise zur Pathogenese oder der Bedeutung als Zoonoseerreger sind derzeit noch nicht abschließend geklärt. Eine sichere Diagnostik ist problematisch, da alle bislang angewandten Verfahren mit Unsicherheiten behaftet sind. Die Bekämpfung beruht v.a. auf Maßnahmen zur Bestandssanierung. Die Einschleppung in einen Bestand erfolgt in der Regel über den Zukauf in der Inkubationszeit befindlicher infizierter Tiere. Für die Aufklärung solcher Infektketten und der Rolle von Wildtieren oder Schafen als Erregerreservoir ist eine genaue Erregerotypisierung notwendig. Diese wurde erst mit der Einführung molekularbiologischer Methoden möglich. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Eignung der Loci-PCR nach Bull et al. (2000) zur *M. paratuberculosis*-Differenzierung zu überprüfen. Als Vergleichsmethode wird der IS900 RFLP, das derzeitige Standardverfahren, eingesetzt. Insgesamt werden 92 willkürlich ausgewählte *M. paratuberculosis*-Isolate untersucht. Um phänotypische Ausprägungen der genetischen Unterschiede nachzuweisen, wird zudem eine kulturmorphologische Untersuchung der *M. paratuberculosis*-Isolate durchgeführt. Da der größte Teil der untersuchten Isolate von *M. paratuberculosis* aus Niedersachsen stammt, ist ein Einblick in die genetische Diversität des Erregers in diesem Bundesland möglich.

Schrifttum

1. Paratuberkulose

1.1. Historischer Überblick

Das Bild einer chronischen, stets tödlich endenden Durchfallerkrankung des Rindes war schon im 19. Jahrhundert bekannt (Rankin, 1970). 1895 beschrieben Johne und Frothingham als Erste eine chronische Enteritis in Verbindung mit säurefesten Stäbchen. Sie gingen von einer atypischen Darmtuberkulose aus. Im Jahre 1906 unterschied Bang diese von einer tuberkulösen Enteritis und nannte sie „Enteritis chronica bovis pseudotuberculosa“. Schon Johne und Frothingham vermuteten, dass es sich beim Erreger dieser Enteritis um den der Geflügeltuberkulose handeln könnte. Isolierung und Anzucht des Erregers gelangen jedoch erst 1912 (Twort und Ingram). Bezeichnet wurde er als *Mycobacterium enteritidis chronicae bovis*, Johne. Seitdem wurde der Erreger mehrfach umbenannt. Aufgrund seiner engen genetischen Verwandtschaft mit *Mycobacterium avium* heißt er heute *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Thorel et al., 1990).

1.2. *M. paratuberculosis*

1.2.1. Taxonomie und Morphologie

Die Gattung *Mycobacterium* wird neben den eng verwandten Corynebakterien, Nokardien und Rhodokokken in die Ordnung der *Actinomycetales* eingeordnet (Brennan und Nikaido, 1995). *M. paratuberculosis* gehört zusammen mit *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis* und *M. avium* subsp. *silvaticum* zur Spezies *M. avium* (Mijs et al., 2002; Thorel et al., 1990). Diese wiederum bildet zusammen mit *M. intracellulare* den *M. avium*-Komplex – MAC (Inderlied et al., 1993).

M. paratuberculosis ist ein kleines (0,5x1,5 µm), säurefestes, gram-positives Stäbchen (Cocito et al., 1994). Die Säurefestigkeit ist bedingt durch den komplexen Aufbau und hohen Lipidgehalt der Zellwand (Clarke, 1997). Die Zellwand besteht aus einer inneren Peptidoglykanschicht, es folgt eine Schicht aus langkettigen Fettsäuren (Mykolsäuren), die mit Arabinogalaktan gekoppelt sind. Nach außen wird die Zellwand durch eine Schicht Peptidoglykolipide abgeschlossen (Brennan und Nikaido, 1995). Phänotypisch zeichnet sich *M. paratuberculosis* durch ein ausgesprochen langsames Wachstum (Lambrecht et al., 1988) und die Abhängigkeit von Mycobactinzusätzen im Nährmedium (Whipple et al., 1991) aus.

1.2.2. Antigene

Wichtige Antigene von *M. paratuberculosis* sind das Lipoarabinomannan (Sugden et al., 1987) sowie der Antigenkomplex A36 (de Kesel et al., 1992; Valentin-Weigand und Goethe, 1999). Der größte Teil der Antigene von *M. paratuberculosis* weist allerdings eine hohe Ähnlichkeit zu den Antigenen anderer Mykobakterien auf (Olsen et al., 2002). In den letzten Jahren wurden jedoch auch subspezies-spezifische Antigene beschrieben (Bannantine et al., 2004; Coetsier et al., 1998; Paustian et al., 2004).

1.2.3. Genetische Charakterisierung

Das Genom von *M. paratuberculosis* ist etwa 4,8 Millionen bp (4829781 bp) groß und sein GC-Gehalt liegt bei knapp 70% (Li et al., 2005). Die vorhergesagten Proteine entsprechen zu einem großen Teil anderen schon bekannten bakteriellen Proteinen, v.a. von *M. tuberculosis* oder *M. avium* subsp. *avium* (Bannantine et al., 2003; Li et al., 2005). *M. paratuberculosis*-spezifische Gene bzw. Proteine sind beschrieben worden, ihre genaue Funktion ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Bannantine et al., 2003; Semret et al., 2005). Einige spezifische Gensequenzen wie die Insertionselemente IS900 (Green et al., 1989) und ISMav2 (Strommenger et al., 2001), das *hspX*-Gen (Ellingson et al., 1998) oder das F57-Fragment (Poupart et al., 1993) werden sowohl zur Speziesbestimmung als auch für die Stammdifferenzierung genutzt. Dem IS900, das in 15-20 Kopien im Genom vorliegt, kommt in diesem Rahmen die größte Bedeutung zu (Motiwala et al., 2006b; Stabel und Bannantine, 2005). Plasmid-DNA konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Harris und Barletta, 2001).

1.3. Erkrankung

1.3.1. Krankheitsbild

Das klinische Bild der Paratuberkulose ist geprägt durch anhaltenden wässrigen Durchfall bei erhaltenem Appetit und fortschreitender Auszehrung bis hin zum Tod (Cocito et al., 1994). Aufgrund der langen Inkubationszeit von 2-10 Jahren (Tiwari et al., 2006) geht der klinischen Erkrankung eine lange klinisch inapparente Phase vorweg. In dieser Phase können unspezifische Symptome wie unbefriedigende Milchleistung oder Fruchtbarkeitsstörungen (Buergelt und Duncan, 1978; Johnson-Ifeorunlu et al., 2000; Nordlund et al., 1996) sowie eine intermittierende Erregerausscheidung beobachtet werden (Cocito et al., 1994). Auslöser für einen Ausbruch der klinischen Erkrankung mit massiver Ausscheidung von Mykobakterien können verschiedene Stressfaktoren, häufig die Abkalbung, sein (Chiodini et al., 1984; Deutz et al., 2003; Gerlach und Valentin-Weigand, 1998).

1.3.2. Pathologie und Histologie

Das pathologisch-anatomische Bild der Paratuberkulose ist gekennzeichnet durch eine granulomatöse Enteritis. Besonders im Bereich des Ileums und des terminalen Jejunums, aber auch im Dickdarm ist die Schleimhaut stark verdickt und bildet v.a. beim Rind „hirnwindungsartige“ Falten (Buergelt et al., 1978; Olsen et al., 2002; Pohlenz, 1991). Die mesenterialen Lymphgefäße sind gestaut und die Mesenteriallymphknoten vergrößert (Buergelt et al., 1978; Gonzáles et al., 2005). Auch in anderen Organen wie z.B. Leber und Niere werden Granulome beobachtet (Buergelt et al., 1978; Hines et al., 1987). In schweren Fällen treten zudem Ödeme, Kachexie sowie eine seröse Atrophie des Körperfetts auf (Clarke, 1997; Olsen et al., 2002). Histologisch sind in der Darmwand, v.a. in der Lamina propria mucosae, epitheloide Zellen, Makrophagen, Riesenzellen vom Langhanstyp sowie Lymphozyten zu beobachten. Mittels Ziehl-Neelsen-Färbung lassen sich intrazellulär säurefeste Stäbchen nachweisen (Gonzáles et al., 2005; Huda und Jensen, 2003). Das histologische Bild der Lymphknoten ist ebenfalls durch eine granulomatöse Entzündung gekennzeichnet (Buergelt et al., 1978). Je nach Ausdehnung der Veränderungen unterscheidet man (multi-)fokale und diffuse Veränderungen. Die diffusen Veränderungen können je nach vorherrschendem Zelltyp als multibazillär (v.a. Makrophagen und Epitheloidzellen, Riesenzellen, massenhaft säurefeste Stäbchen), pauzibazillär bzw. lymphozytär (v.a. Lymphozyten, vereinzelt Riesenzellen und Makrophagen, wenig säurefeste Stäbchen) oder intermediär klassifiziert werden (Gonzáles et al., 2005).

1.3.3. Pathogenese und Immunologie

Die Pathogenese der Paratuberkulose ist bislang nur lückenhaft geklärt. Von großer Bedeutung ist die Fähigkeit von *M. paratuberculosis*, intrazellulär zu überleben, und die hierdurch bedingte Immunantwort des Wirtes (Coussens, 2001; Valentin-Weigand und Goethe, 1999). Der Erreger wird von M-Zellen im Domepithel oberhalb der Peyerschen Platten aufgenommen und gelangt von dort in die sub- und intraepithelial gelegenen Makrophagen (Momotami et al., 1988). Die Persistenz von *M. paratuberculosis* in den Makrophagen ist v.a. durch Hemmung der Phagosom-Lysosom-Fusion und eine nur schwache Ansäuerung der Phagosomen gewährleistet (Coussens, 2001; Valentin-Weigand, 2004). Auch bietet der Zellwandaufbau einen gewissen Schutz vor dem feindlichen Phagosomenmilieu (Chiodini, 1996). Die erste Reaktion des Organismus auf den Erreger ist eine starke zellvermittelte, auf den Darm begrenzte Immunabwehr. Diese wird v.a. durch CD4⁺Th1-Zellen, aber auch durch zytotoxische CD8⁺T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen vermittelt. Die genaue Rolle letzterer ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Coussens, 2001; Koo et al., 2004). Durch die Sezernierung verschiedener Zytokine durch CD4⁺Th1-Zellen, z.B. IFN- γ , TNF- α und IL-2 werden Makrophagen zum Ort der Infektion gelockt und aktiviert, um die intrazellulären Erreger abzutö-

ten. Infolgedessen kommt es entweder zur Erregereliminierung oder, bei Persistenz von *M. paratuberculosis*, zur weiteren Ausbildung der granulomatösen Veränderungen (Chiodini, 1996; Clarke, 1997). Durch Lysis infizierter Makrophagen freigesetzte Mykobakterien führen zu einer intermittierenden Ausscheidung von *M. paratuberculosis* mit dem Kot sowie zur Aktivierung der humoralen Immunantwort (Coussens, 2001). Im weiteren Verlauf wird die zelluläre Immunantwort bis hin zur Anergie herabreguliert, vermutlich, um Gewebsschäden zu vermeiden (Coussens, 2004). Hierdurch kommt es zu einer verstärkten Proliferation der Mykobakterien und durch einen „antigenic overload“ schließlich auch zu einem Rückgang der humoralen Immunabwehr (Chiodini, 1996; Clarke, 1997). Ist die zelluläre Immunabwehr stark genug, bildet sich die sogenannte pauszibazilläre, tuberkuloide Form aus, bei der nur wenige Erreger in den granulomatösen Veränderungen vorliegen. Bei ungehemmter Vermehrung der Erreger kommt es zur Ausprägung der multibazillären, lepromatösen Form (Chiodini, 1996; Clarke, 1997). Allerdings besteht keine Korrelation zwischen dem histologischen und dem klinischen Bild (Valentin-Weigand und Goethe, 1999).

Der Gewichtsverlust ist bedingt durch eine Proteinmalabsorption, die wiederum Folge der massiven zellulären Infiltration der Darmschleimhaut ist (Clarke, 1997). Toxine wurden für den Erreger bisher nicht nachgewiesen (Li et al., 2005; Valentin-Weigand, 2002).

1.3.4. Wirtschaftliche Bedeutung

Die Paratuberkulose gilt als eine der kostenintensivsten Erkrankungen in der Milchwirtschaft. Rindermastbetriebe sind ebenfalls betroffen (Hutchinson, 1996). Die Höhe der Verluste werden in den USA auf 40-227 \$ pro Kuh und Jahr (Harris und Barletta, 2001) oder für die gesamte US-Milchwirtschaft auf 1,5 Milliarden \$ pro Jahr (Cocito et al., 1994) geschätzt. Wirtschaftliche Schäden entstehen sowohl bei klinischen als auch klinisch inapparenten Erkrankungen durch eine herabgesetzte Milchleistung, verminderte Fruchtbarkeit, Kosten für Diagnostik und evtl. Behandlung, den vorzeitigen Verlust des Tieres sowie eine Minderung des Schlachterlöses (Benedictus et al., 1987; Hutchinson, 1996; Johnson-Ifearewande et al., 2000; Nordlund et al., 1996; Tiwari et al., 2006). Zudem fallen im Rahmen eines Bekämpfungsverfahrens zusätzliche Kosten für Diagnostik und Ausmerzungen infizierter Tiere an. Allerdings sind die durch die Paratuberkulose hervorgerufenen wirtschaftlichen Verluste insgesamt schwer quantifizierbar (Hutchinson, 1996).

1.4. Epidemiologie

1.4.1. Wirtsspektrum

Die Paratuberkulose ist vor allem eine Erkrankung der Wiederkäuer. Sowohl Haus- als auch Wildwiederkäuer sind betroffen (Buerget et al., 2000; Chiodini et al., 1984; Deutz et al., 2005; Weber et al., 1992). Experimentell können auch monogastrische Tiere infiziert werden,

z.B. Labornager wie Hamster, Mäuse und Ratten (Chiodini et al., 1984), aber auch Pferde (Larsen et al., 1972), Schweine (Larsen et al., 1971) und Hühner (Larsen und Moon, 1972). Natürliche Infektionen mit *M. paratuberculosis* sind u.a. bei Wildkaninchen (Greig et al., 1997), Füchsen, Wiesel (Beard et al., 2001) und Katzen (Palmer et al., 2005) beschrieben. In der Regel lassen sich zwar histopathologische Veränderungen und eine Ausscheidung des Erregers, aber keine klinischen Symptome nachweisen. Beim Pferd (Rankin, 1956) und bei Stummelschwanz-Makaken (McClure et al., 1987) sind jedoch auch klinische Erkrankungen beschrieben. Des Weiteren gelang die Isolierung von *M. paratuberculosis* u.a. auch aus Organ- und Kotproben von Dachsen (Beard et al., 2001), Waschbären (Corn et al., 2005), verschiedenen Mäusearten (Corn et al., 2005; Deutz et al., 2005) sowie einigen Vogelarten (Beard et al., 2001; Deutz et al., 2005).

Welche Rolle infizierte Wildtiere in der Epidemiologie der Paratuberkulose als Erregerreservoir und/oder Überträger spielen, ist noch nicht abschließend geklärt.

1.4.2. Geografische Verbreitung

Die Paratuberkulose ist weltweit verbreitet (Olsen et al., 2002). Eine Ausnahme stellt u.a. Schweden dar, das nach einem umfangreichen Sanierungsprogramm als paratuberkulosefrei gilt (Engvall et al., 1994). Angaben zur Herdenprävalenz in Europa liegen zwischen 6 und 55% (Boelart et al., 2000; Gasteiner et al., 1999; Manning und Collins, 2001). Aus den USA liegen Prävalenzangaben von knapp 3 bis 40% in großen Herden vor (Manning und Collins, 2001; Stabel, 1998). Ein direkter Vergleich der Prävalenzen ist allerdings aufgrund der unterschiedlichen Ermittlungsverfahren (v.a. Diagnostik, aber auch Stichprobengröße u.ä.) nicht möglich (Köhler et al., 2005; Stabel, 1998). Die Angaben für Deutschland beschränken sich auf einige regionale Studien (Hacker et al., 2004; Köhler et al., 2005; Luyven et al., 2002) sowie die Meldestatistik (Tierseuchen-Nachrichten-System). Eine Prävalenzschätzung für Deutschland ist mit diesen Daten jedoch nicht möglich (Köhler et al., 2005). Verbreitungsschwerpunkte der Paratuberkulose z.B. in Nordwest-Niedersachsen sind allerdings schon früh beschrieben worden (Huber, 1941).

1.4.3. Erregerausscheidung

M. paratuberculosis wird über Kot, Milch und Sperma ausgeschieden (Sweeney, 1996), wobei die Ausscheidung mit dem Kot im Vordergrund steht. Klinisch erkrankte Tiere können 10^8 KBE/g Kot, bzw. 5×10^{12} Keime am Tag ausscheiden (Chiodini et al., 1984). Auch klinisch inapparent infizierte Rinder scheiden den Erreger intermittierend, jedoch in wesentlich geringeren Mengen (10^2 KBE/g Kot), aus (Hietala, 1992). Eine Ausscheidung von *M. paratuberculosis* über Milch und Kolostrum ist sowohl bei klinisch kranken als auch bei klinisch inapparent infizierten Tieren nachgewiesen (Streeter et al., 1995; Sweeney et al.,

1992c; Taylor, 1981). V.a. die Ausscheidung über das Kolostrum ist von großer Bedeutung für die Übertragung des Erregers (Streeter et al., 1995). Aus Sperma und den Reproduktionsorganen von Zuchtbullen konnte *M. paratuberculosis* ebenfalls isoliert werden (Ayele et al., 2004; Glawischnig et al., 2004).

1.4.4. Übertragung

M. paratuberculosis kann horizontal und vertikal übertragen werden (Olsen, 2002). Neugeborene und junge Tiere sind für eine Infektion besonders empfänglich (Larsen et al., 1975). Aus diesem Grund gilt die orale Aufnahme des Erregers über kotverschmierte Zitzen oder erregerehaltiges Kolostrum als wichtigster Übertragungsweg (Sweeney, 1996).

Eine intrauterine Übertragung ist v.a. bei klinisch kranken Tieren beschrieben (Seitz et al., 1989; Sweeney et al., 1992b). Der möglichen Übertragung von *M. paratuberculosis* durch künstliche Besamung oder Embryotransfer wird trotz des Nachweises uteriner Infektionen (Kopecky et al., 1967; Rohde und Shulaw, 1990) nur eine geringe Bedeutung beigemessen (Glawischnig et al., 2004; Sweeney, 1996). Über Personal oder kotverschmutzte Gerätschaften ist auch eine indirekte Übertragung denkbar. Die Einschleppung der Paratuberkulose in eine Herde erfolgt im Normalfall jedoch über den Zukauf eines klinisch inapparent infizierten Tieres (Sweeney, 1996).

1.4.5. Tenazität

M. paratuberculosis zeichnet sich durch eine ausgesprochen hohe Tenazität aus. In der Umwelt kann der Erreger unter günstigen Bedingungen bis zu 55 Wochen überleben (Whittington et al., 2004). Auch in Gülle (Grewal et al., 2006; Jorgensen, 1977) oder Wasser (Rowe und Grant, 2006) liegen die Überlebenszeiten bei mehreren Monaten. Das Überleben von *M. paratuberculosis* wird durch geringe Sonneneinstrahlung, niedrige Temperaturen, Feuchtigkeit und einen sauren pH-Wert begünstigt (Gerlach und Valentin-Weigand, 1998). Zudem verfügt *M. paratuberculosis* über eine ausgesprochen hohe Hitzetoleranz. In pasteurisierter Milch konnten vermehrungsfähige Keime nachgewiesen werden (Grant et al., 2002). Aber auch andere Verfahren wie die Käseherstellung (Spahr und Schafroth, 2001; Sung und Collins, 2000) oder die Chlorierung von Trinkwasser (Whan et al., 2001) kann der Erreger überleben. Nur wenige Desinfektionsmittel, darunter Formaldehydverbindungen, sind gegen *M. paratuberculosis* wirksam. Befindet sich der Erreger im Kot, ist die Wirksamkeit dieser jedoch stark eingeschränkt (Chiodini et al., 1984). Schon der Zellwandaufbau bietet dem Erreger Schutz vor äußeren Einflüssen (Rowe und Grant, 2006). Zudem neigt *M. paratuberculosis* zur Klumpenbildung, die ebenfalls für die erhöhte Tenazität verantwortlich gemacht wird (Grant et al., 1996). Außerdem werden u.a. eine Interaktion mit Protozoen (Mura et al., 2006; Whan et al., 2006), ein Übergang in einen Ruhezustand (Whittington et

al., 2004) oder die Biofilmbildung (Rowe und Grant, 2006) als Überlebensstrategien des Erregers diskutiert.

1.4.6. M. paratuberculosis als potentieller Zoonoseerreger

Ob *M. paratuberculosis* eine Gefahr für den Menschen darstellt, ist umstritten. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Ähnlichkeiten zwischen der Paratuberkulose und Morbus Crohn des Menschen beobachtet (Dalziel, 1913). Seitdem wurde *M. paratuberculosis* bei Morbus-Crohn-Patienten mehrfach nachgewiesen (Bull et al., 2003a; Chiodini, 1989). Allerdings weisen die meisten Studien sowohl zum Nachweis von *M. paratuberculosis* als auch zur Wirksamkeit von antimykobakteriellen Therapien bei Morbus Crohn starke methodische Schwächen auf, so dass ein kausaler Zusammenhang zwischen *M. paratuberculosis* und Morbus Crohn bislang noch als Hypothese betrachtet werden muss (Schrauder et al., 2004). Als möglicher Übertragungsweg wird v.a. die Milch in Betracht gezogen. *M. paratuberculosis* überlebt sowohl die Pasteurisierung als auch andere Prozesse der Milchverarbeitung, es findet aber eine deutliche Reduktion der Erreger statt (Grant et al., 1996; Spahr und Schafroth, 2001). Die Rolle von Fleisch, Pflanzen oder Trinkwasser als mögliche Infektionsquellen ist bislang nur wenig untersucht (Bülte et al., 2005).

1.5. Diagnose der Paratuberkulose

Die Diagnostik der Paratuberkulose gestaltet sich aufgrund des Krankheitsverlaufes schwierig. Trotz der vielen Neuentwicklungen in den letzten Jahren, gerade bezüglich der PCR-Verfahren, können keine entscheidenden Fortschritte zur Verbesserung der Diagnostik verzeichnet werden (Köhler, 2007). Es existiert bislang kein Testverfahren, um infizierte Tiere in allen Krankheitsstadien sicher zu erkennen (Collins, 1996; Hietala, 1992). V.a. während der Inkubationszeit ist die Diagnostik problematisch, da *M. paratuberculosis* intermittierend ausgeschieden wird und auch die Immunantwort im Verlauf der Erkrankung variiert (Coussens, 2001; Olsen et al., 2002). Klinische Verdachtsfälle können hingegen mit verschiedenen Methoden sicher bestätigt werden (Collins, 1996). Die Diagnostik der Paratuberkulose kann sowohl anhand des klinischen bzw. pathologischen/histologischen Bildes (González et al., 2005) als auch durch den Nachweis des Erregers oder der Immunreaktion auf *M. paratuberculosis* erfolgen (Olsen et al., 2002). Der histologische Nachweis granulomatöser Veränderungen v.a. im Bereich des Ileums und der zugehörigen Lymphknoten, mit oder ohne säurefeste Stäbchen, weist eine hohe Sensitivität auf (González et al., 2005) und wird in vielen Untersuchungen neben der kulturellen Anzucht aus den Gewebeproben zur sicheren Feststellung der Infektion eines Tieres verwendet (Collins et al., 1993; McDonald et al., 1999; Pérez et al., 1997). Eine Biopsie von Darmlymphknoten am lebenden Tier stellt eine

geeignete, jedoch wirtschaftlich nicht vertretbare Diagnosemöglichkeit dar (Pemberton, 1979; Sherman et al., 1984).

1.5.1. Direkter Erregernachweis

a) Mikroskopischer Nachweis

Dieser kann am lebenden Tier aus Kotproben oder aus Rektumbiopsien erfolgen. Postmortal eignen sich Abklatschpräparate von Ileum und zugehörigen Lymphknoten (Homuth, 2002). Die Mykobakterien können mittels Ziehl-Neelsen-Färbung oder mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Auramin O oder Acridinorange) nachgewiesen werden (Cocito et al., 1994; Smithwick et al., 1995). Sie stellen sich als schlanke, typischerweise in Nestern liegende, säurefeste Stäbchen dar (Ris et al., 1988). Der mikroskopische Nachweis ist schnell und einfach durchzuführen, gelingt allerdings nur bei stark von der Erkrankung betroffenen Tieren (Hietala, 1992; Ris et al., 1988). Des Weiteren ist eine Differenzierung von *M. paratuberculosis* und anderen Mykobakterienspezies auf diese Weise nicht möglich (Merkal, 1973).

Am histologischen Schnitt ist der Nachweis von Mykobakterien neben einer Ziehl-Neelsen-Färbung zudem mit Hilfe immunhistochemischer Methoden möglich (Brees et al., 2000; Coetsier et al., 1998).

b) Kultureller Erregernachweis

Die kulturelle Anzucht von *M. paratuberculosis* aus Kot oder Organmaterial gilt derzeit als Goldstandard der *M. paratuberculosis*-Diagnostik (Olsen et al., 2002). Erschwert wird diese durch das sehr langsame Wachstum (Lambrecht et al., 1988) und hohe Ansprüche des Erregers an die Nährmedien (Whipple et al., 1991). Für die Primäranzucht werden überwiegend eigelbhaltige Nährböden mit Mycobactinzusatz verwendet, z.B. Herrold's Egg-Yolk-Medium mit Mycobactin J oder Löwenstein-Jensen-Medium (Juste et al., 1991; Whipple et al., 1991). Aufgrund des ausgesprochen langsamen Wachstums von *M. paratuberculosis* ist neben einer langen Bebrütungsdauer von 12-16 Wochen (Whipple et al., 1991) eine Dekontamination des Probenmaterials erforderlich, um eine Überwucherung der Kultur durch die im Probenmaterial enthaltene Begleitflora und Schimmelpilze zu unterdrücken (Collins et al., 1996). Eine Alternative zur Anzucht auf Festmedien stellt die Kultivierung in Flüssigmedien dar. Hierbei wird das Wachstum von *M. paratuberculosis* unspezifisch und indirekt bestimmt. Im Anschluss daran ist eine Speziesbestimmung, z.B. mittels PCR, notwendig. Mit dieser Methode können sowohl die Nachweiszeiten verkürzt als auch die Sensitivität erhöht werden (Collins, 1996; Köhler und Gierke, 2006; Whittington et al., 1998a). Allerdings ist hierfür ein erhöhter apparativer Aufwand notwendig (Hietala, 1992).

Der kulturelle Nachweis des Erregers im Kot oder Organmaterial gilt als 100% spezifisch (Collins, 1996; Olsen et al., 2002). Die Sensitivität der kulturellen Kotuntersuchung liegt, auch aufgrund der intermittierenden Ausscheidung von *M. paratuberculosis*, nur bei etwa 50% (Sherman et al., 1984; Sockett et al., 1992a; Stabel, 1998).

c) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR gilt als schnelles, spezifisches und sensitives Verfahren, um *M. paratuberculosis* nachzuweisen (Collins et al., 1993) oder die kulturelle Anzüchtung zu bestätigen (Whittington et al., 1998a). Als Grundlage dient in den meisten Fällen das *M. paratuberculosis*-spezifische Insertionselement IS900 (Stabel und Bannantine, 2005). Aber auch andere *M. paratuberculosis*-spezifische Zielsequenzen wie die Insertionselemente ISMav2 (Strommenger et al., 2001) und ISMap02 (Stabel und Bannantine, 2005), das *hspX*-Gen (Ellingson et al., 1998) oder die F57-Sequenz (Vansnick et al., 2004) werden für den Nachweis herangezogen. Inzwischen sind mehrere unterschiedliche PCR-Verfahren (single-PCR, nested-PCR, real-time-PCR) (Stabel und Bannantine, 2005) für die *M. paratuberculosis*-Detektion aus unterschiedlichen Matrices (Kot (van der Giessen et al., 1992; Vary et al., 1990), Organe (Englund et al., 2001), Milch (Millar et al., 1996)) entwickelt worden. Die Sensitivität dieser Verfahren ist an natürlich infizierten Proben jedoch deutlich reduziert (Englund et al., 2001; Sockett et al., 1992a). Dies wird zum einen auf eine ineffiziente DNA-Extraktion, zum anderen auf im Probenmaterial vorhandene Inhibitoren zurückgeführt (Englund et al., 2001; van der Giessen et al., 1992).

Vorteil des direkten Erregernachweises ist die Identifizierung *M. paratuberculosis*-ausscheidender Tiere, die v.a. im Rahmen von Bekämpfungsverfahren eine große Rolle spielt (Collins et al., 1990).

1.5.2. Indirekter Erregernachweis

a) Nachweis der zellulären Immunantwort

Diese kann in Anlehnung an die Tuberkulinisierung mittels Hauttest mit Johnin nachgewiesen werden. Bedingt durch Kreuzreaktionen, die durch andere Mykobakterienarten verursacht werden, verfügt dieser Test nur über eine geringe Sensitivität und Spezifität (Olsen et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis von Interferon- γ , mit dem infizierte Tiere schon in einem frühen Infektionsstadium identifiziert werden können. Problematisch ist die geringe Spezifität des Tests, da v.a. bei jungen Tieren unspezifische Reaktionen vorkommen (Huda et al., 2003; Jungersen et al., 2002; McDonald et al., 1999).

b) Nachweis der humoralen Immunantwort

Antikörper gegen *M. paratuberculosis* können mit verschiedenen Verfahren nachgewiesen werden, der Komplementbindungsreaktion (KBR), dem Agargel-Immundiffusionstest (AGIDT) und dem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Die serologischen Verfahren sind schnell, einfach und kostengünstig durchzuführen (Kalis et al., 2002), erfassen aber nur einen Teil (etwa 60%) der Ausscheider (Klarmann et al., 2007; Sockett et al., 1992b). Die heutzutage gängige Methode zur serologischen Diagnostik ist der ELISA. Zum einen sind sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität höher als bei KBR und AGIDT (Kalis et al., 2002; Sockett et al., 1992b), zum anderen ist das Verfahren durch die Verwendung von Testkits standardisierbar und automatisierbar (Homuth, 2002; Kalis et al., 2002).

Sensitivität und Spezifität sind abhängig von der Art und der Präparation des verwendeten Antigens (Harris und Barletta, 2001). Durch eine Präabsorption mit *M. phlei* können Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien vermieden und somit die Spezifität erhöht werden (Collins et al., 1991). Die für verschiedene Testsysteme beschriebenen Sensitivitäten liegen zwischen 40 und 65% (Whitlock et al., 2000), die Spezifität zwischen 93 und 99% (Kalis et al., 2002; Sockett et al., 1992b; Whitlock et al., 2000).

In Deutschland sind derzeit drei verschiedene ELISA-Kits zum Nachweis von *M. paratuberculosis*-Antikörpern in Blut- und Milchproben zugelassen (Fa. Pouquier, Fa. LDL, Fa. IDVet). KBR und AGIDT werden hingegen nicht mehr eingesetzt (Köhler et al., 2008).

1.6. Bekämpfung

1.6.1. Behandlung

Eine symptomatische Behandlung der Paratuberkulose hat allenfalls einen vorübergehenden Rückgang der Diarrhöe zur Folge (Mießner und Trapp, 1910; St. Jean, 1996). Die Verabreichung verschiedener antimykobakteriell wirksamer Antiinfektiva (z.B. Isoniazid, Clofazimin, Rifampin) führt zwar zu einer Reduktion der klinischen Erscheinungen, aber auch nach langer Behandlungsdauer nicht zur Eliminierung des Erregers (St. Jean, 1996). Eine Infektionsprophylaxe oder Reduktion der Ausscheidung von *M. paratuberculosis* durch Antiinfektivgaben ist ebenfalls nicht möglich (Hendrick et al., 2006; Rankin, 1955). Zudem sind diese Medikamente für die Behandlung lebensmittelliefernder Tiere in Deutschland nicht zugelassen und, zumindest bei langer Behandlungsdauer, zu teuer, so dass statt einer Therapie von Einzeltieren eine Bestandssanierung anzustreben ist.

1.6.2. Impfung

Eine Bekämpfung bzw. Vorbeugung der Paratuberkulose mittels Impfung wurde schon sehr früh versucht (Mießner und Trapp, 1910). In den vergangenen Jahrzehnten wurden ver-

schiedene hitzeinaktivierte oder attenuierte Impfstoffe bei Rindern, Schafen und Ziegen eingesetzt (Harris und Barletta, 2001). Durch die Impfung lässt sich in einigen Fällen eine Reduzierung der Ausscheidung und der klinischen Symptome, aber keine vollständige Eliminierung des Erregers erzielen (Harris und Barletta, 2001; Kalis et al., 2001). Nachteilige Effekte der Impfung sind zum einen mögliche Kreuzreaktionen in Bezug auf die Tuberkulinsierung und damit Störungen der Tuberkuloseüberwachung (Kalis et al., 2001; Körmendy, 1994). Zum anderen bilden sich an der Injektionsstelle häufig bis zu brotlaibgroße Granulome (Cocito et al., 1994; Klawonn et al., 2002). Zudem ist eine Unterscheidung geimpfter und klinisch inapparent infizierter Tiere nicht möglich (Chiodini et al., 1984). In Deutschland ist derzeit kein Impfstoff gegen Paratuberkulose zugelassen. Mit einer Ausnahmegenehmigung wird derzeit in Rheinland-Pfalz die Verwendung eines Impfstoffes erprobt. Abschließende Ergebnisse liegen bisher nicht vor (Klawonn et al., 2007).

1.6.3. Sanierung

Die grundsätzlichen Empfehlungen zur Sanierung Paratuberkulose-infizierter Bestände haben sich in den vergangenen Jahrzehnten kaum verändert. Schon Fortmann empfahl 1925 neben hygienischen Maßnahmen eine regelmäßige Untersuchung infizierter Herden sowie die baldige Entfernung infizierter Tiere aus dem Bestand. Auch heute noch gelten das umgehende Entfernen infizierter Tiere aus der Herde, die Verhinderung der Infektion bei Jungtieren sowie ein kontrollierter Zukauf von Tieren als Kernpunkte einer erfolgreichen Paratuberkulosebekämpfung (Köhler et al., 2005).

In vielen Ländern wie z.B. den USA (Sockett, 1996), Australien (Whittington et al., 1998a), den Niederlanden, Schweden und Norwegen (Hacker et al., 2004) existieren staatlich gestützte Bekämpfungsprogramme. In Deutschland ist die Paratuberkulose meldepflichtig und in einigen Bundesländern (u.a. Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Thüringen) gibt es freiwillige Bekämpfungsverfahren (Köhler et al., 2005). Vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft wurden im Januar 2005 „Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien)“ veröffentlicht, um eine bundesweite Vereinheitlichung der gegenwärtig existierenden Sanierungsverfahren zu erreichen. Die in den Sanierungsverfahren geforderten Maßnahmen wie z.B. die sofortige Trennung von Kalb und Muttertier nach der Geburt, keine Ausbringung von Gülle auf Weideflächen oder umfangreiche Hygienemaßnahmen können allerdings von den Betrieben, auch aus ökonomischen Gründen, nicht immer ausreichend umgesetzt werden (Flebbe, 2002; Klawonn et al., 2002). Auch durch das komplexe, noch nicht gänzlich erforschte Krankheitsgeschehen und die unzureichende Diagnostik klinisch inapparenter Infektionen ist die Bekämpfung der Paratuberkulose langwierig und mit hohen Kosten verbunden (Rossiter und Burhans, 1996). Jedoch können durch die Ausmerzungen infizierter Tiere und

durch Verbesserung der Hygiene die Zahl der klinischen Erkrankungen sowie die Herdenprävalenz reduziert werden (Flebbe, 2002; Goodger et al., 1996).

Inwieweit eine Eradikation der Paratuberkulose möglich ist, ist fraglich (Flebbe, 2002). Alternativ könnte ein Überwachungs- und Kontrollprogramm analog zum Salmonellose-Kontrollprogramm für Schweine eingeführt werden (Stratmann et al., 2005).

2. Stammdifferenzierung

Stammdifferenzierungsverfahren werden sowohl bei der Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen (Olive und Bean, 1999) als auch für phylogenetische Untersuchungen (van Belkum, 1994) eingesetzt. Im Rahmen eines Krankheitsgeschehens spielen die Feststellung des Ausgangspunkts der Infektion und die Aufklärung von Übertragungswegen eine wichtige Rolle. Weitere Anwendungen im medizinischen Bereich sind die Identifizierung besonders virulenter Isolate sowie die Überwachung von Impf- und Bekämpfungsprogrammen (Olive und Bean, 1999; Roring et al., 2002). Aber auch in der Lebensmittelindustrie oder der Forensik werden Stammdifferenzierungsverfahren angewendet (Healy et al., 2005).

Die Typisierung einzelner Bakterienisolate kann anhand phänotypischer und genotypischer Merkmale erfolgen (van Belkum, 1994). Wichtige Kriterien zur Beurteilung und zum Vergleich der einzelnen Stammdifferenzierungsverfahren sind nach Olive und Bean (1999) und Tenover et al. (1994):

- Typisierbarkeit:
Sind alle Isolate einer (Sub-)Spezies mit dem Verfahren typisierbar?
- Diskriminierungskraft:
Lassen sich nicht assoziierte Isolate sicher voneinander unterscheiden?
- Reproduzierbarkeit:
Sind die Typisierungsergebnisse sowohl innerhalb des Labores als auch in anderen Laboren reproduzierbar?
- Durchführung:
Ist die Methode einfach in der Durchführung? Sind spezielle Geräte erforderlich?
Welche Kosten entstehen?
- Interpretation der Ergebnisse:
Sind die Ergebnisse gut und eindeutig interpretierbar? Ist die Bewertung von Unterschieden standardisiert?

2.1. Phänotypische Differenzierungsverfahren

Den phänotypischen Differenzierungsverfahren liegen sowohl bestimmte Zellstrukturen oder Zellbestandteile als auch biologische Eigenschaften der Erreger zugrunde. Zur Differenzierung genutzte Strukturen sind z.B. verschiedene Antigene (Serotypisierung) oder Phagenrezeptoren (Phagentypisierung oder Lysotypie) (Olive und Bean, 1999). Auch mit Hilfe der Analyse von Zellbestandteilen wie verschiedener Proteine oder des Fett- bzw. Kohlenhydratanteils kann eine Stammdifferenzierung erfolgen (Selander et al., 1986). An biologischen Eigenschaften werden etwa die Verstoffwechslung bestimmter Substrate oder das Wachstum unter bestimmten Bedingungen (Biotypisierung) oder die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika („resistotyping“ oder „antibiotyping“) zur Differenzierung genutzt (van Belkum, 1994). Die Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) basiert auf den unterschiedlichen Laufeigenschaften bestimmter Enzyme in der Elektrophorese, wodurch ein Rückschluss auf die veränderte Aminosäuresequenz und damit auf die veränderte Nucleotidsequenz des zugrundeliegenden DNA-Abschnitts möglich ist (Selander et al., 1986).

Die phänotypischen Verfahren dienen in erster Linie der Bestimmung der (Sub-)Spezies und nicht der Differenzierung von Stämmen innerhalb einer (Sub-)Spezies (van Belkum, 1994). Sie gelten auch aufgrund der variablen Expression von phänotypischen Charakteristika als weniger diskriminierend und schlechter reproduzierbar als die genotypischen Verfahren (Olive und Bean, 1999; Schwarz et al., 2003). Zudem sind viele Verfahren mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden und nur schlecht standardisierbar. Nichtsdestotrotz werden sie teilweise erfolgreich zur Stammdifferenzierung eingesetzt (van Belkum, 1994). Eine Zuordnung zu pathogenetischen Eigenschaften der Isolate oder zu epidemiologischen Daten ist meistens jedoch nicht möglich (Reboli et al., 1994; Tenover et al., 1994). Die phänotypischen Variationen spiegeln zwar Unterschiede im Genotyp wider, die Zuordnung zu bestimmten Genen oder Allelen ist bislang jedoch sehr schwierig (Selander et al., 1986). Auch ist ausgehend von einem ähnlichen Phänotyp kein Rückschluss auf eine enge genetische Verwandtschaft möglich (Li et al., 1990).

2.2. Genotypische Differenzierungsverfahren

Die auf genotypischen Merkmalen beruhenden Differenzierungsverfahren können zum einen anhand der für die Differenzierung genutzten Struktur im Genom (z.B. repetitive Elemente oder single nucleotide polymorphisms (SNPs)), zum anderen anhand der zugrunde liegenden Methode (z.B. Restriktionsverdau oder PCR) unterschieden werden.

