

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milchrinderbeständen

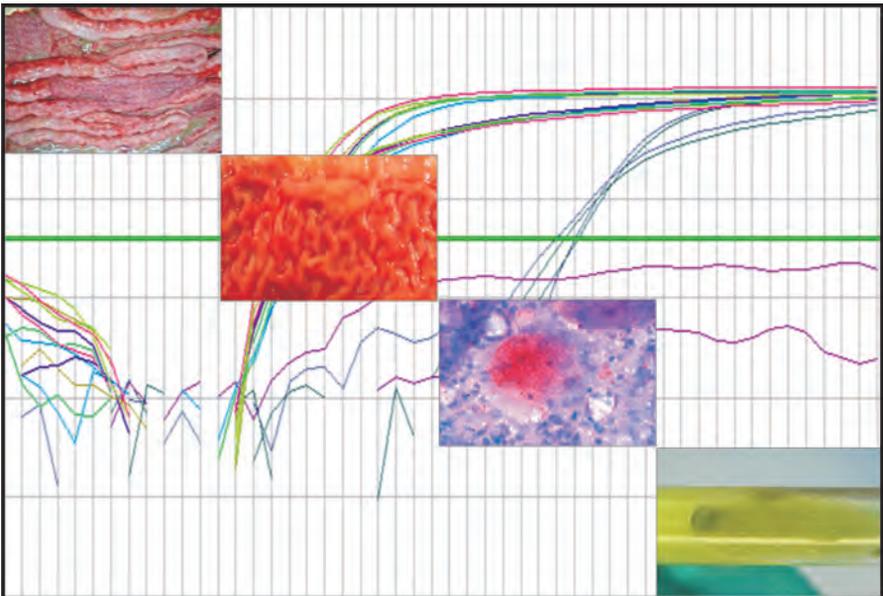
KORINNA BULANDER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2009

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

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Michael Bülte

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von
Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis
in Milchrinderbeständen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von
Korinna Bulander
Tierärztin aus Pforzheim

Gießen 2009

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Michael Bülte

Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Tag der Disputation:

15. April 2009

Meinen Eltern und meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>EINLEITUNG</i>	1
2	<i>LITERATURÜBERSICHT ÜBER DIE PARATUBERKULOSE DES RINDES..</i>	2
2.1	Definition und historischer Überblick	2
2.2	Taxonomie und Charakterisierung von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	3
2.3	Tenazität und Inaktivierung von MAP	6
2.4	Epidemiologie	11
2.5	Wirtsspektrum	13
2.6	Wirtschaftliche Bedeutung der Paratuberkulose	14
2.7	Empfänglichkeit und Übertragungswege	15
2.8	Pathogenese und klinisches Bild der Paratuberkulose	17
2.9	Diagnostische Verfahren	21
2.9.1	Indirekter Erregernachweis.....	21
2.9.2	Direkter Erregernachweis	25
2.9.2.1	Mikroskopischer Erregernachweis	25
2.9.2.2	Kultureller Erregernachweis	26
2.9.2.3	Molekularbiologischer Erregernachweis	29
2.10	Therapie und Bekämpfung der Paratuberkulose	36
2.11	MAP und Morbus Crohn (MC)?	41
3	<i>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</i>	43
3.1	Arbeitskonzept	43
3.2	Material und Methoden	44
3.2.1	Verzeichnis der verwendeten Materialien	44
3.2.2	Referenz- und Kontrollstämme	46
3.2.3	Rinderkotproben	46
3.2.4	Ziehl-Neelsen-Färbung.....	47
3.2.5	Dekontaminationsverfahren zur kulturellen Anzuchtung von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) aus Rinderkot.....	48
3.2.6	Nährmedien für den mikrobiellen Nachweis und die Anzuchtung von MAP	49
3.2.6.1	Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Mycobactin J, Artikelnr. 222232, Fa. Becton Dickinson (BD®).....	49
3.2.6.2	ENCLIT-Schrägnährmedium, Fa. Artelt-ENCLIT.....	49
3.2.6.3	Middlebrook 7H10-Festnährmedium	50
3.2.6.4	Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium.....	52
3.2.6.5	MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube)-Flüssignährmedium, Artikelnr. 245113, Fa. Becton Dickinson (BD®)	53

3.2.7	Kulturelle Anzüchtung von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	54
3.2.7.1	Kulturelle Anzüchtung von MAP aus Rinderkot auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium.....	54
3.2.7.2	Kulturelle Anzüchtung von MAP aus Rinderkot auf ENCLIT-Schrägnährmedium.....	55
3.2.7.3	Kulturelle Anzüchtung von MAP aus Rinderkot auf Middlebrook 7H10-Festnährmedium.....	56
3.2.7.4	Kulturelle Anzüchtung von MAP in Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium.....	56
3.2.7.5	Kulturelle Anzüchtung von MAP in MGIT-Flüssignährmedium.....	57
3.2.8	Archivierung von MAP-Isolaten aus Rinderkotproben.....	57
3.2.8.1	Lyophilisierung	58
3.2.8.2	Gefrierkulturen	58
3.2.9	Extraktion genomischer DNA aus Mykobakterienkulturen	59
3.2.10	Extraktion genomischer DNA aus Rinderkotproben.....	60
3.2.10.1	DNA-Extraktionsverfahren I (Q).....	60
3.2.10.2	DNA-Extraktionsverfahren II (Qm)	61
3.2.10.3	DNA-Extraktionsverfahren III (R)	62
3.2.10.4	DNA-Extraktionsverfahren IV (Rm)	63
3.2.11	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> aus Rinderkot	64
3.2.11.1	Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	64
3.2.11.2	Konventionelle nested-Polymerasekettenreaktion (nPCR).....	68
3.2.11.3	Vorversuch: Einmischversuche 1, 2 und 3 – molekularbiologische Untersuchungen von artifiziell kontaminierten Rinderkotproben unter Berücksichtigung eines standardisierten DNA-Extraktionsverfahrens der Firma Qiagen	73
3.2.12	Hauptversuch I: Einmischversuche 4, 5 und 6 – molekularbiologische Untersuchungen von artifiziell kontaminierten Rinderkotproben unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren Q, Qm, R und Rm	75
3.2.13	Hauptversuch II: kulturelle, mikroskopische und molekularbiologische Untersuchung von nativen Rinderkotproben	77
4	ERGEBNISSE	79
4.1	Ergebnisse des Vorversuches Molekularbiologische Untersuchungen – Einmischversuche 1, 2 und 3.....	79
4.2	Ergebnisse des Hauptversuches I: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen – Einmischversuche 4, 5 und 6.....	81
4.2.1	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen des Einmischversuches 4	82
4.2.2	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen des Einmischversuches 5	87
4.2.3	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen des Einmischversuches 6	92
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Einmischversuche 4, 5 und 6	96
4.3	Ergebnisse des Hauptversuches II	102

4.3.1	Ergebnisse der kulturellen Anzucht der Rinderkotproben	102
4.3.2	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der Rinderkotproben	107
5	<i>DISKUSSION</i>	111
5.1	Analyse des Vorversuches (Einmischversuche 1, 2 und 3)	112
5.2	Analyse des Hauptversuches I (Einmischversuche 4, 5 und 6).....	115
5.3	Analyse des Hauptversuches II	120
5.3.1	Bewertung der kulturellen Untersuchungen des Hauptversuches II	120
5.3.2	Bewertung der mikroskopischen Untersuchungen des Hauptversuches II.....	127
5.3.3	Bewertung der molekularbiologischen Untersuchungen des Hauptversuches II.....	128
6	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	135
7	<i>SUMMARY</i>	136
8	<i>ANHANG</i>	137
8.1	Fließdiagramme.....	138
8.1.1	Fließdiagramm 1: Schematische Darstellung der Dekontamination von Rinderkot in Anlehnung an die AVID-Methode (AVID VII /1996).....	138
8.1.2	Fließdiagramm 2: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Mykobakterienkulturen mittels konventionellem Kitsystem (DNeasy Blood & Tissue Kit® der Fa. Qiagen).....	139
8.1.3	Fließdiagramm 3: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels Standard-DNA-Extraktionsverfahren Q (QIAamp DNA Stool Mini Kit® der Fa. Qiagen)	141
8.1.4	Fließdiagramm 4: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels modifiziertem DNA-Extraktionsverfahren Qm (QIAamp DNA Stool Mini Kit® der Fa. Qiagen).....	143
8.1.5	Fließdiagramm 5: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels Standard sowie modifiziertem DNA-Extraktionsverfahren R und Rm (High Pure PCR Template Preparation Kit® der Fa. Roche unter Verwendung des S.T.A.R. Puffers)	146
8.1.6	Fließdiagramm 6: Schematische Darstellung zur artifiziellen Kontamination von Rinderkotproben mit MAP (Einmischversuche 1, 2 und 3)	148
8.1.7	Fließdiagramm 7: Schematische Darstellung zur artifiziellen Kontamination von Rinderkotproben mit MAP im Hauptversuch I (Einmischversuche 4, 5 und 6)	149
8.2	Ergebnistabellen	150
9	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	170

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
Ct	Schwellenwert-Zyklus (engl.: threshold cycle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
d.h.	das heißt
engl.	englisch
et al.	und andere (lat.: et alii)
Fa.	Firma
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
Hrsg.	Herausgeber
i.A.	im Allgemeinen
i.d.R.	in der Regel
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
Konz.	Konzentration
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
n.d.	not detectable = nicht nachweisbar
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
Primer F	Forward Primer

Primer R	Reverse Primer
s	Sekunde(n)
s.	siehe
\pm s	Standardabweichung
sp./spp.	Spezies (Singular/Plural)
ssp.	Subspezies
sog.	so genannte
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
%	Prozent
+	positiv, plus
-	negativ, minus
>	größer als
\geq	größer als oder gleich
<	kleiner als
\leq	kleiner als oder gleich
®	geschütztes Warenzeichen
μ l	Mikroliter
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Albert Johnes (www.johnes.org)	2
Abbildung 2:	Elektronenmikroskopisches Bild von MAP (Prof. M. Collins an der Microbiology School of Veterinary Medicine University of Wisconsin; www.shafraan.net/chron/MAP200Wis.jpg)	4
Abbildung 3:	Milchrind in der Endphase der Paratuberkulose (Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen)	20
Abbildung 4 und 5:	paratuberkulös-veränderte Darmschlingen (links) bzw. -verändertes Darmstück (rechts) mit hirnwindungsartig aufgeworfener Darmschleimhaut	20
Abbildung 6 und 7:	Ziehl-Neelsen-Färbung von Rinderkot eines an Paratuberkulose erkrankten Rindes (links); Ziehl-Neelsen-Färbung von Darmgewebe eines an Paratuberkulose erkrankten Rindes (rechts)	25
Abbildung 8:	Kulturelle Anzucht von MAP aus Rinderkot auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium	55
Abbildung 9:	MGIT-Flüssignährmedium mit positiver Fluoreszenz nach Wachstum von MAP (rechts); Negativkontrolle (links)	57
Abbildung 10:	Einmischversuch 3 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Berücksichtigung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423, Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6})	79
Abbildung 11:	Einmischversuch 3 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423	80
Abbildung 12:	Einmischversuch 4 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Berücksichtigung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423, Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6})	83
Abbildung 13:	Einmischversuch 4 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423	83
Abbildung 14:	Einmischversuch 5 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Verwendung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423, Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6})	87
Abbildung 15:	Einmischversuch 5 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423	88
Abbildung 16:	Einmischversuch 6 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Verwendung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes J 27, Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6})	92
Abbildung 17:	Einmischversuch 6 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes J 27	93
Abbildung 18:	Graphische Darstellung der Ergebnisse der gemittelten Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens aus den Einmischversuchen 4, 5 und 6 unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren	98

Abbildung 19:	Graphische Darstellung der Resultate der logistischen Regression für die Nachweisrate der Real-Time PCR in Abhängigkeit der MAP-Konzentrationen in Rinderkotproben unter Berücksichtigung der vier DNA-Extraktionsverfahren.....	100
Abbildung 20:	Graphische Darstellung der logistischen Regressionskurven für die Nachweisrate der Real-Time PCR in Abhängigkeit der MAP-Konzentrationen in Rinderkotproben unter Berücksichtigung der Standard-DNA-Extraktionsverfahren Q und R.....	101
Abbildung 21:	Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206); Anzahl der Kultur-positiven (+, ++, +++) und -negativen Kotproben	103
Abbildung 22:	Durchschnittliche Kultivierungszeit bis zum Wachstum von MAP-Kolonien (Time To Detection/TTD) auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium der gering-, mittel- und hochgradig MAP-ausscheidenden Rinder sowie aller Ausscheider.....	103
Abbildung 23:	Anteil der kontaminierten Kulturansätze (n = 43) auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium (in %) der 206 Rinderkotproben unter Berücksichtigung der Kultivierungsdauer#	104
Abbildung 24:	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich zu den kulturellen Untersuchungen.....	106
Abbildung 25:	Ergebnisse der Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) mittels Real-Time PCR im Vergleich zu den kulturellen Untersuchungen	108
Abbildung 26:	Ergebnisse der Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) mittels nested PCR im Vergleich zu den kulturellen Untersuchungen	109
Abbildung 27:	Vergleich der mittels kultureller Anzucht, Real-Time PCR und nested-PCR ermittelten gering-, mittel- und hochgradig MAP-ausscheidenden Tiere	110

TABELLENVEZEICHNIS

Tabelle 1:	Systematik von MAP (NCBI Taxonomy Browser, 2006).....	3
Tabelle 2:	Herden- und Einzeltierprävalenzen der Paratuberkulose in unterschiedlichen Ländern unter Berücksichtigung der Probenanzahl und -art.....	12
Tabelle 3:	In Deutschland zugelassene ELISA-Verfahren zum Nachweis der Paratuberkulose unter Berücksichtigung des jeweiligen Antigens und der Art der Proben.....	22
Tabelle 4:	Diagnostische Validität unterschiedlicher ELISA-Verfahren im Vergleich zur Kotkultur zum Nachweis der Paratuberkulose (Köhler et al., 2004).....	23
Tabelle 5:	Ergebnisse der serologischen Herden- bzw. Einzeltier-Untersuchungen von 2.748 Serumproben aus 119 bayrischen Rinderherden unter Berücksichtigung von drei verschiedenen ELISA-Verfahren (Böttcher et al., 2005).....	24
Tabelle 6:	Angaben über die Primer des MAP-Markers F57.....	65
Tabelle 7:	Angaben über die Primer des MAP-Markers ISMav2.....	65
Tabelle 8:	Pipettierprotokoll für die Real-Time PCR (50 µl-Ansatz).....	66
Tabelle 9:	Thermocyclerkonfigurationen für die Real-Time PCR.....	66
Tabelle 10:	Innen- und Außenprimer der nested-PCR nach Bull et al. (2003).....	70
Tabelle 11:	Pipettierprotokoll für die nested-PCR basierend auf dem MAP-Marker IS900 (50 µl Ansatz).....	71
Tabelle 12:	Thermocyclerkonfiguration für die nested-PCR.....	71
Tabelle 13:	Übersicht zu den Einmischversuchen 1, 2 und 3 unter Berücksichtigung des Standard-DNA-Extraktionsverfahrens Q.....	74
Tabelle 14:	Übersicht zu den Einmischversuchen 4, 5 und 6 des Hauptversuches I unter Berücksichtigung der vier Extraktionsverfahren Q, Qm, R und Rm.....	77
Tabelle 15 a-c:	Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 1, 2 und 3 unter Berücksichtigung des MAP-Markers F57 und des Standard-DNA-Extraktionsverfahrens Q der Fa. Qiagen.....	81
Tabelle 16a-c:	Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 1, 2 und 3 unter Berücksichtigung des MAP-Markers F57 und Standard-DNA-Extraktionsverfahrens Q der Fa. Qiagen.....	81
Tabelle 17:	Einmischversuch 4A – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz).....	84
Tabelle 18:	Einmischversuch 4A – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	84
Tabelle 19:	Einmischversuch 4B – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz).....	85
Tabelle 20:	Einmischversuch 4B – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	85

Tabelle 21:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4A und 4B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	86
Tabelle 22:	Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4A und 4B sowie der jeweils durchgeführten PCR-Ansätze unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	86
Tabelle 23:	Einmischversuch 5A – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)	89
Tabelle 24:	Einmischversuch 5A – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	89
Tabelle 25:	Einmischversuch 5B – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)	90
Tabelle 26:	Einmischversuch 5B – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	90
Tabelle 27:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 5A und 5B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	91
Tabelle 28:	Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 5A und 5B sowie der jeweils durchgeführten PCR-Ansätze unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	91
Tabelle 29:	Einmischversuch 6A – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)	93
Tabelle 30:	Einmischversuch 6A – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	94
Tabelle 31:	Einmischversuch 6B – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)	94
Tabelle 32:	Einmischversuch 6B – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	95
Tabelle 33:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 6A und 6B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	95
Tabelle 34:	Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 6A und 6B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	96

Tabelle 35:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4, 5 und 6 unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	97
Tabelle 36:	Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4, 5 und 6 sowie Anzahl der PCR-Ansätze unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)	98
Tabelle 37:	Nachweisrate beim Einsatz der Real-Time PCR in Abhängigkeit von der MAP-Konzentration in Rinderkotproben unter Berücksichtigung der vier DNA- Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57).....	99
Tabelle 38:	Übereinstimmung der Ergebnisse der eigenen kulturellen Untersuchungen der nativen Rinderkotproben (n = 206) mit den Ergebnissen der unterschiedlichen Nachweisverfahren der Voruntersuchungen	102
Tabelle 39:	Anzahl der kontaminierten Kulturansätze auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium der 206 Rinderkotproben unter Berücksichtigung der Kultivierungsdauer	104
Tabelle 40:	Übersicht der Ergebnisse der mikroskopischen und kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich.....	105
Tabelle 41:	Übersicht der Ergebnisse der Real-Time PCR und der kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich.....	107
Tabelle 42:	Übersicht der Ergebnisse der nested-PCR und der kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich.....	109
Tabelle 43:	Ergebnisübersicht der mikroskopischen, kulturellen und molekularbiologischen Untersuchungen von voruntersuchten, nativen Rinderkotproben auf MAP (n = 206)	151
Tabelle 44:	Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen von voruntersuchten, nativen Rinderkotproben auf MAP (n = 206)	160
Tabelle 45:	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen von voruntersuchten, nativen Rinderkotproben auf MAP (n = 206).....	165

1 EINLEITUNG

Die Paratuberkulose des Rindes ist eine unheilbare, chronische Darmerkrankung der Wiederkäuer, die von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* hervorgerufen wird und im landwirtschaftlichen Sektor, insbesondere in Milchrinderbeständen, zu erheblichen finanziellen Verlusten führen kann. Da eine Beteiligung von MAP am Krankheitsgeschehen des Morbus Crohn beim Menschen nicht auszuschließen ist (Chiodini, 1998; Bull et al., 2003; Naser et al., 2004; Bülte et al., 2005), dieser Erreger in Tierbeständen weit verbreitet ist, und insbesondere Lebensmittel tierischen Ursprungs als Vektoren in Betracht zu ziehen sind (Hammer und Knapstein, 1998), ist die Etablierung eines zuverlässigen und schnellen Verfahrens zum frühzeitigen Nachweis des Erregers in Milchrinderbeständen von entscheidender Bedeutung.

Die diagnostischen Möglichkeiten zum Erregernachweis in infizierten Tieren sind aufgrund der spezifischen Pathogenese der Paratuberkulose begrenzt. Der derzeit als "golden standard" geltende kulturelle Nachweis des Erregers im Kot ist aufgrund der zeitintensiven Anzuchtdauer, der intermittierenden Ausscheidung von MAP sowie der hohen Kosten und Kontaminationsgefahr der Medien problematisch. Die zur Erfassung des Paratuberkulose-Status eines Betriebes am häufigsten zum Einsatz kommenden ELISA-Verfahren vermögen nicht, persistent infizierte Tiere frühzeitig zu identifizieren und weisen selbst bei Rindern, die sich in der klinischen Phase der Paratuberkulose befinden, starke Ergebnisschwankungen auf (Collins und Sockett, 1993; Rossiter und Burhans, 1996; Böttcher et al., 2005; Ortmann et al., 2005).

Vor dem Hintergrund dieser Schwierigkeiten bei der Paratuberkulosedagnostik in Rinderbeständen kommt den molekularbiologischen Nachweisverfahren eine besondere Bedeutung zu (Stephan, 2007), da diese einen schnellen und zugleich spezifischen Erregernachweis ermöglichen. In eigenen Untersuchungen sollte deshalb unter Verwendung eines institutseigenen TaqMan® Real-Time PCR-Verfahrens (Schönenbrücher et al., 2008) für die spezifischen Zielregionen F57 und IS*Mav*2 ein molekularbasierter Erregernachweis aus Rinderkot versucht werden. Um die Gewinnung von MAP-Erbsubstanz in guter analytischer Qualität und Reinheit bei gleichzeitig hoher Sensitivität aus der Matrix Rinderkot gewährleisten zu können, wurden vier unterschiedliche DNA-Extraktionsverfahren zur Isolierung von MAP-DNA aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben vergleichend untersucht. Damit könnte eine zuverlässigere Erfassung MAP-infizierter Rinder sowie eine Reduzierung der Untersuchungsdauer im Hinblick auf das kulturelle Referenzverfahren ermöglicht werden. Zur Bestätigung der Eignung der TaqMan® Real-Time PCR in Abhängigkeit des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens wurden native Rinderkotproben von definitiv Paratuberkulose-positiven sowie -negativen Tieren untersucht. Zusätzlich erfolgten vergleichende Untersuchungen der nativen Rinderkotproben mit einem nested-PCR-Verfahren (Bull et al., 2003), basierend auf dem MAP-Marker IS900, sowie parallel mikroskopische und kulturelle Untersuchungen.

2 LITERATURÜBERSICHT ÜBER DIE PARATUBERKULOSE DES RINDES

2.1 Definition und historischer Überblick

Die Paratuberkulose des Rindes ist eine chronische, granulomatöse Enteritis bei Haus-, Zoo- und Wildwiederkäuern, die von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Es handelt sich dabei um eine weltweit verbreitete, bislang unheilbare Erkrankung, deren klinischer Verlauf durch Abmagerung und Durchfall gekennzeichnet ist und die immer einen tödlichen Ausgang nimmt. Die Paratuberkulose zählt in Deutschland zu den meldepflichtigen Erkrankungen. Den Zusammenhang zwischen der chronischen, granulomatösen Enteritis und der Anwesenheit von säurefesten Mikroorganismen stellten Johnne und Fortingham 1895 her. Daher stammt auch der Name Johnne's Disease, eine weitere geläufige Bezeichnung für diese Erkrankung (Johnne und Fortingham, 1895).