2.2.1. Strukturen im Genom

2.2.1.1. Repetitive Elemente

Das prokaryotische Genom enthält mehrere kodierende wiederholte DNA-Sequenzen wie z.B. rRNA- und tRNA-Gene oder Insertionselemente, die in nur wenigen Kopien vorliegen (Lupski und Weinstock, 1992). Der weitaus größte Teil an repetitiven Sequenzen liegt jedoch in den nicht kodierenden Bereichen vor. Bei Eukaryoten werden diese Genomanteile als Mini- oder Mikrosatelliten-DNA bezeichnet und haben große Bedeutung für die Erstellung des genetischen Fingerabdrucks, z.B. bei Abstammungsuntersuchungen (van Belkum et al., 1998).

Insertionselemente (IS)

Insertionselemente sind kurze (< 2500 bp), einfach strukturierte DNA-Segmente, die an mehreren Stellen in das Genom integriert werden können. In der Regel bestehen sie nur aus einem Gen für die Transposase, flankiert von inverted repeats. Die Insertion in das Wirtschromosom erfolgt teilweise sequenzspezifisch, teilweise z.B. in GC-reiche DNA-Abschnitte. Aber auch andere Einflussfaktoren wie z.B. Überspiralisierung oder Replikation werden diskutiert. Der Einfluss der Insertionselemente auf die Insertionsstelle reicht von der Generierung von direct repeats in der flankierenden DNA bis zur Beeinflussung der Expression benachbarter Gene. Insertionselemente wurden bei vielen Bakterienarten nachgewiesen und liegen häufig in mehrfachen Kopien im Genom vor. Über 500 Insertionselemente sind beschrieben, die anhand ihrer Eigenschaften wie Struktur und Organisation in etwa 20 verschiedene Familien eingeteilt werden (Mahillon und Chandler, 1998).

Short sequence repeat (SSR)

Hierbei handelt es sich um kurze (< 200 bp), nicht kodierende Sequenzen, die v.a. in den intergenen DNA-Abschnitten des prokaryotischen Genoms vorkommen (Lupski und Weinstock, 1992). Sie sind entweder einzeln über das Genom verstreut oder liegen zusammenhängend in mehreren Wiederholungen vor (van Belkum et al., 1998).

Verstreut über das Genom vorkommende repetitive Sequenzen sind beispielsweise die repetitive extragenic palindrome (REP)- und die enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-Sequenzen sowie der BOX-repeat. Die Funktion dieser Elemente ist noch nicht

abschließend geklärt. Vermutet wird eine Beteiligung an der Chromosomenstruktur sowie an der Genregulation (Lupski und Weinstock, 1992; van Belkum et al., 1998).

Bei den zusammenhängenden repeats werden je nach Zusammensetzung homopolymere und multimerere repeats unterschieden. Homopolymere repeats bestehen nur aus einer einzigen Base, z.B. poly(G). Bei den multimeren repeats lassen sich homogene (Wiederholung der gleichen kurzen Sequenz¹) von heterogenen (Wiederholung verschiedener Motive²) repeats unterscheiden. Liegen sie direkt nebeneinander im Genom vor, werden sie als tandem repeats bezeichnet. Bei degenerierten Wiederholungssequenzen liegen innerhalb der Motive kleine Abweichungen z.B. durch den Austausch einzelner Basen vor. Als variable number tandem repeats (VNTR) werden repeats bezeichnet, die in mehreren Allelen (unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen) vorliegen. Die Variabilität dieser VNTRs wird vermutlich durch slipped-strand mispairing³ verursacht. Auch Rekombinationen oder Fehler bei der Reparatur von Fehlpaarungen können zu Veränderungen in der Anzahl der Wiederholungen oder zum Austausch einzelner Basen führen (van Belkum et al., 1998). Je nachdem, an welcher Stelle im Genom diese VNTRs vorkommen, können sie sowohl die Genregulation, in manchen Fällen auch die Genexpression beeinflussen (Roring et al., 2002; van Belkum, 1999).

2.2.1.2. Single nucleotide polymorphism (SNP)

Als SNP wird ein Unterschied zwischen zwei Genomen bezeichnet, der auf dem Austausch einer einzelnen Base beruht. Es werden synonyme und nichtsynonyme SNPs unterschieden. Synonyme SNPs haben eine Veränderung der Aminosäure und damit des codierten Proteins zur Folge. Hierdurch sind sie evolutionsbiologisch relevant, da das veränderte Protein dem Selektionsdruck ausgesetzt ist. Nichtsynonyme SNPs haben keine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge und sind daher evolutionsbiologisch neutral. Aus diesem Grunde sind sie sehr gut für phylogenetische Studien geeignet (Gutacker et al., 2002).

¹ Z.B. AGG AGG AGG.

² Z.B. AAC AAC TG TG TG GCTG GCTG.

³ Durch Abrutschen der DNA-Polymerase bei der Replikation hervorgerufene Strangverschiebungen und Fehlpaarungen.

Weiterhin können auch größere Veränderungen des Genoms wie Deletionen bzw. Insertionen von DNA-Fragmenten mit den Verfahren zur Stammdifferenzierung detektiert werden (Tenover et al., 1995). Zusätzlich kann über den Nachweis oder über das Fehlen bestimmter Gene eine Typisierung vorgenommen werden (McDonald et al., 2006; Neis et al., 2007).

Welche Genomstruktur zur Stammdifferenzierung verwendet wird, hängt u.a. von der Fragestellung ab. Sequenzen, die sich innerhalb weniger Generationen verändern, z.B. VNTRs, eignen sich für die Klärung epidemiologischer Zusammenhänge. Langsam evolvierende Strukturen wie z.B. die SNPs sind eher für phylogenetische Fragestellungen geeignet (Motiwala et al., 2006b). Die zur Stammdifferenzierung verwendeten Verfahren sind grundsätzlich auch zur Unterscheidung von (Sub-)Spezies einsetzbar, v.a. wenn ein sehr hoher Verwandtschaftsgrad vorliegt (Kamerbeek et al., 1997; Romano et al., 2005).

2.2.2. Restriktionsverdaubasierte Differenzierungsverfahren

2.2.2.1. Plasmidtypisierung oder Plasmid(profil)-Analyse

Im Gegensatz zu den anderen genotypischen Differenzierungsverfahren wird hierbei nur die extrachromosomale DNA untersucht. Anzahl und Größe der vorhandenen Plasmide werden durch elektrophoretische Auftrennung der gesamten Plasmid-DNA bestimmt. Zusätzlich kann eine Restriktionsfragmentanalyse (s. 2.2.2.2.), z.B. mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* erfolgen (Takahashi und Nagano, 1984; Tenover et al., 1997). Da nicht alle Isolate einer (Sub-)Spezies über Plasmide verfügen, ist immer nur ein Teil der Isolate typisierbar (Healy et al., 2005). Die Differenzierungskraft ist gering (Reboli et al., 1994; Tenover et al., 1994) und die Reproduzierbarkeit eingeschränkt (Tenover et al., 1994). Durchführung und Interpretation der Ergebnisse sind hingegen einfach (Tenover et al., 1994).

2.2.2.2. Restriktionsfragmentanalyse (REA)

Die Restriktionsfragmentanalyse ist im Grunde ein sehr einfaches Verfahren. Nach Verdau der DNA mit einem Restriktionsenzym⁴ werden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und die entstandenen Bandenmuster verglichen (Upholt, 1977). Unterschiede zwischen den Mustern können sowohl durch Punktmutationen als auch durch Insertion bzw. Deletion von DNA-Fragmenten hervorgerufen werden. Entstehen auf diese Weise Restriktionsschnittstellen neu bzw. gehen verloren, ändern sich sowohl die Anzahl als auch die Größe der Fragmente. Bei Insertion bzw. Deletion von DNA-Fragmenten bleibt die Anzahl der Fragmente gleich, die Größe der Fragmente verändert sich jedoch (Tenover et al., 1995). Bei der Auswahl der Enzyme ist zu beachten, dass diese zum einen die DNA tatsächlich verdauen

⁴ Restriktionsenzyme erkennen und schneiden spezifische DNA-Sequenzen.

(Clark et al., 2003), zum anderen auch unterscheidbare Bandenmuster generiert werden können (Whipple et al., 1989). Allerdings entstehen gerade beim Verdau großer Genome viele Fragmente, die sich in der Größe nur wenig unterscheiden. Eine sichere Auswertung ist hierdurch kaum möglich (Mazurek et al., 1993; Tenover et al., 1997; Thorel et al., 1990). Aus diesem Grund wird diese Methode nur selten eingesetzt. Es wurden verschiedene Verfahren (s. 2.2.2.3.-2.2.2.5.) entwickelt, um die Anzahl der Fragmente, die zum Vergleich zweier Genome herangezogen werden, zu reduzieren (Thorel et al., 1990).

2.2.2.3. Southern Blot und Hybridisierung oder Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Durch Hybridisierung der auf eine Nylonmembran übertragenen (geblotteten) DNA-Fragmente mit einer markierten Sonde werden nur die Fragmente nachgewiesen, die eine bestimmte Sequenz (das „Gegenstück“ zur Sonde) enthalten. Die Markierung und der Nachweis der Sonde können radioaktiv oder über verschiedene enzymgekoppelte Farb- oder Chemilumineszenzreaktionen erfolgen (Olive und Bean, 1999; Tenover et al., 1994). Für eine erfolgreiche Differenzierung ist die Wahl einer geeigneten Sonde von entscheidender Bedeutung (Chiodini, 1990; Tenover et al., 1994). In der als Grundlage für die Sonde dienenden DNA-Sequenz müssen die Schnittstellen des Restriktionsenzym zwischen den Isolaten variieren (Olive und Bean, 1999) oder das nachzuweisende DNA-Fragment muss in mehreren Kopien im Genom vorliegen. Häufig werden (sub-)spezies-spezifische Insertions-elemente verwendet, z.B. *IS6110* oder *IS1245* bei Mykobakterien (van Soolingen, 2001). Auch andere Sequenzen, z.B. bestimmte Gene wie das 16S rRNA- oder *katG*-Gen bei *M. tuberculosis*, werden als Grundlage für die Sonde verwendet (Kremer et al., 1999; Olive und Bean, 1999). Eine besondere Variante des RFLP ist das „ribotyping“. Hierbei dienen 16S und 23S rRNA-Gene von *Escherichia coli* als Grundlage für die Sonde (Olive und Bean, 1999). Unterschiede zwischen den RFLP-Mustern können zusätzlich zu den oben genannten Ereignissen auf Mutationen im Bereich der Bindungsstelle der Sonde (Tenover et al., 1994) sowie auf einer unterschiedlichen Anzahl und Verteilung von Kopien des mittels Sonde nachgewiesenen Fragments beruhen. Letzteres trifft v.a. auf die Insertionselemente zu (Mijs et al., 2002; Tenover et al., 1997). Eine geeignete Sonden/Restriktionsenzym-Kombination muss für jede Bakterienart ermittelt werden (Wild et al., 1994). In der Regel sind dann alle Isolate einer (Sub-)Spezies differenzierbar. Auch die Diskriminierungskraft ist von der verwendeten Sonden/Restriktionsenzym-Kombination abhängig (Chiodini, 1990; van Soolingen et al., 1993). Die RFLP-Muster sind sowohl innerhalb eines Labores als auch im Vergleich verschiedener Labore gut reproduzierbar (Kremer et al., 1999). Durch die Vielzahl von teilweise langwierigen Einzelschritten ist das Verfahren arbeits- und zeitaufwändig und zudem kostenintensiv (Olive und Bean, 1999). Eine Unterscheidung der Muster anhand abweichen-

der Banden ist relativ einfach. Problematisch ist jedoch die Bewertung geringgradiger Abweichungen von z.B. nur einem Fragment, da diese nicht einheitlich gehandhabt wird (Tenover et al., 1994).

2.2.2.4. Verwendung selten schneidender Enzyme: PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese), LFP (large fragment polymorphism) oder Makrorestriktionsanalyse

Durch die Verwendung selten schneidender Restriktionsenzyme entstehen weniger, dafür aber sehr große Fragmente (10 bis 800 kbp). Diese werden mit Hilfe eines speziellen Elektrophoreseverfahrens, der Pulsfeldgelelektrophorese (Schwartz und Cantor, 1984), aufgetrennt (Olive und Bean, 1999). Die Auswahl des Restriktionsenzym erfolgt anhand der Erkennungssequenz, des GC-Gehaltes des zu untersuchenden Genoms sowie der Anzahl und Größe der entstehenden Fragmente (Coffin et al., 1992; Inderlied et al., 1993; Lévy-Frébault et al., 1989; Thong et al., 1994). Grundsätzlich sind alle Isolate einer (Sub-)Spezies mittels PFGE typisierbar. Die Diskriminierungskraft ist hoch und die Methode ist sowohl innerhalb eines Labors als auch im Vergleich mehrerer Labore gut reproduzierbar. Das Verfahren ist zeitaufwändig, da die DNA-Extraktion sowie der Restriktionsverdau in kleinen Agaroseblöcken stattfinden (Olive und Bean, 1999). Zudem ist eine spezielle, teure Elektrophoreseausrüstung erforderlich (Tenover et al., 1997). Auch hier ist die Unterscheidung der einzelnen Muster im Grunde einfach und es existieren Hinweise zur Interpretation der Unterschiede (Olive und Bean, 1999; Tenover et al., 1995). Das Verfahren gilt allgemein als Goldstandard der genotypischen Differenzierung (Harbottle et al., 2006; Olive und Bean, 1999).

2.2.2.5 Vermehrung und Nachweis ausgewählter Fragmente: AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Der AFLP beruht auf der selektiven Vermehrung von Restriktionsfragmenten mittels PCR. Im Anschluss an einen Restriktionsverdau werden die Schnittenden der Fragmente mit doppelsträngigen Adapteroligonucleotiden⁵ ligiert. Diese dienen zusammen mit der Restriktionsschnittstelle als Primerbindungsstelle in der anschließenden PCR. Die Primer bestehen aus einer Stammsequenz (komplementär zur Stammsequenz des Adapters), einer enzymespezifischen Sequenz (komplementär zur Sequenz der Restriktionsschnittstelle) sowie aus einer selektiven Sequenz⁶. Auf diese Weise werden nur die Fragmente amplifiziert, die angrenzend an die Restriktionsschnittstelle eine bestimmte Sequenz – komplementär zur selektiven Sequenz des Primers – aufweisen (Vos et al., 1995). Der Nachweis dieser Fragmente erfolgt entweder mittels Agargelelektrophorese oder mit Hilfe markierter Primer und Sequenzierer

⁵ Die Adaptermoleküle bestehen aus einer Stammsequenz und einer Sequenz, die spezifisch für die Schnittstelle des Restriktionsenzym ist.

⁶ Ein bis vier Nucleotide.

(Savelkoul et al., 1999; Vos et al., 1995). Üblicherweise wird der Restriktionsverdau mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt. Aber auch mit nur einem Restriktionsenzym ist die Methode beschrieben (Savelkoul et al., 1999). Es kann DNA jeglicher Herkunft untersucht werden (Vos et al., 1995). So wird das Verfahren auch für genetische Untersuchungen bei Pflanzen und Tieren eingesetzt (Savelkoul et al., 1999). Kenntnisse über die Sequenz der zu untersuchenden DNA sind für die Typisierung nicht erforderlich. Die Anzahl der amplifizierten Fragmente kann über die Wahl der Restriktionsenzyme und die Anzahl und Auswahl der selektiven Nukleotide der Primer beeinflusst werden (Vos et al., 1995). Die Differenzierungskraft ist hoch und die Muster sind gut reproduzierbar. Es werden nur geringe Mengen genomischer DNA benötigt, das Verfahren ist trotzdem recht aufwändig. Die Interpretation der Ergebnisse ist hingegen relativ einfach (Olive und Bean, 1999; Savelkoul et al., 1999).

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR-basierten Differenzierungsverfahren sind in der Regel schnell, einfach und kostengünstig und ohne spezielle Ausrüstung durchführbar (Olive und Bean, 1999). Es sind nur geringe DNA-Mengen erforderlich, die zudem mit einfachen Methoden (z.B. Kochen der Bakterien) isoliert werden können (Roring et al., 2002; van Belkum, 1994). Somit ist grundsätzlich eine gleichzeitige Detektion und Typisierung eines Erregers ohne vorherige Kultivierung möglich (Kamerbeek et al., 1997; van Belkum, 1994). Eine Automatisierung sowohl der PCR als auch der Auswertung ist ebenfalls grundsätzlich möglich (Healy et al., 2005). Aus diesen Gründen sind die PCR-basierten Verfahren inzwischen weit verbreitet (van Belkum, 2007). Grundsätzlich sind zwei unterschiedliche Ansätze möglich:

- a) Unter Verwendung spezifischer, umspannender Primer werden bestimmte DNA-Fragmente amplifiziert. Variationen beruhen auf Größen- und/oder Sequenzunterschieden des amplifizierten DNA-Abschnitts. Auf diesem Prinzip beruhen die MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis), bzw. MLSSR (multilocus short sequence repeat)-Typisierung, die PCR-REA und das MLST (multilocus sequence typing).
- b) Über consensus-Primer⁷ werden die zwischen den Primerbindungsstellen gelegenen DNA-Abschnitte amplifiziert, die, je nach Verteilung der Primerbindungsstellen im Genom, unterschiedliche Längen aufweisen. Diese Verfahren ist die Grundlage der AP-PCR bzw. RAPD und der Rep-PCR (van Belkum, 1994).

⁷ Consensus-Sequenz: idealisierte Basensequenz, bei der jede Position die an dieser Stelle am häufigsten zu findende Base repräsentiert.

2.2.3.1. Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) oder multilocus short sequence repeat Typisierung (MLSSR-Typisierung)

Bei der Untersuchung zusammenhängender repeats bzw. VNTRs oder SSRs werden für die flankierende DNA spezifische Primer verwendet. Auf diese Weise werden die wiederholten Sequenzen zusammen mit der umgebenden DNA amplifiziert. Die Anzahl der Wiederholungen spiegelt sich in der Größe des PCR-Produkts wider (van Belkum et al., 1997; van Belkum et al., 1998). Die Auswertung erfolgt entweder mittels Agargelelektrophorese oder Sequenzierung (van Belkum et al., 1998). Durch die Sequenzierung der PCR-Produkte können auch kleine Veränderungen innerhalb der repeats detektiert und in die Differenzierung mit einbezogen werden (van Belkum, 2007). Das Auffinden von tandem repeats ist mittels spezieller Software möglich (Benson, 1999). Es sind alle Isolate einer (Sub-)Spezies differenzierbar, allerdings müssen die verwendeten VNTRs bzw. SSRs sorgfältig ausgewählt werden. Die Differenzierungskraft ist hoch und das Verfahren gut reproduzierbar. Die Durchführung und Interpretation sind einfach (van Belkum, 2007).

2.2.3.2. PCR-basierter locus-spezifischer RFLP oder PCR-REA

Wie beim AFLP werden bei diesem Verfahren die PCR und der Restriktionsverdau kombiniert, jedoch in umgekehrter Reihenfolge. Ein bestimmter DNA-Abschnitt wird mittels PCR amplifiziert und das PCR-Produkt im Anschluss verdaut. Die entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt und die entstehenden Bandenmuster verglichen (Olive und Bean, 1999). Als Grundlage dienen z.B. die 16S-23S Spacer-Region oder einzelne Gene (Olive und Bean, 1999), aber auch Insertionselemente (Marsh et al., 1999). Bei sorgfältiger Auswahl des amplifizierten DNA-Abschnitts sind alle Isolate einer (Sub-)Spezies differenzierbar. Die Diskriminierungskraft ist mäßig, das Verfahren ist gut reproduzierbar, einfach in der Durchführung und Interpretation der Ergebnisse (Olive und Bean, 1999).

2.2.3.3. Multilocus sequence typing (MLST)

Bei diesem Verfahren handelt es sich um das molekularbiologische Pendant zur MLEE (Maiden et al., 1998; Schwarz et al., 2003). Fragmente von mehreren (meist sieben) Haushaltsgenen⁸ werden mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Anhand von Sequenzunterschieden der einzelnen Gene (Allele) können Sequenztypen bestimmt werden (Maiden et al., 1998). Es sind alle Isolate einer (Sub-)Spezies differenzierbar. Die Differenzierungskraft wird i.A. als hoch eingestuft, variiert aber in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Bakterienspezies und den untersuchten Genen (Schwarz et al., 2003). Das Verfahren ist sehr gut reproduzierbar und im Prinzip einfach durchzuführen und zu interpre-

⁸ Gene, die kontinuierlich angeschaltet sind, da sie für lebensnotwendige Funktionen benötigt werden.

tieren (Maiden et al., 1998), jedoch kostenintensiv (Schwarz et al., 2003). Über eine Datenbank im Internet (>>www.mlst.net<<) sind Informationen sowohl zur Durchführung (benötigte Primer u.ä.) als auch zur Interpretation (Vergleichssequenzen) verfügbar (Aanensen und Spratt, 2005). Das Verfahren ist eher für phylogenetische oder evolutionsbiologische Studien geeignet, wird aber auch bei epidemiologischen Untersuchungen eingesetzt (Schwarz et al., 2003).

Ein ähnliches Verfahren ist die Genotypisierung auf der Basis des Nachweises verschiedener Gene. Häufig werden Virulenzgene (Elomaa et al., 2005; Neis et al., 2007) oder Resistenzgene (van Belkum, 1994) verwendet, so dass u.U. auch Rückschlüsse auf die Virulenz der einzelnen Isolate möglich sind. Dieses Verfahren kann auch als Multiplex-PCR durchgeführt werden (Neis et al., 2007).

2.2.3.4. RAPD (random amplified polymorphic DNA); AP-PCR (arbitrarily primed PCR)

Im Gegensatz zur Standard-PCR wird nicht ein spezifisches Primerpaar, sondern ein einzelner kurzer⁹ Primer mit zufälliger Sequenz eingesetzt. Bei niedrigen Annealingtemperaturen kann dieser, trotz einzelner Fehlpaarungen, an mehreren Stellen an die Template-DNA binden. Liegen diese Primerbindungsstellen nicht zu weit (bis einige hundert Basenpaare) voneinander entfernt und auf gegenläufigen Strängen, wird der dazwischenliegende Abschnitt amplifiziert. Auf diese Weise entstehen, je nach Ausgangs-DNA, unterschiedliche Bandenmuster, die aus 3-20 Banden bestehen. Von entscheidender Bedeutung ist die Wahl der Annealingtemperatur sowie die Sequenz der Primer. Schon bei geringfügigen Abweichungen (Austausch eines Nukleotids) können die entstehenden Muster stark variieren (Welsh und McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Die Unterschiede der Muster beruhen u.a. auf SNPs an den Primerbindungsstellen oder auf Insertionen bzw. Deletionen in den amplifizierten DNA-Abschnitten (Williams et al., 1990). Das Verfahren ist für alle Isolate einer (Sub-)Spezies verwendbar. Ein großer Vorteil ist hierbei, dass keine Kenntnis über die DNA-Sequenz des untersuchten Erregers notwendig ist (Welsh und McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Die Diskriminierungskraft ist hoch (Olive und Bean, 1999). Da schon geringe Änderungen der PCR-Bedingungen (pH-Wert und Salzgehalt des Puffers, verwendete DNA-Polymerase) zu gravierenden Veränderungen der Muster führen, ist die Reproduzierbarkeit schon innerhalb eines Labores, noch mehr im Vergleich zwischen Laboren eingeschränkt (Tenover et al., 1997). Die Durchführung und die Interpretation der Ergebnisse sind hingegen einfach. Allerdings müssen die geeigneten Primer in der Regel experimentell ermittelt werden (Olive und Bean, 1999).

⁹ In der Regel zehn Nukleotide.

2.2.3.5. Rep-PCR

Dieses Verfahren wird für verstreut im Genom vorkommende repeats, wie z.B. die REP- oder ERIC-Sequenzen (van Belkum et al., 1998) eingesetzt. Unter Verwendung eines für ein bestimmtes repetitives Element spezifischen Primers werden die zwischen den einzelnen repetitiven Elementen liegenden DNA-Abschnitte amplifiziert. Je nach Verteilung und Häufigkeit der repetitiven Elemente entstehen unterschiedliche Bandenmuster (Versalovic et al., 1991). Am häufigsten werden die REP- oder ERIC-Sequenzen verwendet (Olive und Bean, 1999). Aber auch Insertionselemente können als Grundlage für diese Methode dienen (Englund et al., 2003; Pfaller et al., 2007). Bei Verwendung geeigneter repetitiver Elemente sind alle Isolate einer (Sub-)Spezies typisierbar. Genaue Kenntnisse der Sequenz des untersuchten Genoms sind nicht erforderlich (Reboli et al., 1994). Das Verfahren verfügt über eine hohe Diskriminierungskraft, die Reproduzierbarkeit ist im Vergleich zwischen verschiedenen Laboren nur mäßig. Innerhalb eines Labores sind die Ergebnisse jedoch gut reproduzierbar. Durchführung und Interpretation der Ergebnisse sind einfach (Olive und Bean, 1999). Durch die Einführung eines automatisierten Protokolls konnte die Reproduzierbarkeit im Vergleich zwischen verschiedenen Laboren erhöht werden (Healy et al., 2005).

2.2.4. Vergleichende oder komparative Genomik

Hierbei werden komplette Genome miteinander verglichen. So können für eine (Sub-)Spezies spezifische oder innerhalb einer (Sub-)Spezies variable DNA-Regionen identifiziert werden. Die zugrunde liegenden Techniken sind die Sequenzierung und Hybridisierung (Mikroarray, subtraktive Hybridisierung).

2.2.4.1. SNP-Analyse

Hierbei werden SNPs im ganzen Genom oder nur in bestimmten Abschnitten, z.B. einzelnen Genen nachgewiesen (Fleischmann et al., 2002; Kersulyte et al., 2000). Die SNP-Detektion erfolgt in den meisten Fällen sequenzbasiert über den direkten Vergleich zweier Genomsequenzen (Alland et al., 2003; Filliol et al., 2006) oder auch mit Hilfe spezieller Software – SNPsFinder (Song et al., 2005). Die vergleichende Untersuchung mehrerer Isolate auf SNPs erfolgt im Normalfall mittels verschiedener PCR-basierter Verfahren (Fleischmann et al., 2002; Hazbón und Alland, 2004; Kersulyte et al., 2000; McDonald et al., 2006). Für groß angelegte Vergleichsuntersuchungen werden auch erregerspezifischer „SNP-Sets“ konstruiert und verwendet (Gutacker et al., 2002; McDonald et al., 2006). Die gewonnenen Daten sind einfach auszuwerten und gut zwischen verschiedenen Laboren vergleichbar. Noch ist das Verfahren recht kostenintensiv, es ist jedoch mit einer Kostenreduktion zu rechnen. Durch die grundsätzlich realisierbare Automatisierung ist auch ein hoher Probendurchsatz

möglich. Dieses Verfahren wird v.a. für phylogenetische Untersuchungen verwendet, eignet sich jedoch auch für epidemiologische Studien (Gutacker et al., 2002).

2.2.4.2. Sequenzierung

Da alle genotypischen Differenzierungsverfahren letzten Endes auf Unterschieden der DNA-Sequenz beruhen, erscheint die Sequenzierung als der am besten geeignete Weg zur Differenzierung (Olive und Bean, 1999). Über die Sequenzierung des gesamten Genoms können SNPs, repetitive Elemente, Rekombinationen, Deletionen und Insertionen identifiziert werden. Mehrere hundert Bakteriengenome sind inzwischen komplett sequenziert, allerdings ist das Verfahren für große Probenzahlen zu teuer (Garaizar et al., 2006). Die Sequenzierung kürzerer DNA-Abschnitte ist weniger arbeits- und kostenintensiv. Allerdings muss der zu sequenzierende Abschnitt sorgfältig ausgewählt werden. Er muss eine hypervariable Region, umgeben von hoch konservativen Bereichen, enthalten, um sowohl eine ausreichende Diskriminierung als auch die Typisierbarkeit aller untersuchten Stämme zu gewährleisten. Außerdem sollte der genutzte DNA-Bereich horizontal nicht übertragbar sein, um die Stammspezifität sicherzustellen (Olive und Bean, 1999). Verwendete Regionen sind beispielsweise die 16S-23S rDNA-Spacer-Region (Olive und Bean, 1999), die bei der MLST untersuchten Haushaltsgene (Maiden et al., 1998) oder Virulenzgene (Kersulyte et al., 2000).

2.2.4.3. Mikroarray oder DNA-Chip

Bei einem Mikroarray handelt es sich im Grunde um eine Ansammlung mehrerer tausend Sonden, so dass viele Hybridisierungsreaktionen gleichzeitig und auf engstem Raum durchgeführt werden können (Garaizar et al., 2006). Im Gegensatz zum Southern Blot sind jedoch die Sonden auf einem Träger fixiert und die markierte Ziel-DNA schwimmt in der Flüssigkeit (Paustian et al., 2005; Pelludat et al., 2005). Als Grundlage für die Sonden werden meist Fragmente verschiedener ORFs verwendet (Garaizar et al., 2006). Eine erfolgreiche Hybridisierung wird über die markierte Ziel-DNA nachgewiesen, in der Regel mit Hilfe von Fluoreszenzreaktionen. Auf diese Weise kann die An- oder Abwesenheit der untersuchten DNA-Abschnitte im zu analysierenden Genom beurteilt werden und ein Vergleich kompletter Genome ist möglich (Garaizar et al., 2006). Ein großer Vorteil der Mikroarray-Technik ist die universelle Verwendbarkeit, neben der Genotypisierung wird sie v.a. für die Analyse der Genexpression oder auch zur Speziesbestimmung oder für die Analyse von Resistenzgenen eingesetzt (Garaizar et al., 2006; Troesch et al., 1999). Da nicht nur die Unterschiede im Genom, sondern auch die genaue Lokalisation dieser ermittelt werden, sind auch Voraussetzungen zum Phänotyp möglich (Garaizar et al., 2006). Ein großer Nachteil der Methode sind die (noch) immensen Kosten für die benötigten Geräte zur Herstellung und Auswertung der

Chips. Die Auswertung kann durch nicht eindeutige Signale oder Kreuzhybridisierungen erschwert werden und die Reproduzierbarkeit ist eingeschränkt (Garaizar et al., 2006).

2.2.4.4. Subtraktive Hybridisierung (SH)

Es handelt sich hierbei um eine Hybridisierungsreaktion zweier nah verwandter Genome („Tester“ und „Driver“) mit anschließender Isolierung der nicht hybridisierten, nur im Tester-Genom vorkommenden Sequenzen. Der Tester ist das zu untersuchende Genom, der Driver i.A. ein Referenzstamm. Varianten der SH sind die repräsentative Differenzanalyse (RDA) und die „suppression subtractive hybridization“ (SSH).

Mit diesen Verfahren können spezifische Marker z.B. für diagnostische Zwecke (Townsend et al., 1998) oder mobile genetische Elemente identifiziert werden. Aber auch Pathogenitätsinseln, Virulenzgene oder Variationen der Genexpression sind mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung nachweisbar. Durch die Verfügbarkeit kommerzieller Kits lässt sich das Verfahren mit weniger Aufwand und relativ schnell durchführen und die Ergebnisse sind besser reproduzierbar (Winstanley, 2002).

Eine Übersicht über häufig verwendete Differenzierungsverfahren und ihre wichtigsten Eigenschaften gibt Tabelle 1 wieder.

Tabelle 1: Zusammenfassung häufig verwendeter Differenzierungsverfahren (nach Olive und Bean, 1999 und Schwarz et al., 2003)

Verfahren	Typisierbarkeit ¹⁰	Differenzierungskraft	Reproduzierbarkeit	Durchführung	Interpretation
RFLP	alle	variabel ¹¹	gut	aufwändig	einfach
PFGE	alle	hoch	gut	aufwändig	einfach
AFLP	alle	hoch	gut	aufwändig	einfach
RAPD/AP-PCR	alle	hoch	schlecht	einfach	einfach
Rep-PCR	alle	hoch	mäßig – gut	einfach	einfach
MLVA/MLSSR	alle	variabel ¹²	gut	einfach	einfach
MLST	alle	variabel ¹³	gut	aufwändig	einfach
Sequenzierung	alle	hoch	gut	aufwändig	schwierig

¹⁰ Bei Auswahl geeigneter Enzyme, Primer, Gensequenzen.

¹¹ Abhängig von der verwendeten Sonden/Restriktionsenzym-Kombination.

¹² Abhängig von den verwendeten VNTRs/SSRs.

¹³ Abhängig von den untersuchten Genen.

2.3. Differenzierung von *M. paratuberculosis*

Voraussetzung für eine Stammdifferenzierung ist zunächst eine sichere Bestimmung der (Sub-)Spezies. Bei *M. paratuberculosis* ist hier v.a. die Abgrenzung zu den anderen Subspezies von *M. avium* mit Schwierigkeiten verbunden. Die phänotypische Differenzierung der *M. avium*-Subspezies erfolgt in der Regel über die Untersuchung der Mycobactinabhängigkeit bei der in-vitro-Kultivierung (Turenne et al., 2006). Das mycobactinabhängige Wachstum gilt als spezifisch für *M. paratuberculosis*, tritt aber auch bei der Primärkultur von *M. avium* subsp. *silvaticum* und einigen *M. avium* subsp. *avium*-Stämmen auf (Saxegaard und Baess, 1988; Thorel, 1984). Zudem können verschiedene biochemische oder kulturelle Tests herangezogen werden (Mijs et al., 2002; Thorel et al., 1990). Eine sichere Unterscheidung der einzelnen *M. avium*-Subspezies ist jedoch nur mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren möglich (Mijs et al., 2002). Hierbei kommt den Insertionssegmenten eine besondere Bedeutung zu, da sie für die einzelnen Subspezies spezifisch sind (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Vorkommen der Insertionselemente bei den einzelnen *M. avium*-Subspezies

	IS1245 ^e	IS900 ^f	IS901 ^g	IS902 ^{h14}
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ^a	X	–	X	–
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ^b	X	–	–	–
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> ^c	X	–	–	X
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> ^d	–	X	–	–

a) Mijs et al., 2002 b) Mijs et al., 2002 c) Guerrero et al., 1995; Moss et al., 1992
 d) Green et al., 1989 e) Guerrero et al., 1995 f) Green et al., 1989 g) Kunze et al., 1991
 h) Moss et al., 1992

Diese Insertionselemente können mit verschiedenen PCR-Verfahren nachgewiesen werden (Ellingson et al., 2000; Guerrero et al., 1995; Kunze et al., 1992). Eine Unterscheidung der einzelnen Subspezies ist auch mit den zur Stammdifferenzierung verwendeten Verfahren möglich (s. Tabelle 3). Mittels Mikroarray-Analyse konnten zudem für einzelne Subspezies spezifische Genomfragmente – large sequence polymorphisms (LSPs) – ermittelt werden, mit deren Hilfe ebenfalls eine genaue Bestimmung der Subspezies möglich ist (Semret et al., 2006).

¹⁴ Die Insertionselemente IS901 und IS902 weisen eine Sequenzhomologie von 99% auf, so dass es sich höchstwahrscheinlich um das gleiche Insertionselement handelt (Kunze et al., 1991; Moss et al., 1992; Turenne et al., 2007).

Tabelle 3: Eignung der Verfahren zur Abgrenzung von *M. paratuberculosis* von anderen (Sub-)Spezies des MAC

Verfahren	Spezies	Subspezies	Quelle
REA	X	X	Wards et al., 1987; Whipple et al., 1987
5S rDNA RFLP	X	X	Chiodini, 1990
PFGE	X	X	Coffin et al., 1992; Guerrero et al., 1995; Lévy-Frébault et al., 1989; Kunimoto et al., 2003; Mazurek et al., 1993
AFLP	X	X	Motiwala et al., 2003; O'Shea et al., 2004; Pfaller et al., 2007
PCR-REA des IS1311	n.d.	X	Whittington et al., 1998b
PCR-REA des <i>hsp65</i> -Gens	X	X	Eriks et al., 1996; Oliveira et al., 2003; Romano et al., 2005; Telenti et al., 1993
RAPD	n.d.	X	Pillai et al., 2001
ERIC-PCR	X	X	Englund et al., 2003
ERIC/IS900-PCR	X	X	Englund et al., 2003
MLSSR-Typisierung	n.d.	X	Harris et al., 2006
MIRU-VNTR-Typisierung	X	X	Bull et al., 2003b; Romano et al., 2005; Thibault et al., 2007
Sequenzierung der 16S rDNA	X	-	Soini und Musser, 2001
Sequenzierung des 16S-23S rDNA-ITS	X	X	Frothingham und Wilson, 1993; Mijs et al., 2002
Sequenzierung des <i>hsp65</i> -Gens	X	X	Turenne et al., 2006
LSP-PCR	n.d.	X	Semret et al., 2006

X – Differenzierung möglich; - – Differenzierung nicht möglich; n.d. – nicht durchgeführt

Wie problematisch die genaue Abgrenzung gerade zwischen *M. avium* subsp. *avium* und *M. paratuberculosis* v.a. vor der Einführung molekularbiologischer Methoden war, zeigt das Beispiel des „*M. paratuberculosis*-Stammes 18“. Dieser wurde über Jahrzehnte als Referenzstamm (ATCC 12227) zur Gewinnung von Mycobactin J, bei der Herstellung von Impfstoffen und Diagnostika oder im Rahmen von verschiedenen Studien zur Identifizierung bzw. zur Stammdifferenzierung von *M. paratuberculosis* verwendet. Erst Anfang der 1990er Jahre

wurde er korrekt als *M. avium* subsp. *avium*-Stamm identifiziert (Chiodini, 1993; Coffin et al., 1992; Kunze et al., 1992, Merkal, 1979).

2.4. Stammdifferenzierung bei *M. paratuberculosis*

2.4.1. Phänotypische Differenzierung

Schon früh wurden anhand von Wachstumsgeschwindigkeit, Pigmentierung und Wirtspräferenz unterschiedliche Subtypen von *M. paratuberculosis* unterschieden (Taylor, 1951). Andere phänotypische Differenzierungsverfahren wie die Serotypisierung (Chiodini et al., 1984; Whipple et al., 1990) oder die Bestimmung von Fettsäuremustern (Saxegaard et al., 1988) und biochemischer Eigenschaften (Chiodini, 1986) erwiesen sich jedoch als ungeeignet.

2.4.2. Genotypische Differenzierung

Eine weitergehende Typisierung von *M. paratuberculosis*-Isolaten konnte erst mit der Einführung molekularbiologischer Methoden vorgenommen werden.

2.4.2.1 Genutzte Strukturen im Genom

IS900

Das IS900 ist ein *M. paratuberculosis*-spezifisches atypisches Insertionselement (Green et al., 1989; Doran et al., 1997). Im Gegensatz zu anderen Insertionselementen verfügt es weder über terminale inverted repeats noch über direct repeats in der flankierenden DNA. Es gehört wie das IS901/902 anderer *M. avium*-Subspezies zur IS110-Familie (Doran et al., 1997; Mahillon und Chandler, 1998). Die Länge beträgt 1451 bp und der GC-Gehalt 66%. Es kommt in 15-20 Kopien an hochkonservativen, spezifischen Insertionsstellen (Loci) im Genom vor und enthält zwei ORFs (Bull et al., 2000; Doran et al., 1997; Green et al., 1989). Der eine ORF kodiert die vermutete Transposase p43 (Tizard et al., 1992), der andere – auf dem Gegenstrang – das *hed* (host expression dependent)-Gen (Doran et al., 1994; Doran et al., 1997). Das *hed*-Gen benötigt zur Expression RBS, Promoter und Stopcodon der flankierenden DNA, so dass die Translationsprodukte an den einzelnen Insertionsstellen unterschiedlich sind (Doran et al., 1994; Doran et al., 1997). Die genaue Funktion dieser Proteine ist noch unklar, möglicherweise sind sie am Eisentransport beteiligt (Doran et al., 1994). Je nachdem welcher ORF des IS900 bei der Transkription der Ziel-DNA abgelesen wird, können der Einbau in p43- bzw. *hed*-Orientierung unterschieden werden (Bull et al., 2000). Über die Verschiebung der RBS oder die Unterbrechung einzelner ORFs kann die Insertion des IS900 die Expression der umliegenden bzw. stromabwärts gelegenen Gene beeinflussen. Die flankierenden Gene der Loci sind vermutlich u.a. an der Zellwandsynthese oder dem intrazellulären Überleben beteiligt, so dass ein Einfluss des IS900 auf die Erregereigenschaften vermutet wird (Bull et al., 2000). Bei der Stammdifferenzierung dient das IS900 v.a. als

Basis des RFLPs (Pavlik et al., 1999), aber auch eines speziellen Multiplex-PCR-Verfahrens (Bull et al., 2000).

IS1311

Das IS1311 kommt bei allen *M. avium*-Subspezies vor (Turenne et al., 2007) und gehört u.a. mit dem IS1245¹⁵ zur IS256-Familie (Mahillon und Chandler, 1998). Im Genom von *M. paratuberculosis* liegt es in 7-10 Kopien vor und kann sowohl zur Unterscheidung von anderen *M. avium*-Subspezies als auch zur Stammdifferenzierung innerhalb von *M. paratuberculosis* genutzt werden (Whittington et al., 1998b).

MIRU-VNTRs (mycobacterial interspersed repetitive units)

MIRUs bestehen aus mehreren wiederholten Sequenzabschnitten mit einer Länge von jeweils 40-100 bp. Die einzelnen Sequenzen können leicht variieren. Sie kommen an bestimmten Loci in den intergenen Bereichen vor und enthalten kleine, sich gegenseitig überlappende ORFs. Ihre Funktion ist noch ungeklärt, möglicherweise beeinflussen sie durch die Insertion die Expression stromabwärts gelegener Gene (Supply et al., 1997). Sie eignen sich gut zur Stammdifferenzierung, da die Anzahl der Kopien an einigen MIRU-Loci bei den einzelnen Isolaten unterschiedlich ist (Supply et al., 2000). Erstmals wurden sie bei *M. tuberculosis* (Supply et al., 1997), nachfolgend auch bei *M. avium*-Subspezies (Bull et al., 2003b) beschrieben. Im Genom von *M. paratuberculosis* wurden in den letzten Jahren verschiedene VNTRs nachgewiesen, von denen ein Großteil auch MIRU-Strukturen aufweist. 18 dieser teilweise in mehreren Studien beschriebenen MIRU-VNTR-Loci erwiesen sich als zur Stammdifferenzierung geeignet (Bull et al., 2003b; Overduin et al., 2004; Romano et al., 2005; Thibault et al., 2007).

SSRs

Im *M. paratuberculosis*-Genom sind bislang elf polymorphe SSR-Loci beschrieben, die sich für eine Stammdifferenzierung eignen (Amonsin et al., 2004).

2.4.2.2. Verwendete Verfahren

Die Eignung der einzelnen Verfahren zur Unterscheidung der Subtypen bzw. zur weiteren Stammdifferenzierung sind in Tabelle 5 dargestellt. Für allgemeine Angaben zur Durchführung, zur Reproduzierbarkeit u.ä. wird auf das allgemeine Kapitel zur Stammdifferenzierung (2.2.2.-2.2.4.) verwiesen.

¹⁵ Das IS1245 kommt bei *M. avium* subsp. *avium* und *M. avium* subsp. *hominissuis* vor.

REA

Mit Hilfe der REA¹⁶ erfolgten die ersten Differenzierungsversuche von *M. paratuberculosis* (Collins et al., 1990; Collins und de Lisle, 1986; Whipple et al., 1987). Erstmals gelang hiermit eine genombasierte Unterscheidung von rind- und schafassoziierten *M. paratuberculosis*-Isolaten (Collins et al., 1990). Das Verfahren wurde jedoch (bald) vom IS900 RFLP abgelöst, da dieser sowohl eine höhere Diskriminierungskraft aufweist als auch wesentlich leichter auszuwerten ist (Collins et al., 1990; Whipple et al., 1990).

IS900 RFLP

Hierbei handelt es sich um die bislang am häufigsten angewandte Differenzierungsmethode, die in vielen Studien als Referenzverfahren verwendet wird (Bull et al., 2000; Motiwala et al., 2006b; Overduin et al., 2004). Der RFLP wurde in den einzelnen Studien mit einer Vielzahl von Restriktionsenzymen sowie Sonden für die Hybridisierung durchgeführt (Möbius et al., 2008). Verwendete Restriktionsenzyme sind – nach Häufigkeit der Anwendung aufgeführt – *BstEII*, *PstI*, *PvuII*, *BamHI*, und *BclI* (Möbius et al., 2008; Pavlik et al., 1999; Thoresen und Olsaker, 1994; Whipple et al., 1990). Auch unterschiedliche Sonden, basierend auf dem IS900, kommen zum Einsatz (Möbius et al., 2008; Moreira et al., 1999; Pavlik et al., 1995; Whittington et al., 2000). Dies ist von besonderer Bedeutung bei der Verwendung von *PstI* und *PvuII*, da diese Restriktionsenzyme über eine Schnittstelle innerhalb des IS900 verfügen. Aus diesem Grunde unterscheiden sich die Muster in der Literatur voneinander je nachdem, an welcher Stelle des IS900 die verwendete Sonde hybridisiert. Bindet die Sonde auf beiden Seiten der Schnittstelle, ist eine höhere Anzahl nachweisbarer Fragmente und damit ein anderes Muster die Folge als bei einer Sonde, die nur auf einer Seite der Schnittstelle bindet (Möbius et al., 2008; Moreira et al., 1999). Seit 1999 existiert ein standardisiertes Verfahren (Pavlik et al., 1999). Die Diskriminierungskraft des RFLP ist begrenzt¹⁷, sie kann jedoch durch die Verwendung mehrerer Enzyme deutlich erhöht werden (Möbius et al., 2008). Deshalb werden in der überwiegenden Mehrheit der Studien mindestens zwei (Pavlik et al., 1999; Saunders et al., 2003; Stevenson et al., 2002) in einigen Fällen auch bis zu vier Restriktionsenzyme eingesetzt (Cousins et al., 2000; Möbius et al., 2008; Palmer et al., 2005; Whipple et al., 1990). Der IS900 RFLP ist die Grundlage für die Einteilung von *M. paratuberculosis* in C (cattle)-, S (sheep)- und I (intermediäre)-Subtypen (Collins et al., 1990). Assoziationen zur regionalen Herkunft sind in Grenzen möglich. Der weltweit am häufigsten nachgewiesene RFLP-Typ¹⁸ ist C1 (Pavlik et al., 1999; Thibault et al., 2007).

¹⁶ Verdau v.a. mit *BstEII*, aber auch *PstI*.

¹⁷ Diskriminierungsindices zwischen 0,5 und 0,6 (Motiwala et al., 2006b).

¹⁸ Verdau mit *BstEII*.

IS1311 RFLP

Auch auf Basis dieses Insertionselements kann eine Differenzierung mittels RFLP erfolgen (Collins et al., 1997; Whittington et al., 1998b). Die Differenzierungskraft ist jedoch, vermutlich aufgrund der geringeren Kopienzahl des IS1311, geringer als beim IS900 RFLP (Whittington et al., 1998b). Zudem ist das IS1311 nicht *M. paratuberculosis*-spezifisch (Collins et al., 1997). Da kein Informationsgewinn im Vergleich zum IS900 RFLP besteht, wird diese Methode kaum eingesetzt.

PFGE

Die PFGE gehört ebenfalls zu den schon früh angewandten Verfahren zur *M. paratuberculosis*-Differenzierung (Lévy-Frebault et al., 1989). Das am häufigsten verwendete Restriktionsenzym ist *SpeI* (de Juan et al., 2005; Feizabadi et al., 1997; Greig et al., 1999; Sevilla et al., 2007; Stevenson et al., 2002). Weiterhin wurden auch die Enzyme *SnaBI* (de Juan et al., 2005; Sevilla et al., 2007; Stevenson et al., 2002) und *XbaI* (Feizabadi et al., 1997) erfolgreich zur Differenzierung eingesetzt. Mit *DraI* (Feizabadi et al., 1997; Lévy-Frebault et al., 1989) und *HindIII* (Greig et al., 1999) war hingegen keine Differenzierung möglich. Die Differenzierungskraft gilt als höher als die des IS900 RFLPs (Motiwala et al., 2006b). Eine Erhöhung ist durch den Einsatz mehrerer Restriktionsenzyme möglich – Multiplex-PFGE (de Juan et al., 2005; Sevilla et al., 2007; Stevenson et al., 2002). Drei Typen (I-III), die etwa den S-, C- und I-Typen des RFLP entsprechen, können unterschieden werden (de Juan et al., 2005; Stevenson et al., 2002). Eine regionale Zuordnung von Profilen konnte teilweise ebenfalls erfolgen (Feizabadi et al., 1997). Zusätzlich ergaben sich bei der Untersuchung spanischer und portugiesischer *M. paratuberculosis*-Isolate Hinweise auf eine Häufung bestimmter Multiplex-PFGE-Profile bei verschiedenen Rinderrassen (Sevilla et al., 2007).

AFLP

Hierfür wurde in den bisherigen Studien zumeist ein kommerzieller Kit verwendet (Kiehnbaum et al., 2005; Motiwala et al., 2003). Die Diskriminierungskraft ist verhältnismäßig hoch (Diskriminierungsindex von etwa 0,7), eine Zuordnung einzelner AFLP-Typen zur regionalen oder tierartlichen Herkunft ist jedoch nicht möglich (Kiehnbaum et al., 2005; Motiwala et al., 2003). Humane *M. paratuberculosis*-Isolate wiesen allerdings einmalige AFLP-Muster auf (Motiwala et al., 2003).

PCR-REA des IS1311

Mit diesem Verfahren ist neben der Identifizierung von *M. paratuberculosis* eine schnelle, einfache und sichere Unterscheidung von C- und S-Stämmen möglich (Marsh et al., 1999).

Zusätzlich ist mit diesem Verfahren eine weitere Variante von *M. paratuberculosis*, der B (Bison)-Typ, differenzierbar (Whittington et al., 2001a). I- bzw. TypIII-Stämme können mit diesem Verfahren jedoch nicht von S-Stämmen differenziert werden (de Juan et al., 2005). Die unterschiedlichen Restriktionsmuster¹⁹ beruhen auf einem Polymorphismus an Position 223 des IS1311. In Australien wird das Verfahren zur direkten Typisierung aus Kot- und Gewebeproben, histologischen Schnitten oder Kulturen in der Routinediagnostik eingesetzt (Whittington et al., 2000).

RAPD/AP-PCR

Erstmals wurde diese Methode 1997 von Scheibl und Gerlach zur Differenzierung von *M. paratuberculosis*-Isolaten verwendet. Weitere Studien unter Verwendung anderer Primer und PCR-Bedingungen folgten (Francois et al., 1997; Pillai et al., 2001; Zimpernik et al., 1999). Die Diskriminierungskraft ist vergleichsweise hoch²⁰ (Motiwala et al., 2006b; Pillai et al., 2001). Zudem konnte in einer Studie eine Zuordnung bestimmter Muster zur regionalen Herkunft erfolgen (Zimpernik et al., 1999).

Multiplex PCR der IS900 Loci (MPIL)

Dieses *M. paratuberculosis*-spezifische Verfahren bezieht sich auf die Insertionsstellen (Loci) des IS900 im *M. paratuberculosis*-Genom. Die An- oder Abwesenheit von 14 dieser Loci sowie die Insertion eines IS900 in diese Loci kann festgestellt und zur Unterscheidung einzelner Isolate genutzt werden (Bull et al., 2000). Das Verfahren wurde bislang lediglich einzeln zur Differenzierung verwendet (Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004) und weist eine nur begrenzte Differenzierungskraft²¹ auf (Motiwala et al., 2006b). Eine vergleichende Untersuchung ergab eine weitreichende Übereinstimmung zwischen IS900 RFLP- und MPIL-Typen (Bull et al., 2000). Weitergehende Zuordnungen zur geografischen Herkunft der *M. paratuberculosis*-Isolate konnten jedoch nicht vorgenommen werden. Eine sichere Abgrenzung von anderen Isolaten des MAC ist jedoch möglich (Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004).

Rep-PCR

Eine Differenzierung wurde auch mittels ERIC- bzw. ERIC/IS900-PCR versucht, allerdings konnten die untersuchten *M. paratuberculosis*-Isolate nicht unterschieden werden (Englund et al., 2003).

¹⁹ Verdau mit *HinfI* und *MseI* (letzteres zur Differenzierung von *M. avium* subsp. *avium*).

²⁰ Diskriminierungsindex = 0,77.

²¹ Diskriminierungsindices zwischen 0,456 und 0,560 (Motiwala et al., 2006b).

MLSSR-Typisierung

Von den elf beschriebenen SSR-Loci (Amonsin et al., 2004) wurden die mit der höchsten Diskriminierungskraft (G und GGT-Loci) in mehreren Studien verwendet (Cernicchiaro et al., 2008; Corn et al., 2005; Ghadiali et al., 2004; Harris et al., 2006; Motiwala et al., 2004). Von den bislang beschriebenen Verfahren weist die MLSSR-Typisierung die höchste Diskriminierungskraft²² auf. Eine Zuordnung einzelner Genotypen zur regionalen Herkunft der Isolate war nicht möglich (Ghadiali et al., 2004; Harris et al., 2006; Motiwala et al., 2004). Eine über die Unterscheidung von S- und C-Stämmen hinausgehende Assoziation zwischen der Tierart und dem Genotyp konnte bei einer Untersuchung von Isolaten verschiedener Wildtiere jedoch dargestellt werden (Motiwalala et al., 2004).

MLVA oder VNTR-MIRU-Typisierung

Die beschriebenen VNTR-MIRUs wurden in verschiedenen Kombinationen zur Stammdifferenzierung genutzt (Bull et al., 2003b; Möbius et al., 2008; Overduin et al., 2004; Romano et al., 2005; Thibault et al., 2007). Je nach verwendeter Kombination von VNTR-MIRU-Loci und den untersuchten Isolaten schwankte die Differenzierungskraft dieses Verfahrens von gar keiner Differenzierung (Romano et al., 2005) über eher geringe²³ und mittlere²⁴ bis hin zu hohen²⁵ Diskriminierungsindices. Eine Assoziation zwischen VNTR-MIRU-Typ und geografischer Herkunft konnte nicht festgestellt werden (Möbius et al., 2008; Overduin et al., 2004; Thibault et al., 2007).

Komparative Genomik

Verfahren zum Vergleich ganzer Genome wie die RDA (Dohmann et al., 2003) oder die Mikroarray-Analyse (Marsh et al., 2006; Semret et al., 2006) wurden bislang v.a. für den Vergleich von Typl- und TyplI-Stämmen eingesetzt. Hierbei konnten sowohl für Typl- (Dohmann et al., 2003) als auch für TyplI-Stämme (Marsh et al., 2006) für den jeweiligen Subtyp spezifische Sequenzen festgestellt werden, deren genaue Funktionen jedoch noch ungeklärt sind (Dohmann et al., 2003; Marsh et al., 2006). Einzelne dieser Sequenzen sind auch für eine weitere Differenzierung von Typl-Isolaten geeignet (Semret et al., 2006).

²² Diskriminierungsindices zwischen 0,751 und 0,967 (Motiwalala et al., 2006b).

²³ Diskriminierungsindex von 0,316 (Overduin et al., 2004).

²⁴ Diskriminierungsindex von 0,535 (Bull et al., 2003b; Motiwala et al., 2006b).

²⁵ Diskriminierungsindices von 0,751 (Thibault et al., 2007) und 0,905 (Möbius et al., 2008).

2.4.3. Subtypen von *M. paratuberculosis*

Üblicherweise werden die *M. paratuberculosis*-Isolate in drei Subtypen unterteilt, die auf der Basis von Wirtspräferenz, kulturellen und genetischen Eigenschaften unterschieden werden können. Die phänotypischen Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 4: Unterscheidung der drei *M. paratuberculosis*-Subtypen anhand phänotypischer Eigenschaften

	Typ I/S (Sheep)²⁶	Typ II/C (Cattle)²⁷	Typ III/I (Intermediate)²⁸
Wirtspräferenz	Schaf	Rind/andere Wirte	Schaf
Wachstums- geschwindigkeit	sehr langsam ²⁹	langsam	sehr langsam
Kolonien	orange pigmentiert	nicht pigmentiert	nicht pigmentiert
Kultivierbarkeit	schlecht	gut	schlecht
zur Erstisolierung am besten geeignetes Medium ³⁰	LJ; 7H11	HEYM	LJ; 7H11

LJ – Löwenstein-Jensen-Medium, HEYM – Herrold's Egg-Yolk-Medium mit Mycobactin, 7H11 – Middlebrook 7H11 Agar

Diese phänotypischen Unterschiede wurden durch die verschiedene molekulargenetische Untersuchungen untermauert (Collins et al., 1990; de Juan et al., 2005; Stevenson et al., 2002). TypI/III- und TypII-Isolate können mit Hilfe der meisten Differenzierungsverfahren unterschieden werden (s. Tabelle 5), wohingegen die Differenzierung von TypI- und TypIII-Isolaten nur mit Hilfe des IS900 RFLP und der PFGE möglich ist (Collins et al., 1990; de Juan et al., 2005). Eine Unterscheidung von TypI/III und TypII-Stämmen ohne weitergehende Stammdifferenzierung ist zum einen mit Hilfe der PCR-REA des IS1311 (Marsh et al., 1999) oder der Sequenzierung des *hsp65*-Gens (Turenne et al., 2006), zum anderen mittels verschiedener PCR-Verfahren (DMC-PCR nach Collins et al., 2002; RDA-PCR nach Dohmann et al., 2003; LSP-PCR nach Semret et al., 2006) möglich. TypII-Isolate weisen ein breites Wirtsspektrum auf. Sie sind nicht nur bei verschiedenen Haus- und Wildwiederkäuerarten nachgewiesen worden, sondern auch bei vielen Nicht-Wiederkäuern wie z.B. Katzen (Palmer et al., 2005), Kaninchen (Greig et al., 1999), Nashörnern (Cousins et al., 2000) sowie beim Menschen (Collins et al., 1990; Overduin et al., 2004). TypI/III-Isolate werden hingegen v.a. bei Schafen, aber auch bei Ziegen (de Juan et al., 2005), Wildwiederkäuern (de Lisle et al.,

²⁶ Stevenson et al., 2002; Taylor, 1951.

²⁷ S. Fußnote 26.

²⁸ De Juan et al., 2005; Taylor, 1951.

²⁹ Bebrütungsdauer von mindestens 16 Wochen (Motiwala et al., 2006b).

³⁰ Juste et al., 1991; Sevilla et al., 2005.

1993) und selten bei Rindern (de Juan et al., 2005; Whittington et al., 2001b) isoliert. Auch in Bezug auf die geografische Verbreitung unterscheiden sich die Subtypen. Während TypII-Stämme weltweit verbreitet sind (Collins et al., 1990; Cousins et al., 2000; Thibault et al., 2007), wurden sowohl TypI- als auch TypIII-Stämme bislang nur in einzelnen Ländern wie z.B. Australien (Cousins et al., 2000), Spanien (de Juan et al., 2005), Saudi-Arabien (Mahmuod et al., 2002), Kanada (Collins et al., 1990), Südafrika (de Lisle et al., 1992), Großbritannien (Stevenson et al., 2002) oder Island (Whittington et al., 2001b) nachgewiesen. Außerdem weisen TypI/III-Isolate im Gegensatz zu TypII-Isolaten eine höhere genetische Variabilität auf (Motiwala et al., 2003; Semret et al., 2006; Sevilla et al., 2007). Des Weiteren sind unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen der einzelnen Subtypen nachgewiesen (de Juan et al., 2006; Janagama et al., 2006; Motiwala et al., 2006a). Aufgrund der Homologien sowohl TypI-spezifischer Gensequenzen als auch des IS1311³¹ mit *M. avium* subsp. *avium* gilt der TypI als evolutionsbiologische Zwischstufe zwischen *M. avium* subsp. *avium* und *M. paratuberculosis* (Dohmann et al., 2003; Semret et al., 2006; Whittington et al., 1998b). Bei der Typisierung mit Hilfe der IS1311 PCR-REA ist ein weiterer Typ (Bison- oder B-Typ) beschrieben. Dieser ist bislang bei Bisons in den USA (Whittington et al., 2001a), aber auch bei kleinen Wiederkäuern in Indien (Sevilla et al., 2005; Singh et al., 2007) nachgewiesen worden. Diese Isolate sind schwieriger zu isolieren und stellen andere Ansprüche an die Nährmedien zur Erstkultivierung als C-Typ-Isolate (Sevilla et al., 2005). Mit anderen Differenzierungsverfahren ist eine Identifizierung von B-Typ-Isolaten nicht möglich (Sevilla et al., 2007; Whittington et al., 2001a).

Einen Überblick über die angewandten Differenzierungsverfahren nebst der Eignung zur Stammdifferenzierung bzw. der Differenzierung von TypI/III- und TypII-Isolaten geben die Tabellen 5 und 6.

³¹ An Position 223.

Tabelle 5: Eigenschaften der zur *M. paratuberculosis*-Differenzierung verwendeten Verfahren

Verfahren	Differenzierung TypI/III – TypII	Stammdifferenzierung	Quelle
REA	X	X	Collins et al., 1990
IS900 RFLP	X	X	Collins et al., 1990
IS1311 RFLP	X	X	Collins et al., 1997; Whittington et al., 1998b
PFGE	X	X	De Juan et al., 2005; Stevenson et al., 2002
AFLP	X	X	Motiwala et al., 2004
PCR-REA des IS1311	X	-	Whittington, 1998;
RAPD/AP-PCR	X	X	Pillai et al., 2001
ERIC- bzw. ERIC/IS900-PCR	-	-	Englund et al., 2003
MPIL	X	X	Bull et al., 2000
MIRU-VNTR- Typisierung	X	X	Bull et al., 2003b
MLSSR-Typisierung	X	X	Amonsin et al., 2004; Motiwala et al., 2004
Sequenzierung des 16S-23S rRNA- Spacers	-	-	Scheibl und Gerlach, 1997
Sequenzierung des <i>hsp65</i> -Gens	X	-	Turenne et al., 2006
PCR-REA des <i>hsp65</i> -Gens	-	-	Romano et al., 2005

X – Differenzierung möglich, - – Differenzierung nicht möglich, n.d. – nicht durchgeführt

Tabelle 6: Erfolgreich zur Stammdifferenzierung von *M. paratuberculosis*-Isolaten verwendete Verfahren

Verfahren	Quelle
REA	Chiodini, 1990; Collins und de Lisle, 1986; Collins et al., 1990; Whipple et al., 1987; Whipple et al., 1989
IS900 RFLP	Bauerfeind et al., 1996; Bull et al., 2000; Collins et al., 1990; Cousins et al., 2000; De Lisle et al., 1992; De Lisle et al., 1993; Deutz et al., 2005; Djonne et al., 2005; Francois et al., 1997; Greig et al., 1999; Machackova et al., 2004; Machackova-Kopečna et al., 2005; Möbius et al., 2008; Moreira et al., 1999; Overduin et al., 2004; Palmer et al., 2005; Pavlik et al., 1995; Pavlik et al., 1999; Pavlik et al., 2000; Romano et al., 2005; Saunders et al., 2003; Stevenson et al., 2002; Thibault et al., 2007; Thoresen und Olsaker, 1994; Whipple et al., 1990; Whittington et al., 2000
IS1311 RFLP	Collins et al., 1997; Whittington et al., 1998b
PFGE	De Juan et al., 2005; Feizabadi et al., 1997; Greig et al., 1999; Sevilla et al., 2007; Stevenson et al., 2002
AFLP	Kiehnbaum et al., 2005; Motiwala et al., 2003
RAPD/AP-PCR	Deutz et al., 2005; Francois et al., 1997; Pillai et al., 2001; Scheibl und Gerlach, 1997; Zimpernick et al., 1999
MPIL	Bull et al., 2000; Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004
MIRU-VNTR-Typisierung	Bull et al., 2003b; Möbius et al., 2008; Romano et al., 2005; Thibault et al., 2007
MLSSR-Typisierung	Amonsin et al., 2004; Cernicchiaro et al., 2008; Corn et al., 2005; Ghadiali et al., 2004; Harris et al., 2006; Motiwala et al., 2004; Motiwala et al., 2005

Material und Methoden

1. Material

1.1. Bakterienstämme

In die Untersuchung wurden 91 Feldisolate von *M. paratuberculosis* von unterschiedlichen Tierarten und aus verschiedenen Regionen sowie der Referenzstamm ATCC 19698 einbezogen. Die Feldisolate stammten zum großen Teil aus der laufenden Diagnostik des Veterinärinstitutes Oldenburg³², weitere Isolate wurden von anderen Einrichtungen³³ zur Verfügung gestellt. Die Mehrheit der *M. paratuberculosis*-Isolate, im Folgenden Isolate, wurde im Rahmen von freiwilligen Bekämpfungsverfahren gegen die Paratuberkulose, ein Teil jedoch auch bei klinischen Verdachtsfällen isoliert. Die Auswahl der Isolate erfolgte willkürlich, es wurde allerdings versucht, bezüglich der Herkunftstierart bzw. -region ein möglichst breites Spektrum an Isolaten zu untersuchen.

Tabelle 7: Herkunftstierarten der untersuchten *M. paratuberculosis*-Isolate

Tierart	Anzahl (n)	Prozent %
Rind	79	86
Schaf	9	10
Wildwiederkäuer	3	3
Ziege	1	1
gesamt	92	100

Tabelle 8: Herkunftsregionen der untersuchten *M. paratuberculosis*-Isolate

Herkunft (Land/Bundesland)	Anzahl (n)	Prozent %
Niedersachsen	49	54
Nordrhein-Westfalen	11	12
Sachsen-Anhalt	4	4
Thüringen	16	18
Großbritannien	5	5
Niederlande	2	2

³² Vom 31.10.2003 bis zum 21.09.2004 wurden im Veterinärinstitut Oldenburg 1327 Kot- und 19 Organproben kulturell auf *M. paratuberculosis* untersucht. 111 Kot- und 8 Organproben waren *M. paratuberculosis*-positiv. Von diesen wurden 49 Isolate in die Untersuchungen einbezogen.

³³ Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tiergesundheit Oldenburg, Landesamt für Verbraucherschutz Stendal, Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Krefeld, Thüringisches Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz Jena.

Herkunft (Land/Bundesland)	Anzahl (n)	Prozent %
Norwegen	1	1
Österreich	3	3
Gesamt	91	100

1.2. Kennzeichnung der Isolate

Zur besseren Übersicht wurden die Isolate einheitlich nach ihrer Herkunft gekennzeichnet:

Kennzeichnung der Isolate vom Rind:

Bundesland³⁴ - Landkreis³⁵ - Betrieb - Isolat-Nr.

Beispiel: NDS - BRA - 3 - b

Kennzeichnung der Isolate von anderen Tierarten als dem Rind:

Land³⁶ - Tierart - Isolat-Nr.

Beispiel: A - Wild - 1

2. Methoden

2.1. Erfassen von Informationen zu Betrieben und einzelnen Isolaten

An die Institute, die um Überlassung von Isolaten gebeten wurden, wurden Fragebögen (s. Abbildung 12 im Anhang) zu den Isolaten versandt. So konnten Informationen zur Tierart, Ausgangsmaterial der Isolierung, Bestand u.ä. erfasst werden.

Bei Isolaten, die aus der laufenden Diagnostik des Veterinärinstituts Oldenburg stammten, wurden zusätzlich zur Auswertung der Untersuchungsanträge die Besitzer telefonisch befragt. In der HI-Tierdatenbank (>>www.hi-tier.de<<) wurden, soweit möglich, die Geburtsdaten der Tiere recherchiert. Zusätzlich konnte bei einigen Isolaten das zugehörige Organmaterial pathologisch-anatomisch und histologisch untersucht werden (s. 2.2.).

2.2. Untersuchung der Organproben

2.2.1. Probengewinnung

Von neun Tieren (acht Kühe und ein Fetus) aus in die Untersuchung einbezogenen Betrieben konnte Organmaterial gewonnen werden. Diese Tiere wurden aufgrund eines positiven kulturellen oder serologischen Befundes im Rahmen des Niedersächsischen Sanierungsver-

³⁴ NDS – Niedersachsen, NRW – Nordrhein-Westfalen, SSA – Sachsen-Anhalt, THÜ – Thüringen.

³⁵ AC – Aachen, AUR – Aurich, BRA – Wesermarsch, CUX – Cuxhaven, DN – Düren, GL – Rheinisch-Bergischer Kreis, GM – Oberbergischer Kreis, H – Region Hannover, KÖT – Köthen, LER – Leer, MQ – Merseburg-Querfurt, OL – Oldenburg, SDL – Stendal, STD – Stade.

³⁶ A – Österreich, GB – Großbritannien, N – Norwegen, NL – Niederlande.

fahrens geschlachtet. Es wurden, soweit möglich, Tiere ausgewählt, von denen schon ein Isolat aus der kulturellen Kotuntersuchung vorlag.

Tabelle 9: Herkunft der untersuchten Organproben

Schlachthof	Schlachtdatum	Anzahl Tiere (n)	Herkunftsbetrieb
Elsfleth	05.04.2004	4 und ein Fetus	NDS-BRA-1
Oldenburg	11.05.2004	2	NDS-BRA-2
Wilhelmshaven	15.06.2004	2	NDS-BRA-4

Nach der Schlachtung wurden hinteres Jejunum, Ileum, Caecum und der Anfangsteil des Colon mit den dazugehörigen Lymphknoten entnommen. Die Entnahme der Einzelproben sowohl für die kulturelle als auch die histologische Untersuchung erfolgte aus Jejunum, Ileum, Ileocaecalklappe, Follikelplatte an der Einmündung des Ileums in das Caecum, Caecum und Ileocaecallymphknoten, teilweise auch Jejunallymphknoten sowie Blinddarminhalt. Die Einzelproben für die kulturelle Untersuchung wurden bei -70 °C gelagert. Für die histologische Untersuchung wurden die Einzelproben in 10%iger Formaldehydlösung aufbewahrt.

2.2.2. Mikroskopischer und kultureller Erregernachweis

a) Mikroskopischer Erregernachweis

Die Untersuchung auf säurefeste Stäbchen wurde mittels Ziehl-Neelsen-Färbung durchgeführt. Vor der Färbung wurden die Proben luftgetrocknet und hitzefixiert.

Kot/Blinddarminhalt

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Proben mit 15%iger Sputofluol-Lösung vorbehandelt und dünn auf einen Objektträger ausgestrichen.

Organproben

Von Jejunum, Ileum und Caecum wurde Schleimhaut mit einem Objektträger abgekratzt und dünn auf einen anderen Objektträger ausgestrichen.

Bei Lymphknotenproben wurde eine frische Schnittfläche des vorher abgeflammt Lymphknotens auf einen Objektträger ausgestrichen.

b) Kultureller Erregernachweis

Zur kulturellen Untersuchung wurden etwa 3 g Probenmaterial in 0,75%iger HPC (Hexadecylpyridiumchlorid)-Lösung suspendiert und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

Sedimentation (Kot, Blinddarminhalt) oder Zentrifugieren (Organproben) wurden je vier Schrägagarröhrchen mit mycobactinhaltigem Herrold's Egg-Yolk-Agar mit jeweils 200 µl des Sediments beimpft und mit Barthmannstopfen verschlossen. Die Röhrchen wurden für mindestens sechs, höchstens zwölf Wochen bei 37 °C bebrütet, davon die erste Woche in Schräglage.

Sichtbare Kolonien traten frühestens nach fünf Wochen auf. Mittels Ziehl-Neelsen-Färbung wurde das Vorhandensein säurefester Stäbchen untersucht und im positiven Falle eine Subkultur zur Überprüfung der Mycobactinabhängigkeit eingeleitet. Hierfür wurde je ein Röhrchen Herrold's Egg-Yolk-Agar mit und ohne Mycobactinzusatz mit Koloniematerial beimpft und vier Wochen bei 37 °C bebrütet.

Langsam wachsende Kolonien, die nur auf Nährböden mit Mycobactinzusatz wuchsen und sich in der Ziehl-Neelsen-Färbung als säurefeste Stäbchen darstellten, wurden als *M. paratuberculosis* identifiziert. In unklaren Fällen wurde zusätzlich eine PCR (Nachweis des IS900) durchgeführt.

2.2.3. Histologische Untersuchung der Organproben

Die Einzelproben wurden mindestens 16 h in 10%iger Formaldehydlösung fixiert. Danach erfolgte nach Entwässerung und Durchtränkung der Proben mit Paraffin die Einbettung in Paraffin. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt und diese sowohl Hämalaun-Eosin als auch Ziehl-Neelsen gefärbt.

Sowohl bei der pathologisch-anatomischen als auch bei der histologischen Untersuchung der Organproben wurde nur der Nachweis von Veränderungen erfasst, nicht der Grad der Ausprägung.

2.3. Lyophilisieren

Es wurden pro Isolat drei Asservate hergestellt. Pro Konserve wurde Bakterienmaterial bis zur deutlichen Trübung in 2 ml 7,5%iges Glucoseserum eingerieben. Nach Tiefgefrieren wurden die Bakteriensuspensionen in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

2.4. Molekulargenetische Charakterisierung

2.4.1. Untersuchung mit der Loci-PCR (Bull et al., 2000)

Das Genom von *M. paratuberculosis* enthält 14-18 Kopien des IS900, die an konservierten Insertionsstellen (Loci) eingefügt werden können. Die flankierende DNA von 14 dieser Insertionsstellen wurde genau charakterisiert und es wurden für jeden Locus spezifische Primer

entwickelt. Mit Hilfe dieser Locusprimer (LocR und LocL³⁷) können die einzelnen Loci nachgewiesen werden. Anhand der Produktgröße kann zusätzlich eine Aussage darüber getroffen werden, ob an diesem Locus ein IS900 eingefügt ist. Liegt das IS900 vor, ist das PCR-Produkt um die 1451 bp des IS900 länger (s. Abbildung 1).

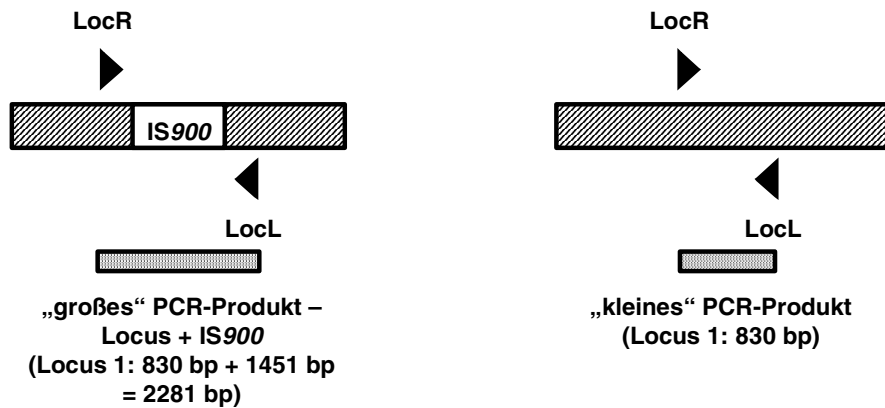


Abbildung 1: PCR zum Nachweis eines einzelnen Locus (Locus-PCR)
links: mit Insertion des IS900, rechts: ohne Insertion des IS900.

Für den spezifischen Nachweis des IS900 und nicht eines anderen DNA-Fragments ähnlicher Größe an den einzelnen Loci wurden zusätzlich die Primer IS9R und IS9L entwickelt. In der Kombination mit den Locusprimern (IS9R und LocL bzw. IS9L und LocR) kann die Insertion des IS900 an den einzelnen Loci überprüft werden (s. Abbildung 2).

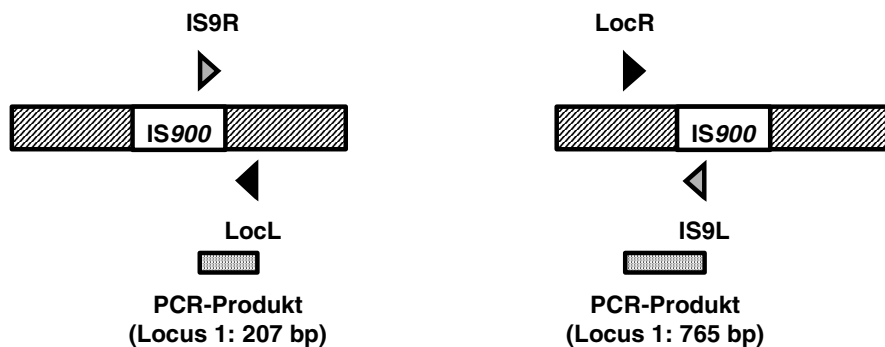


Abbildung 2: PCRs zum Nachweis des IS900
links: Nachweis des „rechten Fragments“;
rechts: Nachweis des „linken Fragments“

³⁷ Loc1R und Loc1L zum Nachweis des Locus 1, Loc2R und Loc2L zum Nachweis des Locus 2 etc.

Bull et al. (2000) führten die Untersuchung als Multiplex-PCR durch. In eigenen Vorversuchen hat sich diese als nicht geeignet erwiesen, da sich die erwarteten Banden in der Größe nur wenig unterschieden und Sekundärbanden auftraten. Um eine sichere Auswertung zu ermöglichen, wurden für jeden Locus drei einzelne PCRs durchgeführt:

- LocR-LocL zum Nachweis des Locus (Locus-PCR, s. Abbildung 1)
- LocR-IS9L und LocL-IS9R zum Nachweis des IS900 (s. Abbildung 2)

Im Folgenden wird dieses Verfahren daher als Loci-PCR bezeichnet.

Die Aufreinigung der Proben (in A. dem. oder physiologischer NaCl-Lösung suspendierte Bakterien) erfolgte mittels MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit®.

Mastermix

5 µl Reddy-Mix®

1,5 µl H₂O³⁸

0,5 µl Primer A

0,5 µl Primer B

2,5 µl DNA

PCR-Profil

Schritt-Nr.	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	94 °C	3 min
2	Denaturierung	94 °C	30 s
3	Annealing	60 °C	30 s
4	Elongation	72 °C	2,5 min
5	terminale Elongation	72 °C	5 min

Die Schritte 2-4 werden 40x wiederholt.

Agar-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,75%igen Agarosegel (0,5x TBE-Puffer) bei 100 V in 50 min aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde Ethidiumbromidlösung zugegeben, und das Gel wurde unter UV-Licht (254 nm) beurteilt und dokumentiert.

³⁸ DNase und RNase frei.

Es kamen folgende Kombinationen von Einzelergebnissen vor:

- a) Locus-PCR positiv, „großes“ PCR-Produkt, beide PCRs zum Nachweis des IS900 positiv
- b) Locus-PCR positiv, „kleines“ PCR-Produkt, beide PCRs zum Nachweis des IS900 negativ
- c) Locus-PCR negativ, beide PCRs zum Nachweis des IS900 positiv
- d) Locus-PCR negativ, eine PCR zum Nachweis des IS900 positiv, die andere negativ
- e) alle drei Einzel-PCRs negativ

Anhand dieser Ergebnisse wurden die Ausprägungen der einzelnen Loci festgelegt:

- a) Locus vorhanden, mit Insertion des IS900
- b) Locus vorhanden, keine Insertion des IS900
- c) Locus fehlt, aber beide IS900-Fragmente nachweisbar
- d) Locus fehlt, aber ein IS900-Fragment nachweisbar
- e) Locus fehlt

2.4.2. IS900 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Beim IS900 RFLP wird die DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut, und die so entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Zahl der Fragmente auf eine gut auswertbare Anzahl zu reduzieren, erfolgt eine DNA-DNA-Hybridisierung mit einer IS900-spezifischen Sonde. Diese wird mit einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Detaillierte Angaben zu den Mengen und den Zeiten sind im Anhang (Tabelle 20) dargestellt.

DNA-Isolierung („CTAB-Methode“; van Soolingen et al., 1994)

Die Mykobakterien wurden in 500 µl 1x TE-Puffer suspendiert und für 45 min bei 80 °C inaktiviert. Es folgte eine Inkubation mit Lysozym (10 mg/ml) bei 37 °C über Nacht. Nach Zugabe von Natriumdodecylsulfat und Proteinase K (12,5 mg/ml) wurde für 30 min bei 65 °C inkubiert. Die Zellwandbestandteile, denaturierte Proteine und Polysaccharide wurden mit Hilfe einer Cetyltrimethylammoniumbromid/NaCl-Lösung gefällt und abzentrifugiert. Die DNA wurde mittels eines Isoamylalkohol-/Chloroformgemischs (24:1) extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Nach Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol (70%) wurde die DNA in A. dem. über Nacht bei 37 °C resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Restriktionsverdau und Southern Blot

Der Verdau erfolgte jeweils mit den Restriktionsenzymen *BstEII* und *PstI*. Pro Ansatz wurden 2 µg DNA und 20 U Restriktionsenzym verwendet.

Reaktionsansatz:

2 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)

2 µl Enzympuffer

x µl DNA-Lösung (2 µg)

ad 20 µl A. dem.

Verdau: *Pst*I: 6 h bei 37 °C, *Bst*EII: 4,5 h bei 60 °C

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden nach Zugabe von je 2 µl Loading-dye in einem 1%igen Agarosegel (1x TBE-Puffer) bei 70 V über 22 h elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Digoxigenin (DIG)-markierter Größenmarker wurde mitgeführt.

Nach Depurinierung mit 0,25M HCl und Denaturierung mit 0,5M NaOH wurde die DNA auf eine Nylonmembran geblottet. Geblottet wurde 90 min in einem Vakuumblotter mit einem Vakuum von 5 mm Hg. Als Transferpuffer wurde 10x SSC-Puffer verwendet.