Abbildung 1: Albert Johnne (www.johnnes.org)

Erst ein Jahrzehnt später wurde zwischen der tuberkulösen und der pseudotuberkulösen Form der Enteritis unterschieden (Bang, 1906). Die ersten Kultivierungsversuche von Albien (1910) führten trotz großer Bemühungen zu keinem Erfolg. Erst zwei Jahre später gelang schließlich Twort und Ingram die Anzüchtung des Erregers durch den Zusatz von hitzeinaktiviertem, getrocknetem Koloniematerial von *Mycobacterium* (*M.*) *phlei* zu dem ursprünglichen Nährmedium (Twort und Ingram, 1912). Fortan wurde der Erreger als *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johnei* bezeichnet. Nach mehrfachen Umbenennungen erlangte er, aufgrund seines hohen genetischen Verwandtschaftsgrades zu *Mycobacterium avium* ssp. *avium*, seine heutige Bezeichnung: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP).

2.2 Taxonomie und Charakterisierung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

MAP ist ein 0,3-2 x 0,3-0,5 µm großes, schwach grampositives, unbewegliches und obligat aerobes Stäbchenbakterium (Bisping und Amtsberg, 1988). Die Systematik des Mikroorganismus ist **Tabelle 1** zu entnehmen.

Tabelle 1: Systematik von MAP (NCBI Taxonomy Browser, 2006)

Systematik	
Domäne:	Bakterien
Abteilung:	Actinobacteria
Ordnung:	Actinomycetales
Familie:	Mycobacteriaceae
Gattung:	<i>Mycobacterium</i>
Art:	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>

Zusätzlich werden Mykobakterien in die **Runyon-Gruppen I-IV** untergliedert (Rolle und Mayr, 2002). Zu der **Runyon-Gruppe I** gehören langsam wachsende, photochromogene Mykobakterien, während zu der **Runyon-Gruppe II** langsam wachsende, skotochromogene Mykobakterien zählen. Alle langsam wachsenden Mykobakterien, die nicht in der Lage sind Pigmente zu produzieren, werden zur **Runyon-Gruppe III** zusammengefasst. Bei langsam wachsenden Mykobakterien ist mit Kultivierungszeiten von 4 bis 16 Wochen zu rechnen, was auf die verlangsamte Nährstoffaufnahme über die spezifische mykobakterielle Zellwand (Domingue und Woody, 1997) und die lang andauernde Generationszeit der Bakterien (unter optimalen Wachstumsbedingungen bei MAP 20 Stunden) zurückzuführen ist (Lambrecht et al., 1988). Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind *Mycobacterium avium* ssp. *avium*, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) und *Mycobacterium intracellulare*, die zusammen den *Mycobacterium-avium-intracellulare*-Komplex (MAC) bilden (Rolle und Mayr, 2002). Basierend auf ausführlichen Untersuchungen konnte ein 95 %iger Verwandtschaftsgrad zwischen *Mycobacterium avium* ssp. *avium* und MAP ermittelt werden (Thorel et al., 1990). Die **Runyon-Gruppe IV** beinhaltet alle schnell wachsenden Mykobakterien, wie *M. phlei*, *M. chelonae* u. a., die bereits nach Kultivierungszeiten von sieben Tagen ein Koloniewachstum zeigen.

Ein weiteres Charakteristikum von MAP ist der spezifische **Zellwandaufbau**. Die mykobakterielle Zellwand besteht aus vier unterschiedlichen Schichten und liegt der inneren bakteriellen Zellmembran direkt auf. Die innen liegende Schicht der Zellwand besteht aus einem Mureingerüst. Ihr folgt eine Zellwandschicht aus Arabinogalactanen und Polysacchariden, die sich aus Galactose und Arabinose zusammensetzen. Die Seitenketten dieser Polysaccharide sind zusätzlich mit Lipiden und langkettigen Mycolsäure-Molekülen (79-85 C-Atome) quervernetzt, die die dritte Schicht der mykobakteriellen Zellwand bilden. Die Enden der Mycolsäuren sind wiederum über Glycolipide mit der vierten und letzten

Schicht der Zellwand verbunden, die aus verschiedenen Lipiden wie Glycosiden und Peptidoglycolipiden besteht (Grange, 1996). Ein bedeutsames Lipid-Molekül der Zellwand von MAP stellt das Lipoarabinomannan dar, welches alle vier Schichten der Zellwand gleichermaßen durchdringt und eine stabile Verankerung der Zellmembran mit der Zellwand gewährleistet. Dieses spezifische Lipid-Molekül trägt nicht nur zur Stabilität der Zellwand dieses Bakteriums bei, sondern ist vermutlich auch an der Ausprägung der Pathogenität verschiedener Stämme von MAP beteiligt (Grange, 1996). Zusätzlich wird Lipoarabinomannan aufgrund seiner Spezifität zur indirekten Diagnostik von MAP herangezogen, wie zum Beispiel bei dem SVANOVIR[®]-ELISA (Fa. Svanova, Uppsala, Schweden). Insgesamt gesehen, besteht die Zellwand von MAP, bezogen auf die Trockenmasse, zu 60 % aus Fetten und Wachsen, die dem Bakterium aufgrund zusätzlicher Quervernetzungen zwischen den Arabinogalactanmycolat-Komplexen und den Peptidoglycanen eine außergewöhnliche Säure- und Alkoholfestigkeit sowie eine äußerst hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber widrigen Umwelteinflüssen wie Trockenheit, Hitze und Kälte verleihen. Die ausgeprägte Säure- und Alkoholfestigkeit der Mykobakterien ermöglicht durch den Einsatz einer selektiven Färbetechnik, der sog. Ziehl-Neelsen-Färbung, einen gezielten mikroskopischen Nachweis. Dabei erscheinen Mykobakterien als rote Stäbchenbakterien auf blauem Hintergrund. Ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Mykobakterien kann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wie Phenol-Acridinorange (Smithwick et al., 1995) oder Auramin O-Rhodamin (Truant, 1962) erfolgen. Ein weiteres Charakteristikum von MAP ist die Ausbildung von **Bakteriennestern**, deren Zusammenhalt durch interzelluläre Filamente gewährleistet wird (Merkal et al., 1968). Derartige typische Nester von MAP können in der Ziehl-Neelsen-Färbung dargestellt werden. **Abbildung 2** zeigt den Zusammenhalt einzelner Zellen von MAP innerhalb eines Nestes in einem elektronenmikroskopischen Bild.

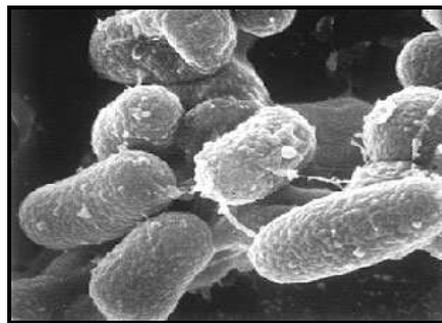


Abbildung 2: Elektronenmikroskopisches Bild von MAP (Prof. M. Collins an der Microbiology School of Veterinary Medicine University of Wisconsin; www.shafraan.net/chron/MAP200Wis.jpg)

Eine weitere Besonderheit von MAP ist die Abhängigkeit des Erregers von **Mycobactin J** (MJ) (Merkal und Mc Cullough, 1982). Mycobactine sind Eisenchelatlagerer und spezifische Bestandteile der mykobakteriellen Zellwand. MJ wurde erstmals 1953 in reiner Form bei einem Stamm von *M. phlei* isoliert (Francis et al., 1953). Mittlerweile sind zahlreiche unterschiedliche Mycobactine verschiedener *Mycobacterium* spp. bekannt (Barclay und Ratledge, 1983). MJ ist für das kulturelle Wachstum von MAP

essentiell, da dieses nicht in der Lage ist, MJ selbständig zu synthetisieren (Merkal und Mc Cullough, 1982). Um ein optimales Wachstum des Erregers zu gewährleisten, ist der Zusatz von 1 µg MJ pro Milliliter Nährmedium zu empfehlen (Lambrecht und Collins, 1992). Die Mycobaktin J-Abhängigkeit von MAP bei der Erstkultivierung diente lange Zeit als diagnostisches Kriterium und ermöglichte die kulturelle Differenzierung zwischen MAP und anderen langsam wachsenden *Mycobacterium* spp., die im Gegensatz zu MAP ausnahmslos in der Lage sind, Mycobactin selbständig zu synthetisieren. Heutzutage erfolgt die Bestätigung gewachsener mykobakterieller Kulturen zumeist molekularbiologisch. Ein Wachstum von MAP kann auch durch die Zugabe hoher Eisenammoniumcitrat-Konzentrationen ermöglicht werden. Teilweise ist der Erreger in der Lage, niedermolekulare Eisenchelatbildner, sog. Exocholine, zu produzieren, die ein MJ-unabhängiges Wachstum ermöglichen (Barclay und Ratledge, 1983).

Ein weiteres Charakteristikum von MAP ist die Möglichkeit, zellwandlose Formen, so genannte **Spheroplasten**, im Gewebe betroffener Organismen auszubilden. Der Verlust der Zellwand zieht dabei gleichzeitig einen Verlust der Säurefestigkeit des Mikroorganismus nach sich und erschwert seine mikroskopische Nachweisbarkeit. Ein direkter Erregernachweis kann allerdings molekularbiologisch oder kulturell erfolgen. Verschiedene Studien berichten vom Nachweis mykobakterieller DNA und der kulturellen Anzüchtung von langsam wachsenden, pleomorphen, Spheroplasten-artigen, mykobakteriellen Mikroorganismen aus Gewebeproben von Morbus Crohn (MC)-, Colitis ulcerosa (CU)-Patienten, aber auch von Kontrollpersonen (Burnham et al., 1978; Chiodini et al., 1984b; Chiodini et al., 1986; Graham et al., 1987; Markeisch et al., 1988; Wall et al., 1993). Chiodini et al. (1984b/1986) gelang die Isolierung von MJ-abhängigen, variabel säurefesten, Spheroplasten-artigen, mykobakteriellen Formen bei vier MC-Patienten, die in einer nachgeschalteten langwierigen kulturellen Anzüchtung ihre ursprüngliche bakterielle Form wiedererlangten. Wall et al. (1993) untersuchten 30 bislang uncharakterisierte Kulturen von 21 MC-Patienten molekularbiologisch, basierend auf dem Insertionselement IS900. 6 von 30 Proben erwiesen sich als MAP-positiv. Des Weiteren wurden PCR-positive Proben auch durch Ziehl-Neelsen-Färbung auf säurefeste Stäbchen überprüft; dabei konnten auch hier zellwandlose, pleomorphe Spheroplasten-artige Formen in den Originalkulturen und den Subkulturen identifiziert werden. Schon lange wurde die Anwesenheit von Spheroplasten bei mykobakteriellen Erkrankungen wie der Tuberkulose vermutet. Mattman beschrieb bereits 1970 die sukzessive Rückbildung von isolierten Spheroplasten von *M. tuberculosis* zu den ursprünglichen säurefesten Stäbchenbakterien (Mattman et al., 1970). Bezüglich der konventionellen Therapie der in China weit verbreiteten Tuberkulose beim Menschen ist das Auftreten zellwandfreier Formen von *M. tuberculosis* mittlerweile unumstritten. Deren Bildung wird durch den Einsatz von antituberkulösen Medikamenten selbst induziert (Wang und Chen, 2001). Auch Untersuchungen von Michailova et al. (2005) zeigten, dass „heteroresistente“ Stämme von *M. tuberculosis* zu einem ausgeprägten Pleomorphismus neigen und Stämme, die Resistenzen gegenüber den Antibiotika Streptomycin und Isoniazid aufwiesen, neben der klassischen bakteriellen Form auch atypische, granuläre, zellwandfreie Formen ausbilden konnten. Dieselbe Wirkung von Streptomycin wird auch bei MAP

vermutet (Michailova et al., 2005). Weiterhin besteht die Möglichkeit der experimentell induzierten Ausbildung von Spheroplasten. Udou et al. (1982/1983) gelang die Bildung von mykobakteriellen Spheroplasten durch den kombinierten Einsatz von L-Glycine, Lysozyme und anderen lytischen Enzymen aus Zellen eines *M. smegmatis*-Stammes. Die Autoren zeigten weiterhin, dass diese Spheroplasten in der Lage waren, ihre ursprüngliche bakterielle Form wiederzuerlangen (Udou et al., 1982; Udou et al., 1983).

2.3 Tenazität und Inaktivierung von MAP

Aufgrund seiner spezifischen Zellwandstruktur verfügt MAP über eine außerordentlich hohe Tenazität. Der Erreger ist in der Lage, in fließenden Gewässern bis zu 163 Tage (Lovel et al., 1944) und in stehenden Gewässern bis zu 270 Tage (Larsen et al., 1956) zu überleben. Die Überlebensfähigkeit des Erregers in Rinderkot wird mit bis zu 270 Tagen nach Larsen et al. (1956) und bis zu 284 nach Lovell et al. (1944) angegeben. Allerdings zeigten weitere Untersuchungen, dass sich die Überlebensdauer von MAP in Gülle, bestehend aus 10 % Kot und 90 % Urin, auf < 30 Tage (Larsen et al., 1956) bzw. in reinem Rinderurin auf 7 Tage (Vishnevskii et al., 1940) reduzierte. Die Autoren schlossen aus ihren Untersuchungen, dass sich Rinderurin hemmend auf die Tenazität des Erregers auswirkt. Anderen Arbeitsgruppen gelang die Isolierung lebensfähiger Zellen von MAP aus Rindergülle, bestehend aus Rinderkot, -urin, Stroh und Wasser, bei Lagertemperaturen von +5 °C nach über 287 Tagen (Jorgensen, 1977), bei +15 °C nach über 112 Tagen (Jorgensen, 1977) und bei +35 °C nach über 28 Tagen (Olsen et al., 1985). Vermutlich hemmen schnell wachsende Begleitkeime bei hohen Lagertemperaturen das Wachstum von MAP.

Auf kontaminierten Weiden kann der Erreger bis zu 11 Monate überdauern (Gay und Sherman, 1992). Diese Wartefrist ist einzuhalten, um eine Infektionsgefahr von Wiederkäuern in der folgenden Weidesaison zu vermeiden (Chiodini und van Kruiningen, 1983). Weiterhin ist zu beachten, dass die Überlebensfähigkeit des Erregers in Böden mit niedrigen pH-Werten noch gesteigert wird (Hammer et al., 1998). Nach Larsen et al. (1956) reagiert MAP allein auf UV-Strahlung empfindlich und überlebt deren direkte Einwirkung für lediglich 65 bis 100 Stunden. In Untersuchungen nach Whittington et al. (2004) konnten auf natürlich kontaminierten Bodenparzellen, die vollständig im Schatten gelagert wurden, nach 24 Wochen Lagerungszeit überlebensfähige Erregerzellen isoliert werden, während der Erreger auf Parzellen mit 70 % Schatten nur eine Lagerungszeit von 9 Wochen überlebte. Die Autoren beobachteten zusätzlich, dass der Erreger auf grasbedeckten Weideflächen, die ansonsten keinen weiteren Schutz vor UV-Licht aufwiesen, 32 Wochen überlebensfähig war. Auf Weideflächen, die von Schafen kahl geweidet wurden und somit keinen Schutz vor UV-Strahlung boten, konnte der Erreger nur zwei Wochen überdauern (Whittington et al., 2004). Aber auch Rinderkot bietet in tiefer gelegenen Schichten Schutz vor dem Sonnenlicht. Die Untersuchungen zeigten auch, dass die Umgebungstemperatur großen Einfluss auf die Überlebensrate des Erregers nimmt. Diese war in den Wintermonaten wesentlich niedriger als in den Frühjahrsmonaten. Weiterhin vermuten die Autoren, dass MAP in der Lage ist, eine sog. „Ruhephase“ zu durchlaufen, die nicht-sporenbildenden Bakterien das Überleben unwirtlicher Umweltbedingungen

ermöglicht. Eine derartige „Ruhephase“ konnte auch bei verschiedenen schnell wachsenden Mykobakterien nachgewiesen werden. So induzierte beispielsweise die Verringerung der Sauerstoffzufuhr bei *M. smegmatis* (Dick et al., 1998), *M. bovis* (Hutter und Dick, 1999) sowie *M. tuberculosis* (Wayne und Hayes, 1996) eine Art „Ruhephase“ der betroffenen Zellen, in der keine Vermehrung, dafür aber eine erhöhte Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika zu beobachten ist (Wayne und Sramek, 1994). Mittlerweile ist bekannt, dass die Entwicklung einer derartigen bakteriellen „Ruhephase“ genetisch gesteuert wird. Dafür verantwortliche Gene (*dps*-like-Gen sowie *relA*-Gen) konnten auch im Genom von Mykobakterien wie *M. smegmatis*, *M. avium* ssp. *avium*, *M. tuberculosis* sowie MAP identifiziert werden (Avarbock et al., 1999; Gupta et al., 2002; Whittington et al., 2004). Allerdings existieren bislang keine Untersuchungen über Expression und Funktion dieser Gene in MAP.

MAP ist weiterhin in der Lage, die **Phagozytose durch Protozoen**, die ubiquitär in Gewässern, Böden und anderen organischen Matrices wie Rinderkot und Gülle (Brown et al., 2002) anzutreffen sind, zu überleben und sich sogar intrazellulär zu vermehren (Primm et al., 2004; Rowe und Grant, 2006). Auch bei anderen pathogenen Bakterien (*Legionella*, *Listeria*, *Clamydophila*, *Mycobacteria*) ist dieses Phänomen beschrieben worden (Harb et al., 2000). So überlebt beispielsweise *M. avium* ssp. *avium*, der nächste Verwandte zu MAP, die Phagozytose durch *Tetrahymena pyriformis* und *Acanthamoeba* spp. (Cirillo et al., 1997; Steinert et al., 1998; Miltner und Bermudez, 2000; Strahl et al., 2001). Miltner und Bermudez (2000) konnten feststellen, dass *M. avium* ssp. *avium* durch die Phagozytose von *A. castellanii* eine ausgeprägtere Resistenz gegenüber gängigen Antibiotika wie Rifabutin, Azithromycin und Clarithromycin aufwies. Cirillo et al. (1997) beobachteten, dass durch die Phagozytose von *M. avium* ssp. *avium* durch *A. castellanii* die Aufnahme des Bakteriums in epheliale Wirtszellen erleichtert wird, da die pathogene Amöbe *A. castellanii* in der Lage ist, in das intestinale Epithel von Wirtstieren vorzudringen und die phagozytierten Mykobakterien in den Wirtsorganismus einzuschleusen. Die Amöben fungieren an dieser Stelle also als „Trojanisches Pferd“ (Baker und Brown, 1994). Einen weiteren Vorteil bietet die Phagozytose durch Protozoen gegenüber widrigen Umwelteinflüssen. In der Doppelwand der widerstandsfähigen zystischen Dauerformen von *A. polyphaga*, die ebenfalls bei widrigen Umweltbedingungen gebildet werden, konnte *M. avium* ssp. *avium* mikroskopisch lokalisiert werden (Steinert et al., 1998). Derartige Zysten können durch den Wind leicht verbreitet werden und bieten dem Bakterium somit nicht nur Schutz vor Umwelteinflüssen. Aber auch MAP überlebt die Phagozytose durch Protozoen (Whan et al., 2006). Im Rahmen von Modellversuchen wurde MAP innerhalb von 180 Minuten bei Umgebungstemperaturen von +25 °C von *A. castellanii* und *A. polyphaga* phagozytiert und erhöhte seine Zellzahlen zwischen dem 7. und 24. Tag der Inkubation um 1-1,5 log₁₀ ohne die Zugabe von Mycobactin J. Wahn et al. (2006) zeigten weiterhin, dass phagozytierte Erregerzellen resistenter gegenüber Chlor-Lösungen waren. Auch Mura et al. (2006) konnte eine Vermehrung von MAP innerhalb *A. polyphaga* beobachten. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen, dass MAP das Potential besitzt, längerfristig in phagozytierter

Form in Protozoen und damit in der Umwelt zu überleben (Mura et al., 2006). Allerdings existieren bislang nur Untersuchungen im Rahmen von Modellversuchen bei optimierten Umgebungstemperaturen.

Die besondere Zellwandstruktur verleiht dem Erreger aber nicht nur eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Umweltfaktoren, sondern auch gegenüber einer Vielzahl von **Desinfektionsmitteln** wie beispielsweise Chlor (Whan et al., 2001). Nur phenol- und formaldehydhaltige Desinfektionsmittel sind in der Lage, die spezifische Zellwand des Erregers zu zerstören (Chiodini et al., 1984a).

Als eine weitere, bislang hypothetische Überlebensstrategie von MAP in der Umwelt wird die Bildung von **Biofilmen** diskutiert (Falkinham et al., 2001). Biofilme bestehen aus einer dünnen Schleimschicht (Film), in der Mikroorganismen eingebettet sind, und befinden sich vorwiegend an Grenzflächen wie zum Beispiel der Wasseroberfläche. Bislang konnte die Ausbildung eines Biofilms von MAP nicht nachgewiesen werden (Rowe und Grant, 2006). Allerdings belegen diverse Studien, dass verschiedene *Mycobacterium* spp. durchaus in der Lage sind, Biofilme zu bilden, so beispielsweise *M. avium* ssp. *avium* (Carter et al., 2003; Carter et al., 2004; Yamazaki et al., 2006), *M. smegmatis* (Martinez et al., 1999; Yamazaki et al., 2006), *M. fortuitum* (Bardouniotis et al., 2003), *M. marinum* (Bardouniotis et al., 2003; Hall-Stoodley et al., 2006) sowie *M. ulcerans* (Marsollier et al., 2004).