Nach Waschen der Membran in 2x SSC-Puffer wurde diese für 2½ h bei 70 °C gebacken, um die DNA zu fixieren.

Herstellung der DNA-Sonde

Die DNA-Sonde wurde durch eine PCR unter Verwendung der Primer nach Kunze et al. (1992) hergestellt (PCR-Profil s. Anhang, Punkt 2.1.). Die Markierung erfolgte durch den Einbau von DIG-markiertem dUTP während der PCR. Das entstandene 453 bp große PCR-Produkt wurde elektrophoretisch nachgewiesen und mit Hilfe eines Gelextraktionskits (QIAquick® Gel Extraction Kit) gewonnen. 20 µl dieses Extraktes wurden mit 40 ml Prähybridisierungslösung verdünnt und so als Sonde verwendet.

DNA-DNA-Hybridisierung und Visualisierung

Die DNA-DNA-Hybridisierung und die Visualisierung wurden in Hybridisierungsbeuteln und, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf einem Taumler durchgeführt. Inkubationen bei 68 °C wurden in einem Schüttelwasserbad vorgenommen.

Nach 90-minütiger Prähybridisierung der Membran bei 68 °C erfolgte die Hybridisierung über Nacht, ebenfalls bei 68 °C. Durch sechsminütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad wurde die Sonde denaturiert und anschließend schockgekühlt, um die Denaturierung zu erhalten. Die Sonde wurde mehrfach verwendet und zwischen den Anwendungen bei -20 °C gelagert. Die folgenden Waschschritte und die Visualisierung wurden mit kleinen Abweichungen gemäß der Anleitung des DIG Luminescent Detection Kit® durchgeführt (Abweichungen s. Tabelle 21 im Anhang). Es handelt sich bei diesem Kit um einen indirekten Nachweis über einen Anti-DIG-Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Nach Zugabe

des Chemilumineszenzsubstrates wird Licht emittiert, welches durch die Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden kann.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die Membran je zwei Mal 5 min mit 2x SSC (mit 0,1% SDS) bei Raumtemperatur und 15 min mit 0,1x SSC (mit 0,1% SDS) bei 68 °C gewaschen, um unspezifisch Gebundenes zu entfernen. Danach wurde die Membran erst mit Waschpuffer gewaschen, dann mit einer Blockierungslösung blockiert. Hierauf folgte eine 60-minütige Inkubation mit der Antikörperlösung, nach der wieder zwei Waschschrirte mit Waschpuffer durchgeführt wurden. Vor der Zugabe des verdünnten Chemilumineszenzsubstrates wurde die Membran für 5 min mit dem Detektionspuffer äquilibriert. Nach Abschluss der Inkubation mit dem verdünnten Chemilumineszenzsubstrat wurde die Membran in Zellophanfolie für 10 min bei 37 °C inkubiert, um die Chemilumineszenzreaktion zu starten.

Die Chemilumineszenzfilme wurden je nach Stärke des Signals 5-90 min belichtet und je eine Minute entwickelt und fixiert.

2.5. Kulturmorphologische Untersuchung der Isolate

Eine Kolonie von *M. paratuberculosis* wurde in PBS-Puffer suspendiert und eine Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} angelegt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 200 µl auf einen Herrold's Egg-Yolk-Agar verimpft. Die Bebrütung erfolgte für 16 Wochen bei 37 °C, die erste Woche in Schräglage. Die Kulturen wurden ab der vierten bis einschließlich der zwölften Woche wöchentlich und abschließend noch einmal nach 16 Wochen Bebrütungsdauer abgelesen. Anhand von Anzahl, Form und Größe der Kolonien wurden hierbei die folgenden Parameter erfasst:

a) Wachstumsgeschwindigkeit:

Erstes sichtbares Wachstum auf der höchsten noch bewachsenen Verdünnungsstufe

b) Koloniemorphologie (s. Abbildung 3)

- Ausbildung eines zentralen Knöpfchens
- Bildung einer Furche um das zentrale Knöpfchen
- Vorhandensein von Kügelchen (Sekundärkolonien) auf den Kolonien

c) Wachstumsintensität

Durchmesser der größten Kolonie (> 2mm – intensiv wachsend)

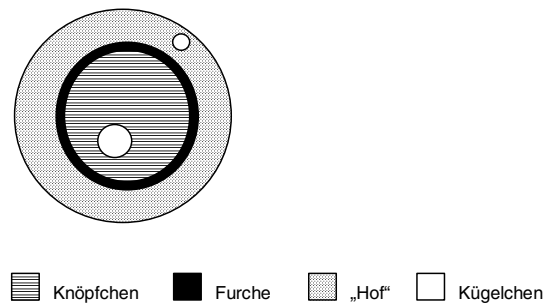


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer *M. paratuberculosis*-Kolonie

2.6. Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Statistikprogramms statgraphics® (Fa. Statpoint. Inc, USA) durchgeführt.

2.6.1. Berechnung der Assoziationen zwischen einzelnen Merkmalen

a) Zusammenhang zwischen kategoriellen Daten

Hierfür wurden der χ^2 -Test und, soweit möglich, zur Überprüfung der exakte Test nach Fisher eingesetzt. Aufgrund der relativ geringen Probenzahl bzw. der teilweise vielen unterschiedlichen Ausprägungen eines Merkmals konnten mit dem χ^2 -Test nicht immer zuverlässige Ergebnisse erzielt werden. In diesen Fällen wurde die Zahl der Ausprägungen durch Zusammenfassen einzelner Varianten verringert, um auf diese Weise ein sicheres Ergebnis im χ^2 -Test oder durch den exakten Test nach Fisher zu erhalten.

b) Zusammenhang zwischen metrischen und kategoriellen Daten

Um eine Aussage über Assoziationen zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und den anderen Merkmalen treffen zu können, wurden der Mann-Whitney-W-Test (bei zwei Faktorstufen) bzw. der Kruskal-Wallis-Test (bei mehreren Faktorstufen) eingesetzt. Beide Verfahren treffen keine Verteilungsannahme über die Daten.

War der p-Wert sowohl bei Berücksichtigung aller Faktorstufen als auch nach Reduzierung der Faktorstufen kleiner als 0,05, wurde ein Zusammenhang als statistisch signifikant gewertet. Konnte die Signifikanz nach Reduktion der Faktorstufen nicht bestätigt werden, wurde dies als Hinweis auf einen Zusammenhang, der jedoch statistisch nicht abgesichert werden konnte, bewertet (Richardson und Overbaugh, 2005).

2.6.2. Cluster-Analyse

Für die Cluster-Analyse wurden die Loci-PCR- und IS900 RFLP-Muster mit Zahlencodes³⁹ versehen. Die Clusterung erfolgte mittels Nearest Neighbour Methode. Als metrisches Maß wurde der City-block verwendet (Ramette, 2007).

2.7. Berechnung der Diskriminierungsindices

Die Diskriminierungsindices wurden nach Hunter und Gaston (1988) mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

N – Anzahl der epidemiologisch nicht verbundenen Isolate, s – die Anzahl der beschriebenen Typen, n_j – Anzahl der epidemiologisch nicht verbundenen Isolate, die zum Typ j gehören.

Da nicht zu allen Isolaten genügend Informationen vorlagen, um eine epidemiologische Verbindung nachzuweisen oder auszuschließen, wurden alle Isolate in die Berechnungen mit einbezogen.

³⁹ Loci-PCR: 0=Locus fehlt, 1=Locus fehlt, ein Fragment des IS900, 2=Locus fehlt, beide Teilstücke des IS900, 3=Locus vorhanden ohne Insertion des IS900, 4=Locus vorhanden mit Insertion des IS900; IS900 RFLP: 0=Bande fehlt, 1=Bande vorhanden.

Ergebnisse

1. Informationen zu den Isolaten

1.1. Weitergehende Informationen zu den Betrieben und Isolaten

Die gewonnenen Informationen sind in den Tabellen 22 und 23 im Anhang dargestellt. Mit Ausnahme des Isolates GB-Schaf-5 (Typl) handelt es sich um TyplI-Isolate.

1.2. Untersuchung der Organproben

1.2.1. Pathologisch-anatomische Untersuchung

Bei zwei der neun Tiere konnten deutliche, für Paratuberkulose typische makroskopische Veränderungen wie Verdickung der Darmschleimhaut und Bildung hirnwindungsartiger Falten v.a. im Bereich des Ileums sowie eine Vergrößerung der zugehörigen Mesenteriallymphknoten festgestellt werden. Bei einem Tier konnte nur der Verdacht auf paratuberkulöse Veränderungen erhoben werden.

1.2.2. Pathologisch-histologische Untersuchung

Im histologischen Schnitt von Darm und Mesenteriallymphknoten zeigte sich bei zwei Tieren das für die Paratuberkulose typische Bild einer granulomatösen Entzündung mit Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen vom Langhanstyp. In einem Fall waren zudem säurefeste Stäbchen nachweisbar. Bei einem weiteren Tier konnte der Verdacht auf eine granulomatöse Entzündung erhoben werden, allerdings ohne den Nachweis säurefester Stäbchen.

1.2.3. Mikroskopische Untersuchung

Säurefeste Stäbchen konnten in Ziehl-Neelsen-gefärbten Präparaten von Blinddarminhalt und Abklatschpräparaten von Darmschleimhaut bzw. Mesenteriallymphknoten bei einem Tier nachgewiesen werden. Bei einem weiteren Tier gelang der Nachweis säurefester Stäbchen nur im Blinddarminhalt, bei einem dritten war der Nachweis säurefester Stäbchen fraglich.

1.2.4. Kulturelle Untersuchung

Die Isolierung von *M. paratuberculosis* gelang bei zwei Tieren sowohl aus dem Blinddarminhalt als auch aus Organmaterial. In drei weiteren Fällen konnte *M. paratuberculosis* nur aus Organmaterial, in einem Fall nur aus Blinddarminhalt angezüchtet werden. Am häufigsten (in fünf von neun Fällen – 55%) gelang der kulturelle Nachweis aus der Ileocaecalklappe.

Angaben zu den einzelnen Herkunftstieren sowie eine detaillierte Darstellung der Einzelergebnisse der Organproben finden sich in den Tabellen 24 und 25 im Anhang.

Sechs aus diesen Proben isolierte *M. paratuberculosis*-Isolate wurden in die Untersuchungen zur Stammdifferenzierung miteinbezogen.

2. Molekulargenetische Charakterisierung

2.1. Loci-PCR nach Bull et al. (2000)

Die einzelnen Insertionsstellen für das IS900, im Folgenden Loci, kamen sowohl in verschiedenen Varianten als auch in unterschiedlicher Variationsbreite vor. Die Loci 2 und 3 wiesen eine besonders hohe Variabilität auf, wohingegen die Loci 4, 13 und 14 bei allen untersuchten Isolaten gleich waren (s. Tabelle 10). Locus 5 wurde aufgrund nicht eindeutiger Ergebnisse aus der Untersuchung ausgeschlossen.

Tabelle 10: Häufigkeit der Ausprägungen der einzelnen Loci

Ausprägung	A	B	C	D	E	F
Locus 1	86 (93)					6 (7)
Locus 2	6 (7)	1 (1)		53 (58)		32 (35)
Locus 3	21 (23)	1 (1)	25 (27)	23 (25)	11 (12)	11 (12)
Locus 4	92 (100)					
Locus 6	76 (83)					16 (17)
Locus 7					7 (8)	85 (92)
Locus 8	91 (99)					1 (1)
Locus 9	88 (96)					4 (4)
Locus 10	32 (35)			45 (49)		15 (16)
Locus 11	86 (94)	1 (1)				5 (5)
Locus 12	58 (63)			4 (4)		30 (33)
Locus 13	92 (100)					
Locus 14			92 (100)			

A – Locus nachweisbar mit Insertion des IS900, B – Locus nachweisbar, keine Insertion des IS900, C – Locus fehlt, D – Locus fehlt, aber IS9R-Fragment, E – Locus fehlt, IS9L-Fragment, F – Locus fehlt, beide Fragmente

Angegeben ist die Zahl der *M. paratuberculosis*-Isolate, in Klammern der prozentuale Anteil.

Anhand der Ausprägung der Loci konnte für jedes Isolat ein Loci-PCR-Muster (im Folgenden Muster) erstellt werden. Insgesamt wurden 52 verschiedene Muster nachgewiesen, von denen der größte Teil nur einmal vorkam. Isolate mit gleichen Mustern konnten in drei größere (n=12 bzw. n=7 Isolate) und mehrere kleine (n=2-4 Isolate) zusammengefasst werden. 39 Isolate wiesen ein nur einmal vorkommendes Muster auf (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: nachgewiesene Loci-PCR-Muster

Loci-PCR-Muster-Nr.	Ausprägungen der Loci 1,2,3,6,7,8,9,10,11,12*	Isolate (n)	%
1	ADCAFAADAF	12	13
2	ADEAFAAAAA	7	8
3	AFAAFAAAAA	7	8
4	ADDAFAADAF	4	4
5	AFDAEAADAA	4	4
6	ADAAFAAAAA	3	3
7	ADCAFAADAA	3	3
8	AFAAFAAAAF	3	3
9	ADDAFAAFAA	2	2
10	ADEFFAADAA	2	2
11	ADFAFAAAAA	2	2
12	AFDAFAADAF	2	2
13	AFFAFAAAAA	2	2
14	AAFFFAAFAA	1	1
15	AAFFFAAFFA	1	1
16	AACFFFAAFAA	1	1
17	AAFFFAAFAA	1	1
18	ADAAFAADAA	1	1
19	ADCAFAAAAA	1	1
20	ADCAFAADAD	1	1
21	ADCAFAAFAA	1	1
22	ADCFFAADAA	1	1
23	ADCFFAADAF	1	1
24	ADDAEAFAAA	1	1
25	ADDAFAAAAA	1	1
26	ADDAFAADAA	1	1
27	ADDAFAADFD	1	1
28	ADDFFAADFA	1	1
29	ADEAFAAFAA	1	1
30	ADEAFAFFAA	1	1
31	ADFAFAAFAA	1	1
32	ADFAFAFAAA	1	1

Loci-PCR-Muster-Nr.	Ausprägungen der Loci 1,2,3,6,7,8,9,10,11,12*	Isolate (n)	%
33	AFAAFAADAA	1	1
34	AFAFFAAAAA	1	1
35	AFAFFAADAA	1	1
36	AFBFFAAAAA	1	1
37	AFCFAAADF	1	1
38	AFCFFAADF	1	1
39	AFDAEAADF	1	1
40	AFDAFAADAA	1	1
41	AFDAFAADAD	1	1
42	AFDAFAAFAD	1	1
43	AFDAFAFAFA	1	1
44	AFFAFAAAAF	1	1
45	AFFAFAADF	1	1
46	AFFAFAAFAA	1	1
47	FAAFFAAAAA	1	1
48	FAFFFAAFFA	1	1
49	FBCFEFFFBF	1	1
50	FDAAFAADAA	1	1
51	FDCAFAADF	1	1
52	FDDAFAADF	1	1
gesamt		92	100

A – Locus nachweisbar mit Insertion des IS900, B – Locus nachweisbar, keine Insertion des IS900, C – Locus fehlt, D – Locus fehlt, aber IS9R-Fragment, E – Locus fehlt, IS9L-Fragment, F – Locus fehlt, beide Fragmente;

* Die Loci 4, 13 und 14 werden hier nicht mit aufgeführt, da sie bei allen *M. paratuberculosis*-Isolaten identisch waren.

Mittels Cluster-Analyse konnten nah verwandte Isolate zu größeren Gruppen zusammengefasst werden (s. Abbildung 4). Deutlich wird hieraus die klare Abgrenzung des TypII-Isolats (Gruppe B) sowie die enge Verwandtschaft der TypII-Isolate (Gruppe A). Des Weiteren sind eine Häufung von Thüringer Isolaten sowie die relativ stark abweichenden Muster einiger Schaf-Isolate und des Typen-Stammes (ATCC19698) festzustellen.

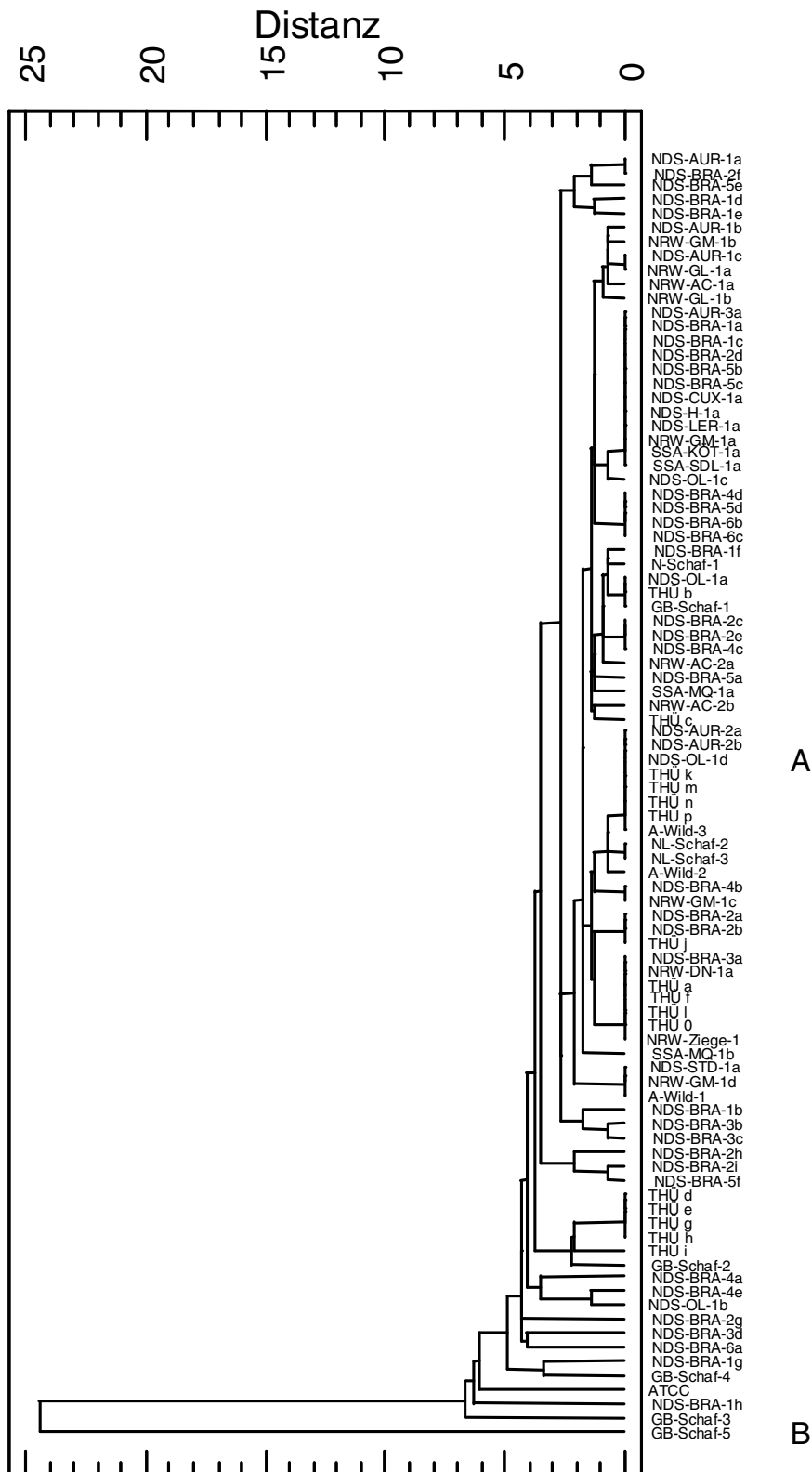


Abbildung 4: Clusterbildung der Loci-PCR-Muster (Nearest Neighbour Methode, City-block)

Statistisch signifikante Zusammenhänge sowie statistisch nicht abgesicherte Hinweise auf Zusammenhänge zwischen den Ausprägungen einzelner Loci konnten festgestellt werden. In allen Fällen lagen die Loci in ihrer jeweils häufigsten Ausprägung vor. Eine genaue Darstellung findet sich in den Tabellen 26 und 27 im Anhang.

2.2. IS900 RFLP

Für ein Isolat, NRW-AC-2b, konnte der IS900 RFLP aufgrund mangelnder DNA nicht durchgeführt werden. Für die beiden verwendeten Restriktionsendonucleasen *BstEII* und *PstI* konnten jeweils neun unterschiedliche RFLP-Typen nachgewiesen werden (s. Abbildung 5-8 und Tabellen 12 und 13). Neun dieser insgesamt 18 RFLP-Typen wurden bislang noch nicht beschrieben. Die Bezeichnung der RFLP-Typen wurde für *BstEII* von Pavlik et al. (1999) und für *PstI* von Möbius et al. (2008) übernommen. Die bislang noch nicht beschriebenen RFLP-Typen wurden in Anlehnung an die Literatur mit Cneux (*BstEII*) bzw. neux (*PstI*) bezeichnet. Die folgenden Tabellen 12 und 13 geben die Häufigkeitsverteilung der RFLP-Typen der einzelnen Enzyme wieder.

Tabelle 12: IS900 RFLP-Typen *BstEII*

RFLP-Typ	Isolate (n)	%
C1	77	86
C5	1	1
C10	1	1
C17	2	2
C22	1	1
Cneu1	5	5
Cneu2	2	2
Cneu3	1	1
S2	1	1
gesamt	91	100

Tabelle 13: IS900 RFLP-Typen *PstI*

RFLP-Typ	Isolate (n)	%
1	78	87
7	4	4
8	2	2
neu1	1	1
neu2	2	2
neu3	1	1
neu4	1	1
neu5	1	1
neu6	1	1
gesamt	91	100

Ergebnisse

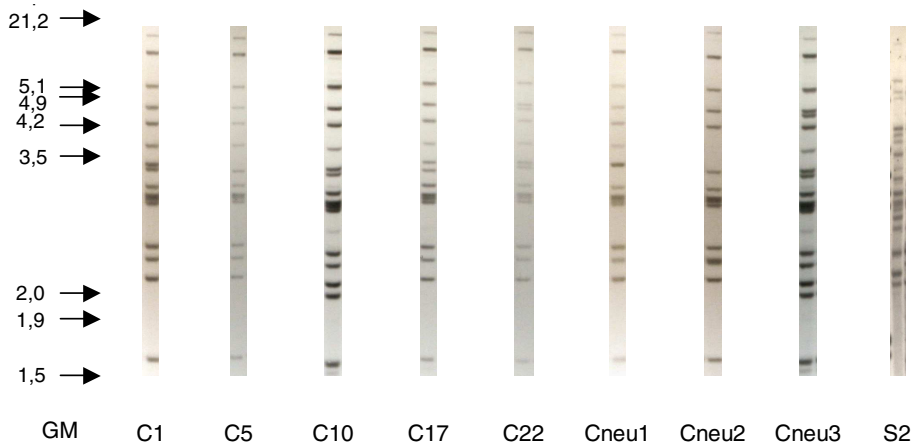


Abbildung 5: IS900 RFLP-Muster – Verdau mit *Bst*EII

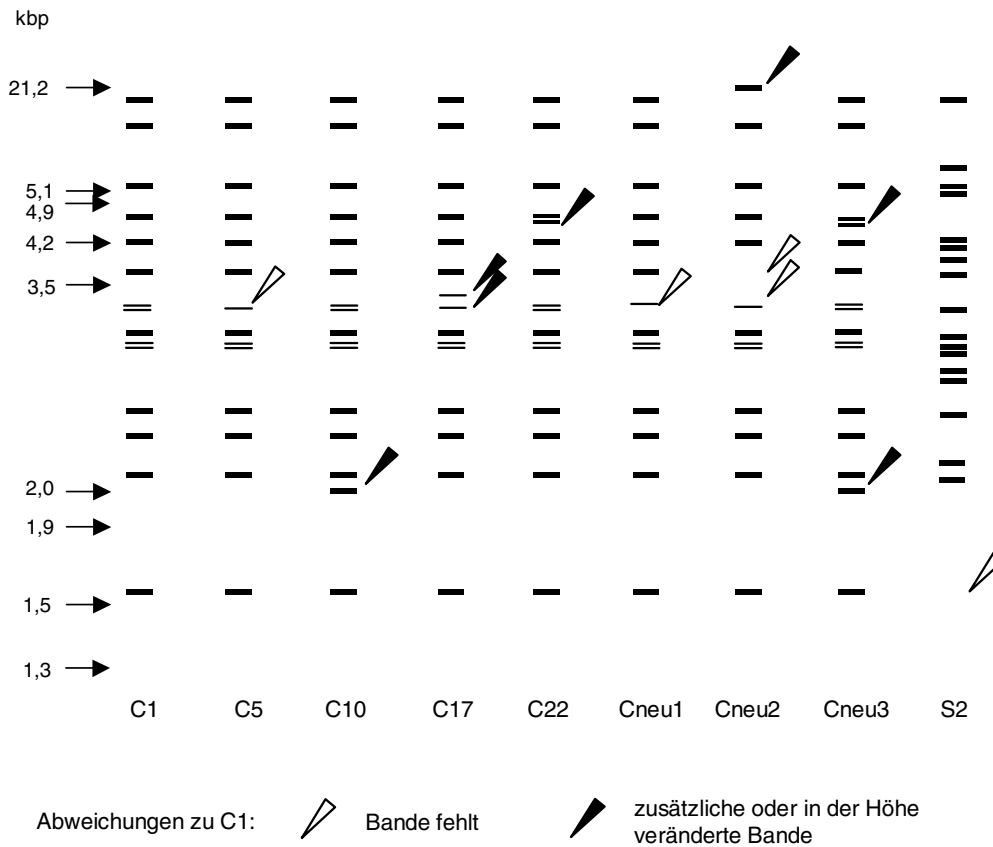


Abbildung 6: IS900 RFLP-Muster, Verdau mit *Bst*EII – schematisch⁴⁰

⁴⁰ Zur besseren Übersicht wird bei S2 nur das zur Unterscheidung von C- und S-Typen herangezogene 1,6 kbp-Fragment als abweichend von C1 gekennzeichnet.

Ergebnisse

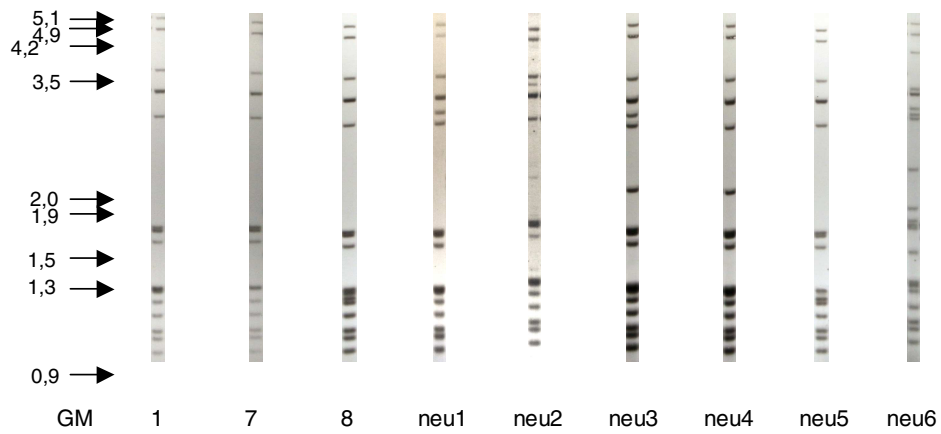


Abbildung 7: IS900 RFLP-Muster – Verdau mit *Pst*I

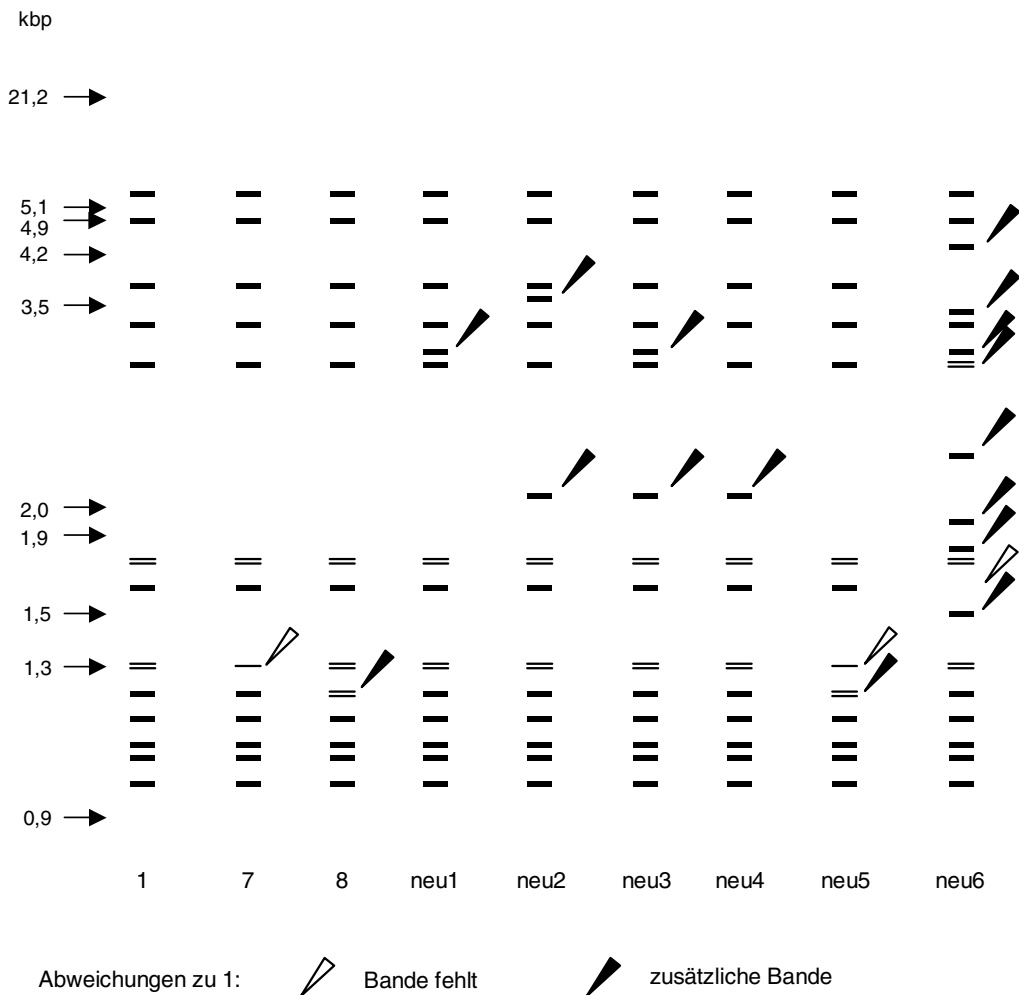


Abbildung 8: IS900 RFLP-Muster, Verdau mit *Pst*I – schematisch

Für beide Restriktionsenzyme zusammen ergaben sich insgesamt elf *BstEII/PstI*-RFLP-Typen (s. Tabelle 14), von denen der Typ C1/1 bei weitem am häufigsten vorkam (81% der Isolate).

Tabelle 14: *BstEII/PstI*-IS900 RFLP-Typen

RFLP-Typ	Isolate (n)	%
C1/1	73	81
C1/7	2	2
C1/neu2	2	2
C5/neu5	1	1
C10/neu4	1	1
C17/8	2	2
C22/neu1	1	1
Cneu1/1	5	6
Cneu2/7	2	2
Cneu3/neu3	1	1
S2/neu6	1	1
gesamt	91	100

Bei beiden Restriktionsenzymen ließen sich zwei deutlich voneinander abgegrenzte Typen unterscheiden: bei *BstEII* die C-Typen und der S-Typ⁴¹, bei *PstI* die Typen 1, 7, 8, neu1-neu5 gegenüber neu6. Die C-Typen bzw. die Typen 1, 7, 8 und neu1-neu5 waren hingegen untereinander recht nah verwandt (s. Abbildung 9).

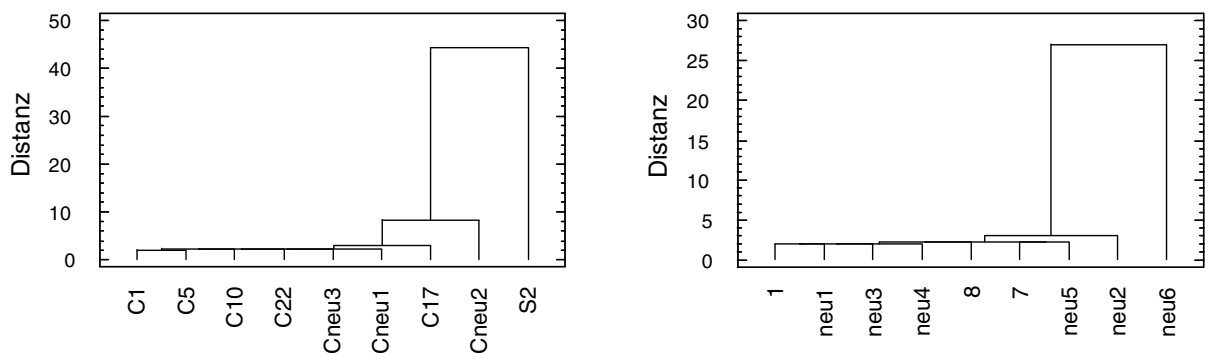


Abbildung 9: Clusterbildung der IS900 RFLP-Muster
links: Verdau mit *BstEII*; rechts Verdau mit *PstI*

⁴¹ Zur Unterscheidung von C- und S-Typen wird das 1,6 kbp-Fragment herangezogen, das bei S-Typen fehlt.

Zwischen den RFLP-Typen der beiden Restriktionsenzyme konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Isolate mit einem anderen *BstEII*-RFLP-Typ als C1 wiesen zumeist auch einen anderen *PstI*-RFLP-Typ als 1 auf ($p=0,0$).

2.3. Kombination von Loci-PCR und IS900 RFLP

Unter Verwendung beider Verfahren konnten 60 Genotypen differenziert werden. Am häufigsten trat der RFLP-Typ C1/1 in Kombination mit dem Loci-PCR-Muster 1 auf. Zwischen der Ausprägung einzelner Loci und dem RFLP-Typ konnten bei einzelnen Loci statistisch signifikante Zusammenhänge bzw. statistisch nicht abgesicherte Hinweise auf Zusammenhänge nachgewiesen werden. In allen Fällen ließ sich feststellen, dass, wenn ein Locus in einer von der Mehrheit der Isolate abweichenden Ausprägung vorlag, dieses Isolat mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einen von C1/1 abweichenden RFLP-Typ aufwies. Eine detaillierte Darstellung findet sich in den Tabellen 28 und 29 im Anhang. Für den *PstI*-RFLP-Typ konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem gesamten Loci-PCR-Muster nachgewiesen werden ($p=0,0$), für den *BstEII*-RFLP-Typ konnte dieser Zusammenhang statistisch nicht abgesichert werden ($p=0,0/0,3875$)⁴².

Tabelle 15 stellt die Verbreitung der einzelnen Genotypen in den unterschiedlichen Herkunftsregionen dar. Von C1/1 abweichende RFLP-Typen sowie mehrere Isolate mit gleichem Genotyp in einer Herde sind **hervorgehoben** dargestellt.

Tabelle 15: Verteilung der Genotypen in den Herkunftsregionen und -herden

(Bundes-)Land	Betrieb/Tierart	Anzahl Isolate (n)	Loci-PCR-Muster	RFLP-Typ*
NDS	AUR-1	1	10	C1/1
		1	12	C1/1
		1	37	C1/1
	AUR-2	1	2	C1/1
		1	2	Cneu1/1
	AUR-3	1	1	C1/1
	BRA-1	2	1	C1/1
		1	21	C1/1
		1	23	C1/1
		1	35	C1/1
		1	38	C1/1
		1	43	C1/1
		1	30	Cneu2/7

⁴² Ergebnis des χ^2 -Test mit allen Faktorstufen/Ergebnis des χ^2 -Test mit reduzierten Faktorstufen.

Ergebnisse

(Bundes-)Land	Betrieb/Tierart	Anzahl Isolate (n)	Loci-PCR-Muster	RFLP-Typ*
	BRA-2	2	6	C1/1
		2	7	C1/1
		1	1	C1/1
		1	10	C1/1
		1	14	C1/1
		1	15	C1/1
		1	17	C1/1
	BRA-3	1	3	C1/1
		1	28	C1/1
		1	34	C1/1
		1	36	C1/1
	BRA-4	1	4	C1/1
		1	7	C1/1
		1	13	C1/1
		1	50	C1/1
		1	52	C1/1
	BRA-5	2	1	C1/1
		1	4	C1/1
		1	16	C1/1
		1	22	C1/1
		1	40	C1/1
	BRA-6	2	4	C1/1
		1	27	C1/1
	CUX-1	1	1	C1/1
	H-1	1	1	C1/7
	LER-1	1	1	C1/1
	OL-1	1	20	C1/1
		1	25	C1/1
		1	29	C1/1
		1	51	C1/1
	STD-1	1	8	Cneu1/1
NRW	AC-1	1	41	C1/1
	AC-2	1	26	C1/neu2
		1	18	C1/1

Ergebnisse

(Bundes-)Land	Betrieb/Tierart	Anzahl Isolate (n)	Loci-PCR-Muster	RFLP-Typ*
	DN-1	1	3	C1/1
	GL-1	1	12	C1/1
		1	42	C1/1
	GM-1	1	1	C1/neu2
		1	8	C1/1
		1	13	C1/1
		1	45	C1/1
	Ziege	1	3	Cneu1/1
SSA	KÖT-1	1	1	Cneu1/1
	MQ-1	1	44	C10/neu4
		1	46	Cneu3/neu3
	SDL-1	1	1	Cneu1/1
THÜ		4	2	C1/1
		4	3	C1/1
		4	5	C1/1
		1	6	C1/1
		1	9	C1/1
		1	33	C1/1
		1	39	C1/1
A	Wildwiederkäuer	1	2	C1/1
		1	8	C1/1
		1	19	C1/1
GB	Schaf	1	47	C1/1
		1	32	C5/neu5
		1	9	C17/8
		1	24	C17/8
		1	49	S2/neu6
N	Schaf	1	31	C1/7
NL	Schaf	1	11	C22/neu1
		1	11	C1/1
ATCC 19698		1	48	Cneu2/7

* *BstEII/PstI*

3. Kulturmorphologische Untersuchung

3.1. Wachstum von *M. paratuberculosis* in Reinkultur auf Herrold's Egg-Yolk-Agar

Erste Kolonien waren v.a. in den niedrigeren Verdünnungsstufen nach drei bis vier Wochen sichtbar. Große Kolonien wuchsen etwa 0,5 mm pro Woche. Das Aussehen der Kolonien variierte in Abhängigkeit von der Größe der Kolonie und vom Standort auf dem Nährboden. Am oberen Rand des Nährbodens waren die Kolonien in der Regel kleiner, bildeten eher morphologische Merkmale aus und waren kräftiger gefärbt als am unteren Rand des Nährbodens bzw. in der Nähe des Flüssigkeitsspiegels der Impfflüssigkeit. Die Kolonien waren erst durchscheinend und nahmen im Laufe des Wachstums eine weißlich-gelbliche Farbe an. Sie wiesen eine runde Form auf und waren zunächst leicht erhaben. Mit zunehmender Größe bildete sich bei den meisten Isolaten ein zentrales Knöpfchen aus, das teilweise durch eine Furche vom übrigen Teil („Hof“) der Kolonie abgegrenzt wurde. Auf der gesamten Kolonie konnten kleine kugelförmige Sekundärkolonien (Kügelchen) auftreten (s. Abbildung 3).

3.2. Erfasste Merkmale der kulturmorphologischen Untersuchung

a) Wachstumsgeschwindigkeit

Sie variierte zwischen vier und 16 Wochen. Der größte Teil der Isolate wuchs nach einer Bebrütung von sechs bis zehn Wochen (s. Abbildung 10), im Schnitt nach 8,8 Wochen. Sechs Isolate zeigten während der 16-wöchigen Bebrütung überhaupt kein Wachstum.

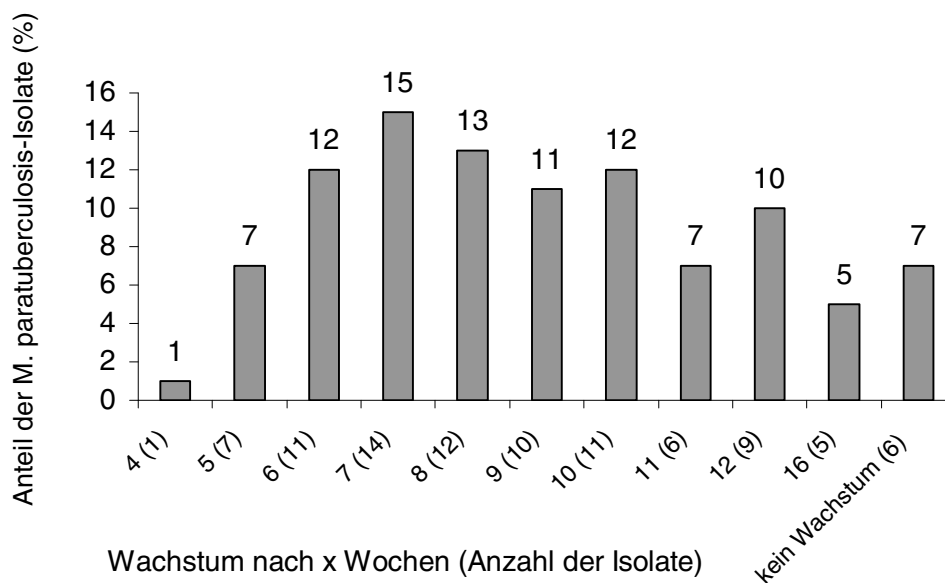


Abbildung 10: Darstellung der Verteilung der Wachstumsgeschwindigkeiten der *M. paratuberculosis*-Isolate (n=86)

b) Koloniemorphologie

Der größte Teil (83%) der Isolate bildete ein Knöpfchen aus, das bei 35% der Isolate von einer Furche umgeben war. Kügelchen traten bei knapp der Hälfte (44%) der Isolate auf (s. Tabellen 16-18). Sechs Isolate zeigten kein Wachstum, demzufolge konnten keine koloniemorphologischen Merkmale erfasst werden.

Tabelle 16: Ausbildung des Knöpfchens

Knöpfchen	Isolate (n)	%
ja	71	83
nein	15	17
gesamt	86	100

Tabelle 17: Ausbildung der Furche

Furche	Isolate (n)	%
ja	30	35
nein	56	65
gesamt	86	100

Tabelle 18: Ausbildung von Kügelchen

Kügelchen	Isolate (n)	%
ja	38	44
nein	48	56
gesamt	86	100

Anhand der drei einzelnen koloniemorphologischen Merkmale konnten die Isolate in sechs Gruppen eingeteilt werden. Der größte Teil der Isolate (etwa 27%) bildete nur ein Knöpfchen aus (s. Abbildung 11).

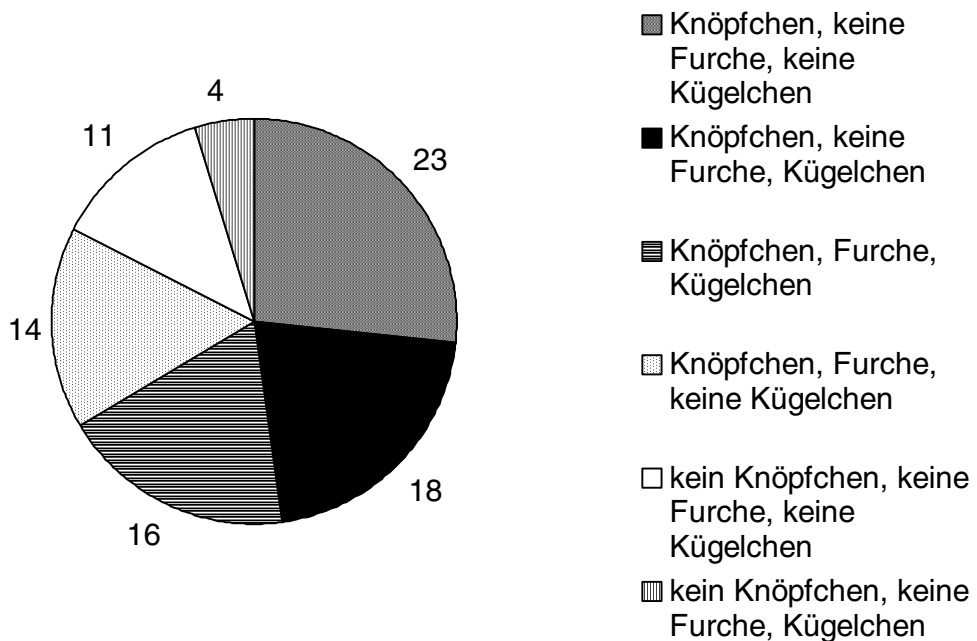


Abbildung 11: Darstellung der Verteilung der Gruppen nach Koloniemorphologie der *M. paratuberculosis*-Isolate (n=86)

c) Wachstumsintensität

68 (79%) Isolate zeigten ein intensives, 18 (21%) ein schwaches Wachstum.

3.3. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Merkmalen der kulturellen Untersuchung

Die Ausbildung einer Furche war streng an die Ausbildung eines Knöpfchens gebunden ($p=0,0009$). Die Wachstumsintensität nahm einen statistisch nachweisbaren Einfluss auf das Auftreten von Knöpfchen und Furche ($p=0,0$ bzw. $0,0042$). Intensiv wachsende Isolate bildeten zum größten Teil ein Knöpfchen aus, eine Furche um das Knöpfchen trat allerdings eher bei den schwach wachsenden Isolaten auf. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Kügelchen und den übrigen morphologischen Merkmalen oder der Wachstumsintensität konnte nicht nachgewiesen werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit hatte ebenfalls keinen nachweisbaren Einfluss auf die Ausprägung morphologischer Merkmale oder die Wachstumsintensität.

4. Zusammenhänge zwischen den genotypischen und phänotypischen Eigenschaften

4.1. Kulturmorphologie – Loci-PCR

Zusammenhänge waren zwischen kulturellen Merkmalen und den Loci 2 bzw. 6 nachweisbar. Bei Isolaten mit einem intensiven Wachstum fehlte Locus 2 zumeist, das IS9R-Fragment war jedoch nachweisbar ($p=0,007$). Die Ausprägung des Locus 6 war assoziiert mit dem Auftreten von Knöpfchen bzw. Furche und der Wachstumsintensität. Bei intensiv wachsenden Isolaten, die ein Knöpfchen, aber keine Furche ausbildeten, lag der Locus 6 gefüllt vor ($p=0,008$ (intensives Wachstum); $p=0,0021$ (Knöpfchen); $p=0,0016$ (Furche)).

4.2. Kulturmorphologie – IS900 RFLP

Zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und dem *Pst*I-RFLP-Typ lag tendenziell ein Zusammenhang vor, der jedoch statistisch nicht abgesichert werden konnte (p -Wert= $0,049979/0,845901$ ⁴³). So zeigten die beiden Isolate vom *Pst*I-RFLP-Typ neu2 ein sehr langsames Wachstum (12-16 Wochen).

⁴³ S. Fußnote 42.

5. Zusammenhänge zwischen der Herkunft der Isolate und den Ausprägungen unterschiedlicher Merkmale

5.1. Loci-PCR

Sowohl regionale als auch tierartliche Herkunft standen in einem statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Ausprägung einzelner Loci oder es konnten statistisch nicht abgesicherte Hinweise hierauf festgestellt werden. Insgesamt lagen die Loci bei Rinderisolaten aus Niedersachsen in ihrer häufigsten Ausprägung vor. Für Einzelheiten sei auf die Tabellen 30-33 im Anhang verwiesen. Bezüglich des gesamten Loci-PCR-Musters konnte mit der regionalen Herkunft ein tendenzieller Zusammenhang nachgewiesen werden, der statistisch jedoch nicht abgesichert werden konnte ($p=0,0/0,0984^{44}$)

5.2. IS900 RFLP

In Niedersachsen trat überwiegend der RFLP-Typ C1/1 auf, wohingegen die anderen RFLP-Typen v.a. bei Isolaten aus anderen (Bundes-)Ländern nachgewiesen wurden. Der Zusammenhang ist statistisch signifikant ($p=0,0$). Auch die tierartliche Herkunft hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf den RFLP-Typ ($p=0,0001$). V.a. die Schafisolate wiesen einen anderen RFLP-Typ als C1/1 auf.

5.3. Kulturmorphologische Untersuchung

Zwischen dem Auftreten von Kügelchen und der regionalen Herkunft konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden – Isolate aus Niedersachsen bildeten eher Kügelchen aus als Isolate aus anderen Regionen ($p=0,0055$). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Furche und der regionalen Herkunft konnte statistisch nicht abgesichert werden ($p=0,0087/0,0747^{45}$).

Für alle nicht aufgeführten Beziehungen zwischen einzelnen Merkmalen konnten statistisch keine Zusammenhänge nachgewiesen werden.

⁴⁴ S. Fußnote 42.

⁴⁵ S. Fußnote 42.

6. Diskriminierungsindices

Tabelle 19: Diskriminierungsindices der einzelnen Verfahren bzw. Kombination von Verfahren

Differenzierungsverfahren	Diskriminierungsindex
Loci-PCR	0,96
IS900 RFLP <i>Bst</i> EII	0,28
IS900 RFLP <i>Pst</i> I	0,26
IS900 RFLP gesamt	0,36
IS900 RFLP + Loci-PCR	0,98

Die gesamten Differenzierungsergebnisse der einzelnen Isolate sind in Tabelle 35 im Anhang dargestellt.

Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Eignung der Loci-PCR nach Bull et al. (2000) zur Stammdifferenzierung von *M. paratuberculosis*. Als Vergleichsverfahren wurde der IS900 RFLP, das derzeitige Standardverfahren, verwendet. Um die untersuchten *M. paratuberculosis*-Isolate zu charakterisieren und epidemiologische Zusammenhänge aufzudecken, wurden weitergehende Informationen zu den einzelnen Isolaten wie Angaben zu Pathologie und Klinik, zum Herkunftsbestand u.ä. erfasst. Hierbei konnten auch Erkenntnisse zum Nachweis von *M. paratuberculosis* in Organproben gewonnen werden. Eine kulturmorphologische Differenzierung erfolgte zusätzlich, um Auswirkungen der festgestellten genotypischen Eigenschaften auf den Phänotyp der *M. paratuberculosis*-Isolate zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit erhob nicht den Anspruch einer objektiven epidemiologischen Studie mit gezielten Stichprobenplänen. Es wurde jedoch versucht, ein möglichst breites Spektrum an *M. paratuberculosis*-Isolaten unterschiedlicher regionaler bzw. tierartlicher Herkunft zu untersuchen. Der überwiegende Teil der untersuchten *M. paratuberculosis*-Isolate stammte aus Niedersachsen, so dass sich ein Einblick in die molekulare Diversität von *M. paratuberculosis* und die Verbreitung einzelner Genotypen in diesem Bundesland ergab.

Untersuchung der Organproben

Im Rahmen des niedersächsischen Paratuberkulose-Bekämpfungsverfahrens werden alle Tiere eines Bestandes mit einem Alter von mindestens zwei Jahren sowohl serologisch als auch kulturell auf Paratuberkulose untersucht und bei einem positiven Befund zeitnah aus dem Bestand entfernt. Es wurde daher davon ausgegangen, dass sich die hier untersuchten Tiere in unterschiedlichen Infektionsstadien befanden.

Der häufigste Nachweis von *M. paratuberculosis* erfolgte über die kulturelle Untersuchung von Organmaterial. Diese gilt aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität als Goldstandard für den *M. paratuberculosis*-Nachweis in Organmaterial (Martinson et al., 2008). Als ideales Probenmaterial werden in der Literatur sowohl die Ileocaecalklappe (Corpa et al., 2000) als auch der Ileocaecallymphknoten (Huda und Jensen, 2003) angegeben. In den eigenen Untersuchungen erwies sich die Ileocaecalklappe als am besten geeignet, da hier die höchste Nachweisrate (55%) vorlag.

Die hohe Sensitivität des histologischen Nachweises von typischen paratuberkulösen Veränderungen wird eingeschränkt durch das multifokale Vorliegen kleiner granulomatöser Veränderungen sowie die Tatsache, dass nur sehr geringe Mengen (10 mg im Vergleich zu 2-3 g bei der kulturellen Untersuchung) untersucht werden (Martinson et al., 2008). Für eine siche-

re Diagnostik wird daher die Untersuchung jeweils mehrerer Einzelproben aus unterschiedlichen Darmabschnitten bzw. Lymphknoten empfohlen, gerade bei klinisch inapparenten Infektionen (Hietala, 1992; McDonald et al., 1999). Bei den eigenen Untersuchungen konnten nur bei den Tieren mit makroskopisch sichtbaren Veränderungen auch histologische Veränderungen nachgewiesen werden. Der Grund hierfür kann eine zu geringe Anzahl an Einzelproben sein.

Der Nachweis säurefester Stäbchen sowohl im histologischen Schnitt als auch im Abklatschpräparat von Organen und bei der mikroskopischen Untersuchung von Blinddarminhalt gelingt nur bei einer hohen Bakteriendichte bzw. in fortgeschrittenen Erkrankungsfällen (Hietala, 1992). Dies konnte bei den eigenen Untersuchungen bestätigt werden, da der Nachweis im Abklatschpräparat bzw. histologisch nur bei Tier Nr. 8 gelang, welches massive makroskopische und histologische Veränderungen sowie eine ausgeprägte klinische Symptomatik aufwies.

Bei zwei Tieren konnte, trotz eines positiven Befundes bei der serologischen bzw. kulturellen Untersuchung, *M. paratuberculosis* nicht im Organmaterial nachgewiesen werden. Da *M. paratuberculosis* im infizierten Gewebe nicht homogen verteilt ist, kann das entnommene Material keine oder für den Nachweis zu wenige Erreger enthalten. Dies gilt insbesondere in frühen Infektionsstadien (Martinson et al., 2008). Passagere Infektionen sind v.a. bei einer hohen Kontamination der Umwelt möglich (Johnson-Ifearegulu et al., 2000; Sweeney et al., 1992a). Ein Tier mit nur positivem Kotbefund stammte aus einem Sanierungsbestand mit einer vermutlich hohen Keimbelastung, so dass in diesem Falle eine transiente Infektion denkbar ist.

Obwohl in der Literatur Hinweise auf eine nur begrenzte Sensitivität und Spezifität der serologischen Diagnostik zu finden sind (Köhler et al., 2008), wird der Antikörpernachweis als Anzeichen für eine Auseinandersetzung mit dem Erreger gewertet. Bei dem Tier mit dem positiven serologischen Befund kann daher auch erregerefreies Untersuchungsmaterial Ursache für den fehlenden Nachweis von *M. paratuberculosis* sein.

Molekulargenetische Differenzierung

Bei der Loci-PCR nach Bull et al. (2000) ermöglichen die unterschiedlichen Ausprägungen der untersuchten Insertionsstellen des IS900 (Loci) und die sich daraus für die einzelnen Isolate ergebenden Loci-PCR-Muster eine Differenzierung von *M. paratuberculosis*. Die einzelnen Loci kamen in verschiedenen Ausprägungen vor: Locus nachweisbar, mit oder ohne Insertion des IS900; Locus nicht nachweisbar. Weitere Variationen waren: Locus nicht, aber ein oder beide IS900-Fragmente nachweisbar. Eine mögliche Ursache hierfür kann ein genetischer Austausch zwischen zwei Loci sein (Bull et al., 2000). So liegen beispielsweise beim Loci-PCR-Muster (Muster) 1 die Loci 7 und 12 in dieser Variante (Locus nicht, beide

IS900-Fragmente jedoch nachweisbar) vor. Ein Austausch zwischen diesen Loci ist somit möglich. Liegt eine ungerade Anzahl von Loci in dieser Form vor, z.B. bei Muster 2, ist ein Crossover mit einem weiteren, hier nicht untersuchten Locus⁴⁶ denkbar. Ein Austausch zwischen verschiedenen Insertionsstellen ist auch beim *M. tuberculosis*-Komplex bezüglich des IS6110 beschrieben (Fleischmann et al., 2002). Als Ursache für den Nachweis nur eines IS900-Fragments bei fehlendem Locusnachweis kommen neben genetischen Rearrangierungen auch Mutationen im Bereich der Primerbindungsstellen in Frage. Eine genaue Abklärung kann durch weitere Untersuchungen (Sequenzierung der PCR-Produkte, Verwendung anderer Primerkombinationen⁴⁷ oder Amplifizierung größerer DNA-Abschnitte im Bereich der Loci) erfolgen (Bull et al., 2000).

Wie alle PCR-basierten Differenzierungsverfahren ist die Loci-PCR nach Bull et al. (2000) grundsätzlich schnell und ohne großen Aufwand durchführbar. Dies gilt v.a. im Vergleich mit sowohl technisch als auch zeitlich intensiven Verfahren wie dem IS900 RFLP oder der PFGE. Zudem werden keine großen Mengen an DNA benötigt, die mit einfachen Verfahren aufgereinigt werden können. Die Untersuchung aller 14 Loci mit jeweils drei Einzel-PCRs ist jedoch aufwändig, so dass hier kein Vorteil gegenüber anderen PCR-basierten Verfahren wie der VNTR/MIRU- bzw. MLSSR-Typisierung vorliegt. Angaben zur Reproduzierbarkeit bzw. zur Stabilität wurden in der bis dato veröffentlichten Literatur zu diesem Verfahren nicht gemacht (Bull et al., 2000; Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen weisen jedoch auf eine nur eingeschränkte Stabilität und Reproduzierbarkeit der Methode hin. Zum einen wurden bei der Untersuchung mehrerer Passagen des gleichen Isolates jeweils eigene Muster festgestellt. Zum anderen konnten bei der Untersuchung mehrerer Isolate aus einem Tier stets unterschiedliche Muster nachgewiesen werden. Im Allgemeinen werden neben polyklonalen Infektionen (Pfaller et al., 2007; Whittington et al., 2000) und passagierten Keimen (Shitaye et al., 2008) auch Mutationen im Verlauf der Infektion (Cousins et al., 2000) als Erklärung hierfür herangezogen. Letzteres steht im Widerspruch zu der Tatsache, dass die Integrationsstellen des IS900 in hochkonservativen Genombereichen vorliegen (Bull et al., 2000; Green et al., 1989). Zusätzlich ergaben sich im Rahmen von Wiederholungsuntersuchungen gerade bei hochvariablen Loci wie dem Locus 3 Hinweise auf eine nur eingeschränkte Reproduzierbarkeit. Für eine umfassende Beurteilung des Verfahrens sind weitere Untersuchungen erforderlich. Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen sind eine Sequenzierung der PCR-Produkte oder die Hybridisierung mit einer IS900-spezifischen Sonde geeignet. Auch der direkte Vergleich der Sequenzen der Primer-

⁴⁶ Das IS900 liegt im Genom von *M. paratuberculosis* in 15-20 Kopien vor; es wurden 14 mögliche Insertionsstellen untersucht.

⁴⁷ Bei Muster 1 z.B. die Primerkombination Loc7R/Loc12L bzw. Loc7L/Loc12R.

bindungsstellen bei Isolaten, die aus dem gleichen Tier stammen oder unterschiedlich oft passagiert wurden, ist zu empfehlen.

Das Verfahren wurde bis dato nur in drei Studien zur Differenzierung von *M. paratuberculosis* eingesetzt (Bull et al., 2000; Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004). Ein Vergleich mit den Ergebnissen von Bull et al. (2000) ergab sowohl Übereinstimmungen bezüglich der nachgewiesenen Ausprägungen einzelner Loci als auch Abweichungen v.a. in der Anzahl der nachgewiesenen Muster. Diese lag mit 52 Mustern in den eigenen Untersuchungen weit über den zehn bei Bull et al. (2000) beschriebenen MPIL-Typen. Dies ist erstaunlich, da von Bull et al. (2000) eine etwa gleiche Anzahl von Isolaten untersucht wurden, die zudem ein wesentlich weiteres Spektrum regionaler bzw. tierartlicher Herkunft aufwiesen. Eine Ursache könnte in dem abgewandelten Verfahren in den eigenen Untersuchungen liegen. Die von Bull et al. (2000) beschriebenen MPIL-Typen konnten nicht nachgewiesen werden. Eine hohe Zahl an Mustern, bzw. Elektrophoresetypen konnten Motiwala et al. (2003 und 2004) in ihren Studien nachweisen. Hier wurden allerdings auch deutlich mehr Isolate (210 bzw. 111) untersucht. Da die einzelnen Typen nicht näher beschrieben sind, ist kein weitergehender Vergleich mit den eigenen Untersuchungen möglich. Jedoch wurde in den genannten Studien ebenfalls eine Cluster-Analyse der nachgewiesenen Genotypen durchgeführt. Hierbei konnten insgesamt 36 Gruppen von ähnlichen Elektrophoresetypen nachgewiesen werden, die sich in zwei große übergeordnete Gruppen zusammenfassen ließen (Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004). Auch bei der eigenen Cluster-Analyse konnten zwei große Zweige nachgewiesen werden, die, im Gegensatz zu den Studien von Motiwala et al. (2003 und 2004), der Einteilung in Typ-I- und TypII-Isolate entsprachen. Diese Abweichungen beruhen vermutlich auf den Unterschieden in der Durchführung der Untersuchung (keine Untersuchung der einzelnen Loci, sondern Bewertung von Elektrophoresetypen der Multiplexansätze; Verwendung anderer Methoden bei der Cluster-Analyse). Der Nachweis einer größeren Gruppe von Isolaten mit gleichem Muster (Muster 1) sowie das Vorkommen von einmaligen Mustern (Muster 14-52) ist sowohl bei Bull et al. (2000) als auch bei Motiwala et al. (2003 und 2004) beschrieben. Motiwala et al. (2004) konnten bei der Untersuchung von 76 Isolaten unterschiedlicher Wildtierspezies in den USA Assoziationen zwischen der Herkunftstierart und dem MPIL-Typ nachweisen. Dies gelang in den eigenen Untersuchungen nicht, ebenso wenig wie eine Zuordnung zur regionalen Herkunft.

Insgesamt entsprechen die Typisierungsergebnisse der Loci-PCR denen anderer Differenzierungsverfahren. Mit den bislang verwendeten Verfahren ist in der Regel eine Einordnung der Mehrheit der untersuchten *M. paratuberculosis*-Isolate in ein oder zwei dominierende Gruppen möglich, wohingegen weitere Typen nur vereinzelt vorkommen (Amonsin et al., 2004; Bull et al., 2000; Ghadiali et al., 2004; Harris et al., 2006; Kiehnbaum et al., 2005; Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004; Overduin et al., 2004; Pavlik et al., 1999; Sevilla

et al., 2007; Thibault et al., 2007). Eine Assoziation mit der Herkunftstierart konnte, abgesehen von der Unterscheidung der einzelnen Subtypen, nur mit der MLSSR-Typisierung und der MPIL (Motiwala et al., 2004) erfolgen. Auch die Existenz eines eigenen „humanen“ *M. paratuberculosis*-Stammes konnte mit der Mehrheit der Differenzierungsverfahren nicht bestätigt werden (Bull et al., 2000; Bull et al., 2003b; Cousins et al., 2000; Overduin et al., 2004; Pillai et al., 2001). Lediglich bei der Untersuchung von Isolaten von Morbus Crohn-Patienten mittels MLSSR-Typisierung (Ghadiali et al., 2004) und des AFLP (Motiwala et al., 2003) konnten Hinweise hierauf ermittelt werden. Eine Zuordnung zur regionalen Herkunft war in einzelnen Studien mit Hilfe der PFGE (Feizabadi et al., 1997) und der RAPD (Zimpernick et al., 1999) möglich. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien ist jedoch durch die unterschiedlichen untersuchten Isolate eingeschränkt. Mit einem Diskriminierungsindex von 0,96 weist die Loci-PCR eine hohe Differenzierungskraft auf. Einen ähnlich hohen Diskriminierungsindex mit nur einem Verfahren erzielten lediglich Amonsin et al. (2004) unter Verwendung der MLSSR-Typisierung. Für epidemiologische Studien wird ein Diskriminierungsindex von mindestens 0,9 empfohlen (Hunter und Gaston, 1988; Möbius et al., 2008). Trotzdem bleibt fraglich, inwieweit eine solch genaue Differenzierung, bei der die Mehrheit der Isolate als einmalig typisiert werden kann, für epidemiologische Untersuchungen sinnvoll ist. Zwei Möglichkeiten bieten sich an, um mehr Isolate in Gruppen mit identischen oder nah verwandten Genotypen zusammenzufassen. Zum einen kann, wie bei Motiwala et al. (2003), eine minimale Distanz zwischen zwei Mustern festgelegt werden, um sie als genetisch unterschiedlich zu definieren. So konnten 90 bzw. 30 Elektrophoresetypen in 29 bzw. 11 Gruppen zusammengefasst werden (Motiwala et al., 2003; Motiwala et al., 2004). Da sich die einzelnen Muster in den eigenen Untersuchungen größtenteils nur wenig unterschieden, stellt dies durchaus einen gangbaren Weg dar. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, besonders variable Loci wie z.B. die Loci 2, 3 und 10 aus der Untersuchung auszuschließen. Auf diese Weise konnte in den eigenen Studien die Anzahl der Muster auf 16 reduziert werden, von denen nur noch sieben einmalig vorkamen (s. Tabelle 34). Eine bessere Zuordnung beispielsweise zur regionalen Herkunft war dadurch jedoch nicht möglich.

Wie im Standardprotokoll von Pavlik et al. (1999) wurden für die Durchführung des IS900 RFLP die Restriktionsenzyme *BstEII* und *PstI* verwendet. Neun *BstEII*-RFLP-Typen konnten nachgewiesen werden, von denen drei bislang noch nicht beschrieben wurden. Im Einklang mit vorherigen Studien (Möbius et al., 2008; Pavlik et al., 1999; Thibault et al., 2007) dominierte der *BstEII*-RFLP-Typ C1, wohingegen die anderen Typen nur vereinzelt auftraten. C17 gilt als dominierender Typ in Großbritannien (Greig et al., 1999) – er wurde in den eigenen Untersuchungen bei zwei Schafisolaten aus Schottland nachgewiesen. Die drei bislang noch nicht beschriebenen RFLP-Muster wurden bei Isolaten aus Deutschland nach-

gewiesen. Da, abgesehen von Möbius et al. (2008), bislang keine größeren Untersuchungen deutscher Isolate vorliegen, war ein Nachweis neuer Typen zu erwarten. Bei der Verwendung von *Pst*I konnten im Vergleich zu *Bst*EII wesentlich mehr neue RFLP-Typen beschrieben werden. Da das IS900 über eine Schnittstelle für *Pst*I verfügt, variieren die RFLP-Muster in Abhängigkeit von der verwendeten Sonde. In den eigenen Untersuchungen wurde eine Sonde unter Verwendung der Primer nach Kunze et al. (1992) hergestellt. Diese Sonde hybridisiert mit dem IS900 ohne Beteiligung der *Pst*I-Schnittstelle. Vergleichbare Sonden wurden von Francois et al. (1997), Möbius et al. (2008), Moreira et al. (1999), Saunders et al. (2003) und Whipple et al. (1990) verwendet. Ein direkter Vergleich ist somit nur mit diesen Studien möglich. Typ 1 ist in den eigenen Studien der dominierende Typ. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von Möbius et al. (2008) und Whipple et al. (1990). Unter Verwendung einer die *Pst*I-Schnittstelle des IS900 überspannenden Sonde wird Typ B am häufigsten nachgewiesen (Pavlik et al., 1999). Dieser entspricht nach von Moreira et al. (1999) dem Typ 1. Die Typen 7 und 8 sind von Möbius et al. (2008) erstmalig beschrieben und wurden in den eigenen Untersuchungen sowohl bei Isolaten aus Deutschland als auch aus Norwegen sowie dem Typenstamm ATCC 19698 nachgewiesen. Auch unter Verwendung von *Pst*I lassen sich, analog zur Einteilung in cattle-, sheep- und intermediäre Typen bei der Verwendung von *Bst*EII, drei Gruppen von RFLP-Mustern unterscheiden (Pavlik et al., 1999). Die eigenen Untersuchungen bestätigen dies. Unter Berücksichtigung beider Restriktionsenzyme ergaben sich insgesamt 11 unterschiedliche Typen, unter denen, analog zu anderen Studien, der Typ C1/1⁴⁸ dominierte. Die Differenzierungskraft des IS900 RFLPs war bei Verwendung der einzelnen Enzyme gering⁴⁹, konnte jedoch, wie in anderen Studien (Cousins et al., 2000; Möbius et al., 2008) durch Kombination beider Enzyme⁵⁰ erhöht werden. Die niedrigen Diskriminierungsindices lassen sich sowohl mit der insgesamt eher begrenzten Differenzierungskraft des Verfahrens (Motiwala et al., 2006b) als auch mit der hier untersuchten Auswahl an Isolaten begründen. Allerdings besteht ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Loci-PCR.

Bei der Kombination der Loci-PCR und des IS900 RFLP konnte die jeweils größte Gruppe gleicher Isolate des einen Verfahrens mit dem anderen Verfahren weiter ausdifferenziert werden. Von besonderer Bedeutung ist dies beim stark dominierenden RFLP-Typ C1/1, der mit Hilfe der Loci-PCR in 41 weitere Genotypen differenziert werden konnte. Dies entspricht den Ergebnissen weiterer Studien zur Differenzierung von *M. paratuberculosis*, sowohl für die Loci- bzw. Multiplex-PCR in Kombination mit dem IS900 RFLP (Bull et al., 2000), dem

⁴⁸ *Bst*EII/*Pst*I.

⁴⁹ Diskriminierungsindices: Verdau mit *Bst*EII: 0,28; Verdau mit *Pst*I: 0,26.

⁵⁰ Diskriminierungsindex: 0,36.

AFLP (Motiwala et al., 2003) und der MLSSR-Typisierung (Motiwala et al., 2004) als auch für den IS900 RFLP z.B. in Kombination mit der MIRU-VNTR-Typisierung (Möbius et al., 2008; Thibault et al., 2007) oder der PFGE (de Juan et al., 2005; Stevenson et al., 2002).

Auch die durch die Kombination erreichte Erhöhung der Differenzierungskraft steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Möbius et al., 2008; Motiwala et al., 2006b). Beide Differenzierungsverfahren beziehen sich auf das IS900 – der nachgewiesene Zusammenhang zwischen dem RFLP-Typ und dem Loci-PCR-Muster, der jedoch nur für den *Pst*I-Typ statistisch abgesichert werden konnte, war zu erwarten. Für eine Differenzierung ist jedoch die Verwendung voneinander unabhängiger Verfahren (z.B. IS900 RFLP in Verbindung mit der MIRU-VNTR-Typisierung) zu empfehlen (Möbius et al., 2008).

Nationale bzw. regionale Studien außerhalb Deutschlands liegen aus Argentinien (Moreira et al., 1999; Romano et al., 2005), Australien (Feizabadi et al., 1997; Saunders et al., 2003; Whittington et al., 2000), Großbritannien (Greig et al., 1999; Stevenson et al., 2002), Neuseeland (Collins et al., 1997; de Lisle et al., 1993), Norwegen (Djonne et al., 2005), Österreich (Deutz et al., 2005; Zimpernik et al., 1999), Spanien (Sevilla et al., 2007), den USA (Harris et al., 2006) sowie einzelnen Bundesstaaten der USA (Motiwala et al., 2003; Kiehnbaum et al., 2005; Pillai et al., 2001) vor. In der Regel konnten in den einzelnen Regionen ein oder zwei dominierende Typen nachgewiesen werden. Diese konnten von Region zu Region variieren. In Europa dominierte beispielsweise der *Bst*II-RFLP-Typ C1 (Thibault et al., 2007), wohingegen in Argentinien v.a. C17 (Moreira et al., 1999; Romano et al., 2005) und in Australien v.a. C3 (Whittington et al., 2000) nachgewiesen wurden. Allerdings bestehen zwischen den einzelnen Studien große Unterschiede nicht nur bezüglich der verwendeten Verfahren, sondern auch in der Anzahl, Auswahl und tierartlichen bzw. genauen regionalen Herkunft der untersuchten Isolate. Ein direkter Vergleich ist somit nur bedingt möglich. Weitere Einschränkungen erfährt die Vergleichbarkeit durch Variationen in der Durchführung der Methoden wie beispielsweise die Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme beim IS900 RFLP sowie der PFGE oder die nicht einheitliche Benennung der einzelnen Genotypen. Die untersuchten Isolate stammten in der Regel aus der Routinediagnostik der beteiligten Einrichtungen, so dass keine repräsentative Auswahl erwartet werden kann. Zudem muss aufgrund der schwierigen Kultivierung von TypI-Isolaten zusätzlich von einer Unterrepräsentation dieses Subtyps in den Studien ausgegangen werden (Motiwala et al., 2003; Whittington et al., 2000). Auch in den eigenen Untersuchungen erfolgte die Auswahl der Isolate überwiegend willkürlich aus der Routinediagnostik des VI Oldenburg. Die übrigen Isolate wurden von anderen Institutionen überlassen und stammten überwiegend ebenfalls aus der Routinediagnostik. Mit einer Verzerrung der Ergebnisse war somit zu rechnen. Deutlich wird dies bei der Betrachtung des nachgewiesenen statistischen Zusammenhangs zwi-

schen der Herkunft (regional sowie tierartlich) eines Isolats und dem RFLP-Typ. V.a. Schafisolate weisen einen von C1/1 abweichenden RFLP-Typ auf. Da alle Schafisolate aus anderen Ländern stammten als die Rinderisolate, muss hier von einem Selektionsbias ausgegangen werden. Für eine Abklärung ist die Untersuchung von Schafisolaten aus Deutschland sowie von Rinderisolaten aus den Herkunftsländern der Schafisolate erforderlich.

M. paratuberculosis gilt als genetisch homogen (Motiwala et al., 2006b). Dies wird in den eigenen Untersuchungen bestätigt. Der RFLP-Typ C1/1 dominierte deutlich und auch die vielen nachgewiesenen Loci-PCR-Muster unterschieden sich mehrheitlich nur in geringem Maße. Der hohe Grad an genetischer Homogenität schränkt die Möglichkeit einer Differenzierung von *M. paratuberculosis* ein. Darüber hinaus konnte bislang, abgesehen von der MLSSR-Typisierung, mit keinem Verfahren eine Einteilung untersuchter *M. paratuberculosis*-Isolate in epidemiologisch relevante Gruppen erfolgen (Motiwala et al., 2006b). Eine Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge wird weiterhin durch die in der Regel nachgewiesene Dominanz eines Genotyps erschwert. Wird beispielsweise in mehreren Herden der am häufigsten auftretende Genotyp nachgewiesen, ist hieraus kein sicherer Rückschluss auf einen epidemiologischen Zusammenhang, wie z.B. eine Verschleppung über den Handel, möglich. In einzelnen Studien konnten jedoch anhand der Typisierungsergebnisse Angaben zur möglichen Eintragsquelle gemacht werden. So wiesen Machackova-Kopečna et al. (2005) in einem Rotwildbestand u.a. den RFLP-Typ C16 nach. Da dieser in Schottland nachgewiesen wurde (Greig et al., 1999) und eines der Tiere aus dieser Region zugekauft wurde, ist die Einschleppung auf diesem Wege wahrscheinlich. Dies gilt auch für den in Argentinien vorherrschenden RFLP-Typ C17 (Moreira et al., 1999; Romano et al., 2005). Dieser gelangte vermutlich über den Import britischer Rinder – C17 ist in Großbritannien weit verbreitet – im 19. Jahrhundert nach Argentinien (Moreira et al., 1999).

Über die genetische Vielfalt von *M. paratuberculosis* in Deutschland gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse. Nach Untersuchungen einzelner deutscher Isolate von Bauerfeind et al. (1996), Pavlik et al. (1995) sowie Scheibl und Gerlach (1997) liegt von Möbius et al. (2008) die erste deutschlandweit angelegte Studie zur *M. paratuberculosis*-Differenzierung vor.

Aus den eigenen Ergebnissen ergeben sich Hinweise auf einen unterschiedlichen Grad an genetischer Diversität in einzelnen Regionen Deutschlands. Während in Sachsen-Anhalt bei einer nur geringen Anzahl untersuchter Isolate auch mit dem IS900 RFLP unterschiedliche Genotypen festgestellt wurden, konnten in Thüringen nur wenige Genotypen nachgewiesen werden, die sich zudem lediglich mit der Loci-PCR unterscheiden ließen. Leider liegen zu diesen Isolaten keine näheren Angaben zur Herkunft vor, so dass über eine gemeinsame Herkunft im Genotyp identischer Isolate aus der gleichen Herde nur spekuliert werden kann.

Unterschiede in der genetischen Vielfalt in den einzelnen Bundesländern wurden auch von Möbius et al. (2008) beobachtet, insgesamt dominierte jedoch der RFLP-Typ C1/1.⁵¹ In den Untersuchungen von Bauerfeind et al. (1996) wies die Mehrheit der untersuchten Isolate ebenfalls den gleichen RFLP-Typ⁵² auf. Allerdings lagen hier keine Angaben zur genauen Herkunft der Isolate vor. Ein gehäuftes Auftreten einzelner Genotypen in bestimmten Landkreisen konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Niedersächsische Isolate wurden bislang nur in einzelnen Studien genetisch charakterisiert. Scheibl und Gerlach (1997) untersuchten niedersächsische Isolate mittels RAPD. Hierbei konnte eine hohe genetische Diversität festgestellt werden. Eine Zuordnung zur Herkunft war jedoch, auch wegen mangelnder Hintergrundinformation zu den Isolaten, nicht möglich. Aufgrund der Instabilität und mangelhaften Reproduzierbarkeit der RAPD (Olive und Bean, 1999) sind diese Ergebnisse allerdings vorsichtig zu bewerten. Die von Möbius et al. (2008) untersuchten Isolate wiesen sowohl im IS900 RFLP⁵³ als auch bei der MIRU-VNTR-Typisierung identische Genotypen auf und stammten aus der gleichen Herde. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnten bei den 49 niedersächsischen Isolaten 35 unterschiedliche Genotypen nachgewiesen werden. Da die Paratuberkulose in Niedersachsen schon seit langem bekannt und weit verbreitet ist (Huber, 1941; Johne und Frothingham, 1895), ist von einer hohen genetischen Diversität auszugehen. Diese Vielfalt spiegelt sich in den 33 nachgewiesenen Loci-PCR-Mustern wider. Im Gegensatz hierzu konnten mittels IS900 RFLP nur fünf Typen nachgewiesen werden. Über 90% der Isolate wiesen den RFLP-Typ C1/1 auf, die vier anderen nachgewiesenen Typen kamen jeweils bei nur einem Isolat vor. Inwieweit die große Anzahl nachgewiesener Loci-PCR-Muster auf die Instabilität dieses Verfahrens oder auf eine tatsächlich vorhandene – mit dem IS900 RFLP nicht erfasste – genetische Diversität zurückzuführen ist, bleibt fraglich. Die Untersuchung der gleichen Isolate mit weiteren Differenzierungsverfahren bietet eine Möglichkeit, dies abzuklären. Zusätzlich ist die Untersuchung weiterer Isolate, sowohl mit den hier verwendeten als auch weiteren Differenzierungsverfahren, für eine weitergehende Beurteilung der Situation in Niedersachsen erforderlich. PCR-basierte Verfahren wie die MIRU-VNTR-Typisierung oder die MLSSR-Typisierung sind aufgrund der höheren Differenzierungskraft und der einfacheren Durchführung vorzuziehen. Der IS900 RFLP ist nach den Ergebnissen dieser Studie für die Differenzierung niedersächsischer Isolate, z.B. zur Aufklärung von Infektketten, aufgrund des überwiegenden Nachweises des Typs C1/1 nicht geeignet.

⁵¹ Zur besseren Vergleichbarkeit wurde nur der *BstEII/PstI*-RFLP-Typ betrachtet.

⁵² Verdau mit *PvuII*.

⁵³ Verwendung der Restriktionsenzyme *BstEII*, *PstI*, *PvuII* und *BamHI*.

Der Nachweis mehrerer Genotypen in einer Herde oder Region spricht für mehrere Eintragsquellen wie z.B. den mehrfachen Zukauf infizierter Tiere oder für die parallele Existenz mehrerer Stämme. Der Nachweis nur eines Genotyps lässt auf die weite Verbreitung nur eines Stammes in einer Region oder Herde schließen (Harris et al., 2006; Motiwala et al., 2004). Es wurde der Verdacht geäußert, dass die Paratuberkulose in die neuen Bundesländer nach der Wende durch Zukauf infizierter Tiere eingeschleppt wurde (Köhler et al., 2005). Für Thüringen mit einer geringen Anzahl unterschiedlicher Genotypen, die jeweils mehrfach nachgewiesen wurden, ist der Zukauf einzelner mit diesen Stämmen infizierter Tiere und die nachfolgende Verbreitung in den Beständen denkbar. Eine Zuordnung bestimmter Genotypen zu einzelnen Betrieben war jedoch nicht möglich. Für ein umfassendes Bild ist die Untersuchung einer größeren Anzahl von Isolaten über einen längeren Zeitraum notwendig. Diese Voraussetzungen wurden bei einzelnen Herden erfüllt – eine Häufung bestimmter Genotypen konnte jedoch auch anhand der Loci-PCR nicht nachgewiesen werden. In den einzelnen untersuchten Herden wurden in der Regel mehrere Genotypen, auch mittels IS900 RFLP, nachgewiesen. Gerade in einer Region mit jahrzehntelangem starkem Tierverkehr wie Nordniedersachsen ist von einer ausgeprägten Durchmischung der verschiedenen Stämme auszugehen.