Auch die ausgesprochene **Thermostabilität** von MAP ist auf die stabile Zellwandstruktur des Bakteriums zurückzuführen. Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Überlebensfähigkeit des Erregers bei sehr **niedrigen Lagertemperaturen**. Larsen et al. (1956) gelang die kulturelle Anzucht von MAP aus natürlich kontaminiertem Rinderkot bei Lagertemperaturen von -14 °C nach einem Zeitraum von 12 Monaten. In einer weiteren Studie (Richards und Thoen, 1977) wurden artifiziiell und natürlich kontaminierte Rinderkotproben direkt und nach Lagerung bei -70 °C für drei sowie 15 Wochen kulturell untersucht. Es zeigte sich, dass die Lagerung der Kotproben während der ersten drei Wochen bei -70 °C zu einer signifikanten Reduktion der Koloniezahlen von MAP bei der kulturellen Anzucht auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium führten, während die Verlängerung des Lagerungszeitraumes auf 15 Wochen bei derselben Temperatur die Koloniezahl nur unwesentlich beeinflusste. Somit ist bei der Lagerung von kontaminierten Kotproben bei derart niedrigen Temperaturen zwar mit Keimzahl-Verlusten zu rechnen, dennoch ist die Überlebensfähigkeit von MAP durchaus gewährleistet. Kulturell falsch-negative Ergebnisse sind allerdings bei Rinderkotproben, die den Erreger nur in geringen Konzentrationen enthalten, nicht auszuschließen. Die Reduktion der Koloniezahlen von MAP bei natürlich kontaminierten Kotproben war deutlich niedriger als bei artifiziiell kontaminierten Kotproben. Vermutlich liegt ein Teil der Erreger in natürlich kontaminierten Kotproben in phagozytierter Form innerhalb von Makrophagen vor, was eine Art „Schutzeffekt“ der Bakterien vor äußeren widrigen Umwelteinflüssen bewirken könnte. Weiterhin ist bislang ungeklärt, welchen Einfluss die Kultivierung von MAP auf dessen Pathogenität und Überlebensfähigkeit nimmt. Richards (1981) zeigte in einem Modellversuch, dass die Anzahl der Kolonien von MAP in natürlich kontaminierten Rinderkotproben bei einer Lagerung bei -70 °C für 15 Wochen

weniger deutlich reduziert wurde als bei einer Lagerung bei +23 °C für vier oder 10 Tage. Er führte dieses Phänomen auf die gesteigerte Vermehrung der im Rinderkot enthaltenen Begleitkeimflora zurück (Richards, 1981). Deshalb sollten Rinderkotproben nach der Entnahme entweder unverzüglich für die kulturelle Anzucht aufbereitet werden oder aber nur wenige Tage kühl bzw. längerfristig tiefgekühlt gelagert werden. Auch Grant (2000) gelang die Isolierung lebensfähiger MAP-Zellen bei Lagertemperaturen von -80 °C nach Lagerzeiten von zwei bis sechs Monaten. Allerdings wiesen die MAP-Isolate eine schwächer ausgeprägte Hitzeresistenz auf (Grant et al., 2000).

MAP-Zellen können auch gegenüber **hohen Temperaturen**, wie sie bei handelsüblichen Pasteurisierungsverfahren von Rohmilch auftreten, eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit aufweisen. Das Vorkommen von MAP in Rohmilch wird von verschiedenen Autoren belegt (Grant et al., 2001; Lund et al., 2002). Dabei steht die Sekundärkontamination der Milch mit erregerehaltigen Kotpartikeln, zumeist verursacht durch eine mangelhafte Melkhygiene, im Vordergrund. Die primäre sekretorische Ausscheidung des Erregers in die Milch ist eher zu vernachlässigen (Sweeney et al., 1992; Streeter et al., 1995; Ayele et al., 2005). In der Literatur wird von Erregerkonzentrationen zwischen 2 und 8 KBE/50 ml Milch bei klinisch inapparent und klinisch infizierten Milchrindern berichtet (Stabel et al., 2001). Deshalb beziehen sich zahlreiche Studien auf die **Hitzeinaktivierung** des Erregers in der Milch. Grundsätzlich werden drei Pasteurisierungsverfahren gemäß VO (EG) Nr. 1662/2006 unterschieden: die Dauererhitzung (30 Minuten bei mind. +63 °C), die Kurzzeiterhitzung (15 Sekunden bei mind. +72 °C) und die Ultrahoherhitzung bei > +85 °C. Derzeit kommen in Deutschland der Kurzzeiterhitzung sowie der Ultrahoherhitzung die größte Bedeutung zu. Die Dauererhitzung findet in Molkereien aus technologisch-wirtschaftlichen Gründen kaum mehr Anwendung. Es gibt zahlreiche Publikationen, in denen die Isolierung und Kultivierung von MAP aus artifiziell kontaminierter Milch (Chiodini und Hermon-Taylor, 1993; Meylan et al., 1996; Grant et al., 1996a; Grant et al., 1996b; Sung und Collins, 1998; Gao et al., 2002; Hammer et al., 2002; McDonald et al., 2005) oder natürlich kontaminierter Milch (Grant et al., 2002a; Grant et al., 2002b) gelang, die zuvor üblichen Pasteurisierungsverfahren wie der Dauererhitzung (+65 °C für 30 Minuten) oder der Kurzzeiterhitzung (HTST = high-temperature, short-time) (+72 °C für 15 Sekunden) unterzogen wurden. Der kritische Bereich für eine effiziente Abtötung von MAP scheint, gemäß entsprechender Untersuchungen (Grant et al., 1999; Grant et al., 2002a; Grant et al., 2002b), bei +72 °C für 15-30 Sekunden zu liegen. Den Autoren gelang zunächst die vollständige Inaktivierung von MAP in artifiziell kontaminierten Milchproben bei einer Temperatur-Zeit-Kombination von +72 °C für 25 Sekunden (Grant et al., 1999). In weiteren Modellversuchen (Grant et al., 2002a; Grant et al., 2002b) führte die Verlängerung der Erhitzungsdauer von 15 auf 25 Sekunden bei einer Erhitzungstemperatur von +72 °C zwar zu einer deutlich erhöhten Abtötungsrate von MAP, dennoch konnten die Autoren bei allen angewandten Temperatur-Zeit-Kombinationen vereinzelt vermehrungsfähige Erregerzellen aus den artifiziell kontaminierten Milchproben isolieren. Einige Studien (Grant et al., 2002a; Grant et al., 2005; McDonald et al., 2005) berichten sogar von überlebenden Zellen des Erregers bei höheren Erhitzungstemperaturen (> +72 °C). Derart inkonsistente Befunde könnten nach Ansicht verschiedener Autoren auf die Fähigkeit

von MAP, Zellaggregate zu bilden, zurückgeführt werden. Derartige Zellaggregate bestehen aus bis zu 10.000 Bakterienzellen (Hammer et al., 2002; Grant et al., 2005), die durch die Ausbildung interzellulärer Filamente den Zusammenhalt der Zellen untereinander und eventuell das Überleben der innen liegenden Bakterienzellen während eines Erhitzungsprozesses gewährleisten. Dies konnte zwar nach Erhitzung von Zellklumpen anhand einer Lebend-Tot-Färbung bestätigt werden (Grant et al., 1996a), nicht aber durch die kulturelle Anzucht erhitzter Bakterienklumpen (Sung und Collins, 1998). Weitere Gründe für die Inkonsistenz der Hitzeinaktivierung von MAP sind diverse Einschränkungen, die Modellversuche im Labormaßstab mit sich bringen. Diese sind nicht mit den Fließverhältnissen in Großanlagen der Molkereibetriebe vergleichbar. Zusätzlich verwenden die meisten Modellversuche artifiziell kontaminierte Milch, welche dieselben Fragestellungen aufwirft wie bereits artifiziell kontaminierter Rinderkot (s.o.). Es ist bislang nicht klar, ob und welche Unterschiede zwischen Wildstämmen und subkultivierten Laborstämmen von MAP bestehen. Damit ließen sich auch Inkonsistenzen bei der Hitzeinaktivierung von MAP in unterschiedlichen Laborstudien erklären, die entweder natürlich (mit Rinderkotpartikeln) kontaminierte Milch (Grant et al., 2002a; Rademaker et al., 2005) oder mit Laborstämmen artifiziell kontaminierte Milch (Grant et al., 2005; McDonald et al., 2005) verwendeten. Weiteren bedeutsamen Einfluss auf die Inaktivierung des Erregers nimmt die Erhitzungsmethode. Die meisten Kurzerhitzungsanlagen in Molkereien arbeiten mit Plattenwärmeaustauschern, die einen kontinuierlichen Durchfluss der Milch mit einer Leistung von mehreren 10.000 Litern pro Stunde gewährleisten. Demgegenüber finden bei den meisten Modellversuchen sog. stationäre Erhitzungsverfahren (batch Verfahren) Verwendung. Selbst große Laboranlagen, die ein hochturbulentes Durchflussverfahren mit einer Durchflusskapazität von 2.000 Litern Milch pro Stunde (Grant et al., 2002b) einsetzen, spiegeln nicht die Fließverhältnisse in den Großanlagen von Molkereien wieder. Hope et al. (1996) und Stabel et al. (1997) erzielten allerdings durch turbulente Strömungen im Durchflusserhitzer eine bessere Hitzeinaktivierung von MAP als mit der sonst üblichen stationären Erhitzung (Hammer und Knappstein, 1998).

Abschließend ist festzuhalten, dass in der Literatur nach wie vor Widersprüche in Bezug auf die Hitzeresistenz von MAP in Milch existieren. Erwiesen scheint, dass durch die Kurzzeiterhitzung die Anzahl an kultivierbaren Erregerzellen in artifiziell kontaminierten Milchproben um mindestens zwei Zehnerpotenzen reduziert wird (Hammer, 2000). Das Vorkommen von MAP in pasteurisierter Milch ist somit eher selten, zumal nur sehr geringe Erregerkonzentrationen in der Rohmilch vorliegen und diese durch kommerzielle Durchflusserhitzung in ihrer Anzahl deutlich reduziert werden (Hammer und Knappstein, 1998).

2.4 Epidemiologie

Die Paratuberkulose war bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts weltweit verbreitet (Bugge und Cordsen, 1908; Pearson, 1908; Paine, 1908; Albiston und Talbot, 1936). Nach Chiodini et al. (1984a) ist auch gegenwärtig das Vorkommen der Paratuberkulose auf allen Kontinenten bestätigt. Als Ausnahme gilt Schweden, das aufgrund von Eradikationsprogrammen frei von der Paratuberkulose sein soll (Viske et al., 1996).

Basierend auf amtlichen Statistiken über gemeldete Paratuberkulosefälle in der Bundesrepublik Deutschland konnten starke regionale Unterschiede in der Verbreitung der Erkrankung festgestellt werden (Schliesser und Schaal, 1983). In der Zeit zwischen 1971 und 1981 traten ca. 90 % der deutschlandweit gemeldeten Herdeninfektionen in den nördlichen Gebieten und Küstenregionen auf. Allerdings gilt damals wie heute, dass Erkrankungsfälle der Paratuberkulose nur dort gemeldet werden können, wo auch nach ihnen gesucht wird (Klee, 2000). Gegenwärtig liegt die Zahl der gemeldeten Paratuberkulose-Erkrankungsfälle zwischen 300 und 450 Fällen pro Jahr, wobei Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen am stärksten betroffen sind. In den Jahren 2003, 2004 und 2005 wurden 281, 283 und 290 Fälle über das Tierseuchennachrichtensystem (TSN) gemeldet (Geue et al., 2005). Allerdings sind diese Fallzahlen aufgrund der Meldebestimmungen, die nur klinisch manifeste Fälle der Paratuberkulose erfassen, sowie aufgrund der erheblichen Schwierigkeiten bei der Paratuberkulose-Diagnostik wenig repräsentativ. Es ist davon auszugehen, dass die Dunkelziffer der Fallzahlen, insbesondere von Tieren, die sich in der langen, oftmals unentdeckten Latenzphase dieser Infektionskrankheit befinden, wesentlich höher liegt.

Zur Abschätzung der Paratuberkulose-Prävalenz in verschiedenen Ländern wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. In Tabelle 2 sind Herden- und Einzeltierprävalenzen einiger dieser Studien aus unterschiedlichen Ländern gelistet. Dabei wurden Herdenprävalenzen von 7 % bis 85 % und Einzeltierprävalenzen von 3 % bis 30 % ermittelt. Allerdings ist die Vergleichbarkeit derartiger Prävalenzstudien aufgrund der Variabilität der eingesetzten Testverfahren sowie Probenmatrizes, inadäquater Beprobungsschemata und der unterschiedlichen Probandenzahlen nicht gewährleistet (Boelaert et al., 2000). Zusätzlich weisen die Schwankungen dieser Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass der Erreger in den Rinderbeständen weiter verbreitet zu sein scheint als bislang angenommen (Doll, 2006). Die derzeit in Deutschland zugelassenen serologischen Nachweisverfahren (Pourquier-ELISA, Svanovir-ELISA, IDEXX-ELISA und Synbiotics-ELISA) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität (s. Kapitel 2.9.1). Deshalb erlauben errechnete Seroprävalenzen keine verlässlichen Rückschlüsse auf die tatsächliche Prävalenz der Paratuberkulose in den Rinderherden. Derzeit existiert kein geeignetes flächendeckendes Surveillance-System als Basis zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Deutschland (Köhler und Burkert, 2003).

Tabelle 2: Herden- und Einzeltierprävalenzen der Paratuberkulose in unterschiedlichen Ländern unter Berücksichtigung der Probenanzahl und -art

Land	Probenmatrix/Anzahl	Herdenprävalenz	Einzeltierprävalenz	Autoren
Deutschland (Meckl.-Vorp.)	Blutserum von 2.997 Rindern	84,7 %	-	Hacker et al., 2004
Deutschland (Thüringen)	>20.000 Milchproben	80 %	13 %	Elschner, 2005
Deutschland (Thüringen)	Blutserum von 43.000 Rindern	-	8,8 %	Elschner, 2005
Deutschland (Brandenburg)	Blutserum von 269 Rindern	-	20 %	Ortmann et al., 2005
Deutschland (Brandenburg)	Milchproben von 238 Rindern	-	5,5 %	Ortmann et al., 2005
Schweiz	Blutserum von 113 Rinderherden	8 %	-	Stark et al., 1997
Schweiz	Blutserum von 595 Rindern	-	6 %	Meylan et al., 1995
Österreich	Blutserum von 11.028 Rindern	7 %	-	Gasteiner et al., 1999
Österreich	Blutserum von 756 Rindern	-	19 %	Dreier et al., 2006
Belgien	Blutserum von 13.317 Rindern	18 %	2,9 %	Boelaert et al., 2000
Dänemark	900 Tankmilchproben	47 %	-	Nielsen et al., 2000
Niederlande	Blutserum von 90 Rinderherden	54,3 %	5,8 %	van Schaik et al., 2003
Portugal	Milchproben von 5.299 Rindern	45,9 %	2,3 %	Niza-Ribeiro et al., 2006
USA (Wisconsin)	Blutserum von 4.990 Rindern	34 %	4,8 %	Collins et al., 1994
USA (Michigan)	Blutserum von 3.886 Rindern	54 %	6,9 %	Johnson-Ifearulundu und Kaneene, 1999
USA (Michigan)	Blutserum von 533 Rindern	59,9 %	-	Johnson et al., 2001
Kanada (Ontario)	Blutserum von 2122 Rindern	30 %	2,6 %	Hendrick et al., 2005
Kanada (Ontario)	Milchproben von 2122 Rindern	18 %	1,7 %	Hendrick et al., 2005
Kanada	Blutserum von 2.819 Rindern	58,8 %	9,1 %	Scott et al., 2006
Korea	Blutserum von 1.056 Fleischrindern Blutserum von 1.105 Milchrindern	-	7,1 %	Park et al., 2006

2.5 Wirtsspektrum

Die Paratuberkulose ist eine spezifische Erkrankung der **Wiederkäuer**, insbesondere der Hauswiederkäuer Rind, Schaf und Ziege. Das Wirtsspektrum umfasst allerdings auch wildlebende Cerviden (Rot-, Reh-, Gams-, Muffel-, Dam-, Stein- und Elchwild) und andere Wild- und Zoowiederkäuer wie Bisons, Antilopen, Kameliden (Kamel, Dromedar, Lama), Zebus, Yaks und Wasserbüffel (Chiodini et al., 1984a; Weber et al., 1991; Clarke, 1997; Godfroid et al., 2000; Manning et al., 2003; Deutz et al., 2005; Sivakumar et al., 2005).

Die Isolierung des Erregers gelang jedoch auch bei zahlreichen **monogastrischen Tieren**, in deren Darmmukosa zwar eine Vermehrung des Erregers erfolgen kann, bei denen allerdings die Ausbildung klinischer Symptome zumeist ausbleibt (Chiodini et al., 1984a). Untersuchungen von Greig et al. (1997) ermöglichten den Nachweis des Erregers aus Kot und Organewebe von Wildkaninchen, wobei ein Teil der untersuchten Tiere bei den Sektionen pathomorphologische Veränderungen, ähnlich denen der Paratuberkulose, aufwies (Greig et al., 1997). In einer weiteren Studie wurden bei den untersuchten Kaninchen zwar keine pathomorphologischen Veränderungen festgestellt, doch konnte der Erreger aus Hoden-, Uterus-, Plazentagewebe, Kaninchenföten und Milch isoliert werden (Judge et al., 2006), was eine vertikale und horizontale Übertragung des Bakteriums in der Kaninchenpopulation belegt. Mc Clure et al. (1987) gelang der Nachweis des Bakteriums bei 29 von 38 Tieren einer Herde Stummelschwanz-Makaken. Verendete Tiere wiesen in der Sektion ebenfalls die für die Paratuberkulose typischen pathomorphologischen Veränderungen auf (Mc Clure et al., 1987). Aber auch bei anderen monogastrischen Tieren wie Schweinen, Primaten (Chiodini et al., 1984a), Füchsen (Beard et al., 1999; Deutz et al., 2005), Schneehasen, Auerwild (Deutz et al., 2005), Wieseln, Dachsen, Dohlen, Saatkrähen (Beard et al., 2001), Ratten, Waldmäusen (Beard et al., 2001; Deutz et al., 2005), Waschbären, Gürteltieren, Opossums und Wildkatzen (Corn et al., 2005) konnte der Erreger isoliert werden. Möglicherweise stellen diese Tiere ein Reservoir des Erregers dar und begünstigen den Infektionszyklus während der Weidehaltung von Weiderindern.

Aufgrund vergleichbarer pathomorphologischer Veränderungen bei der als Morbus Crohn (MC) bezeichneten chronisch-entzündlichen Darmerkrankung des **Menschen** wurde bereits sehr frühzeitig – aber nach wie vor sehr widersprüchlich – die ätiologische Beteiligung von MAP an diesem Krankheitsgeschehen des Menschen diskutiert (Chiodini, 1998). Weitere Einzelheiten zu dieser Thematik können Kapitel 2.11 entnommen werden.

Allgemein anerkannt ist die geno- und phänotypische Varianz von MAP-Isolate. Nach Bauerfeind et al. (1996) existieren molekularbiologische Unterschiede zwischen Rinder-, Schaf- und Ziegenisolaten. Dabei werden bestimmte Wirte von den jeweiligen Stämmen bevorzugt infiziert. So konnte ein Infektionsversuch zeigen, dass spezifische Ziegenstämme von MAP nicht für Rinder pathogen sind (Saxegaard, 1990). Allerdings ist die Übertragung von bovinen MAP-Isolaten auf Schaflämmer durchaus möglich (Juste et al.,

1994). Bislang liegen nur wenige Informationen über Differenzierung und Typisierung unterschiedlicher MAP-Isolate verschiedener Wiederkäuerspezies vor.

2.6 Wirtschaftliche Bedeutung der Paratuberkulose

Die Paratuberkulose ist eine in Deutschland meldepflichtige Tierkrankheit, die immer tödlich verläuft und insbesondere in Milchrinderbeständen zu erheblichen finanziellen Verlusten führen kann. Der finanzielle Schaden resultiert einerseits aus den Tierverluste und andererseits aus der reduzierten Milchleistung, der verminderten Fertilität, erhöhten Anfälligkeit gegenüber anderen Erkrankungen sowie damit verbundenen tierärztlichen Behandlungskosten. Verschiedene Studien konnten einen Rückgang der Milchleistung von 10-20 % bei klinisch inapparent infizierten Milchrindern feststellen (Merkal, 1984; Benedictus et al., 1987). Wilson et al. (1993) beobachteten zusätzlich Häufungen klinisch inapparenter Mastitiden. Merkal (1984) ermittelte reduzierte Schlachterlöse von bis zu 30 % aufgrund der krankheitsbedingten Gewichtsverluste der Tiere. In einem Rindermastbetrieb wurden im Rahmen eines Feldversuches bei Masttieren, die sich in der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose befanden, ein Minderzuwachs von 13 % sowie eine verminderte Futtermittelverwertung von 12,5 % errechnet. Diese Studien belegen somit, dass auch in Mastbetrieben die Paratuberkulose erhebliche finanzielle Verluste verursachen kann (Belletti et al., 1992). Gemäß Literaturangaben belaufen sich die finanziellen Verluste pro Tier und Jahr auf bis zu 100 US \$ (Chiodini et al., 1984a). Berechnungen aus den Niederlanden zu Folge wird der finanzielle Verlust pro Jahr auf ungefähr 25 Millionen US \$ geschätzt (Hammer et al., 1998). Neuere Angaben aus den USA sprechen von Verlusten, verursacht durch die verminderte Milchleistung sowie einen reduzierten Schlachterlös, die im Bereich von 200 bis 250 Millionen US \$ pro Jahr liegen (Ott et al., 1999). Allerdings müssen auch die finanziellen Aufwendungen der Tierseuchenkassen und Länder, die Beihilfen für die Diagnostik sowie Merzung infizierter Tiere gewährleisten, berücksichtigt werden.

Die Paratuberkulose verursacht aber nicht nur wirtschaftliche Schäden auf Betriebsebene. Das „Office International des Epizooties (O.I.E.)“ ordnet die Paratuberkulose den Erkrankungen zu, die von sozioökonomischer bzw. zoonotischer Bedeutung sind. Verschiedene Importstaaten sind somit berechtigt, den Nachweis der Paratuberkulose-Unverdächtigkeit für den Import von Zuchtrindern, Sperma und Embryonen einzufordern. EU-rechtlich wurde die Paratuberkulose zusätzlich in der Entscheidung 90/424 EWG des Rates vom 26. Juni 1990 über Ausgaben im Veterinärbereich in die Gruppe I-Liste der Tierkrankheiten aufgenommen und zählt somit zu den „Endemischen Krankheiten mit vorgeschriebenen und fakultativen Bekämpfungs- bzw. Tilgungsmaßnahmen auf Bestands- oder Herdenebene“. Daraus wird deutlich, dass die Paratuberkulose auch zukünftig eine wichtige Rolle im internationalen Tierhandel spielen wird.