Der Nachweis mehrerer Genotypen in einem Tier ist mehrfach in der Literatur beschrieben (Cousins et al., 2000; Pavlik et al., 1995; Pfaller et al., 2007; Whittington et al., 2000). Als Ursache kommen neben einer polyklonalen Infektion (Pfaller et al., 2007; Whittington et al., 2000) passagiere Keime (Shitaye et al., 2008) oder Mutationen (Cousins et al., 2000) in Frage. Zwei Isolate aus dem selben Tier stammten in der Regel aus der Kotuntersuchung und aus der Untersuchung der Organe einige Monate später. Eine genetische Veränderung über diesen Zeitraum ist, v.a. für die Loci-PCR, denkbar. Das gleiche gilt für die Isolate NDS-BRA-6a und b. Hier wurden vom gleichen Tier zwei Kotproben im Abstand von drei Wochen untersucht. Da *M. paratuberculosis* lange Zeit in der Umwelt überlebt (Rowe und Grant, 2006) und aufgrund der starken Verbreitung im Landkreis Wesermarsch von einer hohen Umweltkontamination auszugehen ist, sind auch passagere Infektionen möglich.

Für den Typenstamm ATCC 19698 wird in der Regel der RFLP-Typ C1/1 angegeben (Cousins et al., 2000; Stevenson et al., 2002; Whipple et al., 1990). Dies steht im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen, in denen der Typ Cneu2/7 vorlag. Ein abweichender RFLP-Typ, C6, wurde jedoch auch in einer weiteren Studie nachgewiesen (Collins et al., 1990). In den eigenen Untersuchungen wurde mit der Loci-PCR für den Typenstamm ATCC 19698 ebenfalls ein deutlich von den anderen Isolaten abweichendes Muster mit vielen genetischen Umordnungen nachgewiesen. Für den *M. paratuberculosis*-Impfstamm 316F sind auch mehrere RFLP-Typen beschrieben. Die sich im RFLP-Typ unterscheidenden Stämme

stammten sowohl aus unterschiedlichen Laboren als auch aus unterschiedlichen Chargen (Collins et al., 1990; Thibault et al., 2007). Die genetischen Unterschiede wurden durch die Verwendung anderer Differenzierungsverfahren wie z.B. des MIRU-VNTR-Typisierung bestätigt (Thibault et al., 2007). Als Ursache hierfür wird die über Jahre praktizierte Subkultivierung angegeben (Thibault et al., 2007), da *M. paratuberculosis* in der Lage ist, sich den Umweltbedingungen anzupassen, und demzufolge im Laufe mehrerer in-vitro Passagen seine Eigenschaften verändern kann (Parrish et al., 2004). Dies trifft auch auf den Typenstamm ATCC 19698 zu. Die Stabilität der RFLP-Muster wird durch diese Ergebnisse jedoch in Frage gestellt. Allerdings waren die Muster des ATCC-Stammes bei allen eigenen RFLP-Ansätzen stabil, trotz der Verwendung von verschiedenen Kulturröhrchen als Ausgangsmaterial. Möglicherweise handelte es sich bei dem Ausgangsisolat des Typenstammes auch um eine Mischkultur aus verschiedenen Klonen mit unterschiedlichen RFLP-Typen, aus der der Typ Cneu2/7 selektiert wurde.

Phänotypische Charakterisierung

M. paratuberculosis wächst auf festen Nährmedien nach einer Bebrütungszeit von bis zu vier Monaten in nicht pigmentierten, rauen Kolonien mit einem Durchmesser von 1-5 mm (Chiodini et al., 1984; Cocito et al., 1994). Eine weitergehende Beschreibung der kulturmorphologischen Eigenschaften von *M. paratuberculosis* erfolgte bislang jedoch nur in wenigen Untersuchungen. Zudem variiert das Erscheinungsbild in Abhängigkeit von den verwendeten Nährmedien (Merkal und Curran, 1974; Sung und Collins, 2003; van Boxtel et al., 1990), so dass ein Vergleich einzelner Studien problematisch ist. Da im Unterschied zu den vorausgegangenen Studien in den eigenen Untersuchungen Herrold's Egg-Yolk-Medium verwendet wurde, ist kein direkter Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen vorhandener Studien möglich. Die Wachstumsgeschwindigkeit von durchschnittlich knapp neun Wochen entspricht den Angaben in der Literatur (Whipple et al., 1991). Unterschiedliche Koloniemorphologien bei verschiedenen Stämmen sind sowohl von Chiodini (1986) als auch von Parrish et al. (2004) beschrieben. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um ein besonders stabiles Merkmal. Zum einen können bei einem Isolat auf ein und dem selben Nährboden mehrere Kolonieförmigkeiten auftreten, wobei allerdings ein morphologischer Typ überwiegt (Merkal und Curran, 1974; Parrish et al., 2004). Zum anderen können auch bei Subkultivierung eines Typs wieder mehrere Typen auftreten – der Elterntyp überwiegt jedoch (Merkal und Curran, 1974). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Beeinflusst wird die Koloniemorphologie auch von der Anzahl der Kolonien, d.h. der Größe des Inokulums (Chiodini, 1986). In den eigenen Untersuchungen konnten die morphologischen Merkmale in der Regel nur bei höheren Verdünnungsstufen beurteilt werden, da bei niedrigen Verdünnungsstufen ein rasenartiges Wachstum mit vielen kleinen Kolonien zu beobachten war. Ein Zusammenhang

zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der Koloniemorphologie konnte, wie auch bei Parrish et al. (2004), nicht nachgewiesen werden. Eine Stammdifferenzierung von *M. paratuberculosis* anhand kulturmorphologischer Merkmale ist grundsätzlich möglich. Eingeschränkt wird dies jedoch durch die Variabilität der Merkmale, den hohen Arbeits- und Zeitaufwand und die mangelnde Objektivierbarkeit.

Inwieweit die hier beobachteten kulturmorphologischen Unterschiede im Zusammenhang mit biologischen Eigenschaften stehen, kann nur spekuliert werden. Bei der Untersuchung von *M. avium* subsp. *avium* variierten bestimmte biologische Eigenschaften wie Virulenz oder Antibiotikaresistenz in Abhängigkeit vom morphologischen Typ (Cangelosi et al., 2001). Für *M. paratuberculosis* konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Koloniemorphologie und der Resistenz gegenüber Antibiotika nachgewiesen werden (Parrish et al., 2004).

Das IS900 verfügt neben der Transposase auch über ein *hed* (host expression dependent)-Gen, das, je nach flankierender DNA, unterschiedliche Proteine kodiert. Ein Einfluss der Lokalisation und Anzahl der Kopien dieses Insertionselementes ist daher anzunehmen, zumal auch die Expression stromabwärts gelegener Gene durch das IS900 beeinflusst werden kann (Doran et al., 1994; Doran et al., 1997). In Experimenten mit *M. smegmatis* konnte eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit nach Klonierung des IS900 in das *M. smegmatis*-Genom festgestellt werden. Als Ursache wurde ein Eingreifen des IS900 in den Mycobactinstoffwechsel angegeben (Naser et al., 1998). Vor diesem Hintergrund erscheint gerade eine Differenzierung anhand der Insertionsstellen des IS900 auch im Hinblick auf die Zuordnung biologischer Eigenschaften vielversprechend.

Ob und inwieweit die in den eigenen Untersuchungen nachgewiesenen Assoziationen zwischen der Ausprägung einzelner Loci und den kulturmorphologischen Eigenschaften im Zusammenhang mit dem IS900 stehen, kann nur spekuliert werden. Bezüglich des RFLP-Typs konnte lediglich ein statistisch nicht abgesicherter Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem *Pst*I-RFLP-Typ und der Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt werden. Die hier beurteilten morphologischen Merkmale wurden willkürlich ausgewählt und es ist fraglich, inwieweit sie überhaupt in einem Zusammenhang mit dem IS900 stehen. Für eine Abklärung ist eine eingehende Untersuchung der an den Insertionsstellen für das IS900 kodierten Proteine sowie der Einflussnahme einer Insertion des IS900 notwendig. Auch eine Analyse der Schnittstellen der Restriktionsenzyme und der möglicherweise betroffenen Gene kann zur Aufklärung von Zusammenhängen zwischen dem RFLP-Typ und den biologischen Eigenschaften beitragen. Eine Zuordnung biologischer Eigenschaften zum Genotyp erfolgte bislang v.a. auf der Ebene der Subtypen. Diese unterscheiden sich u.a. in den Ansprüchen an das Nährmedium (Juste et al., 1991; Sevilla et al., 2005). Cernicchiaro et al. (2008) konnten aus Rinderkotproben in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium TypII-Isolate mit unterschiedlichen MLSSR-Genotypen isolieren. Sie gingen vom Vorkommen mehrerer Genotypen

in derselben Kotprobe und einer Selektivität der einzelnen Nährmedien für bestimmte Genotypen aus (Cernicchiaro et al., 2008). Letzteres kann auf variablen biologischen Eigenschaften einzelner Genotypen oder auf einer Anpassung an das Nährmedium beruhen. Virulenzunterschiede zwischen den einzelnen Subtypen sind beschrieben (Motiwala et al., 2006b; O'Brien et al., 2006) und werden auf unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen zurückgeführt (Janagama et al., 2006; Motiwala et al., 2006a). Innerhalb einer Herde erkrankt, trotz des gleichen Infektionsrisikos, nur ein Teil der Tiere. Dies wird u.a. auf eine unterschiedliche Empfänglichkeit der Tiere zurückgeführt. Aber auch verschieden virulente *M. paratuberculosis*-Stämme können hier eine Rolle spielen. Gollnick et al. (2007) konnten in Infektionsversuchen von Makrophagen erstmals mögliche Virulenzunterschiede von TyphII-Isolaten anhand unterschiedlicher Phagozytoseraten und intrazellulärer Überlebenszeiten des Erregers nachweisen. In den eigenen Untersuchungen konnte bei einzelnen Isolaten auch das pathologisch-anatomische Erscheinungsbild erfasst werden. Ein Rückschluss vom Grad der pathologisch-anatomischen Veränderungen auf die Virulenz des infizierenden Isolats ist jedoch nicht möglich. Die untersuchten Tiere befanden sich in unterschiedlichen Krankheitsstadien und stammten zudem aus verschiedenen Betrieben. Eine Untersuchung von Virulenzunterschieden zwischen den Isolaten dieser Studie ist, neben einer experimentellen Infektion von Kälbern, auch mit Hilfe von Infektionsversuchen an Makrophagenkulturen und nachfolgender Bestimmung von Zytokinexpressionsmustern (Motiwala et al., 2006a) oder der Untersuchung des intrazellulären Überlebens (Gollnick et al., 2007) möglich. Ebenso kann die bereits oben genannte genaue Analyse sowohl der IS900-Integrationsstellen, der Schnittstellen der Restriktionsenzyme als auch anderer zur genetischen Differenzierung genutzter Strukturen (SSRs, MIRU-VNTRs) hierzu beitragen.

Schlussfolgerungen

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit entspricht die Loci-PCR nach Bull et al. (2000) in ihren Typisierungseigenschaften weitgehend anderen Verfahren zur Stammdifferenzierung von *M. paratuberculosis*. Jedoch stellte sich das Verfahren als möglicherweise instabil dar. Aus diesem Grund ist es eher für den schnellen, direkten Vergleich zweier Isolate, nicht jedoch für epidemiologische Studien geeignet. Durch eine Reduktion der Anzahl untersuchter Loci und die Durchführung als Multiplex-PCR kann eventuell eine Verbesserung dieser Methode erreicht werden. Eine abschließende Beurteilung des Verfahrens ist allerdings erst nach weiteren Untersuchungen (exakte Analyse der PCR-Produkte und der Primerbindungsstellen) möglich.

Im Vergleich mit dem IS900 RFLP konnte keine Übereinstimmung der nachgewiesenen Genotypen gefunden werden.

Die molekulargenetische Charakterisierung niedersächsischer Isolate, die in dieser Studie erstmalig in größerem Rahmen durchgeführt wurde, ergab Hinweise auf eine nur begrenzte genetische Diversität innerhalb dieser Region. Weitere Untersuchungen, auch mit anderen Typisierungsverfahren, sind zu empfehlen.

Eine phänotypische Ausprägung genotypischer Unterschiede konnte anhand der hier untersuchten Parameter nicht festgestellt werden. Zur Aufklärung der Frage, inwieweit die einzelnen Genotypen unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen, stellen beispielsweise Infektionsversuche von Makrophagenkulturen eine Möglichkeit dar.

Zusammenfassung

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*) ist der Erreger der Paratuberkulose, einer chronischen, stets tödlich verlaufenden Durchfallerkrankung der Wiederkäuer. Seit der Erstbeschreibung Ende des 19. Jahrhunderts ist die Paratuberkulose weltweit nachgewiesen worden. Regionale Häufungen, z.B. in Nordniedersachsen, wurden schon früh beschrieben. Die Frage, ob sie durch den Tierverkehr verbreitet wurde oder schon seit Jahrhunderten weltweit endemisch ist, lässt sich heute nicht mehr klären. Die Einschleppung in einen Bestand erfolgt in der Regel durch den Zukauf in der Inkubationszeit befindlicher infizierter Tiere. Um solche Infektketten oder die Rolle von Wildtieren als Erregerreservoir aufzuklären, ist eine genaue Erregertypisierung notwendig. Schon in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden unterschiedliche Subtypen von *M. paratuberculosis* beschrieben, die anhand der Pigmentierung, der Wachstumsgeschwindigkeit und der Wirtspräferenz unterschieden werden können. Eine genauere Differenzierung unterschiedlicher *M. paratuberculosis*-Isolate wurde erst mit molekularbiologischen Methoden möglich. Hierdurch konnte die Unterscheidung anhand der Wachstumsrate und der Pigmentierung bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Eignung der Loci-PCR nach Bull et al. (2000) zur Differenzierung von *M. paratuberculosis* anhand von 92 willkürlich ausgewählten Isolaten untersucht. Als Vergleichsmethode wurde der IS900 RFLP, das derzeitige Standardverfahren, eingesetzt. Zudem erfolgte eine kulturmorphologische Untersuchung der *M. paratuberculosis*-Isolate, um phänotypische Ausprägungen der genetischen Merkmale feststellen zu können. Mit Hilfe der Loci-PCR konnten 52, mit Hilfe des IS900 RFLP elf unterschiedliche Typen differenziert werden. Eine Übereinstimmung von Loci-PCR- und IS900 RFLP-Typen konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr konnten sowohl mit der Loci-PCR als auch mit dem IS900 RFLP die bei der jeweils anderen Methode gleichen *M. paratuberculosis*-Isolate weiter differenziert werden. Die Loci-PCR erwies sich allerdings als instabil und somit zur Differenzierung nur bedingt geeignet. Eine Zuordnung der molekularbiologischen zu den kulturmorphologischen Eigenschaften war nicht möglich. Erstmals wurde eine große Anzahl niedersächsischer *M. paratuberculosis*-Isolate molekulargenetisch charakterisiert. Die genetische Diversität variierte in Abhängigkeit vom verwendeten Differenzierungsverfahren.

Summary

Martina Schulze: Strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* – some results of investigative studies

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*) is the causative organism of paratuberculosis, a fatal, chronic enteritis of ruminants. First recorded at the end of the 19th century, it is now found all over the world, with higher prevalence in certain regions e.g. northern Lower Saxony, Germany. It's not possible to determine whether the disease was endemic worldwide or spread through the trade with animals. The introduction into a herd mainly occurs by purchase of inapparently infected animals. Strain genotyping is essential in order to elucidate such chains of infection or the role of wild animals as a natural reservoir of *M. paratuberculosis*. Three subtypes have been detailed since the first half of the 20th century. They differ in phenotypic characteristics such as host preference, growth rate and pigmentation. An accurate strain typing became possible only through the development of molecular typing methods. The phenotypic differences were confirmed.

The aim of this thesis was to investigate the suitability of Loci-PCR as a tool for differentiating *M. paratuberculosis*. 92 randomly selected *M. paratuberculosis* strains were characterised. As reference method, the standard method IS900 RFLP was used. A culture morphological examination was performed in order to determine phenotypic equivalents to the genetic features. Loci-PCR and IS900 RFLP differentiated 52 and 11 genotypes, respectively. No association between Loci-PCR and IS900 RFLP type was found. Loci-PCR subdivided the most predominant IS900 RFLP type, as IS900 RFLP subdivided the predominating Loci-PCR type. Loci-PCR seemed to lack stability and reproducibility resulting in only limited application in strain typing of *M. paratuberculosis*. There was no association between genotype and phenotypic characteristics. This is the first large-scale study of Lower Saxonian *M. paratuberculosis* isolates. Loci-PCR and IS900 RFLP revealed different degrees of genetic diversity for *M. paratuberculosis* in this region.

Literatur

Aanensen, D.M., und Spratt, B.G. (2005): The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucl. Acids Res. 33 (Web Server issue): W728-W733

Alland, D., Whittam, T.S., Murray, M.B., Cave, M.D., Hazbon, M.H., Dix, K., Kokoris, M., Duesterhoft, A., Eisen, J.A., Fraser, C.M., Fleischmann, R.D. (2003): Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: Application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. J. Bacteriol. 185, 3392-3399

Amonsin, A. Li, L.L., Zhang, Q., Bannantine, J.P., Motiwala, A.S., Sreevatsan, Kapur, V. (2004): Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol. 42, 1694-1702

Ayele, W.Y., Bartos, M., Svastova, P., Pavlik, I. (2004): Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. Vet. Microbiol. 103, 209-217

Bang, B. (1906): Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. Berl. Tierärztl. Wochenschr. 8, 759-763

Bannantine, J.P., Hansen, J.K., Paustian, M.L., Amonsin, A., Li, L.-L., Stabel, J.R., Kapur, V. (2004): Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 42, 106-114

Bannantine, J.P., Zhang, Q., Li, L.-L., Kapur, V. (2003): Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their different growth rates. BMC Microbiol. 3, 10

Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H., Baljer, G. (1996): Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. J. Clin. Microbiol. 34, 1617-1621

- Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M. (2001): Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521
- Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A., Stelwagen, J. (1987): Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 121, 142-146
- Benson, G. (1999): Tandem repeat finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 573-580
- Boelart, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeesch, J.P., Berkvens, D., Godfroid, J. (2000): Prevalence of paratuberculosis in Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* 77, 269-281
- Brees, D.J., Reimer, S.B., Cheville, N.F., Florance, A., Thoen, C.O. (2000): Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 60-63
- Brennan, P.J., und Nikaido, H. (1995): The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29-63
- Buergelt, C.D., und Duncan, J.R. (1978): Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173, 478-480
- Buergelt, C.D., Hall, C., McEntee, K., Duncan, J. R. (1978): Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207
- Buergelt, C.D., Layton, A.W., Ginn, P.E., Taylor, M., King, J.M., Habecker, P.L., Mauldin, E., Whitlock, R., Rossiter, C., Collins, M.T. (2000): The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American Bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol.* 37, 428-438
- Bull, T.J., Hermon-Taylor, J., Pavlik, I., El-Zataari, Tizard, M. (2000): Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* 146, 2185-2197 und 3285

- Bull, T.J., McMinn E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, R., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003)a: Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. J. Clin. Microbiol. 41, 2915-2923
- Bull, T.J., Sidi-Boumedine, K., McKinn, E.J., Stevenson, K., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003)b: Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. Mol. Cell. Probes, 17, 157-164
- Bülte, M., Schönenbrücher, H., Abdulmawjood, A. (2005): From farm to fork - *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) als Zoonoseerreger. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 377-385
- Cangelosi, G.A., Palermo, C.O., Bermudez, L.E. (2001): Phenotypic consequences of red-white colony type variation in *Mycobacterium avium*. Microbiology 147, 527-533
- Cernicchiaro, N., Wells, S.J., Janagama, H., Sreevatsan, S. (2008): Influence of type of culture medium on characterization of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subtypes. J. Clin. Microbiol. 46, 145-149
- Chiodini, R.J. (1986): Biochemical characteristics of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 47, 1442-1445
- Chiodini, R.J. (1989): Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. Clin. Microbiol. Rev. 2, 90-117
- Chiodini, R.J. (1990): Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* and organisms of the *Mycobacterium avium* complex by restriction polymorphism of the rRNA gene region. J. Clin. Microbiol. 28, 489-494
- Chiodini, R.J. (1993): Abolish *Mycobacterium avium* strain 18. J. Clin. Microbiol. 31, 1956-1958
- Chiodini, R.J. (1996): Immunology: Resistance to paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 313-343

Chiodini, R.J., van Kruiningen, H., Merkal, R.S. (1984): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262

Clark, C.G., Kruk, T.M.A.C., Bryden, L., Hirvi, Y., Ahmed R., Rodgers, F.G. (2003): Subtyping of *Salmonella enterica* serotype enteritidis strains by manual and automated *PstI-SphI* ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 41, 27-33

Clarke, C.J. (1997): The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261

Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., Vanuffel, P. (1994): Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 328-345

Coetsier, C., Havaux, X., Mattelard, F., Sadatte, S., Cormont, F., Buergelt, K., Limbourg, B., Latinne, D., Bazin, H., Deneff, J.-F., Cocito, C. (1998): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 446-451

Coffin, J.W., Condon, C., Compston, C.A., Potter, K.N., Lamontagne, L.R., Shafiq, J., Kunitomo, D.Y. (1992): Use of restriction length polymorphisms resolved by pulse-field gel electrophoresis for subspecies identification of Mycobacteria in the *Mycobacterium avium* complex and for isolation of DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1829-1836

Collins, D.M., und de Lisle, G.W. (1986): Restriction endonuclease analysis of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 47, 2226-2229

Collins, D.M., Cavaignac, S., de Lisle, G.W. (1997): Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes* 11, 373-380

Collins, D.M., de Zoete, M., Cavaignac, S.M. (2002): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4760-4762

Collins, D.M., Gabric, D.M., de Lisle, G.W. (1990): Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591-1596

- Collins, D.M., Hilbink, F., West, D.M., Hosie, B.D., Cooke, M.M., de Lisle, G.W. (1993): Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterization and polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* 133, 599-600
- Collins, M.T. (1996): Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 357-372
- Collins, M.T., Kenefick, K.B., Sockett, D.C., Lambrecht, R.S., McDonald, J., Jorgensen, J.B. (1990): Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2514-2519
- Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C. (1991): Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272-276
- Corn, J.L., Manning, E.J.B., Sreevatsan, S., Fischer, J.R. (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6963-6967
- Corpa, J. M., Garrido, J., García Marin, J.F., Pérez, V. (2000): Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265
- Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J. (2000): DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust. Vet. J.* 78, 184-190
- Coussens, P.M. (2001): *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Animal Health Res. Rev.* 2, 141-161
- Coussens, P.M. (2004): Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72, 3089-3096
- Dalziel, T.K. (1913): Chronical intestinal enteritis. *Br. Med. J.* 2, 1068-1070
- De Juan, L., Álvarez, J., Aranaz, A., Rodríguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Domínguez, L. (2006): Molecular epidemiology of types I/III strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115, 102-110

- De Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K. (2005): Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulse-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106, 249-257
- de Kesel, M., Gilot, P., Coene, M., Cocito, C. (1992): Composition and immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 26, 201-212
- De Lisle, G.W., Collins, D.M., Huchzermeyer, H.F.K.A. (1992): Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA-hybridization. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 59, 163-165
- De Lisle, G.W., Yates, G.F., Collins, D.M. (1993): Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 567-571
- Deutz, A., Spargser, J., Wagner, P., Rosengarten, R., Köfer, J. (2005): Nachweise von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bei Wildtieren und Rindern in der Steiermark/Österreich. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 118, 314-320
- Deutz, A., Spargser, J., Wagner, P., Steineck, T., Köfer, J., Rosengarten, R. (2003): Paratuberkulose bei Wildtieren – Häufung klinischer Fälle in freier Wildbahn. *Tierärztl. Umschau* 58, 482-489
- Djonne, B., Pavlik, I., Svastova, P., Holstad, G. (2005): IS900 restriction length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. *Acta Vet. Scand.* 46, 13-18
- Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V., Bull, T.J., Gerlach, G.-F. (2003): Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Type I and Type II Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5215-5223
- Doran, T., Tizard, M., Millar, D., Ford, J., Sumar, N., Loughlin, M., Hermon-Taylor, J. (1997): IS900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hsp* gene. *Microbiology* 143, 547-552

Doran, T.J., Davies, J.K., Radford, A.J., Hodgson, A.L. (1994): Putative functional domains within ORF2 on the *Mycobacterium* insertion sequences IS900 and IS902. Immunol. Cell. Biol. 72, 427-434

Ellingson, J.L., Bolin, C.A., Stabel, J.R. (1998): Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. Mol. Cell. Probes 12, 133-142

Ellingson, J.L.E., Stabel, J.R., Bishai, W.R., Frothingham, R., Miller, J.M. (2000): Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. Mol. Cell. Probes 14, 153-161

Elomaa, A., Advani, A., Donnelly, D., Antila, M., Mertsola, J., Hallander, H., He, Q. (2005): Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. J. Clin. Microbiol. 43, 3681-3687

Englund, S. (2003): IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguish *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from closely related mycobacteria. Vet. Microbiol. 96, 277-287

Englund, S., Bölske, G., Ballagi-Podány, A., Johansson, K.E. (2001): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. Vet. Microbiol. 81, 257-271

Engvall, A., Larsson, B., Bölske, G., Wahlstrom, H. (1994): Sweden is free from paratuberculosis. Proceedings of the fourth International Colloquium on Paratuberculosis, Cambridge, UK, 27-31

Eriks, I.S., Munck, K.T., Besser, T.E., Cantor, G.H., Kapur, V. (1996): Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 34, 734-737

Feizabadi, M.M., Robertson, I.D., Hope, A., Cousins, D.V., Hampson, D.J. (1997): Differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* using pulse-field gel electrophoresis. Aust. Vet. J. 75, 887-889

Filliol, I., Motiwala, A.S., Cavtore, M., Qi, W., Hazbón, M.H., del Valle, M.B., Fyfe, J., García-García, L., Rastogi, N., Sola, C., Zozio, T., Guerriero, M.I., León, C.I., Crabtree, J., Angiuoli, S., Eisenach, K.D., Durmaz, R., Joloba, M.L., Rendón, A., Sifuentes-Osornio, J., de León, A.P., Cave, M.D., Fleischmann, R., Whittam, T.S., Alland, D. (2006): Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on a single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: Insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendation for a minimal standard SNP set. *J. Bacteriol.* 188, 759-772

Flebbe, U. (2002): 15 Jahre Paratuberkulosebekämpfung, Erfahrungen der Niedersächsischen Tierseuchenkasse. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 109, 520-523

Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Umayam, L.A., Ermolaeva, M., Salzberg, S.L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs, W.R. Jr., Venter, J.C., Fraser, C.M. (2002): Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* 184, 5479-5490

Fortmann, A. (1925): Die Paratuberkulose des Rindviehs. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

Francois, B., Krishnamoorthy, R., Elion, J. (1997): Comparative study of *Mycobacterium paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease and Johne's disease using restriction fragment length polymorphism and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.* 118, 227-233

Frothingham, R., und Wilson, K.H. (1993): Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.* 175, 2818-2825

Garaizar, J., Rementeria, A., Porwollik, S. (2006): DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 178-189

Gasteiner, J., Wenzl, H., Fuchs, K., Jark, U., Baumgartner, W. (1999): Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *J. Vet. Med. B* 46, 457-466

Gerlach, G.-F., und Valentin-Weigand, P. (1998): Die Paratuberkulose des Rindes: Ursache und Auswirkungen neuer Bemühungen um eine alte Erkrankung. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 111, 368-373

Ghadiali, A.H., Strother, M., Naser, S.A., Manning, E.J.B., Sreevatsan, S. (2004): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. J. Clin. Microbiol. 42, 5345-5348

Glawischnig, W., Awad-Masalmeh, M., Khaschabi, D., Schönbauer, M. (2004): Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* im Hoden eines klinisch erkrankten Zuchtstiers. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 117, 136-139

Gollnick, N.S., Mitchell, R., Baumgart, M., Janagama, H.K., Sreevatsan, S., Schukken, Y.H. (2007): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. Vet. Immunol. Immunopathol. 120, 93-105

González, J., Geijo, M.V., Garcia-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J.M., Reyes, L.E., Ferreras, M.C., Juste, R.A., Garcia Marin, J.F., Perez, V. (2005): Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J. Comp. Pathol. 133, 184-196

Goodger, W.J., Collins, M.T., Nordlund, K.V., Eisele, C., Pelletier, J., Thomas, C.B., Sockett, D.C. (1996): Epidemiological study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 1877-1881

Grant, I.R., Ball, H.J., Neill, S.D., Rowe, M.T. (1996): Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's milk at pasteurization temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 62, 631-636

Grant, I.R., Hitchings, E.L., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M.T. (2002): Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurisation on the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. Appl. Environ. Microbiol. 68, 602-607

Green, E.P., Tizard, M.L.V., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J. (1989): Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063-9073

Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines II, M. E., McKendrick, I., Sharp, J. M. (1999): Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbit in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751

Greig, A., Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A. A., Grant, J. M., Sharp, J. M. (1997): Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* 140, 141-143

Grewal, S.K., Rajeev, S., Sreevatsan, S., Michel, F.C. Jr. (2006): Persistence of *Mycobacterium avium paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 565-574

Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T., Telenti, A. (1995): A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 33, 304-307

Gutacker, M.M., Smoot, J.C., Lux Migliaccio, C.A., Ricklefs, S.M., Hua, S., Cousins, D.V., Graviss, E.A., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. (2002): Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162, 1533-1543

Hacker, U., Hüttner, K., Konow, M. (2004): Untersuchung zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 117, 140- 144

Harbottle, H., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, Zhao, S. (2006): Comparison of multilocus sequence typing, pulse-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2449-2457

Harris, N.B., und Barletta, R.G. (2001): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 489-512

Harris, N.B., Payeur, J.B., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2006): Short-sequence-repeat analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates collected from animals throughout the United States reveals both stability of loci and extensive diversity. J. Clin. Microbiol. 44, 2970-2973

Hazbón, M.H., und Alland, D. (2004): Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and other organisms. J. Clin. Microbiol. 42, 1236-1242

Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Woods, C., Versalovic, J., Lupski, J.R. (2005): Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. J. Clin. Microbiol. 43, 199-207

Hendrick, S.H., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., Bagg, R., Dick, P., Duffield, T.F. (2006): Efficacy of monensin sodium for reduction of fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected dairy cattle. Prev. Vet. Med. 75, 206-220

Hietala, S.K. (1992): The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. Vet. Med. 87, 1122-1132

Hines, S.A., Buergelt, C.D., Wilson, J.H., Bliss, E.H. (1987): Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* in a cow. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 681-683

Homuth, M. (2002): Diagnostik der Paratuberkulose. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 516-519

Huber, F. (1941): Die Paratuberkulose in Großdeutschland. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

Huda, A., und Jensen, H.E. (2003): Comparison of histopathology and cultivation of tissues and rectal contents, and interferon- γ and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. J. Comp. Pathol 129, 259-267

Huda, A., Lind, P., Christoffersen, A.B., Jungersen, G. (2003): Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN- γ) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 94, 95-103

Hunter, P.R., und Gaston, A.G. (1988): Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465-2466

Hutchinson, L.J. (1996): Economic impact of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 373-381

Inderlied, C.B., Kemper, C.A., Bermudez, L.E.M. (1993): The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 226-310

Janagama H.K., il Jeong, K., Kapur, V., Coussens, P., Sreevatsan, S. (2006): Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol.* 6, 10

Johne, H.A., und Frottingham, L. (1895): Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch. Z. Tiermed. Vergl. Path.* 21, 438-454

Johnson-Ifearegulu Y.J., und Kaneene, J.B. (1997): Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 1735-1740

Johnson-Ifearegulu Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J., Gardiner, J.C., Lloyd, J.W. (2000): The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46, 171-181

Jorgensen, J.B. (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.* 29, 267-270

Jungersen, G., Huda, A., Hansen, H.H., Lind, P. (2002): Interpretation of the Gamma Interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 9, 453-460

Juste, R.A., Marco, J.C., Saéz de Ocáriz, C. Adúriz, J.J. (1991): Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385-390

Kalis, C.H., Barkema, H.W., Hesselink, J.W., van Maanen, C., Collins, M.T. (2002): Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacement of fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Invest. 14, 219-224

Kalis, C.H.J., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., Collins, M.T. (2001): Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds. Am. J. Vet. Res. 62, 270-274

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J.D.A. (1997): Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35, 907-914

Kersulyte, D., Mukopadhyay, A.K., Velapatino, B., Su, W., Pan, Z., Garcia, C., Hernandez, V., Valdez, Y., Mistrà, R.S., Gilman, R.H., Yuan, Y., Gao, H., Alarcón, T., López-Brea, Nair, G.B., Chowdury, A., Datta, S., Shirai, M., Nakazawa, T., Ally, R., Segal, I., Wong, B.C.Y., Lam, S.K., Olfat, F.O., Borén, T., Engstrand, L., Torres, O., Schneider, R., Thomas, J.E., Czinn, S., Berg, D.E. (2000): Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. J. Bacteriol. 182, 3210-3218

Kiehnbaum, L.A., Amonsin, A., Wells, S.J., Kapur, V. (2005): Amplified fragment length polymorphism to detect clonal diversity and distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in selected Minnesota cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 311-315

Klarmann, D., Bötcher, L. Moss, A., Schöttker-Wegner, H.-H. (2007): Entwicklung des Infektionsstatus ausgewählter rinderhaltender Betriebe im Rahmen des Niedersächsischen Sanierungsverfahrens zur Bekämpfung der Paratuberkulose. Stendaler Symposium zur BHV1-, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung, 7.-9.3.2007, Stendal

Klawonn, W., Dräger, K., Köhler, H., Labohm, R. (2007): Paratuberkulosebekämpfung – Erste Erfahrungen mit dem inaktivierten Impfstoff SILIRUM®. 6. Stendaler Symposium zur BHV1-, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung, 7.-9.3.2007, Stendal

Klawonn, W., Cußler, K., Dräger, K.G., Gyra, H., Köhler, H., Zimmer, K., Heß, R.G. (2002): Zur Bedeutung von allergischem Hauttest mit Johnin, Antikörper-ELISA, kultureller Kotuntersuchung sowie der Impfung für die Sanierung dreier chronisch Paratuberkulose-infizierter Milchviehherden in Rheinland-Pfalz. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 510-516

Köhler, H. (2007): Paratuberkulose. Tiergesundheitsjahresbericht 2006 des Friedrich-Loeffler-Instituts, 84-87

Köhler, H., und Gierke, F. (2006): Ist die Flüssigkultur die Methode der Wahl für die Anzucht von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aus Kotproben von Rindern? Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, 11./12.10.2006, Jena

Köhler, H., Burkert, B., Pavlik, I., Diller, R., Geue, L., Conraths, F.J., Martin, G. (2008): Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine serum. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 121, 203-210

Köhler, H., Conraths, F.J., Geue, L. (2005): Epidemiologie, Diagnostik und Bekämpfung der Paratuberkulose. Tierärztl. Umschau 60, 492-497

Koo, H.E., Park, Y.H., Hamilton, M.J., Barrington, G.M., Davies, C.J., Kim, J.B., Dahl, J.L., Waters, W.R., Davis, W.C. (2004): Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected calves. Infect. Immun. 72, 6870-6883

Kopecky, K.E., Larsen, A.B., Merkal, R.S. (1967): Uterine infection in bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 28, 1043-1045

Körmendy, B. (1994): The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. Vet. Microbiol. 41, 117-125

Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakus, M.A., Musser, J.M., van Embden, J.D.A. (1999): Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J. Clin. Microbiol. 37, 2607-2618

- Kunimoto, D.Y., Pepler, M.S., Talbot, J., Phillips, P., Shafran, S.D., Canadian HIV Trials Network Protocol 010 Study Group (2003): Analysis of *Mycobacterium avium* complex isolates from blood samples of AIDS patients by pulse-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41, 498-499
- Kunze, Z.M., Portaels, F., McFadden, J.J. (1992): Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. J. Clin. Microbiol. 30, 2366-2372
- Kunze, Z.M., Wall, S., Appelberg, R., Silva, M.T., Portaels, F., McFadden J.J. (1991): IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. Mol. Microbiol. 5, 2265-2272
- Lambrecht, R.S., Carriere, J.F, Collins, M.T. (1988): A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp.. Appl. Environ. Microbiol. 54, 910-916
- Larsen, A.B., und Moon, H.W. (1972): Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. Am. J. Vet. Res. 33, 1231-1235
- Larsen, A.B., Merkal, R.S., Cutlip, R.C. (1975): Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 35, 255-257
- Larsen, A.B., Moon, H.W., Merkal, R.S. (1971): Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 32, 589-595
- Larsen, A.B., Moon, H.W., Merkal, R.S. (1972): Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 33, 2185-2189
- Lévy-Frébault, V.V., Thorel, M.-F., Varnerot, A., Gicquel, B. (1989): DNA polymorphism in *Mycobacterium paratuberculosis*, "Wood pigeon mycobacteria" and related mycobacteria analyzed by field inversion gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 27, 2823-2826
- Li, J., Musser, J.M., Beltran, P., Kline, M.W., Selander, R.K. (1990): Genotypic heterogeneity of strains of *Citrobacter diversus* expressing a 32-Kilodalton outer membrane protein associated with neonatal meningitis. J. Clin. Microbiol. 28, 1760-1765

- Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D., Banerji, N.B., Kanjilal, S., Kapur, V. (2005): The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 12344-12349
- Lupski, J.R., und Weinstock, G.M. (1992): Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J. Bacteriol. 174, 4525-4529
- Luyven, G., vom Schloss, A., Saßerath, M. (2002): Paratuberkulosesanierung in Nordrhein-Westfalen. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 524-527
- Machackova, M., Svastova, P., Lamka, J., Parmova, I., Liska, V., Smolik, J., Fischer, O.A., Pavlik, I. (2004): Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). Vet. Microbiol. 101, 225-234
- Machackova-Kopečna, M., Bartos, M., Straka, M., Ludvik, V., Svastova, P., Alvarez, J., Lamka, J., Trcka, I., Tremel, F., Parmova, I., Pavlik, I. (2005): Paratuberculosis in one red deer farm studied by IS900 and IS901 RFLP analysis. Vet. Microbiol. 105, 261-268
- Mahillon, J., und Chandler, M. (1998): Insertion sequences. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 725-774
- Mahmoud, O.M., Haroun, E.M., Elfaki, M.G., Abbas, B. (2002): Pigmented paratuberculosis granulomata in the liver of sheep. Small Rumin. Res. 43, 211-217
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtmann, M., Spratt, B.G. (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 3140-3145
- Manning, E.J.B., und Collins, M.T. (2001): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. - Off. Int. Epizoot. 20, 133-150
- Marsh, I., Whittington, R., Cousins, D. (1999): PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. Mol. Cell. Probes 13, 115-126

- Marsh, I.B., Bannantine, J.P., Paustian, M.L., Tizard, M.L., Kapur, V., Whittington, R.J. (2006): Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. *J. Bacteriol.* 188, 2290-2293
- Martinson, S.A., Hanna, P.E., Ikede, B.O., Lewis, J.P., Miller, L.M., Keefe, G.P., McKenna, S.L.B. (2008): Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 51-57
- Mazurek, G.H., Hartmann, S., Zhang, Y., Brown, B.A., Hector, J.S.R., Murphy, D., Wallace, R.J. Jr. (1993): Large DNA restriction fragment polymorphism in the *Mycobacterium avium* - *Mycobacterium intracellulare* complex: a potential epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.* 31, 390-394
- McClure, H.M., Chiodini, R.J., Anderson, D.C., Swenson, R.B., Thayer, W.R., Coutu, J.A. (1987): *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J. Inf. Dis.* 155, 1011-1019
- McDonald, M., Dougall, A., Holt, D., Huygens, F., Oppedisano, F., Giffard, P.M., Inman-Bamber, J., Stephens, A.J., Towers, R., Carapetis, J.R., Currie, B.J. (2006): Use of a single-nucleotide polymorphism genotyping system to demonstrate the unique epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in remote aboriginal communities. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3720-3727
- McDonald, W.L., Ridge, S.E., Hope, A.F., Condon, R.J. (1999): Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J.* 77, 113-119
- Merkal, R.S. (1973): Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163, 1100-1102
- Merkal, R.S. (1979): Proposal of ATCC 19698 as the neotype strain of *Mycobacterium paratuberculosis* Bergey et al. 1923. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29, 263-264
- Merkal, R.S., und Curran, B.J. (1974): Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.* 28, 276-279
- Mießner und Trapp (1910): Der chronische infektiöse Darmkatarrh des Rindes. Enteritis chronica infectiosa bovis. *Berl. Tierärztl. Wochenschr.* 30, 593-595

- Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., van der Laan, T., Rigouts, L., Portaels, F., van Soolingen, D. (2002): Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1505-1518
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J. (1996): IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3446-3452
- Möbius, P., Luyven, G., Hotzel, H., Köhler, H. (2008): High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains of German cattle herds shown by combination of IS900 RFLP analysis and MIRU-VNTR typing. *J. Clin. Microbiol.* 46, 972-981
- Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F. (1988): Role of M Cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* 25, 131-137
- Moreira, A. R., Paolicchi, F., Morsella, C., Zumarraga, M, Cataldi, A., Bigi, F., Alito, A., Overduin, P., van Soolingen, D., Romano, M.I. (1999): Distribution of IS900 restriction fragment polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet. Microbiol.* 70, 251-259
- Moss, M.T., Malik, Z.P., Tizard, M.L.V., Green, E.P., Sanderson, J.D., Hermon-Taylor, J. (1992): IS902, an insertion element of the chronic-enteritis-causing *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 139-145
- Motiwala, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J.B., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2004): Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1703-1712
- Motiwala, A.S., Janagama, H.K., Paustian, M.L., Zhu, X., Bannantine, J.P., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2006)a: Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect. Immun.* 74, 6064-6056
- Motiwala, A.S., Li, L., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2006)b: Current understanding of genetic diversity of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Microbes Infect.* 8, 1406-1418

Motiwala, A.S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S.A., Stable, J.R., Shulaw, W.P., Bannantine, J.P., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2003): Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Evidence of limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2015-2026

Motiwala, A.S., Strother, M., Theus, N.E., Stich, R.W., Byrum, B., Shulaw, W.B., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2005): Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from broth cultures. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2111-2117

Mura, M., Bull, T.J., Evans, H., Sidi-Boumedine, K., McMinn, L., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2006): Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 854-859

Naser, S.A., Gillespie, R.F., Naser, N.A., El-Zaatari, A.K. (1998): Effect of IS900 gene of *Mycobacterium paratuberculosis* on *Mycobacterium smegmatis*. *Curr. Microbiol.* 37, 373-379

Neis, C., Rohde, J., Valentin-Weigand, P., Baums, C. (2007): Untersuchung einer möglichen *Streptococcus suis*-Infektionskette in einer Schweineerzeugergemeinschaft mittels PCR-gestützter Genotypisierung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 120, 202-206

Nordlund, K.V., Goodger, W.J., Pelletier, J., Collins, M.T. (1996): Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1872-1876

O'Brien, R., Mackintosh, C.G., Bakker, D., Kopecna, M., Pavlik, I., Griffin, J.F.T. (2006): Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the red deer (*Cervus elaphus*). *Infect. Immun.* 74, 3530-3537

O'Shea B., Khare, S., Bliss, K., Klein, P., Ficht, T.A., Adams, L.G., Rice-Ficht, A.C. (2004): Amplified fragment length polymorphism reveals genomic variability among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3600-3606

Olive, D.M., und Bean, P. (1999): Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1661-1669

- Oliveira, R.S., Sircili, M.P., Oliveira, E.M.D., Balian, S.C., Ferreira-Neto, J.S., Lealo, S.C. (2003): Identification of *Mycobacterium avium* genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-based restriction fragment length polymorphism and restriction analysis of *hsp65*. J. Clin. Microbiol. 41, 44-49
- Olsen, I., Sigurgardottir, G., Djonne, B. (2002): Paratuberculosis with special references to cattle. A review. Vet. Q. 24, 12-28
- Overduin, P., Schouls, L., Roholl, P., van der Zanden, A., Mahmmod, N., Herrewegh, A., van Soelingen, D. (2004): Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 42, 5022-5028
- Palmer, M.V., Stoffregen, W.C., Carpenter, J.G., Stabel, J.R. (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from feral cats on a dairy farm with *M. paratuberculosis*-infected cattle. J. Wildl. Dis. 41, 629-635
- Parrish, N.M., Ko, C.G., Dick, J.D., Jones, P.B., Ellingson, J.L.E. (2004): Growth, congo red agar colony morphotypes and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Clin. Med. Res. 2, 107-114
- Paustian, M.L., Amonsin, A., Kapur, V., Bannantine, J.P. (2004): Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Implications for diagnosis of Johne's disease. J. Clin. Microbiol. 42, 2675-2681
- Paustian, M.L., Kapur, V., Bannantine, J.P. (2005): Comparative genomic hybridizations reveal genetic regions within the *Mycobacterium avium* complex that are divergent from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. J. Bacteriol. 187, 2406-2415
- Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R., Machackova, M., Ayele, Y.W., Horvathova, A. (2000): Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech republic during the period 1995-1998. Vet. Microbiol. 77, 231-251
- Pavlik, I., Bejcková, L., Pavlas, M., Rozsypalová, Z., Kosková, S. (1995): Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. Vet. Microbiol. 45, 311-318

- Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., Rychlik, I. (1999): Standardization of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods 38, 155-167
- Pelludat, C., Prager, R., Tschäpe, H., Rabsch, W., Schuchhardt, J., Hardt, W.-D. (2005): Pilot study to evaluate microarray hybridization as a tool for *Salmonella enterica* serovar typhimurium strain differentiation. J. Clin. Microbiol. 43, 4092-4106
- Pemberton, D.H. (1979): Diagnosis of Johne's disease in cattle using mesenteric lymph node biopsy: accuracy in clinical suspects. Aust. Vet. J. 55, 217-219
- Pérez, V., Tellechea, J., Badiola, J.J., Gutiérrez, M., García Marín, J.F. (1997): Relation between serological response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 58, 799-803
- Pfaller, S.L., Aronson, T.W., Holtzmann, A.E., Covert, T.C. (2007): Amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* complex isolates recovered from southern California. J. Med. Microbiol. 56, 1152-1160
- Pillai, S.R., Jayarao, B.M., Gummo, J.D., Hue, E.C. Jr., Tiwari, D., Stabel, J.R., Whitlock, R.H. (2001): Identification and sub-typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* by randomly amplified polymorphic DNA. Vet. Microbiol. 79, 275-284
- Pohlenz, J. (1991): Krankheiten der Verdauungsorgane. Schulz, L.C.: Pathologie der Haustiere Band 1, 1. Auflage, Verlag Gustav Fischer, Jena, 312-313
- Poupart, P., Coene, M., van Heuverswyn, Cocito, C. (1993): Preparation of a specific RNA probe for detection of *M. paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. J. Clin. Microbiol. 31, 1601-1605
- Ramette, A. (2007): Multivariate analyses in microbial ecology. FEMS Microbiol. Ecol. 62, 142-160
- Rankin, J.D. (1955): An attempt to prevent the establishment of *Mycobacterium paratuberculosis* in calves by means of isoniazid alone and in combination with streptomycin. Vet. Rec. 67, 1105-1107

Rankin, J.D. (1956): Identification of a strain of *Mycobacterium johnei* recovered from a horse. J. Pathol. Bacteriol. 72, 689-690

Rankin, J.D. (1970): Die Paratuberkulose in: Meißner, G., Schmiedel, A.: Bovine Tuberkulose, aviäre Tuberkulose und andere Mykobakteriosen. Teil VII aus Band 4: Mykobakterien und mykobakterielle Krankheiten der Monographiensammlung: Infektionskrankheiten und ihre Erreger. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 323-354

Reboli, A.C., Houston, E.D., Monteforte, J.S., Wood, C.A., Hamill, R.J. (1994): Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 32, 2635-2640

Richardson, B.A., und Overbaugh, J. (2005): Basic statistical considerations in virological experiments. J. Virol. 79, 669-676

Ris, D.R., Hamel, K.L., Ayling, J.M. (1988): The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. N.Z. Vet. J. 36, 112-114

Rohde, R.F., und Shulaw, W.P. (1990): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 1482-1483

Romano, M.I., Amadio, A., Bigi, F., Klepp, L., Etchechoury, I., Noto Llana, M., Morsella, C., Paolicchi, F., Pavlik, I., Bartos, M., Leao, S.C., Cataldi, A. (2005): Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. Vet. Microbiol. 110, 221-237

Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S., Skuce, R. (2002): Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 40, 2126-2133

Rossiter, C. A., und Burhans, W. S. (1996): Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 383-415

Rowe, M.T., und Grant, I.R. (2006): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. Lett. Appl. Microbiol. 42, 305-311

Saunders, V.F., Eamens, G.J., Turner, M.J., Jessep, T.M. (2003): Identification of a new RFLP type of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in epidemiological tracing of bovine Johne's disease. Aust. Vet. J. 81, 564-566

Savelkoul, P.H.M., Aarts, H.J.M., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L.W., Schouls, L., Lenstra, J.A. (1999): Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J. Clin. Microbiol. 37, 3083-3091

Saxegaard, F., und Baess, I. (1988): Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and wood pigeon mycobacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 96, 37-42

Saxegaard, F., Baess, I., Jantzen, E. (1988): Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. APMIS 96, 497-502

Scheibl, P., und Gerlach, G.-F. (1997): Differentiation of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates by rDNA-spacer analysis and random amplified polymorphic DNA patterns. Vet. Microbiol. 51, 151-158

Schrauder, A., Ammon, A., Stark, K., Euler, U., Bräunig, J., Weise, E. (2004): Morbus Crohn und *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* – eine Literaturstudie. Robert-Koch-Institut und Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
>>www.bgvv.de/cd/3862?index=77&index_id=5196<<

Schwartz D.C., und Cantor, C.R. (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75

Schwarz, S., Blickwede, M., Kehrenberg, C., Michael, G.B. (2003): Phänotypische und genotypische Verfahren zur Typisierung veterinärmedizinisch relevanter bakterieller Erreger im Rahmen infektionsepidemiologischer Fragestellungen, dargestellt am Beispiel von Bakterien der Genera *Staphylococcus*, *Salmonella* und *Pasteurella*. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 116, 401-416

- Seitz, S.E., Heider, L.E., Hueston, W.D., Bech-Nielsen, S., Rings, D.M., Spangler, L. (1989): Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Assoc. 194, 1423-1426
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S. (1986): Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51, 873-884
- Semret, M., Turenne, C.Y., de Haas, P., Collins, D.M., Behr, M.A. (2006): Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 44, 881-887
- Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., Juste, R.A. (2007): Pulse-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. BMC Microbiol. 7, 18
- Sevilla, I., Singh, S.V., Garrido, J.M., Aduriz, G. Rodríguez, S., Geijo, M.V., Whittington, R.J., Saunders, V., Whitlock, R.H., Juste, R.A. (2005): Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. Rev. - Off. Int. Epizoot. 24, 1061-1066
- Sherman, D.M., Markham, J.F., Bates, F. (1984): Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 185, 179-182
- Shitaye, J.E., Matlova, L., Horvathova, A., Moravkova, A., Dvorska-Bartosova, L., Tremel, F., Lamka, J., Pavlik, I. (2008): *Mycobacterium avium* subsp. *avium* distribution studied in a naturally infected hen flock and in the environment by culture, serotyping and IS901 RFLP methods. Vet. Microbiol. 127, 155-164
- Singh, S.V., Singh, P.K., Singh, A.V., Sohal, J.S., Gupta, V.K., Vihan, V.S. (2007): Comparative efficacy of an indigenous 'inactivated vaccine' using highly pathogenic field strain of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' with a commercial vaccine for the control of Capri-paratuberculosis in India. Vaccine 25, 7102-7110
- Smithwick, R.W., Bigbie, M.R. Jr., Ferguson, R.B., Karlix, M.A., Wallis, C.K. (1995): Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 33, 2763-2764

Sockett, D.C. (1996): Johne's disease eradication and control: regulatory implications. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 431-440

Sockett, D.C., Carr, D.J., Collins, M.T. (1992)a: Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 148-153

Sockett, D.C., Conrad, T.A., Thomas, C.B., Collins, M.T. (1992)b: Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134-1139

Soini, H., und Musser, J.M. (2001): Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin. Chem.* 47, 809-814

Song, J., Xu, J., White, S., Miller, K.W.P., Wolinsky, M. (2005): SNPsFinder – a web-based application for genome-wide discovery of single nucleotide polymorphisms in microbial genomes. *Bioinformatics* 21, 2083-2084

Spahr, U., und Schafroth, K. (2001): Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4199-4205

St. Jean, G. (1996): Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 417-430

Stabel, J.R. (1998): Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci.* 81, 283-288

Stabel, J.R., und Bannantine, J.P. (2005): Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, *ISMap02*, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4744-4750

Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, M. (2002): Molecular characterization of pigmented and non-pigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804

Stratmann, J., Homuth, M., Gerlach, G.-F. (2005): Überlegungen zur Kontrolle und Bekämpfung der Paratuberkulose in Milchviehbeständen. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 112, 304-306

Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P., Rings, D.M. (1995): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Vet. Res. 56, 1322-1324

Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G.-F. (2001): Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. 196, 31-37

Sugden, E.A., Samagh, B.S., Bundle, D.R., Duncan, R. (1987): Lipoarabinomannan and lipid-free arabinomannan antigens of *Mycobacterium paratuberculosis*. Infect. Immun., 55, 762-770

Sung, N., und Collins, M.T. (2000): Effect of three factors in cheese production (pH, salt, heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1334-1339

Sung, N., und Collins, M.T. (2003): Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6833-6840

Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., Locht, C. (1997): Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component operon. Mol. Microbiol. 26, 991-1003

Supply, P., Mazars E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C. (2000): Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol. Microbiol. 36, 762-771

Sweeney, R.W. (1996): Transmission of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 305-312

Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A. (1992)a: Isolation of *M. paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. Am. J. Vet. Res. 53, 1312-1314

Sweeney, R.W., Whitlock, R. H., Rosenberger, A.E. (1992)b: *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetus of infected cows not manifestings signs of the disease. Am. J. Vet. Res. 53, 477-480

Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A. E. (1992)c: *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin. Microbiol. 30, 166-171

Takahashi, S., und Nagano, Y. (1984): Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. J. Clin. Microbiol. 20, 608-613

Taylor, A.W. (1951): Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. J. Pathol. Bacteriol. 63, 333-336

Taylor, T.K., Wilks, C.R., McQueen, D.S. (1981): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec. 109, 532-533

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E.C., Bodmer, T. (1993): Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 31, 175-178

Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Herbert, A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth, B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, L.K., Miller, J.M., Mulligan, M., Pfaller, M.A. (1994): Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 32, 407-415

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R., Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America (1997): How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. Infect. Contr. Hosp. Epidemiol. 18, 426-439

Thibault, V.C., Grayon, M., Boschioli, M.L., Hubbans, C., Overduin, P., Stevenson, K., Gutierrez, M.C., Supply, P., Biet, F. (2007): New variable-number tandem repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: Comparison with IS900 und IS1245 restriction fragment polymorphism typing. J. Clin. Microbiol. 45, 2404-2410

- Thong, K.-W., Cheong, Y.-M., Puthucheary, S., Koh, C.-L., Pang, T. (1994): Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulse-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1135-1141
- Thorel, M.-F. (1984): Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species. *Ann. Rech. Vét.* 15, 405-409
- Thorel, M.-F., Krichevsky, M., Lévy-Frébault, V.V. (1990): Numeral taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 254-260
- Thoresen, O.F., und Olsaker, I. (1994): Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 293-303
- Tiwari, A., van Leeuwen, J.A., McKenna, S.L.B., Keefe, G.P., Barkema, H.W. (2006): Johne's disease in Canada Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet. J.* 47, 874-882
- Tizard, M.L.V., Moss, M.T., Sanderson, J.D., Austen, B.M., Hermon-Taylor, J. (1992): P43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1729-1736
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitrou, Dawkins, H.J.S. (1998): Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1096-1100
- Troesch, A., Nguyen, H., Miyada, C.G., Desvarenne, S., Gingeras, T.R., Kaplan, P.M., Cros, P., Mabilat, C. (1999): *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J. Clin. Microbiol.* 37, 49-55
- Turenne, C., Wallace, R. Jr., Behr, M.A. (2007): *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 205-229

Turenne, C.Y., Semret, M., Cousins, D.V., Collins, D.M., Behr, M.A. (2006): Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. J. Clin. Microbiol. 44, 433-440

Twort, F.W., und Ingram, G.L.Y. (1912): A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, *Johne*, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 84, 517-43

Upholt, W.B. (1977): Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. Nucleic Acids Res. 4, 1257-1265

Valentin-Weigand, P. (2002): Pathomechanismen und Immunreaktionen bei der Paratuberkulose. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 507-509

Valentin-Weigand, P. (2004): Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 117, 459-463.

Valentin-Weigand P., und Goethe, R. (1999): Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. Microbes Infect. 1, 1121-1127

Van Belkum, A. (1994): DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin. Microbiol. Rev. 7, 174-184

Van Belkum, A. (1999): The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. Curr. Opin. Microbiol. 2, 306-311

Van Belkum, A. (2007): Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol. Med. Microbiol. 49, 22-27

Van Belkum, A., Scherer, S., D., van Alphen, L., Verbrugh, H. (1998): Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 275-293

- Van Belkum, A., Scherer, S., van Leeuwen, W., Willems, D., van Alphen, L., Verbrugh, H. (1997): Variable number tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 65, 5017-5027
- Van Boxtel, R.M., Lambrecht, R.S., Collins, M.T. (1990): Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*. *APMIS* 98, 901-908
- Van der Giessen, J.W.B., Haring, R.M., Vauclare, E., Eger, A., Haagsma, J., van der Zeijst, B.A.M. (1992): Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: Application in a control program. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1216-1219
- Van Soolingen, D. (2001): Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 249, 1-26
- Van Soolingen, D., de Haas, P.E.W., Hermans, P.W.M., Groenen, P.M.A., van Embden, J.D.A. (1993): Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1987-1995
- Van Soolingen, D., de Haas, P.E.W., Hermans, P.W.M., van Embden, J.D.A. (1994): DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 235, 196-205
- Vansnick, E., de Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F. (2004): Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 100, 197-204
- Vary, P.H., Andersen, P.R., Green, E., Hermon-Taylor, J., McFadden, J.J. (1990): Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 28, 933-937
- Versoalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 19, 6823-6831

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, 4407-4414

Wards, B. J., Collins, D. M., de Lisle, G. W. (1987): Restriction endonuclease analysis of members of the *Mycobacterium avium*- *M. intracellulare*- *M. scrofulaceum* serocomplex. *J. Clin. Microbiol.* 25, 2309-2313

Weber, A., Gürke, R., Bauer, K., Schreyer, K. (1992): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Mycobacterium paratuberculosis* in Kotproben von Zoowiederkäuern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 105, 161-164

Welsh, J., und McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18, 7213-7218

Whan, L., Grant, I.R., Rowe, M.T. (2006): Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol.* 6, 63

Whan, L.B., Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R., Rowe, M.T. (2001): Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 227-231

Whipple, D.L., Callihan, D.R., Jarnagin, J. L. (1991): Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 368-373

Whipple, D.L., Kapke, D.A., Andrews, R.E. Jr. (1989): Analysis of restriction endonuclease patterns of DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 19, 189-194

Whipple, D., Kapke, P., Vary, C. (1990): Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561-2564

Whipple, D.L., le Febvre, R.B., Andrews, R.E. Jr., Thiermann, A.B. (1987): Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from *Mycobacterium paratuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1511-1515

- Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., van Thiem, J. (2000): ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity for each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387-398
- Whittington, R.J., Marsh, I., Turner, M.J., McAllister, S., Choy, E., Eamens, G.J., Marshall, J., Ottaway, S. (1998)a: Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 701-707
- Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I. (2000): Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3240-3248
- Whittington, R.J., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D. (1998)b: Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within this species. *Mol. Cell. Probes* 12, 349-358
- Whittington, R.J., Marsh, I.B., Whitlock, R.H. (2001)a: Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domestic livestock. *Mol. Cell. Probes* 15, 139-145
- Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B., Reddacliff, L.A. (2004): Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2989-3004
- Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., Fridiksdottir, V. (2001)b: Molecular epidemiological confirmation and occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet. Microbiol.* 79, 311-322
- Wild, I.J.F., Werely, C., Beyers, N., Donald, P., van Helden, P.D. (1994): Oligonucleotide (GTG)₅ as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1318-1321

Williams, J.G.K., Kubeklik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18, 6531-6535

Winstanley, C. (2002): Spot the difference: Applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. J. Med. Microbiol. 51, 459-467

Zimpernik, I., Awad-Masalmeh, M., Baumgartner, W. (1999): Zur Typisierung von *Mycobacterium-avium*-subspecies-*paratuberculosis*-Stämmen isoliert aus Wiederkäuern in Österreich mittels RAPD. Tierärztl. Umschau 54, 335-338

Anhang

1. Erfassung der Informationen zu den *M. paratuberculosis*-Isolaten

Fragebogen – Teil I

Kennzeichnung der Probe: _____

Angaben zur Probe:

Herkunft der Probe: _____

Bundesland: _____ Landkreis: _____ Ort: _____

Betriebsart: _____ Bestandsgröße: _____

Art der Probe: Kotprobe Organmaterial

Klinischer Verdachtsfall? nein
 ja, mit folgenden klinischen Erscheinungen _____

_____ und seit wann _____

Problemmahme im Rahmen eines Bekämpfungsprogramms? nein, ja

Angaben zum Tier:

Tierart: _____ Kennzeichnung (Ohrmarke): _____

Alter: _____ Geschlecht: _____

Nutzung: Milchkuh Mutterkuh Zuchtbulle

zugekauft? nein
 ja, wenn ja, woher _____ und in welchem Alter _____

Angaben zum Bestand:

Sind weitere Tiere betroffen? nein, ja

Ist Paratuberkulose ein Problem im Bestand? nein, ja

Fragebogen – Teil II

Kennzeichnung der Probe: _____

Pathologischer Befund:

Äußere Besichtigung

Ernährungszustand: _____

Äußere Hinweise auf Durchfall? nein, ja

Makroskopie:

Welche Darmabschnitte sind betroffen, und welche Veränderungen liegen vor?

Welche Lymphknoten sind betroffen, und welche Veränderungen liegen vor?

Sonstige Veränderungen?

Histologie:

Nachweis von säurefesten Stäbchen in der Darmschleimhaut? ja nein

Nachweis von säurefesten Stäbchen in den Darmlymphknoten? ja nein

Histologische Veränderungen?

Abbildung 12: Fragebogen zur Erfassung von Informationen zu den einzelnen *M. paratuberculosis*-Isolaten

2. Durchführung des IS900 RFLP

Tabelle 20: Mengen- und Zeitangaben zur Durchführung des IS900 RFLP

Schritt	verwendete Lösung	Menge pro Probe bzw. Gel/Membran (Inkubationszeit)
DNA-Isolierung	1x TE-Puffer	500 µl
	Lysozymlösung	50 µl
	SDS/Proteinase K- Gemisch	75 µl
	5 M NaCl-Lösung	je 100 µl (10 min bei 65 °C)
	CTAB/NaCl	
	Chloroform/Isoamylalkohol	750 µl
	Isopropanol	1 ml (30 min bei -20 °C)
	70% Ethanol	1 ml
	A. bidest	55 µl
	Blotten	0,25 N HCl
0,5 N NaOH		400 ml
10x SSC-Puffer		1,5 l
2x SSC-Puffer		400 ml
Hybridisierung und Nachweis	Prähybridisierungslösung	100 ml
	Hybridisierungslösung	40 ml
	2x SSC-Puffer mit 0,1% SDS	2x 200 ml
	0,1x SSC mit 0,1% SDS	2x 200 ml
	Waschpuffer	100 ml (5 min)
	Blockierungslösung	250 ml (30 min)
	Antikörperlösung	50 ml
	Waschpuffer	2x 200 ml (je 15 min)
	Detektionspuffer	40 ml (5 min)
	CSPD-Lösung	10 ml (5 min)

2.1. PCR zur Herstellung der DNA-Sonde innerhalb des IS900

Mastermix

2 µl Puffer 10x (15 mmol MgCl₂)

2 µl DIG-DNA-Labeling-Mix (10x)

0,5 µl Primer Kunze F (20 pmol/µl)

0,5 µl Primer Kunze R (20 pmol/µl)

0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U/µl)

PCR-Profil

Schritt-Nr.	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	94 °C	30 s
2	Denaturierung	94 °C	30 s
3	Annealing	68 °C	30 s
4	Elongation	72 °C	2,5 min
5	terminale Elongation	72 °C	5 min

Die Schritte 2-4 werden 28x wiederholt.

Tabelle 21: Abweichungen vom DIG Luminescent Detection Kit®

Schritt /Lösung	Oldenburg	DIG Luminescent Detection Kit®
Hybridisierungslösung	1 µl Sonde/ml Hybridisierungspuffer	2 µl Sonde/ml Hybridisierungspuffer
Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure, 1,15 M NaCl, 0,2% Tween 20	0,1 M Maleinsäure, 1,15 M NaCl, 0,3% Tween 20
Blockierungslösung	Ansatz mit Waschpuffer	Ansatz mit Waschpuffer ohne Tween 20
Verdünnung der Antikörperlösung	1:5000	1:10000
alle Schritte	Durchführung im Hybridisierungsbeutel	bis auf CSPD-Inkubation Durchführung in Plastikschaalen

3. Verwendete Lösungen und Nährmedien

3.1. Loci-PCR

5x TBE-Puffer (450 mM Tris-borat, 10 mM EDTA, pH 8,3)

Tris-base	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA	3,75 g
A. dem.	ad 1 l

3.2. IS900 RFLP

DNA-Isolierung

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl-Lösung (10% CTAB, 0,73 M NaCl)

NaCl	4,1 g
CTAB	10 g
A. dem.	ad 100 ml

30 Minuten bei 65 °C lösen

NaCl-Lösung (5 M)

NaCl	29,2 g
A. dem.	ad 100 ml

Sodiumdodecylsulfat (SDS)/Proteinase K-Gemisch

Proteinase K (12,5 mg/ml)	5 µl
SDS-Lösung (10%ig)	70 µl

Frisch ansetzen

10x TE-Puffer (100 mM Tris-base, 10 mM EDTA, pH 8,0)

Tris-base	1,21 g
EDTA	0,372 g
A. dem.	ad 100 ml

Elektrophorese und Southern Blot

Längenstandard III/Loading dye-Gemisch

Längenstandard III/digoxigeninmarkiert	500µl
Loading dye	50 µl

Anhang

6x Loading buffer (0,25% Bromphenolblau, 40% Sacharose)

Bromphenolblau	0,25g
Sacharose	40g
A. dem.	ad 100 ml

20x SSC-Puffer Stammlösung (3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7)

NaCl	175,3 g
Natriumcitrat	88,2 g
A. dem.	ad 1 l

pH 7 mit HCl einstellen, autoklavieren

Hybridisierung und Nachweis

Antikörperlösung (Verdünnung 1:5000)

Anti-DIG-AP-Konjugat	10 µl
Blockierungslösung	50 ml
Frisch herstellen	

Blockierungslösung (1% Blockierungsreagenz)

Blockierungsstammlösung (10%ig)	30 ml
Waschpuffer	270 ml

10 min vor Gebrauch immer frisch herstellen.

CSPD-Lösung (Verdünnung 1:100)

CSPD	100 µl
Detektionspuffer	10 ml
Frisch ansetzen	

Detektionspuffer (100 mM Tris-base, 100 mM NaCl, pH 9,5)

Tris-base	2,42 g
NaCl	1,17
A. dem.	ad 200 ml

pH 9,5 mit HCl oder NaOH einstellen

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung	40 ml
Sonde	20 µl

Prähybridisierungslösung (5x SSC-Puffer, 0,1% Natriumlauroylsarkosinat, 0,02% SDS, 1% Blockingreagenz)

20x SSC-Puffer	25 ml
Natriumlauroylsarkosinat	0,1 g
SDS-Lösung (10%ig)	200µl
Blockierungsstammlösung (10%ig)	10 ml
A. dem.	ad 100 ml

bei Raumtemperatur 5 h lösen

2x SSC-Puffer (mit 0,1% SDS)

20x SSC-Puffer	50 ml
SDS-Lösung (10%ig)	5 ml
A. dem.	ad 500 ml

bei Bedarf erwärmen

0,1x SSC-Puffer (mit 0,1% SDS)

20x SSC-Puffer	2,5 ml
SDS-Lösung (10%ig)	5 ml
A.dem.	ad 500 ml

Waschpuffer (100 mM Maleinsäure, 1,15 M NaCl, 0,2% Tween 20, pH 7,5)

Maleinsäure	11,6 g
NaCl	66,7 g
Tween 20	2 ml
A. dem.	ad 1 l

pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren
bei 4 °C sechs Monate haltbar

3.3. Kulturmorphologische Untersuchung

Herrold's Egg-Yolk-Agar mit Mycobactin J

Pepton tryptisch verdaut	9,0 g
NaCl	4,5 g
Agar-Agar	9,0 g
Fleischextrakt	2,7 g
Glycerin	25,0 g
A. dem.	870 ml

- pH 7,3 mit 1M NaOH einstellen
- 15 min bei 121 °C autoklavieren
- auf 56 °C abkühlen und folgende Substanzen zugeben:

Natriumpyruvat	4,0 g
Cycloheximid	750 mg
Chloramphenicol	50 mg
Penicillin G	200000 I.E.
Mycobactin J	2 mg
Dotter von Hühnereiern	6
Malachitlösung (2%ig)	5,1 ml

Herrold's Egg-Yolk-Agar ohne Mycobactin J

Dieser Nährboden entspricht dem oben beschriebenen, allerdings ohne Mycobactin-J-Zugabe.

PBS-Puffer (0,05M, pH 7,6)

NaCl	1,305 g
NaH ₂ PO ₄	0,593
A. dem.	ad 1 l

autoklavieren

4. Primer und PCR-Produktgrößen

Die Primer wurden von der Firma Tib-Molbiol, Berlin bezogen.

4.1. Loci-PCR nach Bull et al., 2000

Primer:

IS9R: ACg CTg TCT ACC ACC CCg CA	Loc 3R: CgC ggA Cag ACA Cag gTA gg
IS9L: ACC ACA TgA Aag CCA TAC CC	Loc 3L: ACA ATT Cgg CgA TCg TCT Cg
Loc 1R: CCA CCC TCg TTC Cgg TCg Tg	Loc 4R: TAT TCg ggg TTg TTC Agg gA
Loc1 L: CCC gTg ACA Agg CCg Aag A	Loc 4L: CCG CAA gTA gTg CAC TAT gg
Loc 2R: gTC gAC CAT CgC TCT TCC CT	Loc 5R: gAC AAT CTg CCg TCg TAT CA
Loc 2L: ATC ggT gTC gAg gAC ATT CC	Loc 5L: TCC Cgg TAg Aag ATC ATg Tg

Anhang

Loc 6R: CTA Cgg Tgg CCA gCg TTT CT

Loc 6L: ggT Tgg AgA CAA CCT CgT TC

Loc 7R: TCC TCg ACg TgC TCg Tgg AA

Loc 7L: gTg ACC ggA ATC ATC TTg CTg

Loc 8R: Tgg gCC TgA ggT Cag AAC CA

Loc 8L: gAA gAC CAC CTC TAC CTC AC

Loc 9R: TgA gCT CgC Cgg CgA AAT A

Loc 9L: Cgg CCC Tgg CgT TCC TAT g

Loc 10R: AgC TgC Cgg gAg TTg ATC T

Loc 10L: TCA Cgg CTC ACC gCA CgC T

Loc 11R: CgT gAC gAA CgA CAT gTg TT

Loc 11L: gCT CgA gAC ATT Tag CCC AC

Loc 12R: Cag gCA Cgg AAC ACA gTT Cg

Loc 12L: TgT TCg gCT ACg gCA TAC Tg

Loc 13R: Cgg CCC gCT TgA TCC ATT Tg

Loc 13L: CAA Tgg ATg gTC gTC ACC Tg

Loc 14R: TCA Cgg Cgg TCA ggT ACT TC

Loc 14L: CgT TCT gAg CAT CCA TCg
ACg

Annealingtemperatur: 60 °C

Produktgrößen:

Produktgröße Locus mit Insertion des IS900: Produktgröße + Länge des IS900 (1451 bp)

Locus 1:

LocR-LoCL: 830 bp

LocR-IS9L: 765 bp

LocL-IS9R: 207 bp

Locus 4:

LocR-LoCL: 796 bp

LocR-IS9L: 693 bp

LocL-IS9R: 244 bp

Locus 7:

LocR-LoCL: 789 bp

LocR-IS9L: 409 bp

LocL-IS9R: 466 bp

Locus 2:

LocR-LoCL: 687 bp

LocR-IS9L: 543 bp

LocL-IS9R: 224 bp

Locus 5:

LocR-LoCL: 387 bp

LocR-IS9L: 340 bp

LocL-IS9R: 185 bp

Locus 8:

LocR-LoCL: 230 bp

LocR-IS9L: 143 bp

LocL-IS9R: 226 bp

Locus 3:

LocR-LoCL: 844 bp

LocR-IS9L: 509 bp

LocL-IS9R: 560 bp

Locus 6:

LocR-LoCL: 1171 bp

LocR-IS9L: 1044 bp

LocL-IS9R: 267 bp

Locus 9:

LocR-LoCL: 281 bp

LocR-IS9L: 265 bp

LocL-IS9R: 147 bp

Locus 10:	Locus 12:	Locus 14:
LocR-LocL: 462 bp	LocR-LocL: 1077 bp	LocR-LocL: 411 bp
LocR-IS9L: 386 bp	LocR-IS9L: 893 bp	LocR-IS9L: 285 bp
LocL-IS9R: 206 bp	LocL-IS9R: 326 bp	LocL-IS9R: 150 bp
Locus 11:	Locus 13:	
LocR-LocL: 159 bp	LocR-LocL: 324 bp	
LocR-IS9L: 102 bp	LocR-IS9L: 203 bp	
LocL-IS9R: 245 bp	LocL-IS9R: 263 bp	

4.2. Herstellung der DNA-Sonde innerhalb des IS900

Primer:

Kunze F: Tgg ACA Atg ACg gTT ACg gAg gTg g

Kunze R: gAT Cgg AAC gTC ggC Tgg TCA ggA T

Annealingtemperatur: 68 °C

Produktgröße: 453 bp

5. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

5.1. Chemikalien

Agar-Agar	Oxoid, Wesel
Agarose	Serva, Heidelberg
Anti-DIG-AP-Konjugat, Fab fragments	Roche Diagnostics, Penzberg
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics, Penzberg
Borsäure für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
<i>Bst</i> EII (500 U)	Roche Diagnostics, Penzberg
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen
Chloroform p.A.	Merck, Darmstadt
CSPD (Chemiluminescence substrate)	Roche Diagnostics, Penzberg
CTAB (N-cetyl-N,N,N,-trimethyl-ammoniumbromid),	Applichem, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
DIG-DNA-Labeling Mix 10x	Roche Diagnostics, Penzberg

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut. unvergällt p. A	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (0,7 mg/ml)	eurobio, Les Ullis, Frankreich
Fleischextrakt Lab Lemco	Oxoid, Wesel
Formaldehyd (10%)	Büsing & Fasch, Oldenburg
GBX Fixierer	Kodak, Stuttgart
GBX Entwickler	Kodak, Stuttgart
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hexadecylpyridiniumchlorid-Lösung	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt
Karbofuchsin	Sigma, Deisenhofen
Längenstandard III, digoxigeninmarkiert	Roche Diagnostics, Penzberg
Löfflers Methylenblau	Merck, Darmstadt
Lysozym für die Molekularbiologie (20000 U/mg)	Applichem, Darmstadt
Malachitgrün (Oxalat)	Merck, Darmstadt
Maleinsäure reinst Ph. Eur.	Applichem, Darmstadt
Mycobactin	Rhone Merieux, Laupheim
NaCl p.A.	Applichem, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen p.A.	Applichem, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Neoclear	Merck, Darmstadt
Neomont	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarkosinat Natriumsalz für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin	Vogel, Giessen
Penicillin G	Heyl, Berlin
Pepton tryptisch verdaut	Merck, Darmstadt
2-Propanol (Isopropylalkohol) p.A.	Merck, Darmstadt
Proteinase K (41 units/mg)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PstI (3000 U)	New England Biolabs, Frankfurt/Main
2x ReddyMix™ PCR Master Mix	ABgene House, Surrey, UK
Salzsäure (25%)	Merck, Darmstadt
SDS-Lösung (20%ig) für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt
Sputofluol®-Lösung	Merck, Darmstadt

Trinatriumcitratdihydrat p.A	Applichem, Darmstadt
Tris für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt

5.2. Kits

MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit®,	Roche Diagnostics, Mannheim
MolTaq (Taq DNA Polymerase; 5 U/μl) mit 10x PCR Puffer	Molzym, Bremen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

5.3. Verbrauchsmaterialien

Barthmannstopfen	diagonal, Münster
Blottingpapier 20x25cm	Amersham Pharme Biotech AB, San Francisco, USA
Eppendorf Uvette	Eppendorf, Hamburg
Hybridization bags	Roche Diagnostics, Penzberg
Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film 18x24 cm RPN 3103 K	Amersham Biosciences, Amersham
Jet Kassetten	Leica, Nussloch
Messer	Feather, Japan
Nylonmembran Hybond-N (30cm x 3m)	Amersham International plc, Amersham, UK
Objekträger	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen	ART, Molecular Bio Product, San Diego, USA
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss und Spitzboden	Greiner bio-one, Frickenhausen

6. Geräteverzeichnis

Autostainer XL	Leica Instruments, Nussloch
Automatikpipette Eppendorf Research (20, 50, 100, 1000)	Eppendorf, Hamburg
Combi-Spin FVL-2400	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT System mit Stromversorgungsgerät: Power Pack 300	biorad, München
Fotoeinheit Bioprint Modell 008	Peqlab, Erlangen
Gefriertrocknungsanlage	Christ, Osterode
Hypercenter XP	Shandon GmbH, Frankfurt/Main
Hyperkassette™ (18x24cm)	Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK

Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss, Jena
Mini-Shaker Typ MS I	IKA Works, Wilmington, USA
Multicycler PTC 200	Biozyme, Hess. Oldendorf
Multifuge 3S-R, Heraeus	Kendro Laboratory Products, Osterode
Paraffin-Ausgießstation AP 250	Microm Laborgeräte, Walldorf
Paraffin-Streckbad Typ 25900	Meday-Nagel, Kiel
Paraffin-Streichtisch HI 1220	Leica Microsystems, Nussloch
pH-Meter inoLab Level 2	WTW, Weilheim
Photometer Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierautomat MagNA-Pure LC	Roche Diagnostics, Mannheim
Präzisionsheizplatte Präzitherm, Typ PZ 28 1	Störk-Tronic über Jürgens, Bremen
Präzisionswaage Sartorius BP 410 S	Sartorius, Göttingen
Rotationsmikrotom RM 2125	Leica Microsystems, Nussloch
Schüttelwasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler Typ 3016	GFL, Burgwedel
Taumler, Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vakuumblotter Modell 785	biorad, München

7. Informationen zu den *M. paratuberculosis*-Isolaten

Tabelle 22: Informationen zu den Herkunftsbetrieben, soweit verfügbar

Betrieb-Nr.	Betriebsart	Klinische Symptome	Paratuberkulose-Sanierungsverfahren	Zukauf	Haltung anderer Wdk.	untersuchte Isolate (n)
Nds-AUR-1	Milcherzeuger	ja	ja			3
Nds-AUR-2			ja			2
Nds-AUR-3			ja			1
Nds-BRA-1	Milcherzeuger	nein	ja	nein	ja, 1 Ziege	8
Nds-BRA-2	Milcherzeuger	nicht mehr (Sanierungserfolg)	ja	nein	ja, Schafe und Ziegen	9
Nds-BRA-3	Milcherzeuger	ja	ja	nein	nein, aber Nachweide	4

Anhang

Betrieb-Nr.	Betriebsart	Klinische Symptome	Paratuberkulose-Sanierungsverfahren	Zukauf	Haltung anderer Wdk.	untersuchte Isolate (n)
					von Schafen	
Nds-BRA-4	Milcherzeuger		ja	ja		4
Nds-BRA-5	Milcherzeuger	selten	ja, seit 1999	nein	nein	6
Nds-BRA-6	Limousinzucht	ja	ja, seit 2004	ja	ja	3
Nds-OL-1			ja			4
Nds-CUX-1	Milcherzeuger	ja	ja, seit 2004	ja	nein, aber Schafe auf den Weiden	1
Nds-H-1			war bis 2004 frei			1
Nds-LER-1			ja			1
Nds-STD-1						1
NRW-AC-1			ja			1
NRW-AC-2			ja			2
NRW-GL-1			ja			2
NRW-GM-1		ja	ja			4
SSA-KÖT-1		ja	nein, aber Einsatz eines isopathischen Therapieschemas			1
SSA-MQ-1		ja				2
SSA-SDL-1	Mutterkuhherde	ja				1
NRW-Ziege	Milchziegenhalter	ja		ja		1

Leere Felder: keine Angabe möglich

Tabelle 23: Informationen zu den einzelnen *M. paratuberculosis*-Isolaten, bzw. den Herkunftstieren