2.7 Empfänglichkeit und Übertragungswege

Eine besonders hohe Empfänglichkeit gegenüber dem Erreger weisen **Kälber** bis zu einem Alter von sechs Monaten auf (Bang, 1906; Erichsen, 1926; Larsen et al., 1975). Infektionen innerhalb dieses Zeitraums führen in der Regel bei betroffenen Tieren zur Ausbildung klinischer Symptome in einem Alter von drei bis fünf Jahren; weiterhin ist von einer hohen Ausscheidungsrate des Erregers, vorwiegend über den Kot, auszugehen (Larsen et al., 1975; Chiodini et al., 1984a; Gay und Sherman, 1992; Clarke, 1997). Bereits 1913 führten Twort und Ingram erfolgreiche Infektionsversuche mit Reinkulturen des Erregers an Kälbern durch. Diese umfangreichen Modellversuche führten zu dem Ergebnis, dass über sechs Monate alte Rinder nur selten und Jährlinge nicht mit MAP infiziert werden konnten (Mc Fadyean und Sheater, 1916). Ein weiterer Infektionsversuch wies ebenfalls die unterschiedliche Empfänglichkeit von Kälbern variierender Altersklassen nach (Taylor, 1953). Dabei wurden jeweils vier neugeborene, vier drei Monate alte und vier sechs Monate alte Kälber oral mit dem Erreger infiziert. In der ersten Kälbergruppe erwiesen sich in der Sektion (30 Monate nach Verabreichung des Erregers) drei Tiere als infiziert sowie klinisch erkrankt. In der zweiten Gruppe waren alle vier Tiere infiziert und eines der Kälber klinisch erkrankt. Dagegen war in der dritten Gruppe nur eines der Kälber infiziert und keines klinisch erkrankt. Ebenso ergaben die Untersuchungen von Klee (1986), dass Rinder ab einem Alter von zwei Jahren überwiegend resistent gegenüber einer Infektion mit MAP sind. Weiterhin ist zu beachten, dass nur ein Drittel aller Kälber, die mit dem Erreger in Kontakt kommen, eine klinische Manifestation entwickeln (Chiodini et al., 1984a). Ein Teil der Tiere zeigt zeitlebens keine klinische Symptomatik, scheidet jedoch den Erreger intermittierend aus. Weitere wichtige Aspekte für die klinische Erkrankung eines Rindes sind das Alter zum Zeitpunkt der Infektion, die aufgenommene Erregermenge, die körpereigene Abwehrlage sowie Stressfaktoren wie Geburten, Hochlaktation, Ortswechsel, Transporte sowie zusätzliche Erkrankungen (rechtsseitige oder linksseitige Labmagenverlagerung und andere Darmerkrankungen) (Clarke, 1997). Jedoch ist auch eine natürliche bzw. künstliche Infektion erwachsener Tiere mit MAP möglich (Hole, 1956). Gerade die Einschleppung der Paratuberkulose in jungtierlose Rinderbestände durch zugekaufte Tiere spricht dafür, dass auch Infektionen bei erwachsenen Tieren erfolgen können. Somit ist eine Infektion mit MAP prinzipiell in allen Altersstufen möglich. Die Infektion von Milchrindern, die älter als ein Jahr sind, dürfte im Bezug auf die Verbreitung der Erkrankung aber eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Früher wie heute gilt der **Kot** infizierter Rinder als Hauptinfektionsquelle für die Paratuberkulose (Meyer, 1908; Miessner, 1908; Bang, 1909). Tiere, die sich in der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose befinden, sind gemäß Collins (1996) die Hauptursache für die Erregerverbreitung innerhalb einer Herde, da diese Rinder den Erreger über Jahre hinweg ausscheiden und dabei aufgrund der fehlenden klinischen Symptomatik unerkannt bleiben. Bei Tieren, die sich in der klinisch inapparenten Phase der Erkrankung befinden, ist mit Erregerkonzentrationen von 10^1 - 10^2 KBE/g Kot zu rechnen (Sweeney et al., 1994).

Dabei findet die Übertragung von MAP am häufigsten fäkal-oral durch das Saugen der Kälber an kotverschmutzten Zitzen des Muttertieres statt (Chiodini et al., 1984a; Gay und Sherman, 1992; Clarke,

1997). Ein wichtiger Grund, weshalb der Rinderkot als Hauptinfektionsquelle bei der Paratuberkulose gilt, sind die sehr hohen Erregerkonzentrationen pro Gramm Rinderkot, die von Tieren mit manifester Paratuberkulose täglich ausgeschieden werden (Chiodini et al., 1984a; Clarke, 1997). Bei klinisch erkrankten Tieren ist mit einer Kontamination der Umgebung von bis zu 5×10^{12} KbE pro Tag auszugehen (Chiodini et al., 1984a). Allerdings sind diese Erregerkonzentrationen nicht kontinuierlich im Kot zu erwarten, da der Erreger intermittierend ausgeschieden wird (Clarke, 1997).

Aber auch andere Infektionsquellen müssen in Betracht gezogen werden. In geringeren Mengen kann der Erreger über die **Milch** ausgeschieden werden (Schaaf und Beerwerth, 1960), die somit auch als Infektionsquelle von Jungtieren in Frage kommt. In der Literatur wird von Erregerkonzentrationen zwischen 2 und 8 KbE pro 50 ml Milch bei klinisch inapparent und klinisch infizierten Milchrindern berichtet (Stabel et al., 2001). Einer Studie gelang der kulturelle Nachweis von MAP im Kolostrum von Rindern, die sich in der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose befanden (Streeter et al., 1995). Untersuchungen von Euterlymphknoten, Milch sowie Kot symptomloser Rinder ergaben ebenfalls positive kulturelle Ergebnisse (Sweeney et al., 1992). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Mehrzahl der Kälber (85 %) sich nach der Geburt über Kot-verschmutzte Milch bzw. Kot-verschmutzte Zitzen oder durch erregerhaltiges Kolostrum infizieren. Die *dosis infectiosa minima* wurde mit 10^4 Erregern pro Kalb angegeben (Gerlach, 2002).

Weiterhin sind auch **Trinkwasser** (Larsen et al., 1956), Kot-verschmutztes Gras auf den **Weideflächen** (Gay und Sherman, 1992), aber auch verschmutzte **Gerätschaften** und Arbeitskleidung des Personals bzw. Tierarztes (Schaaf et al., 1956) als mögliche Infektionsquellen in Betracht zu ziehen. Einige Autoren halten eine Verbreitung von MAP über Aerosole, die von kontaminierten Gewässern aufgewirbelt werden, für möglich (Blanchard und Syzdek, 1970; Primm et al., 2004; Rowe und Grant, 2006). Derartige MAP-haltige Aerosole können nach Meinung der Autoren durch den Wind große Distanzen zurücklegen und von grasenden Tieren aufgenommen werden (Clark, 2005; Whittington et al., 2005). Die Inhalation von Aerosolen konnte als möglicher Übertragungsweg von MAP auf Rinder bereits nachgewiesen werden (Corner et al., 2004).

Da **Darmnematoden** wie *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* sowie *Trichostrongylus colubriformis* der kleinen und großen Wiederkäuer direkten Kontakt zu pathogenen Mikroorganismen im Kot der Tiere haben, ist eine Kontamination der Parasiten mit MAP und damit die Übertragung dieser Erreger über die Darmparasiten innerhalb von Tierherden möglich (Lloyd et al., 2001; Gerlach, 2002). In einem Modellversuch wurde Kot von Schafen, die mit *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* sowie *Trichostrongylus colubriformis* infiziert waren, artifiziell mit MAP kontaminiert (Lloyd et al., 2001). Die Untersuchungen zeigten, dass aus allen drei Nematoden-Spezies (*Trichostrongylidae*) lebensfähige Erreger isoliert werden konnten.

Aber auch aus den **Genitalorganen** weiblicher sowie den Geschlechtsdrüsen und der Samenflüssigkeit männlicher Rinder gelang der Nachweis des Erregers (Philpott, 1993; Cocito et al., 1994; Streeter et al., 1995; Millar et al., 1996; Herthnek und Bölske, 2006). Bereits 1955 wurde der Erreger aus dem Uterus

einer Kuh sowie dem Hüft- und Blinddarm des zugehörigen Fötus isoliert (Pearson und McClelland, 1955). Ebenso konnte MAP in fünf von 24 Föten und in drei Uteri klinisch erkrankter Kühe isoliert werden (Lawrence, 1956). Schaaf (1957) gelang bei 23 von 36 untersuchten Föten die kulturelle Anzüchtung von MAP aus Magen-Darm-, Gehirn-, Milz-, Leber-, Nieren-, Lunge- sowie Herzgewebe. Die beprobten und infizierten Föten wiesen dabei unterschiedliche Entwicklungsstufen auf. Bei Seitz et al. (1989) wiesen von 34 untersuchten Föten MAP-positiver, klinisch auffälliger Rinder 9 Föten (26,4 %) ein positives kulturelles Ergebnis der Organuntersuchungen auf. Bei Sweeney et al. (1992) waren 17,8 % der untersuchten Föten von infizierten Muttertieren MAP-positiv. Auch Rohde und Shulaw (1990) konnten in ihren Untersuchungen MAP im Endometrium und den Kotyledonen gravider sowie nicht gravider, klinisch bzw. klinisch inapparent erkrankter Rinder nachweisen. Cocito et al. (1994) schließen eine mögliche intrauterine Übertragung des Erregers auf den Fötus auch bei klinisch inapparent infizierten Muttertieren nicht aus. Insgesamt kommt jedoch der intrauterinen Übertragung der Paratuberkulose auf die Nachzucht in Rinderbeständen eine weniger bedeutsame Rolle zu (Gerlach, 2002).

Bereits 1956 isolierten Tunkl und Aleraj MAP aus Hoden und Samenflüssigkeit von klinisch erkrankten Bullen. Larsen et al. (1981) gelang der Nachweis von MAP aus der Bulbourethraldrüse, der Prostata und der Samenblase von Bullen mit und ohne klinisch manifester Paratuberkulose. Nach Meinung der Autoren ist der Erreger zudem in der Lage, den Tiefgefriervorgang bei der Herstellung von Tiefgefriersperma zu überleben. Somit muss auch der Geschlechtsakt als möglicher Übertragungsweg der Paratuberkulose in Betracht gezogen werden (Larsen et al., 1981).

2.8 Pathogenese und klinisches Bild der Paratuberkulose

Bislang ist die Pathogenese der Paratuberkulose noch weitgehend ungeklärt. Der Verlauf einer Infektion mit MAP ist abhängig von Immunstatus, Alter, der aufgenommenen Erregermenge sowie der Resistenzlage des betroffenen Tieres (Dirksen et al., 2003). Die Paratuberkulose des Rindes wird anhand symptomatischer Kriterien in drei unterschiedliche Stadien untergliedert (Dirksen et al., 2003). Das **erste Stadium** ist das frühe Infektionsstadium der Kälber. Nach der oralen Aufnahme des Erregers wird dieser überwiegend durch Endozytose von intestinalen M-Zellen im Epithel von Ileum (vorwiegend PEYER'schen Platten) und Jejunum aufgenommen (Chiodini et al., 1984a; Momotani et al., 1988). Die Tatsache, dass adulte Tiere eine weit geringere Anzahl an M-Zellen in ihrer Darmmukosa aufweisen, könnte die Ursache für ihre reduzierte Infektionsanfälligkeit sein (Chiodini, 1991).

Nach Freisetzung des Erregers aus den intestinalen M-Zellen erfolgt dessen gezielte Phagozytose durch die eigentlichen Zielzellen des Erregers, die sub- und intraepithelialen Wirtsmakrophagen (Clarke, 1997). MAP-spezifische Rezeptoren auf deren Oberfläche konnten bislang nicht identifiziert werden. Nach Zurbrick und Czuprynski (1987) wird der Erreger jedoch von ausgereiften Makrophagen wesentlich effektiver phagozytiert als von unreifen Monozyten. Bislang sind die intrazellulären Pathomechanismen bei der Paratuberkulose nicht vollständig bekannt (Zurbrick und Czuprynski, 1987). Als gesichert gilt, dass

MAP in der Lage ist, die Abwehrmechanismen der Makrophagen langfristig zu überdauern ohne eine ausgeprägte humorale Immunantwort des Wirts zu induzieren (Pohlenz, 1991). Einige Autoren machen die lipidreiche Zellwandschicht von MAP für die außerordentliche Resistenz des Erregers gegenüber intrazellulären Abwehrmechanismen seitens der Wirtsmakrophagen verantwortlich (Zurbrick und Czuprynski, 1987; Brennan und Nikaido, 1995; Tanaka et al., 1996). Die Immunantwort ist in diesem Krankheitsstadium insbesondere durch T-Lymphozyten zellvermittelt (Clarke, 1997). Gemäß den Untersuchungen von Wu et al. (2007) konnte bei einem Infektionsversuch an Kälbern (n = 7) mittels Durchflusszytometrie eine Proliferation von CD4⁺ T-Helferzellen 8 bis 9 Monate *post infectionem* nachgewiesen werden. Weiterhin konnte bei den Untersuchungen der Gewebeproben dieser Tiere eine TH1-vermittelte zelluläre Immunantwort ermittelt werden.

Mit Hilfe erregerehaltiger Makrophagen gelangt MAP in mesenteriale Lymphknoten bzw. Lymphgewebe oder über den *Ductus thoracicus* auch in andere Organe des Wirts (Chiodini, 1996). Die Arbeitsgruppe von Wu et al. (2007) konnte den Erreger bereits ein bis zwei Stunden nach dessen Inokulation direkt in das Darmlumen von Kälbern (n = 7) in den Mesenteriallymphknoten kulturell nachweisen. MAP ist somit offensichtlich in der Lage, die Darmbarriere in wenigen Stunden zu überwinden. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass insbesondere in den Mesenteriallymphknoten und der Leber nachweisbare Erregerkonzentrationen zu finden waren, nicht aber in anderen Organen. Selbst in Gewebeproben des Ileums und des Jejunums konnten vier Tage *post infectionem* keine Erregerzellen kulturell nachgewiesen werden (Wu et al., 2007). Ab dem 30. Tag *post infectionem* gelang über einen Zeitraum von neun Monaten der kulturelle Erregernachweis ausschließlich im Ileum und den Lymphknoten der Tiere mit einer Nachweisgrenze von 20 KBE/g Gewebe. Die Autoren schlussfolgern aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen, dass MAP insbesondere in den Lymphknoten und dem Ileum persistiert. Die Untersuchungen der Kälberkotproben zeigten in den ersten drei Tagen *post infectionem* ein positives kulturelles Ergebnis. Die Autoren gehen von einem Nachweis „passagierter Erreger“ nach Verabreichung des Inokulums aus. In den neun Monaten Beprobungszeit konnten in dieser Studie ansonsten keine positiven Kultursergebnisse erzielt werden.

Im ersten Stadium der Erkrankung sind keine **makroskopischen** Veränderungen bei der Sektion feststellbar. Erste granulomatöse Läsionen sind **pathohistologisch** nach zwei bis drei Monaten *post infectionem* in den interfollikulären Regionen der Peyerschen Platten und den Mesenteriallymphknoten zu erwarten. Klinische Symptome der Paratuberkulose sind in diesem Krankheitsstadium nur selten zu beobachten. Ebenso ist die Ausscheidung des Erregers über den Kot infizierter Tiere selten (Whitlock und Buergelt, 1996).

Das **zweite Stadium der Paratuberkulose**, das klinisch inapparente Infektionsstadium adulter Tiere, wird auch als klinisch inapparente Exkretionsphase bezeichnet. Innerhalb dieser Phase ist nur bei einer sehr geringen Anzahl der betroffenen Milchrinder mit einer klinischen Symptomatik zu rechnen (Lepper et al., 1989), allerdings besteht ein fließender Übergang in das dritte, klinische Stadium der Erkrankung. In der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose kommt es vermehrt zur Freisetzung von MAP aus

erregerhaltigen Makrophagen in das umliegende Gewebe und zu Neuinfektionen weiterer phagozytierender Wirtszellen. Dadurch ist eine kontinuierliche Vermehrung und Ausbreitung von MAP in der Darmmukosa und anderen Organen gewährleistet. Die große Anzahl an Zellinfiltrationen in den betroffenen Darmgeweben führt zur Ausbildung von Granulomen in der Darmmukosa und den umliegenden Lymphknoten (Zurbrick und Czuprynski, 1987; Momotani et al., 1988). Die bislang überwiegende zelluläre Immunabwehr geht langsam in eine humorale über (Chiodini et al., 1984a). **Makroskopisch** können jedoch in der Sektion Anzeichen einer leichten Enteritis, gering- bis mittelgradige Darmschleimhauthypertrophien und vergrößerte Mesenterial-Lymphknoten zu erkennen sein. **Pathohistologisch** finden sich in betroffenem Gewebe massive Infiltrationen von Makrophagen, Epitheloidzellen und vereinzelt Langhansschen Riesenzellen, in denen sich die Erreger durch eine Ziehl-Neelsen-Färbung als leuchtend rote Stäbchen anfärben lassen.

Das **dritte** bzw. **Endstadium** der Paratuberkulose ist das klinisch manifeste oder auch exkretorische Stadium mit einer Inkubationszeit von zwei bis zehn Jahren (Whitlock und Buergelt, 1996). Es gibt aber auch Autoren, die zwischen einem dritten und vierten Krankheitsstadium unterscheiden (Whitlock und Buergelt, 1996). Das vierte Stadium ist dabei das „Finalstadium“ der Erkrankung und spiegelt den Höhepunkt der klinischen Manifestation mit massiv ausgeprägter klinischer Symptomatik bis hin zum Tod der Tiere wider. Beide gehen fließend ineinander über, so dass man sie auch zu einem Krankheitsstadium zusammenfassen kann.

Die aus der fortschreitenden Darmschleimhauthypertrophie resultierende, stark eingeschränkte Resorptions- und Sekretionsleistung der betroffenen Darmabschnitte (Malabsorptions- bzw. Maldigestions-Syndrom), gefolgt von einer ausgeprägten Hypoproteinämie, führen zu der klassischen Symptomatik der Paratuberkulose: unstillbare, wiederkehrende, wässrig-blasige Durchfälle, kontinuierliche Abmagerung trotz gleich bleibender Futteraufnahme, Reduktion der Milchleistung und der Fertilität, gesteigerte Anfälligkeit gegenüber anderen Erkrankungen, struppiges Fell sowie in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium Hungerödeme, insbesondere an Trierl und Unterkiefer, bis hin zu einem gestörten Allgemeinbefinden (Patterson und Berrett, 1969; Dirksen et al., 2003). In diesem Stadium sind großflächige Darmabschnitte von Ileum und Jejunum, aber auch angrenzende Lymphknoten bzw. -gewebe und parenchymatöse Organe wie Niere, Milz, Leber, Lunge und Uterus von dem Bakterium befallen (Trautwein, 1991). In der klinischen Phase der Paratuberkulose ist die humorale Immunantwort vorherrschend und ermöglicht den serologischen Nachweis von Antikörpern (Chiodini et al., 1984a). Gegen Ende des dritten Krankheitsstadiums kann diese jedoch bis hin zur Anergie abnehmen und zu serologisch falsch-negativen Ergebnissen führen (Chiodini, 1996).



Abbildung 3: Milchrind in der Endphase der Paratuberkulose (Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen)

Makroskopisch erscheint die betroffene massiv verdickte Dünndarmschleimhaut von Ileum und Jejunum in der Sektion hirnwindungsartig aufgeworfen. Die Mesenteriallymphknoten sind teilweise hochgradig vergrößert. Gegen Ende des dritten Krankheitsstadiums werden mit Erregern angefüllte epitheloide Zellen ins Darmlumen abgestreift und intermittierend mit dem Kot ausgeschieden.



Abb. 4



Abb. 5

Abbildung 4 und 5: paratuberkulös-veränderte Darmschlingen (links) bzw. -verändertes Darmstück (rechts) mit hirnwindungsartig aufgeworfener Darmschleimhaut (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen)

Pathohistologisch sind granulomatöse Entzündungen des Ileums und Jejunums sowie der zugehörigen Mesenteriallymphknoten zu erkennen. Die erregerrhaltigen Zellinfiltrate können dabei die Krypten der betroffenen Darmabschnitte verdrängen und sich bis in die Mukosa und Submukosa ausdehnen. Die Darmzotten sind verdickt und verkürzt. Sie sind zu ihrer Spitze hin kolbenförmig aufgetrieben und enthalten eine Vielzahl an erregerrhaltigen Makrophagen, die mittels Ziehl-Neelsen-Färbung sichtbar werden. Die granulomatösen Zellinfiltrationen führen aufgrund der fortschreitenden Schleimhauthyperplasie zu massiven Funktionsverlusten der betroffenen Darmabschnitte.

2.9 Diagnostische Verfahren

2.9.1 Indirekter Erregernachweis

Der **Johnin-Test** gehört zu den indirekten Nachweisverfahren und ist ein **allergologischer Test** zum Nachweis der Paratuberkulose bei Rindern auf Basis der zellulären Immunantwort. Bei diesem Testverfahren wird Rindern entweder intradermal oder intravenös aviäre Tuberkulin- oder Johnin-/Paratuberkulin-Lösung verabreicht. Die Auswertung dieses allergologischen Tests erfolgt bei intradermaler Applikation über die Messung der Hautfaltendicke an der Injektionsstelle. Dabei werden zwei Reaktionstypen unterschieden: zum einen die allergische Reaktion vom Soforttyp, die sich innerhalb von zwei Stunden durch ödematöse Schwellungen an der Injektionsstelle äußert, zum anderen können nach 24-72 Stunden Reaktionen vom verzögerten Typ in Form von tiefreichenden Umfangsvermehrungen im Bereich der Injektionsstelle beobachtet werden. Die Auswertung des Tests bei intravenöser Applikation erfolgt durch Messung der Körpertemperatur bzw. durch das Verhältnis neutrophiler Granulozyten zu Lymphozyten (Chiodini et al., 1984a). Bereits 1909 stellte Bang fest, dass an Paratuberkulose erkrankte Rinder auf subkutane Injektionen von aviärem Tuberkulin mit einem deutlichen Temperaturanstieg reagieren. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung von bovinem Tuberkulin bei der Injektion zu keinen Temperaturveränderungen. Erst später ergaben Untersuchungen an MAP-infizierten Rindern, dass Johnin eine größere diagnostische Zuverlässigkeit aufweist als aviäres Tuberkulin (Ernest, 1927; Dunkin, 1928; Beach, 1930). Bei wiederholten Injektionen von Johnin ist die Injektionsstelle zu wechseln, da sonst mit reduzierten Hautreaktionen zu rechnen ist (Larsen und Johnson, 1949). Nach Untersuchungen von Merkal (1973) ermöglicht die intravenöse Applikation von Johnin eine zuverlässigere Auswertung als die intradermale Applikation. Allerdings ist bei der intravenösen Injektion die Entwicklung eines anaphylaktischen Schocks nicht auszuschließen (Chiodini et al., 1984a). Mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien wie *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium avium* ssp. *avium* sowie die variable Abwehrlage der Tiere erschweren eine definitive Diagnose (Stabel, 1996; Clarke, 1997).