Isolat	Informationen zum Isolat		Informationen zum Tier					
	Matrix	Sonstiges	Alter der Tiere*	Klinische Symptome	Ergebnis des Antikörper-ELISAs	Pathol.-anatom. Veränderungen**	Sonstiges	
NDS-AUR-1a	Kot		4					
NDS-AUR-1b	Kot		8					
NDS-AUR-1c	Kot		3					
NDS-AUR-2a	Kot							
NDS-AUR-2b	Kot		8					
NDS-AUR-3a	Kot		5					
NDS-BRA-1a	Kot		8	keine		keine	Probennahme: 11.01.2004	
NDS-BRA-1b	Kot		9	keine		keine		
NDS-BRA-1c	Kot		9	keine		keine		
NDS-BRA-1d	Kot		7	keine		keine		
NDS-BRA-1e	Kot		4	keine		keine		
NDS-BRA-1f	Kot	s. NDS-BRA-1c					Probennahme: 05.04.2004	
NDS-BRA-1g	Ileocaecal- klappe	s. NDS-BRA-1e						
NDS-BRA-1h	Ileocaecal- klappe	s. NDS-BRA-1a						
NDS-BRA-2a	Kot		4		fraglich***			
NDS-BRA-2b	Kot		4	Diarrhoe	fraglich***	Ileum	Probennahme:	

Isolat	Informationen zum Isolat		Informationen zum Tier				
	Matrix	Sonstiges	Alter der Tiere*	Klinische Symptome	Ergebnis des Antikörper-ELISAs	Pathol.-anatom. Veränderungen**	Sonstiges
							29.10.2004
NDS-BRA-2c	Kot		7				
NDS-BRA-2d	Kot						
NDS-BRA-2e	Kot						
NDS-BRA-2f	Kot		9				
NDS-BRA-2g	Ileum	s. NDS-BRA-2b					Probennahme: 11.05.2004
NDS-BRA-2h	Kot						
NDS-BRA-2i	Kot		5				
NDS-BRA-3a	Kot		4				
NDS-BRA-3b	Kot		4				
NDS-BRA-3c	Kot		7		fraglich***		
NDS-BRA-3d	Kot		4		fraglich***		
NDS-BRA-4a	Kot						Probennahme: 02.04.2004
NDS-BRA-4b	Kot		5				Probennahme: 15.06.2004
NDS-BRA-4c	Ileum			Diarrhoe, Abmagerung		Ileum, Ln., ZN +	
NDS-BRA-4d	Mesenterialln.	s. NDS-BRA-4c					

Isolat	Informationen zum Isolat		Informationen zum Tier				
	Matrix	Sonstiges	Alter der Tiere*	Klinische Symptome	Ergebnis des Antikörper-ELISAs	Pathol.-anatom. Veränderungen**	Sonstiges
NDS-BRA-4e	Ileum	(s. NDS-BRA-4a)****					
NDS-BRA-5a	Kot		5				
NDS-BRA-5b	Kot		7				
NDS-BRA-5c	Kot		9				
NDS-BRA-5d	Kot		4				
NDS-BRA-5e	Kot		mind. 9				
NDS-BRA-5f	Kot		7				
NDS-BRA-6a	Kot	Probennahme: 03.05.2004	3	Diarrhoe, Abmagerung	positiv***		Zukauf aus Sachsen-Anhalt (Lkr. Werningerode), Limousinrind
NDS-BRA-6b	Kot	s. NDS-BRA-6a					Probennahme: 26.05.2004
NDS-BRA-6c	Kot		5		negativ***		Zukauf
NDS-CUX-1a	Kot						
NDS-H-1a	Kot (Poolprobe)****		2 bis 9				Fleischrassen
NDS-LER-1a	Kot		3				
NDS-OL-1a	Kot		3				

Isolat	Informationen zum Isolat		Informationen zum Tier				
	Matrix	Sonstiges	Alter der Tiere*	Klinische Symptome	Ergebnis des Antikörper-ELISAs	Pathol.-anatom. Veränderungen**	Sonstiges
NDS-OL-1b	Kot		3				
NDS-OL-1c	Kot		5				
NDS-OL-1d	Kot		3				
NDS-STD-1a	Kot						
NRW-GM-1a	Kot		> 2		positiv		
NRW-GM-1b	Kot		> 2		negativ		
NRW-GM-1c	Kot		> 2		positiv		
NRW-GM-1d	Kot		> 2	Diarrhoe	positiv		
NRW-GL-1a	Kot		> 2		negativ		
NRW-GL-1b	Kot		> 2		negativ		
NRW-DN-1a	Kot		> 2		negativ		
NRW-AC-1a	Kot		> 2		positiv		
NRW-AC-2a	Kot		> 2		negativ		
NRW-AC-2b	Kot		> 2		fraglich		
SSA-SDL-1a	Kot						
SSA-KÖT-1a	Kot						
SSA-MQ-1a	Mesenterialln.		5	Diarrhoe			
SSA-MQ-1b	Mesenterialln.		7	Diarrhoe			
THÜ a - p	Kot						

Isolat	Informationen zum Isolat		Informationen zum Tier				
	Matrix	Sonstiges	Alter der Tiere*	Klinische Symptome	Ergebnis des Antikörper-ELISAs	Pathol.-anatom. Veränderungen**	Sonstiges
A-Wild-1	Mesenterialln.			ggr. – mgr. Abmagerung		Ln., ZN +	Reh weiblich
A-Wild-2	Mesenterialln.			gerung			Hirsch männlich
A-Wild-3	Mesenterialln.						Reh männlich
NRW-Ziege-1 ⁵⁴	Kot		1,5	Diarrhoe, Abmagerung	negativ, AGIDT: positiv	Ileum, Ln., ZN +	
NL-Schaf-2							
NL-Schaf-3							
GB-Schaf-1-4							
GB-Schaf-5		Typ I-Isolat					
N-Schaf-1							
ATCC 19698							

* in Jahren; ** an Ileum (Ileum) und Mesenteriallymphknoten (Ln.), ZN + – säurefeste Stäbchen nachweisbar; *** verwendete Antikörper-ELISAs im VI Oldenburg: IDEXX und Svanovir (positiv: Svanovir und ELISA positiv; fraglich: Svanovir positiv und IDEXX negativ; negativ: Svanovir und IDEXX negativ), aus den anderen Instituten liegen keine Angaben vor; **** eine sichere Zuordnung zum gleichen Tier wie Isolat NDS-BRA-4a ist aufgrund unklarer Angaben auf dem Untersuchungsantrag nicht möglich; ***** fünf Tiere; leere Felder – keine Angaben möglich

⁵⁴ Informationen aus: Schroeder, C., Seeliger, F., Gaede, W., Westermeier, G., Ganter, M. (2001): Diagnostik, Epidemiologie und Pathologie der Paratuberkulose in einem Ziegenbestand in Deutschland. Tierärztl. Prax. 29(G): 19-26.

8. Ergebnisse der Untersuchung der Organproben

Tabelle 24: Informationen zu den Tieren, von denen Organproben untersucht wurden

Tier Nr.	Untersuchung im Rahmen des Sanierungsverfahrens		Klinische Symptome**	Informationen zum Tier		
	Kotkultur	Serologie*		Alter	Herkunftsbetrieb	Zukauf
1	pos	n.d.	nein	9 Jahre	NDS-BRA-1	nein
2	pos	n.d.	nein	9 Jahre	NDS-BRA-1	nein
3	pos	n.d.	nein	4 Jahre	NDS-BRA-1	nein
4	pos	n.d.	nein	8 Jahre	NDS-BRA-1	nein
5	n.d.	n.d.	n.d.	8 Monate	NDS-BRA-1	Kalb von Tier 2
6	neg	pos	nein	9 Jahre	NDS-BRA-2	nein
7	pos	n.d.	D	4 Jahre	NDS-BRA-2	nein
8	pos	n.d.	D, A	4 Jahre	NDS-BRA-4	nein
9	pos	n.d.	nein	3 Jahre	NDS-BRA-4	nein

* ELISA (IDEXX und Svanovir); ** D – Diarrhoe, A – Abmagerung; pos – positiv, neg – negativ, n.d. – Untersuchung nicht durchgeführt

Tabelle 25: Darstellung der Ergebnisse der Organuntersuchungen der einzelnen Tiere

Tier Nr.	EZ	MV*	HV*	Organe		Blinddarminhalt		Bezeichnung des Isolats
				Abklatsch	Kultur	Mikroskopie	Kultur	
1	gut	-	-	-	-	(+)	+	NDS-BRA-1f
2	gut	-	-	-	-	-	-	-
3	gut	-	-	-	+	-	-	NDS-BRA-1g
4	gut	-	-	-	+	-	-	NDS-BRA-1h
5	gut	-	-	-	-	n.d.	n.d.	-
6	gut	-	-	-	-	-	-	-
7	gut	+	+	-	+	-	+	NDS-BRA-2g
8	schlecht	+	+	+	+	+	+	NDS-BRA-4c und NDS-BRA-4d ⁵⁵

⁵⁵ Von Tier 8 wurden Isolate aus dem Ileum sowie dem Ileocaecallymphknoten in die Untersuchung einbezogen.

Tier Nr.	EZ	MV*	HV*	Organe		Blinddarminhalt		Bezeichnung des Isolats
				Abklatsch	Kultur	Mikroskopie	Kultur	
9	mäßig	(+)	(+)	-	+	+	-	NDS-BRA-4e

*an Ileum und zugehörigen Lymphknoten; EZ – Ernährungszustand, MV – makroskopische Veränderungen, HV – histologische Veränderungen; + – positiv, (+) – fraglich, - – negativ, n.d. – nicht durchgeführt

9. Statistische Zusammenhänge

Tabelle 26: Loci-Paare, die sich statistisch signifikant gegenseitig beeinflussen

Betroffene Loci	häufigste Ausprägungen der Loci	p-Wert
1 – 11	Locus 1: mit IS900 – Locus 11: mit IS900	0,0003
2 – 3	Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment – Locus 3: fehlt	0,001
2 – 6	Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment – Locus 6: mit IS900	0,0
2 – 7	Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment – Locus 7: fehlt, beide Fragmente	0,0004
2 – 10	Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment – Locus 10: fehlt, IS9R-Fragment	0,0
3 – 10	Locus 3: fehlt – Locus 10: fehlt, IS9R-Fragment	0,0
3 – 12	Locus 3: mit IS900 – Locus 12: mit IS900	0,0003
6 – 11	Locus 6: mit IS900 – Locus 11: mit IS900	0,0028
8 – 9	Locus 8: mit IS900 – Locus 9: mit IS900	0,0435
9 – 11	Locus 9: mit IS900 – Locus 11: mit IS900	0,0
10 – 12	Locus 10: mit IS900 – Locus 12: mit IS900	0,0

Tabelle 27: Loci-Paare, die sich tendenziell gegenseitig beeinflussen

Betroffene Loci	häufigste Ausprägungen der Loci	p-Wert ⁵⁶
1 – 2	Locus 1: mit IS900 – Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment	0,0/0,6957
2 – 8	Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment – Locus 8: mit IS900	0,0/0,4239
2 – 9	Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment – Locus 9: mit IS900	0,0001/1
2 – 11	Locus 2: fehlt, IS9R-Fragment – Locus 11: mit IS900	0/0,3955
3 – 7	Locus 3: fehlt – Locus 7: fehlt, beide Fragmente	0,0093/0,0016 W
6 – 10	Locus 6: mit IS900 – Locus 10: fehlt, IS9R-Fragment	0,0322/0,6494

⁵⁶ Ergebnis des χ^2 -Test mit allen Faktorstufen/Ergebnis des χ^2 -Test mit reduzierten Faktorstufen (W – kein zuverlässiges Ergebnis ermittelbar).

Betroffene Loci	häufigste Ausprägungen der Loci	p-Wert ⁵⁶
7 – 11	Locus 7: fehlt, beide Fragmente – Locus 11: mit IS900	0,0018/0,3867
8 – 11	Locus 8: mit IS900 – Locus 11: mit IS900	0,0/0,0652

Tabelle 28: statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den Ausprägungen einzelner Loci und dem IS900 RFLP-Typ der *M. paratuberculosis*-Isolate

Locus	Ausprägung	Häufigster BstEII-RFLP-Typ	p-Wert	Häufigster PstI-RFLP-Typ	p-Wert
9	mit IS900	C1	0,0	1	0,0
10	fehlt, IS9R-Fragment	C1	0,0009	-	-

Tabelle 29: tendenzielle Zusammenhänge zwischen den Ausprägungen einzelner Loci und dem IS900 RFLP-Typ der *M. paratuberculosis*-Isolate

Locus	Ausprägung	Häufigster BstEII-RFLP-Typ	p-Wert ⁵⁷	Häufigster PstI-RFLP-Typ	p-Wert ⁵⁸
1	mit IS900	C1	0,0064/0,2293	1	0,0281/0,2029
2	fehlt, IS9R-Fragment	C1	0,0/1	1	0,0/0,3415
7	fehlt, beide Fragmente	C1	0,0204/0,2928	1	0,0208/0,2611
8	mit IS900	C1	0,0/0,1538	1	0,0/0,1429
10	fehlt, IS9R-Fragment	-	-	1	0,0007/0,0715
11	mit IS900	C1	0,0/0,2074	1	0,0/0,1677

Tabelle 30: Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Ausprägung der Loci und der regionalen Herkunft eines *M. paratuberculosis*-Isolats

Regionale Herkunft	Locus	Häufigste Ausprägung	p-Wert
Niedersachsen	2	fehlt, IS9R-Fragment	0,0076
Niedersachsen	3	fehlt	0,0068
Niedersachsen	7	fehlt, beide Fragmente	0,0006
Niedersachsen	10	fehlt, IS9R-Fragment	0,0041

⁵⁷ S. Fußnote 56.

⁵⁸ S. Fußnote 56.

Tabelle 31: Tendenzielle Zusammenhänge zwischen der Ausprägung eines Locus und der regionalen Herkunft eines *M. paratuberculosis*-Isolats

Regionale Herkunft	Locus	Häufigste Ausprägung	p-Wert ⁵⁹
Niedersachsen	8	mit IS900	0,015/0,4674
Niedersachsen	9	mit IS900	0,0188/1

Tabelle 32: Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Ausprägung der Loci und der Herkunftstierart eines *M. paratuberculosis*-Isolats

Herkunftstierart	Locus	Häufigste Ausprägung	p-Wert
Rind	10	fehlt, IS9R-Fragment	0,0038

Tabelle 33: Tendenzielle Zusammenhänge zwischen der Ausprägung eines Locus und der Herkunftstierart eines *M. paratuberculosis*-Isolats

Herkunftstierart	Locus	Häufigste Ausprägung	p-Wert ⁶⁰
Rind	8	mit IS900	0,014/0,1304
Rind	9	mit IS900	0,0287/0,0811

10. Zusammenfassung eng verwandter Loci-PCR-Muster durch Reduktion der berücksichtigten Loci

Tabelle 34: Loci-PCR-Muster ohne Berücksichtigung der Loci 2,3 und 10

PCR-Muster	Anzahl Isolate (n)	<i>M. paratuberculosis</i> Isolate		
1*	36	NDS-AUR-2a	NDS-OL-1d	THÜ I
		NDS-AUR-2b	NRW-AC-2a	THÜ m
		NDS-BRA-1f	NRW-AC-2b	THÜ n
		NDS-BRA-2a	NRW-DN-1a	THÜ o
		NDS-BRA-2b	NRW-GM-1c	THÜ p
		NDS-BRA-2c	SSA-MQ-1a	A-Wild-2
		NDS-BRA-2e	THÜ a	A-Wild-3
		NDS-BRA-3a	THÜ b	GB-Schaf-1
		NDS-BRA-4b	THÜ c	N-Schaf-1
		NDS-BRA-4c	THÜ f	NL-Schaf-2
		NDS-BRA-5a	THÜ j	NL-Schaf-3

⁵⁹ S. Fußnote 56.⁶⁰ S. Fußnote 56.

PCR-Muster	Anzahl Isolate (n)	<i>M. paratuberculosis</i> Isolate		
2*	24	NDS-AUR-1b NDS-AUR-1c NDS-AUR-3a NDS-BRA-1a	NDS-BRA-5c NDS-BRA-5d NDS-BRA-6b NDS-BRA-6c	NRW-GL-1a NRW-GM-1a NRW-GM-1b NRW-GM-1d
		NDS-BRA-1c NDS-BRA-2d NDS-BRA-4d NDS-BRA-5b	NDS-CUX-1a NDS-H-1a NDS-LER-1a NDS-STD-1a	SSA-KÖT-1a SSA-MQ-1b SSA-SDL-1a A-Wild-1
3*		NDS-AUR-1a NDS-BRA-1b NDS-BRA-2f	NDS-BRA-2h NDS-BRA-2i NDS-BRA-3b	NDS-BRA-3c NDS-BRA-5e NDS-BRA-5f
4*	5	THÜ d THÜ e	THÜ g THÜ h	GB-Schaf-2
5*	3	NDS-OL-1c	NRW-AC-1a	NRW-GL-1b
6*	2	NDS-BRA-1g	GB-Schaf-4	
7*	2	NDS-BRA-1d	NDS-BRA-1e	
8*	2	NDS-BRA-2g	NDS-BRA-3d	
9*	2	NDS-BRA-4e	NDS-OL-1b	
10*-16*	je 1	NDS-BRA-1h NDS-BRA-4a NDS-BRA-6a	THÜ i GB-Schaf-3 GB-Schaf-5	ATCC 19698

* Loci-PCR-Muster ohne Berücksichtigung der Loci 2,3 und 10

11. Darstellung der Ergebnisse der Stammdifferenzierung der einzelnen *M. paratuberculosis*-Isolate

Tabelle 35: Darstellung der Einzelergebnisse der Stammdifferenzierung für die einzelnen *M. paratuberculosis*-Isolate

Isolat	Kultur			Loci-PCR														IS900 RFLP-Typ		
	WG	KM	WI	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	PCR-Muster	Muster-Nr.	BsfEII	PstI
NDS-AUR-1a	9	001	0	A	D	E	A	F	F	A	A	D	A	A	A	C	ADEFFAADAA	10	C1	1
NDS-AUR-1b	8	111	1	A	F	C	A	A	F	A	A	D	A	F	A	C	AFCFAADAF	37	C1	1
NDS-AUR-1c	9	111	0	A	F	D	A	A	F	A	A	D	A	F	A	C	AFDAFAADAF	12	C1	1
NDS-AUR-2a	8	101	1	A	D	E	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADEAFAAAAA	2	Cneu1	1
NDS-AUR-2b	11	101	1	A	D	E	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADEAFAAAAA	2	C1	1
NDS-AUR-3a	5	100	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	F	A	C	ADCAFAADAF	1	C1	1
NDS-BRA-1a	9	101	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	F	A	C	ADCAFAADAF	1	C1	1
NDS-BRA-1b	6	101	0	A	F	A	A	F	F	A	A	D	A	A	A	C	AFAFFAADAA	35	C1	1
NDS-BRA-1c	7	000	0	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	F	A	C	ADCAFAADAF	1	C1	1
NDS-BRA-1d	10	001	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	F	A	C	ADCFFAADAF	23	C1	1
NDS-BRA-1e	10	001	0	A	F	C	A	F	F	A	A	D	A	F	A	C	AFCFFAADAF	38	C1	1
NDS-BRA-1f	6	111	1	A	D	C	A	A	F	A	A	F	A	A	A	C	ADCAFAAFAA	21	C1	1
NDS-BRA-1g	4	110	1	A	D	E	A	A	F	A	A	F	A	A	A	C	ADEAFAFFAA	30	Cneu2	7
NDS-BRA-1h	7	111	1	A	F	D	A	A	F	A	A	F	A	F	A	C	AFDAFAFAFA	43	C1	1
NDS-BRA-2a	11	100	1	A	D	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADAAFAAAAA	6	C1	1
NDS-BRA-2b	8	101	1	A	D	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADAAFAAAAA	6	C1	1
NDS-BRA-2c	11	100	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	A	A	C	ADCAFAADAA	7	C1	1

Isolat	Kultur				Loci-PCR														IS900 RFLP-Typ	
	WG	KM	WI	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	PCR-Muster	Muster-Nr.	BsfEII	PstI
NDS-BRA-2d	9	101	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	F	A	C	ADCAFAADAF	1	C1	1
NDS-BRA-2e	6	100	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	A	C	C	ADCAFAADAA	7	C1	1
NDS-BRA-2f	5	101	1	A	D	E	A	F	F	A	A	D	A	A	C	C	ADEFFAADAA	10	C1	1
NDS-BRA-2g	k.E.	k.E.	k.E.	A	A	A	A	F	F	A	A	F	F	A	C	C	AAFFFAFFA	15	C1	1
NDS-BRA-2h	7	101	1	A	A	A	A	F	F	A	A	F	A	A	C	C	AAFFFAFFA	14	C1	1
NDS-BRA-2i	12	100	1	A	A	F	A	F	F	A	A	F	A	A	C	C	AAFFFAFFA	17	C1	1
NDS-BRA-3a	9	100	0	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	A	C	C	AFAAFAAAA	3	C1	1
NDS-BRA-3b	9	100	0	A	F	A	A	F	F	A	A	A	A	A	C	C	AFAFFAAAA	34	C1	1
NDS-BRA-3c	12	000	1	A	F	B	A	F	F	A	A	A	A	A	C	C	AFBFFAAAA	36	C1	1
NDS-BRA-3d	12	001	0	A	D	D	A	F	F	A	A	D	F	A	C	C	ADFFFAADFA	28	C1	1
NDS-BRA-4a	10	111	1	F	D	A	A	A	F	A	A	D	A	A	C	C	FDAFAADAA	50	C1	1
NDS-BRA-4b	10	000	0	A	F	F	A	A	F	A	A	A	A	A	C	C	AFFFAAAAA	13	C1	1
NDS-BRA-4c	5	111	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	A	C	C	ADCAFAADAA	7	C1	1
NDS-BRA-4d	6	111	1	A	D	D	A	A	F	A	A	D	A	F	C	C	ADDAFAADAF	4	C1	1
NDS-BRA-4e	7	111	1	F	D	D	A	A	F	A	A	D	A	F	C	C	FDDAFAADAF	52	C1	1
NDS-BRA-5a	5	101	0	A	F	D	A	A	F	A	A	D	A	A	C	C	AFDAFAADAA	40	C1	1
NDS-BRA-5b	5	101	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	F	C	C	ADCAFAADAF	1	C1	1
NDS-BRA-5c	11	100	1	A	D	C	A	A	F	A	A	D	A	F	C	C	ADCAFAADAF	1	C1	1
NDS-BRA-5d	11	101	1	A	D	D	A	A	F	A	A	D	A	F	C	C	ADDAFAADAF	4	C1	1
NDS-BRA-5e	7	101	1	A	D	C	A	F	F	A	A	D	A	A	C	C	ADGFFAADAA	22	C1	1

Isolat	Kultur				Loci-PCR														IS900 RFLP-Typ		
	WG	KM	WI		1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	PCR-Muster	Muster-Nr.	BstEil	Pstl
NDS-BRA-5f	k.E.	k.E.	k.E.	A	A	C	A	F	F	A	A	A	F	A	A	A	C	AACFFAAFAA	16	C1	1
NDS-BRA-6a	7	110	1	A	D	D	A	A	F	A	A	A	D	F	D	C	ADDAFAAADF	27	C1	1	
NDS-BRA-6b	10	100	1	A	D	D	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	ADDAFAADAF	4	C1	1	
NDS-BRA-6c	11	111	1	A	D	D	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	ADDAFAADAF	4	C1	1	
NDS-CUX-1a	k.E.	k.E.	k.E.	A	D	C	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	ADCAFAADAF	1	C1	1	
NDS-H-1a	8	100	1	A	D	C	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	ADCAFAADAF	1	C1	7	
NDS-LER-1a	8	000	1	A	D	C	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	ADCAFAADAF	1	C1	1	
NDS-OL-1a	12	101	1	A	D	E	A	A	F	A	A	A	F	A	A	C	ADEAFAAFAA	29	C1	1	
NDS-OL-1b	16	100	1	F	D	C	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	FDCAFAADAF	51	C1	1	
NDS-OL-1c	10	101	1	A	D	C	A	A	F	A	A	A	D	A	D	C	ADCAFAADAD	20	C1	1	
NDS-OL-1d	10	110	1	A	D	D	A	A	F	A	A	A	D	A	A	C	ADDAFAAAAA	25	C1	1	
NDS-STD-1a	6	100	1	A	F	A	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	AFAAFAAAAF	8	Cneu1	1	
NRW-AC-1a	12	111	1	A	F	D	A	A	F	A	A	A	D	A	D	C	AFDAFAADAD	41	C1	1	
NRW-AC-2a	12	110	1	A	D	D	A	A	F	A	A	A	D	A	A	C	ADDAFAADAA	26	C1	neu2	
NRW-AC-2b	k.E.	k.E.	k.E.	A	D	A	A	A	F	A	A	A	D	A	A	C	ADAAFAADAA	18	k.E.	k.E.	
NRW-DN-1a	7	000	0	A	F	A	A	A	F	A	A	A	D	A	A	C	AFAAFAAAAA	3	C1	1	
NRW-GL-1a	8	110	1	A	F	D	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	AFDAFAADAF	12	C1	1	
NRW-GL-1b	k.E.	k.E.	k.E.	A	F	D	A	A	F	A	A	A	D	A	D	C	AFDAFAAFAD	42	C1	1	
NRW-GM-1a	16	110	1	A	D	C	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	ADCAFAADAF	1	C1	neu2	
NRW-GM-1b	16	000	0	A	F	F	A	A	F	A	A	A	D	A	F	C	AFFAFAADAF	45	C1	1	

Isolat	Kultur			Loci-PCR														IS900 RFLP-Typ		
	WG	KM	WI	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	PCR-Muster	Muster-Nr.	BstEII	PstI
NRW-GM-1c	9	110	1	A	F	F	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	AFFAFAAAAA	13	C1	1
NRW-GM-1d	k.E.	k.E.	k.E.	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	F	A	C	AFAAFAAAAF	8	C1	1
SSA-KÖT-1a	6	111	1	A	D	C	A	A	F	A	A	A	A	F	A	C	ADCAFAADAF	1	Cneu1	1
SSA-MQ-1a	8	110	1	A	F	F	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	AFFAFAAFAA	46	Cneu3	neu3
SSA-MQ-1b	7	110	1	A	F	F	A	A	F	A	A	A	A	F	A	C	AFFAFAAAAF	44	C10	neu4
SSA-SDL-1a	16	111	1	A	D	C	A	A	F	A	A	A	A	F	A	C	ADCAFAADAF	1	Cneu1	1
THÜ a	8	100	1	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	AFAAFAAAAA	3	C1	1
THÜ b	9	000	0	A	D	D	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADDAFAAFAA	9	C1	1
THÜ c	9	100	0	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	AFAAFADAA	33	C1	1
THÜ d	8	100	1	A	F	D	A	A	E	A	A	A	A	A	A	C	AFDAEAADAA	5	C1	1
THÜ e	8	000	1	A	F	D	A	A	E	A	A	A	A	A	A	C	AFDAEAADAA	5	C1	1
THÜ f	6	100	1	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	AFAAFAAAAA	3	C1	1
THÜ g	10	100	1	A	F	D	A	A	E	A	A	A	A	A	A	C	AFDAEAADAA	5	C1	1
THÜ h	9	110	1	A	F	D	A	A	E	A	A	A	A	A	A	C	AFDAEAADAA	5	C1	1
THÜ i	7	110	1	A	F	D	A	A	E	A	A	A	F	A	A	C	AFDAEAADAF	39	C1	1
THÜ j	7	100	1	A	D	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADAAFAAAAA	6	C1	1
THÜ k	12	100	0	A	D	E	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADEAFAAAAA	2	C1	1
THÜ l	7	110	1	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	AFAAFAAAAA	3	C1	1
THÜ m	10	100	1	A	D	E	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADEAFAAAAA	2	C1	1
THÜ n	8	110	1	A	D	E	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	ADEAFAAAAA	2	C1	1

Isolat	Kultur			Loci-PCR														IS900 RFLP-Typ		
	WG	KM	WI	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	PCR-Muster	Muster-Nr.	BstEil	Pstl
THÜ o	10	000	0	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	A	A	C	AFAAFAAAA	3	C1	1
THÜ p	7	111	1	A	D	E	A	A	F	A	A	A	A	A	C	ADEAFAAAA	2	C1	1	
A-Wild-1	6	101	1	A	F	A	A	A	F	A	A	A	F	A	C	AFAAFAAAAF	8	C1	1	
A-Wild-2	5	100	1	A	D	C	A	A	F	A	A	A	A	A	C	ADCAFAAAAA	19	C1	1	
A-Wild-3	8	101	1	A	D	E	A	A	F	A	A	A	A	A	C	ADEAFAAAA	2	C1	1	
GB-Schaf-1	10	100	1	A	D	D	A	A	F	A	A	A	A	A	C	ADDAFAAFAA	9	C17	8	
GB-Schaf-2	6	101	1	A	D	D	A	A	E	A	A	A	A	A	C	ADDAEAAFAA	24	C17	8	
GB-Schaf-3	6	000	0	F	A	A	A	F	F	A	A	A	A	A	C	FAAFFAAAA	47	C1	1	
GB-Schaf-4	12	110	1	A	D	F	A	A	F	A	F	A	A	A	C	ADFAFAFAAA	32	C5	neu5	
GB-Schaf-5	16	000	0	F	B	C	A	F	E	F	F	B	F	A	C	FBCFEFFFBF	49	S2	neu6	
N-Schaf-1	7	111	1	A	D	F	A	A	F	A	A	A	A	A	C	ADFAFAAFAA	31	C1	7	
NL-Schaf-2	7	111	1	A	D	F	A	A	F	A	A	A	A	A	C	ADFAFAAAAA	11	C1	1	
NL-Schaf-3	5	101	1	A	D	F	A	A	F	A	A	A	A	A	C	ADFAFAAAAA	11	C22	neu1	
NRW-Ziege-1	12	111	1	A	F	A	A	A	F	A	A	A	A	A	C	AFAAFAAAA	3	Cneu1	1	
ATCC 19698	6	100	1	F	A	F	A	F	F	A	A	F	A	A	C	FAFFFAAFFA	48	Cneu2	7	

Kulturmorphologische Untersuchung: WG – Wachstumsgeschwindigkeit (angegeben in Wochen); KM – Koloniemorphologie (Knöpfchen, Furchen, Kügelchen: 1 – vorhanden, 0 – fehlt); WI – Wachstumsintensität (1 – intensives Wachstum, 0 – schwaches Wachstum).

Loci-PCR: 1-4; 6-14 – einzelne Loci (A = Locus nachweisbar, mit Insertion des IS900, B = Locus nachweisbar, keine Insertion des IS900, C = Locus fehlt, D = Locus fehlt, aber IS9R-Fragment, E = Locus fehlt, IS9L-Fragment, F = Locus fehlt, beide Fragmente).

IS900 RFLP: IS900 RFLP-Typen mit dem jeweils genannten Restriktionsenzym. k.E. – kein Ergebnis

12. Abbildungen

Abbildung 1:	PCR zum Nachweis eines einzelnen Locus (Locus-PCR)	42
Abbildung 2:	PCRs zum Nachweis des IS900.....	42
Abbildung 3:	Schematische Darstellung einer <i>M. paratuberculosis</i> -Kolonie	47
Abbildung 4:	Clusterbildung der Loci-PCR-Muster (Nearest Neighbour Methode, City-block).....	53
Abbildung 5:	IS900 RFLP-Muster – Verdau mit <i>BstEII</i>	55
Abbildung 6:	IS900 RFLP-Muster, Verdau mit <i>BstEII</i> – schematisch.....	55
Abbildung 7:	IS900 RFLP-Muster – Verdau mit <i>PstI</i>	56
Abbildung 8:	IS900 RFLP-Muster, Verdau mit <i>PstI</i> – schematisch	56
Abbildung 9:	Clusterbildung der IS900 RFLP-Muster	57
Abbildung 10:	Darstellung der Verteilung der Wachstumsgeschwindigkeiten der <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate (n=86).....	61
Abbildung 11:	Darstellung der Verteilung der Gruppen nach Koloniemorphologie der <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate (n=86).....	62
Abbildung 12:	Fragebogen zur Erfassung von Informationen zu den einzelnen <i>M. paratuberculosis</i> -Isolaten.....	115

13. Tabellen

Tabelle 1:	Zusammenfassung häufig verwendeter Differenzierungsverfahren (nach Olive und Bean, 1999 und Schwarz et al., 2003)	25
Tabelle 2:	Vorkommen der Insertionselemente bei den einzelnen <i>M. avium</i> -Subspezies.....	26
Tabelle 3:	Eignung der Verfahren zur Abgrenzung von <i>M. paratuberculosis</i> von anderen (Sub-)Spezies des MAC	27
Tabelle 4:	Unterscheidung der drei <i>M. paratuberculosis</i> -Subtypen anhand phänotypischer Eigenschaften.....	34
Tabelle 5:	Eigenschaften der zur <i>M. paratuberculosis</i> -Differenzierung verwendeten Verfahren.....	36
Tabelle 6:	Erfolgreich zur Stammdifferenzierung von <i>M. paratuberculosis</i> -Isolaten verwendete Verfahren	37
Tabelle 7:	Herkunftstierarten der untersuchten <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate	38
Tabelle 8:	Herkunftsregionen der untersuchten <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate	38
Tabelle 9:	Herkunft der untersuchten Organproben	40
Tabelle 10:	Häufigkeit der Ausprägungen der einzelnen Loci	50
Tabelle 11:	nachgewiesene Loci-PCR-Muster	51
Tabelle 12:	IS900 RFLP-Typen <i>BstEII</i>	54
Tabelle 13:	IS900 RFLP-Typen <i>PstI</i>	54
Tabelle 14:	<i>BstEII/PstI</i> -IS900 RFLP-Typen	57
Tabelle 15:	Verteilung der Genotypen in den Herkunftsregionen und -herden	58
Tabelle 16:	Ausbildung des Knöpfchens	62
Tabelle 17:	Ausbildung der Furche	62
Tabelle 18:	Ausbildung von Kügelchen	62
Tabelle 19:	Diskriminierungsindices der einzelnen Verfahren bzw. Kombination von Verfahren.....	65
Tabelle 20:	Mengen- und Zeitangaben zur Durchführung des IS900 RFLP	116
Tabelle 21:	Abweichungen vom DIG Luminescent Detection Kit®	117
Tabelle 22:	Informationen zu den Herkunftsbetrieben, soweit verfügbar	126
Tabelle 23:	Informationen zu den einzelnen <i>M. paratuberculosis</i> -Isolaten, bzw. den Herkunftstieren	128
Tabelle 24:	Informationen zu den Tieren, von denen Organproben untersucht wurden .	133
Tabelle 25:	Darstellung der Ergebnisse der Organuntersuchungen der einzelnen Tiere	133
Tabelle 26:	Loci-Paare, die sich statistisch signifikant gegenseitig beeinflussen.....	134
Tabelle 27:	Loci-Paare, die sich tendenziell gegenseitig beeinflussen	134

Tabelle 28: statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den Ausprägungen einzelner Loci und dem IS900 RFLP-Typ der <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate	135
Tabelle 29: tendenzielle Zusammenhänge zwischen den Ausprägungen einzelner Loci und dem IS900 RFLP-Typ der <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate.....	135
Tabelle 30: Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Ausprägung der Loci und der regionalen Herkunft eines <i>M. paratuberculosis</i> -Isolats.....	135
Tabelle 31: Tendenzielle Zusammenhänge zwischen der Ausprägung eines Locus und der regionalen Herkunft eines <i>M. paratuberculosis</i> -Isolats.....	136
Tabelle 32: Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Ausprägung der Loci und der Herkunftstierart eines <i>M. paratuberculosis</i> -Isolats	136
Tabelle 33: Tendenzielle Zusammenhänge zwischen der Ausprägung eines Locus und der Herkunftstierart eines <i>M. paratuberculosis</i> -Isolats	136
Tabelle 34: Loci-PCR-Muster ohne Berücksichtigung der Loci 2,3 und 10.....	136
Tabelle 35: Darstellung der Einzelergebnisse der Stammdifferenzierung für die einzelnen <i>M. paratuberculosis</i> -Isolate.....	138

14. Abkürzungen

μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
A. dem	demineralisiertes Wasser
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AGIDT	Agargel-Immundiffusionstest
AP-PCR	arbitrarily primed PCR
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERIC	enterobacterial intergenic consensus
g	Gramm
ggr.	geringgradig
h	Stunde
<i>hed</i>	host expression dependent
i.A.	im Allgemeinen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IS	Insertionselement
ITS	internal transcribed spacer
k	kilo ($\times 10^3$)
KBE	Kolonie-bildende Einheit
KBR	Komplementbindungsreaktion
l	Liter
LFP	large fragment polymorphism
LSP	large sequence polymorphism
m	Meter
m	milli ($\times 10^{-3}$)
M	mol/l
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> -Komplex
mgr.	mittelgradig
min	Minute
MIRU	mycobacterial interspersed repetitive unit
MLEE	Multilocus-Enzym-Elektrophorese
MLSSR	Multilocus short sequence repeat typing
MLST	multilocus sequence typing
MLVA	Multilocus variable number tandem repeat analysis
MPIL	Multiplex-PCR der IS900-Loci
ORF	open reading frame
p.A.	pro Analyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RBS	ribosome binding site
RDA	repräsentative Differenzanalyse
REA	Restriktionsfragmentanalyse
REP	repetitive extragenic palindrome
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
s	Sekunde
s.	siehe

s.u.	siehe unten
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	subtraktive Hybridisierung
SNP	single nucleotide polymorphism
SSH	suppression subtractive hybridization
SSR	short sequence repeat
subsp.	subspecies
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit
u.ä.	und ähnliches
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
VI	Veterinärinstitut
VNTR	variable number tandem repeat
z.B.	zum Beispiel

Publikationen

Schulze, M., Klarmann, D., Moss, A. (2005):

„Untersuchungen zur Stammdifferenzierung von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*“

Poster, 5. Internationales Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung
09.-11.03.2005 in Stendal

Schulze, M., L. H. Wieler (2006):

„Untersuchungen zur Stammdifferenzierung von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*“

Vortrag auf dem 1. Doktoranden-Symposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien
Universität Berlin

23.06.2006

Schulze, M. (2006):

„Nachweismöglichkeiten von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) in Organen vom Rind“

Vortrag auf der 3. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des
nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose – Mykobakterieninfektionen

11./12.10.2006 in Jena

Schulze, M., Moss, A., Klarmann, D. (2007):

„Untersuchungen zur Stammdifferenzierung von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)“

Vortrag auf dem 6. Internationalen Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung

07.-09.03.2007 in Stendal

Schulze, M., Moss, A., Klarmann, D. (2008):

„Untersuchungen zur Stammdifferenzierung von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)“

Vortrag auf der DVG-Tagung, Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie

25.-27.06.2008 in Braunschweig

Danksagung

Zuerst gilt mein Dank dem Veterinärinstitut Oldenburg des LAVES Niedersachsen unter der Leitung von Prof. Dr. G. Thalmann für die Möglichkeit, dort diese Dissertation anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. L. H. Wieler danke ich für die Vertretung und Betreuung der Arbeit.

Innerhalb des Veterinärinstitutes danke ich insbesondere Herrn Dr. A. Moss für die Ausarbeitung des interessanten Themas, sowie ihm und Herrn Dr. D. Klarman für die stets freundliche Unterstützung und fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den übrigen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Fachbereiche Diagnostik (A. Büsing, M. Hedemann, A. Heeren, M. Messing, N. Meyer, K. Wiegert), Pathologie (Dr. M. Brügmann, Dr. H.-H. Fiedler, G. Habermann, U. Niemann) und PCR (B. Krah, S. Tamke) für die Einarbeitung in die Methoden, die stete Hilfe und nette Zusammenarbeit bei der Durchführung der Experimente. Hier gilt mein besonderer Dank Frau U. Lehmann, ohne deren tatkräftige Unterstützung ich wahrscheinlich den Mut verloren hätte.

Für das Überlassen von *M. paratuberculosis*-Isolaten danke ich dem Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien, dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, dem Institut für Tiergesundheit Oldenburg, dem Landesamt für Verbraucherschutz Stendal, dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Krefeld sowie dem Thüringischen Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz Jena.

Frau Dr. P. Möbius und Frau J. König vom Institut für molekulare Pathogenese des FLI, Standort Jena danke ich für die gründliche Einarbeitung in die Durchführung des IS900 RFLPs sowie für die Hilfe bei der Auswertung.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse danke ich Herrn Dr. M. Filter von der Charité in Berlin.

Weiterhin gilt mein Dank den beteiligten Landwirten und Schlachthöfen für die Unterstützung der Arbeit.

Auch meiner Familie möchte ich für die vielseitige Unterstützung außerhalb des Fachlichen danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Oldenburg, den 02.01.2009