Eine weitere Möglichkeit, MAP-infizierte Tiere in einem frühen Krankheitsstadium zu detektieren, ist die Bestimmung der **γ -Interferon-Konzentration** (γ -IFN) im Blutserum von Rindern (Stabel, 1996). Dieser Test ermöglicht den Nachweis der zellulären, T-Zell-gesteuerten Immunantwort und bietet die Möglichkeit, Paratuberkuloseinfektionen bei Jungtieren bzw. Rindern mit einer geringen humoralen Immunantwort zu detektieren (Hietala, 1992; Collins, 1996). Nach Hietala (1992) lag bei einem kommerziell erhältlichen γ -Interferon-ELISA (Fa. IDEXX Laboratories) die Sensitivität in einem Bereich von 70-94 % und die Spezifität in einem Bereich von 97-99 %. Bei Untersuchungen von McDonald et al. (1999) traten zahlreiche falsch-positive Reagenten auf, weshalb die Autoren dieses Testsystem als ungeeignet für die Paratuberkulosedagnostik befanden. Zusätzlich erschwert die große Variabilität der Immunantwort infizierter Tiere die Diagnostik mit dem γ -IFN-Test (McDonald et al., 1999).

Die **Komplementbindungsreaktion (KBR)** und der **Agargel-Immundiffusionstest (AGID)** sind serologische Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP. Im Vergleich zu verschiedenen ELISA-Verfahren zeigte die KBR eine signifikant niedrigere Sensitivität (Sockett et al., 1992; Reichel et al., 1999). Gegenüber dem kulturellen Nachweis von MAP ergab sich nach Reichel et al. (1999) eine Sensitivität von nur 17,9 %.

Die AGID-Methode verfügt gemäß Literaturangaben über eine Sensitivität von nur 50 % bei klinisch auffälligen Rindern, die sich in der Endphase der Paratuberkulose befinden. Bei klinisch inapparent infizierten Rindern wurde eine deutlich niedrigere Sensitivität mit Werten von 27-29 % ermittelt (Hietala, 1992). Auch zahlreiche andere Studien bestätigen, dass sowohl die KBR als auch der AGID aufgrund ihrer geringen Sensitivität für eine erfolgreiche Bestandssanierung ungeeignet sind (Kreeger, 1991; Ridge und Morgan, 1991; Belletti et al., 1992; Hilbink et al., 1994).

Ein weiteres, sehr häufig eingesetztes serologisches Nachweisverfahren bei der Paratuberkulose-Diagnostik ist der **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**. Der ELISA liefert eine signifikant höhere Sensitivität und Spezifität als die KBR oder der AGID (Reichel et al., 1999). Insgesamt existieren derzeit vier kommerziell erhältliche ELISA-Verfahren, die als indirekte Diagnostika für die Paratuberkulose in Deutschland zugelassen sind. Dazu gehört der ELISA der Firma IDEXX, der Firma Pourquier, der Firma Svanova und der Firma Symbiotics (Tabelle 3).

Tabelle 3: In Deutschland zugelassene ELISA-Verfahren zum Nachweis der Paratuberkulose unter Berücksichtigung des jeweiligen Antigens und der Art der Proben

ELISA	Antigen	Erhöhung der Spezifität	Art der Probe
Firma Pourquier Frankreich	protoplasmatischer Extrakt von MAP	Vorabsorption mit <i>M. phlei</i>	Blutserum, Milch
Firma IDEXX Scandinavia, Schweden	Ganzzellantigen von MAP	Vorabsorption mit <i>M. phlei</i>	Blutserum
Firma Svanova Schweden	Zellwandantigen (LAM ¹) von MAP	-	Blutserum, Milch
Firma Symbiotics USA	protoplasmatisches Antigen von <i>M. avium</i> ssp.	-	Blutserum

¹LAM: Lipoarabinomannan

Diese zugelassenen ELISA-Verfahren unterscheiden sich sowohl in ihrer Sensitivität als auch in ihrer Spezifität (Tabelle 4). Deshalb gewährleisten die durch diese unterschiedlichen Tests ermittelten Seroprävalenzen keine verlässlichen Rückschlüsse auf die tatsächliche Prävalenz der Paratuberkulose in den Rinderherden (Köhler, 2005).

Tabelle 4: Diagnostische Validität unterschiedlicher ELISA-Verfahren im Vergleich zur Kotkultur zum Nachweis der Paratuberkulose (Köhler et al., 2004)

Nachweisverfahren	Probenmatrix	Sensitivität (%)		Spezifität (%)
		Gesamtpopulation (MAP positiv + neg.)	klinisch unauffällige Milchrinder	
ELISA der Firma Pourquier	Serum	53,6	34,4	99,3
ELISA der Firma IDEXX	Serum	55,6	37,7	94,8
ELISA der Firma Svanova	Serum	70,0	55,7	76,6
ELISA der Firma Symbiotics	Serum	40,0	n.d.*	94,8
ELISA der Firma Pourquier	Milch	54,5	n.d.	98,3
ELISA der Firma Svanova	Milch	54,5	n.d.	88,7
Kotkultur	Kot	40,0	28,6	100,0

*n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Die große Varianz der serologischen Untersuchungen bedingt durch den Einsatz verschiedener ELISA-Verfahren wird durch zahlreiche Studien belegt (Collins und Sockett, 1993; Rossiter und Burhans, 1996). Beispielsweise erwiesen sich bei den Untersuchungen von Ortmann et al. (2005) von 269 Rinderseren, die mit dem SVANOVIR®-ELISA (Fa. Svanova) untersucht wurden, 53 (20 %) der untersuchten Blutproben als „nicht negativ“. Von diesen reagierten 38 Proben (72 %) eindeutig positiv und 15 Proben (28 %) fraglich. Nachgeschaltete serologische Untersuchungen dieser 53 „nicht negativen“ Blutproben mit dem IDEXX-ELISA (Fa. IDEXX) führten zu folgenden Ergebnissen: 39 Blutseren (74 %) reagierten mit dem IDEXX-ELISA eindeutig negativ und 14 Proben (26 %) „nicht negativ“. Davon wurden jeweils 7 Proben positiv und 7 fraglich beurteilt. Die Ergebnisse zeigen deutliche Diskrepanzen zwischen den beiden serologischen Testverfahren. Ebenso belegen Untersuchungen von 2.748 Serumproben in Bayern die Diskrepanzen der derzeit in Deutschland zugelassenen ELISA-Verfahren (Böttcher et al., 2005). In Tabelle 5 sind die Herden- bzw. Einzeltieruntersuchungen, die mit den unterschiedlichen ELISA-Verfahren ermittelt werden konnten, gelistet.

Tabelle 5: Ergebnisse der serologischen Herden- bzw. Einzeltier-Untersuchungen von 2.748 Serumproben aus 119 bayrischen Rinderherden unter Berücksichtigung von drei verschiedenen ELISA-Verfahren (Böttcher et al., 2005)

Test		SVANOVIR®-ELISA		IDEXX-ELISA		Pourquier-ELISA	
Einzeltiere	negativ (-)	60,6 % (58,7-62,4 %)		95,9 % (95,1-96,6 %)		98,8 % (98,4-99,2 %)	
	positiv (+)	15,3 % (13,9-16,6 %)		2,6 % (2,0-3,2 %)		0,3 % (0,1-0,5 %)	
	fraglich (?)	24,1 % (22,0-26,2 %)		1,5 % (1,0-1,9 %)		0,9 % (0,4-1,4 %)	
Herden	Probeninterpretation	?/+	+	?/+	+	?/+	+
	Herden mit Reagenten	98 % (96-100 %)	93 % (88-98 %)	45 % (36-54 %)	20 % (10-23 %)	18 % (9-21 %)	12 % (5-15 %)

Aber nicht nur die Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität der zugelassenen ELISA-Verfahren erschweren den gezielten Antikörpernachweis von MAP in den Rinderherden. Zusätzlich verhindern die humoralen Abwehrreaktionen im Rahmen des Krankheitsgeschehens der Paratuberkulose einen frühzeitigen Antikörpernachweis. Eine Serokonversion ist bei Rindern meist erst ab einem Alter von ein bis drei Jahren nachweisbar und kann von Tier zu Tier stark variieren. Allerdings ist die Ausscheidung des Erregers mit dem Kot bereits in der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose oftmals vor einer nachweisbaren Serokonversion möglich, wie Untersuchungen von Sweeney et al. (2005) belegen. Dabei konnte im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen von 500 Milchrindern bei 50 % der MAP-infizierten Tiere der Erreger mindestens einmal kulturell nachgewiesen werden, bevor diese im ELISA positiv reagierten. 38 % der Tiere zeigten gleichzeitig sowohl im ELISA als auch in der Kotkultur ein positives Ergebnis, während sich nur 12 % als ELISA-positiv vor dem Nachweis im Kot erwiesen (Sweeney et al., 2005).

Eine Ausnahme bildet der sog. LAM-ELISA der Fa. Svanova, mit dem das Zellwandantigen Lipoarabinomannan von MAP nachgewiesen werden kann. Dieser ELISA bietet einen neuen diagnostischen Ansatz, da ein großer Anteil infizierter Rinder in der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose identifiziert werden kann. Der LAM-ELISA eignet sich damit besonders zum Einsatz für die Sanierung von Problembetrieben. Dennoch ist auch mit dem LAM-ELISA ein 100 %iger Nachweis infizierter Tiere, die sich entweder in der klinischen oder klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose befinden, nicht gewährleistet, zumal individuelle Unterschiede in der humoralen Immunität der Tiere vorliegen und diese darüber hinaus phasenweise Schwankungen unterliegen kann.

Vor diesem Hintergrund ist nach wie vor der kombinierte Einsatz verschiedener Nachweisverfahren (Kotkultur, ELISA oder PCR) zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderherden zu empfehlen (s. Kapitel 2.10). Die Seroprävalenz lässt derzeit noch keine sicheren Rückschlüsse auf die tatsächliche Prävalenz in Rinderherden zu und ist nicht ausreichend für die Ermittlung des Infektionsstatus von Einzeltieren.

2.9.2 Direkter Erregernachweis

2.9.2.1 Mikroskopischer Erregernachweis

Der **mikroskopische Erregernachweis** ist ein schnelles und kostengünstiges Verfahren, das sich sehr gut zur Absicherung einer gestellten klinischen Diagnose eignet. Die Mikroskopie findet häufig Anwendung bei der Untersuchung von Kotproben lebender Tiere, aber auch bei postmortalen Untersuchungen von Darm- und Lymphgewebe. Bislang ist die Ziehl-Neelsen-Färbung die Methode der Wahl für den mikroskopischen Nachweis von säurefesten Mykobakterien (Rolle und Mayr, 2002). Durch gleichzeitiges Einwirken von Beize und Hitze wird die stabile mykobakterielle Zellwand durchlässig für den Arylmethanfarbstoff Carbol-fuchsin, der die Mykobakterien leuchtend rot anfärbt. Die umliegende Matrix kann anschließend mit Methyleneblau angefärbt werden. Hinweise auf das Vorliegen von MAP bei der mikroskopischen Untersuchung von Probenmaterial liefern nestartige Zusammenlagerungen, die typisch für MAP sind (Merkal, 1973; Benedictus et al., 1987). Saprophytische Mykobakterien wie *M. phlei* neigen nicht zur Ausbildung von Nestern (Schaaf et al., 1956; Chiodini et al., 1984a).

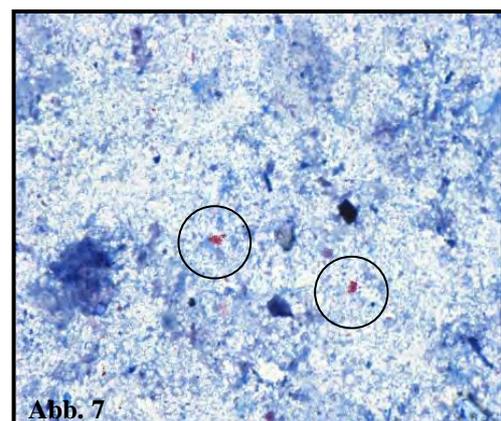
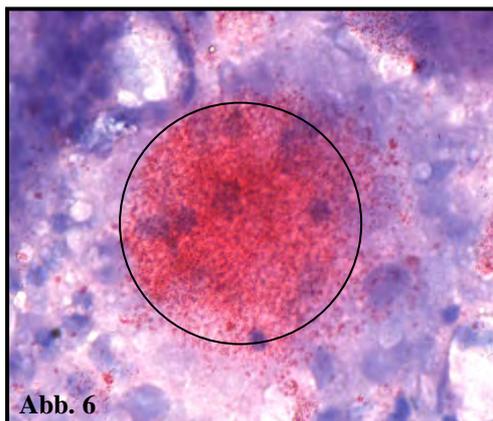


Abbildung 6 und 7: Ziehl-Neelsen-Färbung von Rinderkot eines an Paratuberkulose erkrankten Rindes (links); Ziehl-Neelsen-Färbung von Darmgewebe eines an Paratuberkulose erkrankten Rindes (rechts) (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen)

Allerdings ermöglicht die mikroskopische Untersuchung keine endgültige Spezies-Differenzierung nachgewiesener säurefester Stäbchenbakterien (Benazzi et al., 1996). Ein weiterer Nachteil der mikroskopischen Untersuchung ist die geringe Sensitivität im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren. Untersuchungen von Kotproben klinisch und klinisch inapparent infizierter Rinder (n = 132) zeigten, dass nur 49 % der klinisch und 19 % der klinisch inapparent infizierten, kulturell positiv detektierten Rinder mit der Ziehl-Neelsen-Färbung bestätigt werden konnten (Zimmer et al., 1999). Auch nach Merkal et al. (1968) konnten bei der Untersuchung von Kotproben in der Regel nur Rinder als positiv identifiziert werden, die sich in der klinisch-manifesten Endphase der Paratuberkulose befanden und den Erreger massiv mit dem Kot ausschieden. Zudem ist selbst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium aufgrund der

intermittierenden Ausscheidung des Erregers mit dem Kot nicht immer ein Erregernachweis möglich. Weitere mikroskopische Untersuchungen von postmortal entnommenen Gewebeproben des Ileums sowie zugehöriger Darmlymphknoten ermöglichten einen zuverlässigeren Erregernachweis (Merkal, 1973). Demgegenüber erbrachte die mikroskopische Untersuchung der rektalen Darmschleimhaut klinisch auffälliger Rinder keine befriedigenden Ergebnisse (Merkal, 1973; Schliesser und Schaal, 1983), zumal selbst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium keine pathomorphologischen Veränderungen der distalen Darmabschnitte wie Colon und Rektum zu beobachten sind.

2.9.2.2 Kultureller Erregernachweis

Der positive **kulturelle Nachweis** von MAP im Kot gilt bislang, trotz der langen Kultivierungszeiten von 8-16 Wochen, als „gold standard“ der Paratuberkulose-Diagnostik (Chiodini et al., 1984a; Hietala, 1992; Collins et al., 1993). Aufgrund der intermittierenden Erregerausscheidung mit dem Kot eignet sich der kulturelle Nachweis von MAP aus Lymph- und Darmgewebe besser zum Nachweis infizierter Tiere und ist daher als „gold standard“ geeigneter. Allerdings sind die letztgenannten Matrizes ungeeignet für die Diagnostik am lebenden Tier.

Um eine kulturelle Anzucht für einen derart langen Zeitraum zu ermöglichen, müssen die unterschiedlichen Probenmatrizes im Vorfeld dekontaminiert werden, da sonst die Gefahr einer Kontamination der Medien durch Begleitkeime (Pilze und Bakterien) besteht. Im Laufe der Jahrzehnte fanden verschiedene Dekontaminationsverfahren für die kulturelle Anzucht von MAP aus Rinderkot Verwendung, wie beispielsweise Schwefelsäure (Löwenstein, 1924), 20 %iges Antiformin (Dunkin, 1928), aber auch Kalilauge und Salzsäure in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten (Lange und Pescatore, 1937). Zahlreiche Studien erzielten mit Antiformin die besten Anzucht-Ergebnisse (Lange und Pescatore, 1937; Minett, 1942; Bierbaum, 1950). Nach Merkal et al. (1964) töten Dekontaminationsverfahren mit Phenolen, Natronlauge, Schwefelsäure, Oxalsäure und Antiformin nicht nur die Begleitkeimflora ab, sondern auch einen hohen Anteil der gesuchten MAP-Zellen. Die Autoren stellten bei Untersuchungen von Kot- und Gewebeproben infizierter Rinder mit unterschiedlichen Dekontaminationsverfahren wie NaOH, Phenol, NaOCl und Benzalkoniumchlorid, bei gleichzeitig variablen Einwirkzeiten, fest, dass das Benzalkoniumchlorid in Konzentrationen bis zu 1 % selbst bei mehrtägigen Einwirkphasen nur geringe Erregerverluste bewirkte. Gleichzeitig wurde das Wachstum der meisten Begleitkeime erfolgreich unterdrückt (Merkal et al., 1964). Weitere umfangreiche Untersuchungen über den kulturellen Nachweis von Mykobakterien in Kotproben zeigten, dass die Kombination aus 4 %iger Natronlauge und 5 %iger Oxalsäure die Begleitflora bei der kulturellen Anzucht von MAP auf ein akzeptables Minimum herabsetzt (Beerwerth, 1967). Eine Schädigung der Mykobakterien konnte dabei nicht festgestellt werden. Auch heute findet dieses Dekontaminationsverfahren in Einzelfällen bevorzugt Anwendung (Glanemann et al., 2004), während die Mehrheit der Studien Dekontaminationsverfahren basierend auf Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC: C₂₁H₃₈ClN·H₂O) einsetzen (Merkal, 1984; David und Bonner, 1986; Schneider, 2003; Johansen et al., 2006). Der Arbeitskreis für Veterinärmedizinische

Infektionskrankheiten (AVID) empfiehlt für den kulturellen Nachweis von MAP aus Rinderkot 0,75 %ige HPC-Lösung in Kombination mit einer 24-stündigen Einwirkzeit. HPC gewährleistet eine zuverlässige Abtötung der im Rinderkot enthaltenen Begleitkeimflora und ermöglicht eine gezielte Selektion von MAP (AVID VII/1996). In verschiedenen Studien konnte mit einer zusätzlichen Zentrifugation der Proben während der Dekontamination (Ridge, 1993; Stabel et al., 1997; Reddacliff et al., 2003) sowie Konzentrierung der Erreger durch Filtrierung der Proben nach der Dekontamination (Collins et al., 1990; Ridge, 1993) vorteilhafte Anzuchtergebnisse erzielt werden. Eine aktuelle Studie verglich die Effektivität sieben verschiedener HPC-Dekontaminationsverfahren miteinander. Dabei wurden die getesteten Rinderkotproben mit 0,75 %iger HPC-Lösung durchmischt und im Anschluss sechs verschiedenen Prozeduren unterzogen: a) 24 Stunden Einwirkzeit, b) 48 Stunden Einwirkzeit, c) 72 Stunden Einwirkzeit, d) 96 Stunden Einwirkzeit, e) 24 Stunden Dekontamination mit 0,75 %iger HPC-Lösung, Zentrifugation und anschließend eine 24 Stunden Dekontamination in einer Amphotericin B-Nalidixinsäure-Vancomycin (ANV)-Lösung, f) 24 Stunden Dekontamination mit 0,75 %iger HPC-Lösung, Zentrifugation und anschließend eine 24 Stunden Dekontamination in einer hochkonzentrierten Amphotericin-B-Lösung (Gierke und Köhler, 2006). Die Kultivierungsergebnisse zeigten, dass Einwirkzeiten > 48 Stunden zu einer signifikant niedrigeren Anzahl an positiven Kulturröhrchen führten. Alle übrigen Dekontaminationsverfahren unterschieden sich nicht wesentlich in ihrer Nachweis- und Kontaminationsrate. Auch der Einsatz der sog. Cornel-Methode (g), bei der die Proben für 24 Stunden in ½ Hirn-Herz Bouillon (HHB)-0,9 %iger HPC-Lösung dekontaminiert, anschließend zentrifugiert und erneut 24 Stunden in einer Amphotericin B-Nalidixinsäure-Vancomycin (ANV)-Lösung dekontaminiert wurden, erbrachte keine Vorteile gegenüber den vorangestellten Dekontaminationsverfahren (Gierke und Köhler, 2006).

Die ersten Kultivierungsversuche von Albien (1910) führten trotz großer Bemühungen zu keinem Erfolg. Erst zwei Jahre später gelang schließlich Twort und Ingram (1912) die Anzüchtung des Erregers auf Eiernährböden durch Zusatz von hitzeinaktivierten, getrockneten Kulturen von *M. phlei*. Derzeit stehen für die kulturelle Anzüchtung von MAP aus Rinderkotproben verschiedene Fest- (Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium (HEYM), Löwenstein-Jensen-Medium, Middlebrook 7H9, 7H10 sowie 7H11 u. a.) und Flüssignährmedien (Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT), Middlebrook 7H9 Broth u. a.) zur Verfügung (Gerlach und Valentin-Weigand, 1998; Hughes et al., 2001). Jedes der Nährmedien sollte mit dem Eisenchelatbildner Mycobactin J substituiert sein, da nur so das Wachstum von MAP gewährleistet ist (Gerlach, 2002). Des Weiteren bieten Zusätze von Antibiotika bzw. Antimycotika bei den eingesetzten Nährmedien erhebliche Vorteile, da diese gezielt die Überwucherung der Medien mit Begleitkeimen während der langen Kultivierungsphasen unterdrücken. Es zeigte sich, dass Festnährmedien auf Eigelbbasis besonders geeignet sind für die Kultivierung des Erregers (Ridge, 1993). Weiterhin sind Schrägnährmedien unter den Festnährmedien im Rahmen der langwierigen Kultivierungsphasen ebenfalls besser geeignet, da sie länger Schutz vor Austrocknung bieten. Das Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit dem Zusatz von Mycobactin J ist derzeit am besten geeignet für den Nachweis von MAP aus Rinderkot

(Merkal et al., 1987; Nielsen et al., 2004). Die optimalen Kultivierungstemperaturen für MAP liegen bei +37-39 °C. Bei +30 °C ist nur noch ein leichtes Wachstum zu beobachten, während ab Temperaturen > +42 °C das Wachstum des Erregers eingestellt wird (Chiodini, 1986). Die Spezifität der kulturellen Anzucht liegt bei 100 %, allerdings ist der Nachweis passagerer, nicht infizierter Ausscheider insbesondere in einer erregerebelasteten Umgebung möglich. Demgegenüber ist die Sensitivität der kulturellen Nachweismethode gering, da MAP intermittierend mit dem Kot ausgeschieden wird. In der Literatur existieren verschiedene Angaben über die Sensitivität der Kotkultur. Diese wird auf 40-50 % (Sokkett et al., 1992) oder aber 60-90 % (Hietala, 1992) geschätzt; letztere allerdings nur, wenn die zu untersuchenden Tiere auch klinisch erkrankt sind.

Aber auch Flüssignährmedien gewährleisten ein rasches Wachstum von MAP (Pfyffer, 2001). Die Entwicklung eines radiometrischen Kulturverfahrens (radiometrisches BACTEC 460-Kulturverfahren) ermöglichte eine Verkürzung der Bebrütungsdauer bei der kulturellen Anzucht von MAP (Morgan et al., 1983; Damato und Collins, 1990). Zusätzlich konnten verschiedene Autoren durch den Einsatz dieses radiometrischen Nachweisverfahrens die Sensitivität der kulturellen Anzucht im Vergleich zum Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium erhöhen (Whittington et al., 1998; Whittington et al., 1999; Eamens et al., 2000). Das BACTEC-System nutzt die Fähigkeit von Mykobakterien, aus radioaktiv markierter Palmitinsäure [¹⁴C] Kohlendioxid freizusetzen, das sich radiometrisch nachweisen lässt. In jüngster Zeit wurde eine Reihe neuer, nicht-radiometrischer Kulturverfahren entwickelt, die ebenfalls auf Flüssigmedien wie dem MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) der Firma Becton Dickinson oder dem MB/Redox der Firma Biotest basieren bzw. voll automatische Systeme wie das BACTEC MGIT 960 (Fa. Becton Dickinson), das MB/BacT (Fa. Organon Teknika) und das ESP Culture System II (Fa. AccuMed). Ihre Entwicklung diente dem Ziel, einerseits schnelle Ergebnisse zu liefern und andererseits die mit der radiometrischen BACTEC 460-Methode verbundenen Probleme, wie die Entsorgung radioaktiver Medien, der Arbeitssicherheit, der hohen Anschaffungskosten für das Analysegerät entgegen zu wirken. Die Technik des manuellen MGIT bzw. des voll automatisierten MGIT (BACTEC MGIT 960) basiert dabei auf einem im Boden der Kulturröhrchen befindlichen Fluoreszenzindikator, der durch eine Silikonmembran von der Kulturflüssigkeit getrennt ist. Sobald der im Medium enthaltene Sauerstoff durch das Wachstum von Mikroorganismen verbraucht wird, ist eine kontinuierliche Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten. Diese kann im manuellen MGIT durch eine UV-Lampe (366 nm) und im automatisierten System instrumental nachgewiesen werden. Allerdings führt auch das Wachstum unerwünschter Begleitkeime zu falsch-positiven Fluoreszenzsignalen (Pfyffer, 2001). Eine Studie am Friedrich-Löffler-Institut vergleicht die Effektivität der kulturellen Anzucht von MAP in einem kommerziellen, automatisierten Flüssigkultursystem mit der herkömmlichen Kultur auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium. Bei der Flüssigkultur wurde ein hoher Anteil an falsch-positiven Instrument-Signalen ermittelt, der nicht nur auf Kontaminationen durch Begleitkeime zurückzuführen war. Zusätzlich wurden in der Flüssigkultur häufiger andere im Kot vorhandene Mykobakterien nachgewiesen als bei der Festkultur.

Die Studie zeigte, dass derzeit die Kultur auf festen Nährmedien nicht ersetzt werden kann (Gierke und Köhler, 2006).

2.9.2.3 Molekularbiologischer Erregernachweis

Vor dem Hintergrund der bestehenden Schwierigkeiten bei der Paratuberkulosedagnostik in Rinderbeständen kommt den molekularbiologischen Nachweisverfahren eine besondere Bedeutung zu. Die PCR-Technologie (Polymerasekettenreaktion) ermöglicht einerseits die frühzeitige Bestätigung des mikrobiologischen Befundes und erlaubt weiterhin die Analyse unterschiedlicher Probenmatrizes wie Rinderkot und Rindergewebe ohne zeitintensive Voranreicherungen (Collins et al., 1993; Fang et al., 2002). Neben der Gewährleistung einer ausreichenden Sensitivität der PCR-Verfahren zeigen die wissenschaftlichen Arbeiten der letzten Jahre auch bestehenden Forschungsbedarf im Hinblick auf die Spezifität der Nachweissysteme. Es finden überwiegend PCR-Verfahren auf Basis der Insertionssequenz IS900 Verwendung (Kim et al., 2002; Bull et al., 2003). Diese wurde erstmals 1989 identifiziert (Green et al., 1989) und liegt in 14 bis 20, identischen Kopien im Gesamtgenom von MAP vor. Dabei kodiert der Marker für ein 43 kDa großes Protein mit bislang unbekannter Funktion. Bei einer Vielzahl von untersuchten Referenzstämmen von MAP konnte IS900 identifiziert werden und zeigte vorerst keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen *Mycobacterium*-Spezies oder verwandten Gattungen wie *Nocardia* oder *Streptomyces* (Vary et al., 1990; Moss et al., 1991; Englund et al., 1999). Die Entdeckung des IS900-Insertionselements und die Fortschritte in der PCR-Technologie waren Basis für die Entwicklung eines spezifischen, sensitiven und schnellen Erregernachweises. Mittlerweile ist IS900 ein allgemein anerkannter Standard-Marker für den molekularbiologischen Nachweis von MAP.

Allerdings konnten in den letzten Jahren nicht nur Homologien zwischen IS900 und verschiedenen anderen Insertionselementen wie IS110 von *Streptomyces coeliclavulgerus*, IS116 von *Streptomyces clavuligerus* sowie IS902 von *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* nachgewiesen werden (Green et al., 1989), sondern auch Kreuzreaktionen zu weiteren *Mycobacterium*-Spezies, die zu falsch-positiven Ergebnissen in der molekularbiologischen Diagnostik führten (Cousin et al., 1999; Englund et al., 2002; Fang et al., 2002; Kim et al., 2002; O'Mahony und Hill, 2002; Khare et al., 2004; O'Mahony et al., 2004; Vansnick et al., 2004). Beispielsweise belegen zwei dieser Studien den Nachweis von IS900 im Genom von *M. cookii* sowie *M. scrofulaceum*, zwei apathogenen *Mycobacterium*-Spezies aus der natürlichen Bodenflora (Cousin et al., 1999; Englund et al., 2002). Zusätzlich konnten Variationen des ursprünglich isolierten IS900-Insertionselements beobachtet werden, die auf einem oder sogar mehreren Nukleotid-Polymorphismen beruhen (Pickup et al., 2005; Bhide et al., 2006).

Als Alternative zu IS900 wurden zahlreiche weitere MAP-spezifische Zielregionen wie F57 (Poupart et al., 1993), Hsp X (Ellingson et al., 1998), ISMav2 (Strommenger et al., 2001), ISMpa1 (Olsen et al., 2004), ISMap02 (Stabel und Bennatine, 2005), IS_MAP04 (Li et al., 2005) oder Lokus 255 (Bannantine et al., 2002) im bakteriellen Genom des Erregers identifiziert und für die molekularbiologische Diagnostik verwendet. Die beiden Marker F57 und Hsp X sind jeweils mit einer einzigen Kopie im bakteriellen

Genom von MAP vertreten, während von den Markern IS*Mav*2 und IS*Mpa*1 jeweils drei und von IS_MAP04 vier identische Kopien existieren. Aufgrund dieser geringen Anzahl an Genomkopien sind diese Marker zwar weniger sensitiv für den Nachweis des Erregers als IS900, dafür aber umso spezifischer (Poupart et al., 1993; Ellingson et al., 1998; Vansnick et al., 2004; Tasara et al., 2005). Häufiger vertreten im bakteriellen Genom von MAP ist das Insertionselement IS*Map*02. Insgesamt existieren davon sechs identische Kopien (Stabel und Bennatine, 2005).

Insbesondere die Zielregionen IS*Mav*2 und F57 sind mehrfach als geeignet für den spezifischen MAP-Nachweis beschrieben worden (Poupart et al., 1993; Strommenger et al., 2001; Godfroid et al., 2005; Tasara und Stephan, 2005; Bosshard et al., 2006; Schönenbrücher et al., 2008). Die Zielregion F57 ist ein DNA-Segment, bestehend aus 620 bp, das bislang ausschließlich im Genom von MAP isoliert werden konnte. Bei den Untersuchungen von Poupart et al. (1993) wurden 9 MAP-Stämme, 8 *M. avium* ssp. *avium*-Stämme, je ein Stamm von *M. bovis* und *M. tuberculosis* sowie zwei non-Mykobakterien-Stämme von *Corynebacterium renale* und *Corynebacterium xerosis* mitberücksichtigt. Alle MAP-Stämme wurden eindeutig positiv detektiert und es traten keinerlei Kreuzreaktionen zu den anderen untersuchten Bakterienstämmen auf.

Ebenso zeigte das Insertionselement IS*Mav*2 bislang keinerlei Übereinstimmungen mit anderen bekannten Bakteriengenomen und ermöglichte Spezies-spezifisch den Nachweis aller untersuchten MAP-Isolate (Strommenger et al., 2001). Insgesamt wurden 79 MAP-Feldisolate, 9 *M. avium* ssp. *avium*-Isolate und Referenz-Stämme von 9 weiteren non-MAP Mycobacterium-Spezies in die Untersuchungen aufgenommen. In einer weiteren Studie von Schönenbrücher et al. (2008), in der parallel beide Marker F57 und IS*Mav*2 zur Etablierung eines TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahrens eingesetzt wurden, traten ebenfalls keine Kreuzreaktionen zu anderen non-MAP- und non-Mykobakterien-Stämmen auf. Insgesamt wurden 42 MAP-Stämme, 34 non-MAP-Stämme und 65-Non-Mykobakterien-Stämme in die Untersuchungen einbezogen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche **konventionelle PCR-Systeme** zum qualitativen Nachweis von MAP in Rinderkot etabliert. Allerdings fanden überwiegend PCR-Verfahren auf Basis der Insertionssequenz IS900 Verwendung (Vary et al., 1990; Englund et al., 1999; Garrido et al., 2000; Kim et al., 2002; Stabel et al., 2004; Dreier et al., 2006). Nur vereinzelt basieren konventionelle PCR-Verfahren auf anderen MAP-Markern wie beispielsweise dem Marker F57 zum Nachweis von MAP in Rindergewebe (Coetsier et al., 2000) oder in artifiziell kontaminierter Milch (Tasara et al., 2005). Wesentlich für die Bestimmung von Sensitivität und Spezifität eines PCR-Verfahrens ist ein Vergleich mit dem „gold standard“, der Kotkultur. In einer Studie konnte im Vergleich zur kulturellen Anzüchtung von Schafkotproben (n = 43) mit einem konventionellen PCR-Verfahren, basierend auf dem MAP-Marker IS900, eine Sensitivität von 94,1 % und eine Spezifität von 92,3 % erzielt werden (Garrido et al., 2000). Bei dem Vergleich eines PCR-Verfahrens (IS900-basiert) sowie zwei unterschiedlicher Kultivierungsverfahren zum Nachweis von MAP aus definitiv positiven Schaf- und

Ziegenkotproben mit histopathologischen Untersuchungsergebnissen aus Sektionsmaterial der Tiere (Dimareli-Malli und Sarris, 2001) erzielte das PCR-Verfahren bei den Ziegenproben eine Sensitivität von 17,2 % und die kulturellen Verfahren von 25,4 % bzw. 22,8 %. Bei den Schafproben konnten 13,2 % der Ausscheider molekularbiologisch und 8,8 % bzw. 5,9 % kulturell detektiert werden. Die Spezifität der Nachweisverfahren betrug jeweils 100 %. Bei weiteren Untersuchungen von Rinderkotproben (n = 100) wurden Sensitivitäten von 54 %, 49 % sowie 48 % und Spezifitäten von jeweils 100 % mit drei unterschiedlichen konventionellen PCR-Verfahren ermittelt, die ebenfalls auf dem MAP-Marker IS900-basierten (Taddei et al., 2004). Als Referenz zur Bewertung der molekularbiologischen Ergebnisse wurden die Kotproben kulturell angezüchtet (Taddei et al., 2004). Im Vergleich von radiometrischer Kultivierung (BACTEC-Verfahren) und konventioneller PCR erwies sich letztere mit 44 % (Mason et al., 2001) bzw. 55 % sowie 89,2 % (Sockett et al., 1992) als wesentlich weniger sensitiv. Collins et al (1993) erzielten mit einem konventionellen PCR-Verfahren, basierend auf dem MAP-Marker IS900, für den Nachweis des Erregers aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben Erregerkonzentrationen von ≥ 1.600 KbE/g mit einer 100 %igen Nachweiswahrscheinlichkeit. Diese betrug allerdings bei Erregerkonzentrationen von ≤ 112 KbE/g Kot nur noch 15 %. Die Studie zeigt somit, dass die Nachweiswahrscheinlichkeit des PCR-Verfahrens bei Erregerkonzentrationen von ca. 10^2 KbE/g Rinderkot sehr gering ist. 100 Erreger/g Rinderkot gelten als Nachweisgrenze bei der kulturellen Anzüchtung von MAP („gold standard“) (Merkal et al., 1968).

Eine weitere molekularbasierte Nachweismöglichkeit für MAP stellt die **nested-PCR** (nested: deutsch = verschachtelt) dar. Dabei werden zwei PCR-Assays hintereinander geschaltet und das PCR-Produkt aus dem ersten Assay als Matrize für das zweite nachgeschaltete Assay verwendet. Dies setzt voraus, dass die Primer der zweiten PCR innerhalb des amplifizierten DNA-Fragmentes der ersten PCR liegen. Nested-PCR-Verfahren ermöglichen durch die Kombination von zwei exponentiellen Amplifikationen den Nachweis äußerst geringer DNA-Mengen. Ein entscheidender Nachteil der nested-PCR ist die erhöhte Kontaminationsgefahr aufgrund der Notwendigkeit, zwischen den beiden PCR-Ansätzen die Inkubationsröhrchen zu öffnen. Zahlreiche etablierte nested-PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP aus Rinderkot basieren ebenfalls auf dem MAP-Marker IS900 (Collins et al., 1993; Englund et al., 1999; Erume et al., 2001; Christopher-Hennings et al., 2003). Aber auch andere MAP-Marker finden im Zusammenhang mit nested-PCR-Verfahren Verwendung. Eine nested-PCR, basierend auf dem MAP-Marker ISMap02, ermöglichte den zuverlässigen Nachweis von MAP aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben mit Nachweisraten zwischen 10^3 bzw. 10^4 KbE/g Rinderkot. Mit einem seminested-PCR-Verfahren konnte in vergleichenden Untersuchungen zur kulturellen Anzüchtung von MAP aus Rinderkotproben eine Sensitivität von über 70 % erzielt werden (Schneider, 2003).

Konventionelle PCR-Verfahren weisen den Nachteil einer fehlenden Quantifizierung der gesuchten Ziel-DNA auf. Im Rahmen der konventionellen PCR ist eine Quantifizierung von Ziel-DNA nur durch

den kombinierten Einsatz von PCR und ELISA oder unter Verwendung kompetitiver PCR-Verfahren möglich. Allerdings sind diese aufgrund weiterer Arbeitsschritte im Anschluss an die PCR (PCR-ELISA) bzw. der benötigten internen Koamplifikation eines Kompetitors (kompetitive PCR) sehr aufwendig. Vorteilhaft für die Paratuberkulosedagnostik sind daher automatisierte, quantitative PCR-Systeme wie die **Real-Time PCR** (quantitative Echtzeit-PCR), die als Weiterentwicklung der konventionellen PCR anzusehen ist. Als weitere Vorteile bieten Real-Time PCR-Verfahren eine deutlich reduzierte Kontaminationsgefahr der zu untersuchenden Einzelproben und einen erheblich verminderten Zeit- und Arbeitsaufwand bei der Durchführung, da keine aufwendige Agargelelektrophorese im Anschluss an den PCR-Lauf erforderlich ist.

Die Quantifizierung bei der Real-Time PCR erfolgt durch Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus und unterscheidet sich damit grundlegend von anderen quantitativen PCR-Verfahren, die eine Quantifizierung des Amplifikates erst nach Ablauf der PCR gewährleisten. Die kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals während eines PCR-Laufes ermöglicht die Untergliederung in drei Phasen (Becker-Follmann und Baas, 2004). Zu Beginn des Laufes wird das Signal des gesuchten PCR-Produktes von Hintergrundreaktionen überlagert. In der zweiten Phase erfolgt die Amplifikation der Ziel-DNA exponentiell und die Messung des Fluoreszenzsignals nimmt einen sigmoiden Verlauf. Während dieser Phase erfolgt die Quantifizierung der Ziel-DNA durch die Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle bzw. Ct-Wert. Der Ct-Wert ist derjenige PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz der Ziel-DNA die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Der Ct-Wert ist dabei umso kleiner, je größer die ursprüngliche Konzentration der Ziel-DNA in der untersuchten Probe ist. Die Quantifizierung basiert dabei jedoch nicht auf der absoluten Menge an PCR-Produkten, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktionen. Die letzte Phase ist gekennzeichnet durch ein Plateau, da sich die Menge der gebildeten PCR-Produkte gegen Ende des PCR-Laufes nicht mehr verändert.

In dem folgenden Abschnitt werden die am häufigsten in der PCR-Technologie verwendeten Fluorophore vorgestellt: **Ethidiumbromid** war das erste Fluorophor, das für die PCR-Diagnostik eingesetzt wurde. Es bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und wird durch UV-Licht angeregt (Higuchi et al., 1992). Ein heutzutage noch häufig universell eingesetztes Fluorophor ist **SYBR[®]Green**, das ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefert als Ethidiumbromid und ebenfalls unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet (O'Mahony und Hill, 2002; Ravva und Stanker, 2005). Allerdings erlauben derart unspezifische Bindungen dieser interkalierenden Fluorophore keine Unterscheidung zwischen den gewünschten Amplifikaten und Artefakten bzw. Primerdimeren, die während der PCR-Reaktion entstehen können. Der Problematik mangelnder Spezifität bei der Verwendung interkalierender Fluorophore konnte durch die Entwicklung spezifischer FRET-Sonden (Förster Resonanz Energie Transfer) entgegengewirkt werden. Häufige Anwendung finden die so genannten **TaqMan[®]-Sonden**, die aus einer spezifischen Oligonukleotid-Sequenz bestehen und an ihrem 5'-Ende mit einem Donor-Fluorochrom (Reporter) sowie an ihrem 3'-Ende mit einem

Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) versehen sind (Brakmann und Nöbel, 2003; Landt, 2006). Dabei wird die abgegebene Energie des Reporters, der durch eine Lichtquelle angeregt werden kann, von dem in ausreichender Nähe befindlichen Quencher absorbiert. Sobald die Taq-Polymerase die Sonde bei der Synthese des Komplementär-Stranges der Ziel-DNA abbaut, entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und die Reporter-Fluoreszenz wird messbar. Eine Weiterentwicklung der TaqMan[®]-Sonden stellen so genannte **Molecular Beacons** dar, die ebenfalls eine spezifische Oligonukleotidsequenz aufweisen und mit einem Reporter und Quencher gekoppelt sind. Zusätzlich besitzen sie eine Haarnadelstruktur mit eigenkomplementären Enden auf. Damit liegen Reporter und Quencher direkt in Nachbarschaft. Sobald die Sonde spezifisch an die gesuchte Ziel-Sequenz in einem PCR-Ansatz bindet, werden aufgrund einer Konformationsänderung der Sonde Reporter und Quencher voneinander getrennt und die Reporter-Fluoreszenz wird messbar (Brakmann und Nöbel, 2003; Landt, 2006).

In den letzten Jahren wurden auch vereinzelt Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP in Rinderkot herangezogen. Beispielsweise ermöglichte ein IS*Mav2*-basiertes Real-Time PCR-Verfahren den Nachweis von 23 % der in der Kotkultur positiven Proben (n = 1.481). Dabei wurden 60 (76 %) von 79 Rindern, die den Erreger in hohen Konzentrationen mit dem Kot ausschieden und 10 (4,1 %) von 244 Rindern, die den Erreger in geringen Konzentrationen mit dem Kot ausschieden, molekularbiologisch positiv detektiert (Wells et al., 2006). Im Vergleich von zwei hintereinander geschalteten Kotkulturen und einem IS*900*-basierten Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP aus Rinderkotproben (n = 41) erzielte das PCR-Verfahren Sensitivitäten von 93 % und 96 % sowie eine Spezifität von jeweils 92 % (Fang et al., 2002). Ein weiteres IS*900*-basiertes Real-Time PCR-Verfahren detektierte 31 von 310 Rinderkotproben als MAP-positiv. Damit wurde im Vergleich zur kulturellen Anzucht der Proben eine Sensitivität von 60 % und, unter Berücksichtigung fraglicher PCR-Ergebnisse, eine Spezifität von 93,4 % erzielt (Bogli-Stuber et al., 2005). Nur 20 der 31 molekularbiologisch positiven Kotproben wurden kulturell positiv bestätigt. Die Autoren schließen somit nicht aus, dass Rinder, die sich in der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose befinden, den Erreger in derart geringen Mengen mit dem Kot ausscheiden, dass die Nachweisgrenze der Kotkultur unterschritten wird. In Vorversuchen mit artifiziell kontaminierten Kotproben wurden Erregerkonzentrationen von 500 Kbe/g Kot mit einer 100 %igen Nachweiswahrscheinlichkeit detektiert. Somit wäre es denkbar, Kotproben, die geringere Erregerkonzentrationen (≤ 100 Kbe/g Kot) unterhalb der Nachweisgrenze der kulturellen Anzucht enthalten, als molekularbiologisch positiv zu detektieren (Bogli-Stuber et al., 2005). Ein IS*900*- sowie ein F57-basiertes Real-Time PCR-Verfahren erzielten beim Nachweis von MAP aus artifiziell kontaminierten Milchproben Nachweisgrenze von jeweils 100 Kbe/ml Milch (O'Mahony et al., 2004; Tasara et al., 2005). Die Nachweiswahrscheinlichkeiten der beiden Real-Time PCR-Verfahren lagen bei jeweils 100 %. Bei Erregerkonzentrationen von 10-100 Kbe/ml Milch erzielte das letztere Verfahren eine Nachweiswahrscheinlichkeit von 70 % (Tasara et al., 2005). Beim Nachweis von MAP aus artifiziell

kontaminiertem Bullensamen ($1 \cdot 10^6$ Kbe/100 μ l) mittels IS900-basiertem Real-Time PCR-Verfahren wurden Nachweisgrenzen von 10 Kbe/100 μ l Bullensamen erreicht (Herthnek und Bölske, 2006). Die Nachweisgrenzen der oben angeführten Real-Time PCR-Verfahren verdeutlichen die an bestimmte Matrices wie Rinderkot, Milch und Bullensperma gebundene Problematik bei der DNA-Isolierung.

Insbesondere Rinderkot stellt für den molekularbiologischen Nachweis von MAP eine große Herausforderung dar, da diese Matrix mit zahlreichen **PCR-Inhibitoren** belastet ist (Al-Soud und Radström, 1998). Dabei ist für eine erfolgreiche Anwendung von PCR-Methoden das DNA-Extraktionsverfahren ausschlaggebend (Harris und Barletta, 2001). Zum einen müssen die in der Matrix enthaltenen Inhibitoren entfernt und zum anderen die DNA aus der Matrix isoliert werden. Zu den PCR-Inhibitoren im Rinderkot zählt vor allem die Phytinsäure, die bereits in Mengen von 0,4 mM PCR-Amplifikationsreaktionen vollständig hemmen kann (Thronton und Passen, 2004). Weiterhin weisen Polyphenole, Polysaccharide und Hämin, ein Derivat des Blutfarbstoffes Hämoglobin, sowie deren Abbauprodukte wie beispielsweise Bilirubin bzw. Gallensalze einen inhibitorischen Effekt gegenüber PCR-relevanten Enzymen wie der DNA-Polymerase und Restriktionsenzymen auf (Do und Adams, 1991; Demeke und Adams, 1992; Akane et al., 1994; Monteiro et al., 1997; Al-Soud und Radström, 2001).

Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft sind PCR-Verfahren aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität sehr gut für eine gezielte Identifizierung von pathogenen Mikroorganismen geeignet. Dementsprechend führten kontinuierliche Weiterentwicklungen und Modifikationen von **DNA-Extraktionsverfahren** für den Nachweis pathogener Mikroorganismen für die unterschiedlichsten Matrices inklusive Kot zur Entwicklung einer Vielzahl von kommerziell erhältlichen Kit-Systemen. Wesentliche Aspekte bei der DNA-Isolierung sind dabei mechanische, chemische bzw. thermische Aufreinigungen der Proben, um die Freisetzung der Ziel-DNA zu gewährleisten sowie eventuell in den Matrices enthaltene PCR-Inhibitoren zu eliminieren. Ein mechanischer Zellaufschluss kann beispielsweise über Glas- oder Zirkoniumbeads sichergestellt werden, die mehrere Minuten in einem „Bead beater“ bei Frequenzen von 100 Hz geschüttelt werden und somit eine gezielte Homogenisierung der Proben, Zerstörung der Bakterienzellwände und Freisetzung der Ziel-DNA ermöglichen (Bleumink-Pluym et al., 1994; Odumeru et al., 2001). Für die thermische Aufreinigung von Proben zum Nachweis von Mykobakterien sind aufgrund der besonders widerstandsfähigen Zellwand dieser Bakterien Temperatur-Zeit-Kombinationen von ≥ 95 °C für 15 bis 20 Minuten erforderlich (Hurley et al., 1987). Der chemische Zellwandaufschluss kann unter Verwendung von Chemikalien wie beispielsweise Lysozym, Proteinase K, Subtilisin, Pronase u. a. erfolgen (Visuvanathan et al., 1989; Bose et al., 1993). Weiterhin unerlässlich, insbesondere bei der Aufreinigung von Rinderkot, ist die gezielte Abtrennung grober Kotpartikel mittels Sedimentation und Zentrifugation. Der von Kotpartikeln befreite Überstand muss anschließend möglichst vollständig von PCR-Inhibitoren gereinigt werden und eine gezielte Bindung der enthaltenen DNA-Moleküle gewährleisten. Vary et al. (1990) isolierten die gesuchte DNA mit Hilfe einer Zelloulose säule, in zwei weiteren Studien erfolgte eine Adsorption der DNA an Glasmilch (Collins et al., 1993; Millar et al.,

1995). Neuere Methoden ermöglichen die Bindung von Nukleinsäuren an Silikagelmembranen und erlauben damit die gezielte Entfernung unerwünschter Inhibitoren, die über mehrere nachfolgende Waschschrte entfernt werden. Im Anschluss kann dann die aufgereinigte und isolierte DNA eluiert werden (QIAamp DNA Stool Mini Kit[®], Fa. Qiagen; High Pure PCR Template Preparation Kit[®], Fa. Roche Applied Science; PSP Spin Stool Kit[®], Fa. Invitex). Derartige kommerzielle Kit-Systeme bieten bei der DNA-Isolierung entscheidende Vorteile. Sie gewährleisten ohne aufwendige Vorbereitungen die gleichzeitige Aufbereitung zahlreicher Proben. Da nahezu alle Gebrauchsmaterialien und Reagenzien im Voraus bereitgestellt werden, sind manuell- bzw. herstellungsbedingte Fehler stark reduziert und eine eindeutige Reproduzierbarkeit und gleichmäßige Aufbereitung aller Proben garantiert. Die ausführlichen Protokolle können schrittweise abgearbeitet werden und sind automatisierbar. In zahlreichen Publikationen finden kommerzielle Kit-Systeme bei der molekularbiologischen Diagnostik Anwendung (O'Mahony und Hill, 2002; Wells et al., 2006; Schönbrücher et al., 2008) und gewährleisten die Isolierung von DNA guter analytischer Qualität und Reinheit bei gleichzeitig hoher Sensitivität der eingesetzten PCR-Verfahren.

Eine weitere Möglichkeit zur verbesserten DNA-Isolierung von MAP aus Milch- oder Rinderkotproben bietet die **immunomagnetische Separation (IMS)**. Dabei werden die Erregerzellen gezielt an mit Antikörpern beschichtete Beads gebunden und somit von einem Großteil inhibitorischer Substanzen der Untersuchungsmatrix getrennt. Wesentlich für den Erfolg von DNA-Extraktionsverfahren in Kombination mit der IMS ist die im Anschluss an die IMS folgende Probenaufbereitung. Nur durch nachgeschaltete mechanische, thermische und chemische Aufreinigung der Proben wird die Beseitigung weiterer inhibitorischer Substanzen und die Isolierung von MAP-DNA guter Qualität realisiert (Khare et al., 2004). Beispielsweise konnten mit einem konventionellen PCR-Verfahren, basierend auf der Insertionssequenz IS900, nur 44 % der kulturell positiv getesteten Rinderkotproben molekularbiologisch bestätigt werden (Mason et al., 2001). Das verwendete DNA-Extraktionsverfahren basierte dabei auf einer IMS und einem nachgeschalteten Erhitzungsschritt, der eine Freisetzung der DNA aus den isolierten Erregerzellen bezwecken sollte. Allerdings lassen die Ergebnisse dieser Studie darauf schließen, dass eine rein mechanische Aufbereitung der Kotproben im Anschluss an die IMS nicht ausreicht, um die Isolierung qualitativ hochwertiger DNA zu gewährleisten. In einer weiteren Studie erwies sich die IMS-PCR bei der Untersuchung von Schafkotproben (Poolproben = 502) als weniger sensitiv als die konventionelle PCR, basierend auf dem MAP-Marker IS900. Die konventionelle PCR detektierte 74 % der Kotkultur-positiven Proben, wohingegen die IMS-PCR nur 44 % der kulturell positiven Proben nachwies (Marsh und Whittington, 2001). Demgegenüber ermöglichte eine IMS in Kombination mit einem Real-Time PCR-Verfahren, basierend auf dem MAP-Marker IS900, einen zuverlässigen Nachweis von MAP aus artifiziell kontaminierten Milch- und Rinderkotproben (10^1 bis 10^5 KBE/g) (Khare et al., 2004). Mit Hilfe der Real-Time PCR waren ≤ 10 MAP-Zellen in 2 ml Milch bzw. 200 mg Rinderkot nachweisbar. Metzger-Boddien et al. (2006) erzielten ebenfalls gute Ergebnisse mit einem automatisierten IMS-

Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP aus Milchproben. In Vorversuchen mit artifiziell kontaminierten Milchproben wurde eine Nachweisgrenze von ≤ 20 KBE/ml Milch erreicht. Das automatisierte IMS-Real-Time PCR-Verfahren stellte sich bei Untersuchungen von nativen, gepoolten Milchproben (n = 200) als schnelles, sensitives Nachweisverfahren für eine routinierte MAP-Diagnostik in Milch dar (Metzger-Boddien et al., 2006).

2.10 Therapie und Bekämpfung der Paratuberkulose

Wie bereits erwähnt, ist die erfolgreiche Therapie der Paratuberkulose bei Wiederkäuern bislang nicht möglich. Durch therapeutische Maßnahmen wie zum Beispiel den Einsatz von Tuberkulostatika (Tsoniazid, Clofamizine, Streptomycin u. a.) können lediglich vorübergehende Besserungen der klinischen Symptomatik erzielt werden. Die Bekämpfung der Paratuberkulose gestaltet sich äußerst schwierig und konzentriert sich vorwiegend auf Maßnahmen zur Verhinderung ihrer Ausbreitung. Ursachen hierfür sind zum einen die hohe Tenazität des Erregers in der Umgebung der Tiere und zum anderen der Umstand, dass derzeit keine geeigneten Diagnostika zur Verfügung stehen, um auch klinisch inapparent infizierte Tiere zuverlässig zu erfassen.

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Bekämpfung ist die intensive Auseinandersetzung sowohl der Tierärzteschaft als auch der Landwirte mit dieser Erkrankung. Insbesondere in infizierten Betrieben ist ein umfassendes, individuell auf die Situation angepasstes Hygiene- und Betriebsmanagement konstant und längerfristig durchzuführen. Als Hilfestellung wurde deshalb im Jahr 2005 eine Leitlinie für den Umgang der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinie) von Wissenschaftlern, den zuständigen Landesbehörden und dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz verfasst.

Die Leitlinie basiert auf drei Säulen:

1. Hygienemaßnahmen zur Vermeidung der Weiterverbreitung von MAP
2. Bestandsüberwachung
3. Vorbereitung einer flächendeckenden, bundesweiten Überwachung bzw. Erfassung der Verbreitung der Paratuberkulose.

Die Ziele der Paratuberkuloseleitlinie sind:

1. Vereinheitlichung der Maßnahmen in Deutschland
2. Reduzierung der klinischen Fälle sowie der Schäden durch Infektionen in den Betrieben
3. Eindämmung der Weiterverbreitung des Erregers
4. Senkung der Prävalenz der Paratuberkulose.

Einige bedeutsame Aspekte der Leitlinie sind in dem folgenden Abschnitt zusammengefasst. Um eine Verbreitung von MAP zu vermeiden, sind allgemeine Bestandsmaßnahmen wie die räumliche Trennung

der Tiere nach Art und Altersklassen (Kälber, Jungvieh sowie Alttierbestand), ausgeprägte Personalhygiene kombiniert mit einer Hygieneschleuse (Vermeidung der Erregerübertragung durch Arbeitskleidung, verschmutzte Hände), ein reduzierter Fremdenverkehr in den Stallungen, regelmäßige Schadnagerbekämpfung und die hygienische Lagerung von Futtermitteln durchzuführen. Besondere Aufmerksamkeit ist dabei auf die Phase der höchsten Empfänglichkeit (Kälber bis zu einem Alter von 6 Monaten) und damit auf hygienische Maßnahmen im Abkalbbereich sowie der Kälberaufzucht zu legen. In Milchrinderbeständen sind Abkalboxen räumlich getrennt vom übrigen Bestand einzurichten und nach jeder Abkalbung gründlich zu reinigen und zu desinfizieren. Die Muttertiere sind vor dem Verbringen in den Abkalbbereich zu reinigen. Die neugeborenen Kälber sind unverzüglich von den Muttertieren zu trennen und separat aufzustellen. Jedes Kalb sollte während der ersten Lebenstage nur Kolostrum des eigenen Muttertieres erhalten. Anschließend ist das Verfüttern von Milchaustauscher zu bevorzugen. Die Tränkeeinrichtungen sind nach jeder Benutzung gründlich zu reinigen. Weiden, die von Rindern im Alter von über 18 Monaten genutzt wurden, sollten für einen Zeitraum von einem Jahr nicht von Kälbern beweidet werden.

Auf Ausstellungen und Auktionen sollten nur Tiere mit einem bekannten Paratuberkulosestatus teilnehmen. Dabei sind die Tiere je nach Paratuberkulosestatus getrennt aufzustellen. Die Eigenremontierung ist zu bevorzugen, während Zukäufe zu vermeiden sind. Der Zukauf von Tieren sollte nur aus Betrieben mit bekanntem Paratuberkulosestatus erfolgen. Alle Tiere eines Bestandes sind regelmäßig klinisch zu beobachten. Durchfälle, die länger als fünf Tage andauern, sind diagnostisch abzuklären. Klinisch auffällige Tiere sind unverzüglich aus dem Betrieb zu entfernen.

Die Statusdefinition für einen Bestand erfolgt gemäß den vom Tierbesitzer durchgeführten Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Paratuberkulose:

1. **Status I** (Basismaßnahmen): Durchführung der empfohlenen Hygienemaßnahmen mit regelmäßiger Kontrolle durch die zuständigen Behörden
2. **Status II** (fortgeschrittene Überwachung): Voraussetzungen von Status I sind erfüllt; einmal jährlich erfolgt eine serologische Überwachung (Testverfahren > 99 % spezifisch) aller Tiere ab einem Alter von zwei Jahren oder aber Untersuchung dieser Tiere mittels molekularbiologischem Nachweisverfahren
3. **Status III** (Bekämpfung/Sanierung): Voraussetzungen von Status II sind erfüllt; alle serologisch positiven Tiere sowie deren Nachkommen und Vorfahren sind dreimal im Abstand von sechs Monaten mittels bakteriologischer Kotuntersuchung oder mittels PCR aus Kot zu untersuchen. Nachkommen im Alter von unter zwei Jahren sind zu separieren und ab einem Alter von zwei Jahren nachzuuntersuchen. Nachfolgend sind alle serologisch positiven Tiere einmal jährlich mittels Kotkultur oder PCR zu untersuchen.
4. **Status IV** (Paratuberkulose-unverdächtig): Ein Bestand ist unverdächtig, wenn dieser über mindestens fünf Jahre auf Paratuberkulose serologisch und klinisch bzw. bakteriologisch

(einschließlich PCR-Befunde) negativ getestet wurde. Zur Aufrechterhaltung des Status IV müssen die serologischen oder bakteriologischen Untersuchungen fort dauern.

Allerdings sind die in den Leitlinien geforderten Maßnahmen der Paratuberkulosebekämpfung nur schwer in der Praxis umsetzbar. Die einzelnen Bundesländer führen sehr unterschiedliche Überwachungsmaßnahmen und Bekämpfungsprogramme, teilweise auch unter Mitwirkung der landeseigenen Tierseuchenkassen, durch. Bislang werden die Vorgaben der Leitlinie zur Überwachung und Bekämpfung der Paratuberkulose ansatzweise in drei Bundesländern (Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, Thüringen) umgesetzt. Allerdings sind vor und während der Teilnahme an Sanierungsprogrammen die regelmäßige, intensive Betreuung der jeweiligen Betriebe und individuelle Anpassung des Untersuchungs- sowie des Hygieneprogrammes erforderlich. Eine langfristige kooperative Mitarbeit der Landwirte im Rahmen von Bekämpfungsmaßnahmen ist unerlässlich, um Erfolge bei der Prävalenz-Senkung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen zu erzielen. Eine Eradiktion der Paratuberkulose scheint vorerst in den meisten Ländern unmöglich. Als Hauptziele sollten deshalb die Senkung der Paratuberkulose-Prävalenz und die Aufzucht Paratuberkulose-freier Kälber im Vordergrund stehen. Allein Schweden konnte aufgrund höchst restriktiver Bekämpfungsmaßnahmen infizierte Rinder, die vorwiegend importiert worden waren, ausmerzen und gilt seit einigen Jahren als Paratuberkulose-frei (Viske et al., 1996; Sternberg et al., 2006). Auch neueste Untersuchungen an schwedischen Schafherden bestätigen den Status der Paratuberkulose-Freiheit (Sternberg et al., 2006).

Ähnlich den Paratuberkuloseleitlinien in Deutschland haben die USA und Australien ausführliche Bekämpfungsmaßnahmen und -programme gegen die Paratuberkulose schriftlich fixiert. Im Jahr 2005 wurden die „Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne’s Disease Control Program“ (VBJDCP) unter Zusammenarbeit der „National Johne’s Working Group“, dem „Johne’s committee of the United States Animal Health Association“, dem „State Veterinarians“ und Repräsentanten der involvierten Industriezweige verfasst und vom „United States Department of Agriculture“ befürwortet und veröffentlicht. Dabei basieren die VBJDCP auf drei Hauptelementen:

1. **Schulungen** der Tierbesitzer, Landwirte und Tierärzteschaft über das Krankheitsbild, mögliche Kosten, Prävention und Bekämpfung
2. **Herdenmanagement-Strategien** zur Prävention von Infektionen sowie zur Reduktion der Prävalenz von MAP in den Herden
3. **Klassifizierung** der Herden, basierend auf Herden- bzw. Einzeltierdiagnostik mit zusätzlicher individueller Betreuung

Die VBJDCP gelten zwar als nationales, Staaten-übergreifendes Standardwerk für die Bekämpfung der Paratuberkulose in den USA, gewährleisten aber dennoch innerhalb der einzelnen US-Bundesstaaten die individuelle Anpassung der Bekämpfungsstrategien. Jeder US-Bundesstaat wird von einer qualifizierten Person, dem „Designated JD coordinator“ betreut, der eine beratende Funktion bei der Bekämpfung der Paratuberkulose inne hat.

Die Herdenklassifizierung erfolgt nach dem prozentualen Anteil positiver Tiere, die mittels Screenig-Test (ELISA) ermittelt werden. Zur weiteren Selektion positiver Rinder sind genbasierte Verfahren, die kulturelle Anzüchtung des Erregers und histologische Untersuchungen von Gewebematerial vorgesehen.

Ein vergleichbares, übergreifendes Bekämpfungsprogramm „National Johne’s Disease Control Program“ (NJDCP) wurde vom „Animal Health Council“ in Australien veröffentlicht. Dieses ist wiederum untergliedert in Teilprojekte, die sich mit tierartenspezifischen Bekämpfungsprogrammen (Rinder, Schafe, Ziegen, Alpaka), Schulungsmaßnahmen (Tierärzteschaft, Tierbesitzer), Forschung und Entwicklung sowie Öffentlichkeitsarbeit auf nationaler Ebene beschäftigen.

In den Niederlanden wurde ebenfalls ein Bekämpfungsprogramm (Dutch Paratuberculosis Program) unter Mitwirkung der Regierung erarbeitet mit dem Ziel, die MAP-Kontamination der Milch zu reduzieren und damit auch die Prävalenz der Paratuberkulose in den Milchrinderbeständen, die derzeit in den Niederlanden auf über 30 % geschätzt wird (Franken, 2006). Das Bekämpfungsprogramm gliedert sich dabei in drei große Teilschritte:

1. **Klassifizierung der Milchrinderherden:** ELISA von Blutproben aller Tiere älter als drei Jahre oder ELISA von Milchproben aller laktierenden Kühe
2. **Monitoring ELISA-negativer Milchrinderherden:** wiederholter ELISA-Test von Blutproben aller Tiere älter als drei Jahre oder ELISA-Test von Milchproben aller laktierenden Kühe alle zwei Jahre
3. **Monitoring ELISA-positiver Milchrinderherden:** wiederholter ELISA-Test von Blutproben aller Tiere älter als drei Jahre oder ELISA-Test von Milchproben aller laktierenden Kühe jährlich bzw. kulturelle Anzüchtung von Kotproben aller Tiere älter als zwei Jahre

Ziel dabei ist die Identifizierung und Eliminierung von klinisch unauffälligen Milchrindern, die den Erreger unbemerkt ausscheiden, sowie deren letztgeborene Kälber. Das „Dutch ELISA-based Paratuberculosis Program“ ermöglicht ein effektives praktikables und finanzierbares Herden- bzw. Bekämpfungsmanagement. Allerdings ist der Erfolg abzuwarten.

Verschiedene Bekämpfungsprogramme setzen insbesondere in Problembeständen mit Häufungen klinischer Fälle der Paratuberkulose erfolgreich **Impfprogramme** ein und konnten damit die Anzahl der klinischen Manifestationen innerhalb der Herde und die Ausscheideraten des Erregers mit dem Kot senken (Larsen et al., 1978; Wentink et al., 1994; van Schaik et al., 1996; Eppleston et al., 2005). In Rheinland-Pfalz wurden drei mit Paratuberkulose infizierte Milchrinderherden über einen Zeitraum von sechs Jahren einem Sanierungsverfahren unterworfen. Die Milchrinderherden wurden zweimal jährlich mittels Intrakutantest, Antikörper-ELISA und Kotkultur untersucht. Tiere, die nachweislich den Erreger mit dem Kot ausschieden, wurden gemerzt. Die Jungtiere wurden mit NEOPARASEC[®] (Fa. Merial), einem Lebendimpfstoff immunisiert. Insgesamt konnte innerhalb von sechs Jahren durch die konsequente Merzung von MAP-ausscheidenden Rindern und die Impfung der neugeborenen Kälber in allen drei Betrieben eine erhebliche Senkung der Erkrankungsprävalenz erreicht werden (Klawonn et al., 2002). Geimpfte Tiere, die doch an der Paratuberkulose erkrankten, wiesen einen deutlich milderen

Krankheitsverlauf auf als nicht-geimpfte Tiere. Die Untersuchungen zeigen somit, dass zumindest in schwer betroffenen Milchrinderherden, auch aus Kostengründen, die Impfung als Bekämpfungsmaßnahme in Betracht gezogen werden kann. Allerdings ist die Sanierung eines MAP-infizierten Betriebes nicht möglich, da die Impfung nicht vor einer Neuinfektion empfänglicher Tiere schützt (Larsen et al., 1974; Juste et al., 1994). Als Nachteil der Impfung mit dem Lebendimpfstoff (NEOPARASEC[®]) wurden an den Injektionsstellen lokale, granulomatöse Impfreaktionen unterschiedlicher Größe beobachtet. Zusätzlich sind serologische Untersuchungen in der Routinediagnostik bei geimpften Tieren, die im Rahmen der Impfung Antikörper gegen MAP ausgebildet haben, nicht mehr aussagekräftig. Derzeit steht kein zugelassener Impfstoff in Deutschland zur Verfügung. Ein neuer Tot-Impfstoff GUDAIR[®] (Fa. CZ Veterinaria) wurde bereits in Spanien entwickelt und in Australien erfolgreich bei Schafherden eingesetzt (Eppleston et al., 2005). Dabei wurden 200 Lämmer mit einem Alter zwischen einem und vier Monaten geimpft. Eine gleichgroße Kontrollgruppe mit ungeimpften Tieren wurde ebenfalls in der Studie berücksichtigt. Die Impfung bewirkte eine Reduktion der Mortalität der ovinen Paratuberkulose um über 90 % und führte im Vergleich zu ungeimpften Tieren zu einer verzögerten Erregerausscheidung mit dem Kot. Die Schlachtung von geimpften und ungeimpften Schafen erfolgte gezielt zwei bzw. vier Jahre nach erfolgter Impfung. Die Gewebeuntersuchungen zwei Jahre nach der Vakzinierung zeigten bei geimpften Tieren eine Reduktion der pathomorphologischen Veränderungen von 65 %. Bei vier Jahre alten, vakzinierten Tieren betrug die Reduktion der pathomorphologischen Veränderungen noch 50 %. Innerhalb dieser Studie entwickelten 50 % der vakzinierten Schafe an der Injektionsstelle granulomatöse Umfangsvermehrungen unterschiedlicher Größe. In einer weiteren Studie wurden Kälber ebenfalls mit einer Tot-Vakzine (SILIRUM[®], Fa. CZ Veterinaria) gegen die Paratuberkulose immunisiert. Zwei Monate nach der Vakzinierung wurden die Kälber mehrfach artifiziell mit MAP (10^{10} Kbe) inokuliert. In nachfolgenden Sektionen zeigten die geimpften Kälber eine deutliche Reduktion der histopathologischen Veränderungen. Die Studie konnte somit ebenfalls einen Schutzeffekt der Vakzine belegen (Munoz et al., 2005).

Dieselbe Tot-Vakzine (SILIRUM[®]) wurde auch in fünf Milchrinderherden in Rheinland-Pfalz eingesetzt. In den teilnehmenden Betrieben konnte durch die Impfung eine deutliche Reduktion der klinischen Paratuberkulose-Erkrankungen erzielt werden. Auch bei dieser Vakzine traten lokale Reaktionen an der Impfstelle auf, allerdings deutlich milder als bei der Impfung mit dem Lebendimpfstoff NEOPARASEC[®] (Klawonn et al., 2007).

Die Bekämpfung der Paratuberkulose ist komplexer Natur. Die Aufzucht einer Erreger-freien Nachzucht erfordert aufwendige, lang andauernde Maßnahmen sowie Engagement zur Verhinderung der Neuinfektion von Kälbern. Trotz der derzeit bestehenden Schwierigkeiten, besonders im Hinblick auf eine effektive Diagnostik, die lange Inkubationszeit sowie den anfänglich nur schwer erkennbaren Krankheitsverlauf, sollte aufgrund der erheblichen wirtschaftlichen Schäden, die durch die Paratuberkulose verursacht werden, der Bekämpfung dieser Erkrankung ein besonderes Augenmerk zukommen. Gezielte Bekämpfungsprogramme auf Basis der Leitlinien wären wünschenswert.

2.11 MAP und Morbus Crohn (MC)?

Morbus Crohn (MC) ist eine chronisch entzündliche, segmental auftretende, unheilbare Darmerkrankung beim Menschen, die auch die tiefen Wandschichten des Darmes betrifft. MC und die Colitis ulcerosa (CU) werden unter dem Begriff der „chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“ zusammengefasst (Schneider, 2003). Der Name des Krankheitsbildes leitet sich von seinem Entdecker, dem amerikanischen Gastroenterologen Dr. Burrill Crohn ab, der MC erstmals 1932 beschrieb (Crohn et al., 1932). Charakteristisch für das Krankheitsbild ist der diskontinuierliche, segmental-entzündliche Befall („skip lesions“) der Darmschleimhaut. Dabei kann die Erkrankung im gesamten Magen-Darm-Trakt – von der Mundhöhle bis zum After – auftreten. Bevorzugt finden sich allerdings Manifestationen im terminalen Ileum und proximalen Kolon (Schmailzl, 1995; Harris und Lammerding, 2001).

Die Symptomatik des MC äußert sich meist anfänglich mit Müdigkeit, Mattigkeit, Gewichtsverlust, Schmerzen und Krämpfen. In Folge können rezidivierend flüssige, aber auch blutig-schleimige Durchfälle auftreten. Allerdings ist eine Manifestation ohne Durchfall ebenso möglich (Schneider, 2003). Jeder akute „Krankheitsschub“ kann zusätzlich von Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Anämie und Leukozytose begleitet sein. Mögliche schwerwiegende Komplikationen, die im Rahmen dieses Krankheitsbildes auftreten können, sind Darmperforationen (Tonelli, 1995), mechanischer Ileus (Stawarski et al., 2006), Darmblutungen (Stawarski et al., 2006), Fisteln (Derty et al., 1985), Konglomerattumore (Stein, 2003), intra- und retroperitoneale Abszesse (Tonelli, 1995) und bei bis zu 50 % der Betroffenen so genannte extraintestinale Manifestationen. Letztere betreffen sehr häufig Gelenke, Haut und Augen (Uveitis, Erythema nodosum, enteropathische Arthritis oder Sakroilitis) (Sons et al., 1990; Stawarski et al., 2006). Des Weiteren sind MC-Patienten einem weit höheren Risiko ausgesetzt, an Darmkrebs zu erkranken (Winkler et al., 2002).

Die Ätiologie des MC ist bislang ungeklärt. Es existieren verschiedene Theorien, die als ätiologische Faktoren in Betracht gezogen werden, wobei von einem multifaktoriellen Krankheitsgeschehen auszugehen ist. Zu den möglichen ätiologischen Faktoren gehören: intestinale Infektionen, verursacht durch *Listeria monocytogenes* (Liu et al., 1995), *Escherichia coli* (Darfeuille-Michaud et al., 1998), *Klebsiella pneumoniae* (Cooper et al., 1988), *Yersinia* spp. (Kallinowski et al., 1998), *Streptococcus* spp. (Liu et al., 1995) oder *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Bull et al., 2003), Dysbalancen der Immunantwort, genetische Prädispositionen (teilweise familiäre Häufungen sowie eine gestörte Mukosabarriere mit Aufnahme luminaler Antigene), psychische, diätetische und Umwelt-bedingte Faktoren (Sartor, 1997; Schreiber und Stange, 1997).

MAP zählt aus verschiedenen Gründen zu den möglichen Erregern, die als mitverursachendes Agens bei der Entstehung des MC beim Menschen diskutiert werden. 1913 beschrieb Dalziel erstmals in der Geschichte die makroskopischen und mikroskopischen Ähnlichkeiten der „chronischen Enteritis“ des Menschen und der Paratuberkulose der Wiederkäuer (Dalziel, 1913). Aufgrund vergleichbarer pathomorphologischer Veränderungen wurde bereits sehr frühzeitig – aber nach wie vor sehr

widersprüchlich – die ätiologische Beteiligung von MAP an diesem Krankheitsgeschehen des Menschen diskutiert (Chiodini, 1998). Der Erreger konnte aus Darmbiopтатаen (Bull et al., 2003) sowie dem Blut von Patienten mit MC (Naser et al., 2004), aber auch aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs, insbesondere Milch und Milcherzeugnissen (Hammer und Knappstein, 1998), mehrfach isoliert werden. Einige Studien belegen den Nachweis von MAP in handelsüblicher Milch (Ayele et al., 2005; Ellingson et al., 2005) sowie in Milchprodukten wie Käse (Ikonopoulou et al., 2005) oder Quark (Clark et al., 2006). Verschiedene Modellversuche belegen die Überlebensfähigkeit von MAP bei der Herstellung von Käse wie Emmentaler, Tilsiter oder Cheddar (Spahr und Schafroth, 2001; Donaghy et al., 2004). Mittlerweile liegen auch positive Ergebnisse bei Säuglingsnahrungsmitteln vor (Akineden et al., 2006). Aber auch andere Eintragungswege in die Nahrungsmittelkette wie Trinkwasser (Mayberry und Hitchens, 1978; Pickup et al., 2005), Gemüse, Salat, Rettich und Tomaten (Pavlik et al., 1995) sind aufgrund der hohen Tenazität und Verbreitung des Erregers in der Umwelt wahrscheinlich. Bei letzteren sind insbesondere Produkte von „natürlich gedüngten“ Feldern im Rahmen ökologischer Produktionsausrichtungen betroffen, die direkten Kontakt zu erregerhaltigen Tierexkrementen haben können. Über das Vorkommen von MAP in Fleisch und Fleischprodukten liegen bislang kaum Daten vor (Gwozdz et al., 1997; Chamberlin et al., 2001). Da es bereits *intra vitam* im Rahmen einer primären Kontamination zu einer lymphogenen bzw. hämatogenen Streuung des Erregers mit anschließender Besiedelung der Muskulatur sowie Organen (Collins, 1997; Gwozdz et al., 1997; Pavlik et al., 2000; Ayele et al., 2004) von Rindern kommen kann, aber auch Sekundärkontaminationen beim Schlachtprozess nicht auszuschließen sind, ist die Möglichkeit, dass auch Fleisch und Fleischprodukte den Erreger enthalten können, gegeben. In einer Studie konnte bei den Untersuchungen verschiedener Probenmatrizes (Kot, Milch, Mesenteriallymphknoten und Darmgewebe (Ileum)) von 101 Schlachtrindern mittels Real-Time PCR, basierend auf dem MAP-Marker F57, bei 2,9 % der Tiere (3 von 101) MAP-DNA in Zwerchfellmuskulatur nachgewiesen werden (Bosshard et al., 2006). Eine vergleichende kulturelle Anzuchtung der untersuchten Proben erfolgte allerdings nicht. Denkbar wäre auch die Übertragung von MAP auf Fleisch von Schlachttieren über verschiedene Fliegen-Spezies (*Calliphora vicina*, *Lucilia caesar* u.a.), die Träger des Erregers sein können (Fischer et al., 2001; Fischer et al., 2004). Bei Untersuchungen verschiedener Fliegen-Spezies, die auf dem Schlachthof Kontakt zu MAP-infizierten Rindern hatten, konnte der Erreger mehrfach isoliert werden. Selbst an Tagen, an denen nur Rinder aus Paratuberkulose-freien Beständen geschlachtet wurden, konnte MAP bei Fliegen auf dem Schlachthof isoliert werden (Fischer et al., 2004).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Arbeitskonzept

Das **Ziel der Dissertation** sollte der molekularbiologische Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Kotproben von Milchrindern durch das im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde entwickelte TaqMan® Real-Time PCR-Verfahren (Schönenbrücher et al., 2008) sein. Dabei sollten nicht nur klinisch erkrankte Tiere, sondern auch klinisch inapparent infizierte Tiere erfasst werden.

Insgesamt waren folgende Arbeitsmodule zu berücksichtigen:

- **Bestimmung der Nachweisrate** der institutseigenen TaqMan® Real-Time PCR mit artifiziell kontaminierten Kotproben unter Berücksichtigung verschiedener DNA-Extraktionsverfahren (Vorversuch und Hauptversuch I)
- **Bestimmung von Spezifität und Sensitivität** der TaqMan® Real-Time PCR und einer nested-PCR (Bull et al., 2003) bei der Nachuntersuchung bereits durch andere Institutionen voruntersuchter, nativer Kotproben von Paratuberkulose-positiven und -negativen Rindern als Blindversuche (Hauptversuch II)
- Parallele, vergleichende **mikroskopische** und **kulturelle Untersuchungen** der nativen Rinderkotproben (Hauptversuch II)

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien

a) Allgemeine Laborausstattung:

- Abfüllgerät für Nährmedien, Typ Tecnomat 125, Fa. Integra Bioscience
- Analyse- und Präzisionswaage, Typ BP 3100 S, Fa. Satorius
- Automatischer Nährmediensterilisator und Tischautoklav, Typ Agarclav 5/10, Fa. Integra Bioscience
- Beutelwalkmischgerät/Stomacher, Typ Lab Blender 400; Modell No BA 6021, Fa. Seward
- Brutschrank (+37 °C) Typ BVW 50 K, Fa. Memmert
- Bunsenbrenner, Typ Gasi 3.340102, Fa. Schütt Labortechnik
- Dampfsterilisator, Typ H+P 500EV, Fa. Varioklav
- Färbekbank mit Abzugseinrichtung, Fa. Weseman
- Feinwaage, Typ BA 210 S – OD1/MCBB 100, Fa. Satorius
- Gefriertruhe (-25 °C), Typ GTL 37000, Fa. Bosch
- Glasfläschchen mit Schraubverschluss (Volumen 25 ml)
- Impfösenhalter, Artikelnr. 231.2572, Fa. VWR International
- Kühlschrank (+2 bis +4 °C)
- Kühlzentrifuge, Typ Multifuge 1 S-R, Fa. Heraeus Instruments
- Lichtmikroskop, Typ KF 2, Fa. Zeiss
- Messkolben aus Glas nach DIN 12664, Genauigkeitsklasse A
- Messpipetten 1 ml und 10 ml., Artikelnr. 6121125 und 6121134, Fa. VWR International
- Messzylinder aus Glas nach DIN 12680, Genauigkeitsklasse B
- Metallspatel
- Petrischalen mit und ohne Nocken, Fa. Nerbe plus
- Pipettierball (Peleusball), Artikelnr. 6122006, Fa. VWR International
- Pipettenspitzen (Volumina 10 µl, 200 µl und 1.000 µl), Fa. Eppendorf
- Pipetten, Typ Research[®], Varipip[®] (100-1.000 µl, 50-200 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl), Referenz der Fa. Eppendorf
- Platinösen, Volumen 0,5 µl, Artikelnr. 631. 712, Fa. VWR International
- Reagenzglasschüttler, Typ 7-2020, Fa. neoLab
- Schüttelinkubator, Typ 3033, Fa. GFL (Gesellschaft für Labortechnik)
- Sicherheitswerkbank, Typ LaminAir HB 2448, Fa. Heraeus Instruments
- Ständer für Kulturröhrchen, Artikelnr. E 101.1, Fa. Roth
- Thermomixer, Typ 5436, Fa. Eppendorf

- Tischzentrifuge, Typ 5415C, Fa. Eppendorf
- Trocknungsschrank, +40 °C, Fa. Memmert
- Wasserbad, Typ 780027, Fa. Köttermann
- Wasserbad, Typ 1002, GFL (Gesellschaft für Labortechnik)
- Weithals-Erlenmeyerkolben, Artikelnr. 391.0260, Fa. VWR International
- Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit Schraubdeckel, Produkt-Nr. N 465.1, Fa. Roth

b) Molekularbiologischer Bedarf:

- Einmalhandschuhe Touch NT-Nitril, Artikelnr. 92-60, Fa. Ansell
- Einmalpapiertücher, Fa. Torx
- Elektrophoresekammer, Typ Blue Manne 100 und 200, Fa. Blueline
- Fotoanlage (MP 4*), Fa. Polaroid
- Netzteil MBT, Typ 57042, Fa. MicroBiotecBrand
- Netzteil Transphor/Electrophoresis DC Power Supply, Produkt-Nr. 95-2021, Fa. HSI Hoefer
- Pasteurpipetten, Fa. VWR International
- PCR-Reaktionsgefäßständer, Fa. Eppendorf
- Reagenzgefäße (1,5 ml und 2 ml), Fa. Biozym
- Reagenzgefäße für PCR (100 µl, 200 µl), Fa. Biozym
- Reagenzgefäße mit Schraubdeckel (2 ml), Fa. Biozym
- Real-Time Cycler, Typ ABI PRISM 7000 Sequence, Fa. Applera
- Ribolyser, Typ FastPrep 120, Fa. Savant Instruments
- SiLibeads® Keramikkügelchen, Fa. Sigmund Lindner
- Thermocycler, Typ TouchDown™ Temperature Cycling System, Fa. Hybaid
- Thermocycler, Typ GeneAmp PCR-System 9600, Fa. Perkin Elmer
- Ultraviolet Transilluminator, Typ Mighty Bright UVTM-25, Fa. Hoefer Scientific Instruments
- UV-Kabinett, Typ 825-UCV/22, Fa. Plas-Labs
- Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel (15 ml), Fa. Sarstedt

3.2.2 Referenz- und Kontrollstämme

Zur artifiziiellen Kontamination von Rinderkot sowie als Negativ- und Positivkontrollen für die eingesetzten PCR-Systeme wurden die folgenden Mykobakterienstämme verwendet:

- ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* D8168/02 (interne Bezeichnung: MAP 423):**
Herkunft: Rinderkot
Quelle: Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz
- ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* DSMZ-Nr. 44135 (interne Bezeichnung: J 27):**
Herkunft: Rinderkot
Quelle: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena
- ***Mycobacterium scrofulaceum* 8821/04 (interne Bezeichnung: Bo 18):**
Herkunft: unbekannt
Quelle: Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel
- ***Mycobacterium smegmatis* 8414/02 (interne Bezeichnung: Bo 16):**
Herkunft: unbekannt
Quelle: Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel
- ***Mycobacterium fortuitum* 7157/01 (interne Bezeichnung: Bo 11):**
Herkunft: unbekannt
Quelle: Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel

3.2.3 Rinderkotproben

Insgesamt wurden 206 native Rinderkotproben im Rahmen des Hauptversuches II mikroskopisch, kulturell sowie molekularbiologisch untersucht. Darunter befanden sich 144 Rinderkotproben von Tieren aus 24 unterschiedlichen Beständen und 62 Kotproben von Einzeltieren aus Hessen (n = 139), Rheinland-Pfalz (n = 21) und Thüringen (n = 46). Die Rinderkotproben wurden von der Klinik für Wiederkäuer und Schweine an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in Koblenz, der Thüringer Tierseuchenkasse in Jena und dem Landesbetrieb Hessisches Landeslabor in Gießen zur Verfügung gestellt. Bei den nativen Rinderkotproben (n = 206) handelte es sich um Kotproben klinisch auffälliger Milchrinder aus Paratuberkulose-Problembeständen und/oder um Proben von Milchrindern, die mit unterschiedlichen, teilweise auch mehreren Nachweisverfahren der Paratuberkulose von den o. g. Institutionen voruntersucht wurden.

Teils lagen nur serologische, kulturelle oder molekularbiologische Untersuchungsergebnisse von Serum- bzw. Kotproben der einzelnen Tiere vor, teils existierten Ergebnisse verschiedener parallel eingesetzter Nachweisverfahren. Bei den serologischen Nachweisverfahren ist zwischen milchserologischen Untersuchungen mittels Milch-ELISA (ELISA (M)) und/oder blutserologischen Untersuchungen mittels Blut-ELISA (ELISA (B)) zu unterscheiden. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Rinderkotproben finden sich im Anhang Kapitel 8.2 Tabelle 43 dieser Arbeit.

3.2.4 Ziehl-Neelsen-Färbung

Reagenzien und Chemikalien:

- TB Stain Kit ZN, Artikelnr. 212520, Fa. Becton Dickinson (BD[®]):
 - TB Carbofuchsin ZN (pro 1 Liter):
 - 1,7 g Basic Fuchsin
 - 50 g Phenol
 - 95 ml Isopropanol
 - 905 ml destilliertes Wasser
 - TB Decolorizer (pro 1 Liter):
 - 30 ml Salzsäure (HCl)
 - 970 ml Ethanol/Methanol
 - TB Methylenblau (pro 1 Liter):
 - 2,4 g Methylenblau
 - 300 ml Ethanol/Methanol
 - 700 ml purified Wasser

Ein erbsengroßes Stück Rinderkot wurde auf einem Objektträger möglichst dünn ausgestrichen. Dabei wurden grobe, faserige Kotbestandteile entfernt. Nach dem Trocknen des Ausstriches wurde der Objektträger über der Flamme eines Bunsenbrenners hitzefixiert. Anschließend wurde dieser in einen Färbeständer gelegt und auf der Färbekbank vollständig mit Carbofuchsin ZN bedeckt. Das Carbofuchsin ZN wurde mit dem Bunsenbrenner über einen Zeitraum von fünf Minuten behutsam mehrmals zum Dampfen gebracht. Nach dem Abgießen des Farbstoffes und einer Spülung des Objektträgers mit Wasser wurde das Präparat mit dem TB Decolorizer entfärbt (Einwirkzeit ca. ein bis zwei Minuten) und behutsam mit Wasser abgespült. Der Entfärbvorgang wurde bei Bedarf noch ein weiteres Mal wiederholt. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung des Präparates mit Methylenblau. Dafür wurde der Objektträger vollständig für einen Zeitraum von 20 Sekunden mit Methylenblau bedeckt. Nach einer gründlichen Spülung mit Wasser und vollständiger Trocknung des Objektträgers erfolgte die mikroskopische Untersuchung mittels Ölimmersion bei 1.000-facher Vergrößerung für 10 Minuten (ca. 200 Blickfelder). Das Vorliegen von nestartig zusammengelagerten, roten, säurefesten Stäbchenbakterien auf blauem Hintergrund galt als Hinweis auf das Vorkommen von MAP. Wurden keine roten Stäbchen in der untersuchten Probe identifiziert, so galt diese als Mykobakterien-negativ. Das Vorkommen vereinzelter roter Stäbchenbakterien, die nicht in Nestern

vorlagen, ermöglichte keine sichere Aussage über den Nachweis von MAP in der Kotprobe (nach den Vorgaben des Arbeitskreises für Veterinärmedizinische Infektionskrankheiten: AVID VII/1996).

3.2.5 Dekontaminationsverfahren zur kulturellen Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus Rinderkot

Reagenzien und Chemikalien:

- Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC)/1-Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat (C₂₁H₃₈ClN·H₂O), Artikelnr. 8.40008.0100, Fa Merck
- Herstellung der 0,75 %igen HPC-Lösung:
0,75 g Hexadecylpyridiniumchlorid ad 100 ml Aqua dest.

Um die im Rinderkot enthaltene Begleitkeimflora zu eliminieren bzw. zu reduzieren, wurden die Rinderkotproben vor der kulturellen Anzucht in Anlehnung an die Methode des Arbeitskreises für Veterinärmedizinische Infektionskrankheiten (AVID VII/1996) sowie die Dissertation von Schneider (2003) dekontaminiert.

Dazu wurden jeweils 3 g Rinderkot in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 0,75 %iger HPC-Lösung auf 30 ml aufgefüllt. Grobe Kotpartikel wurden nach gründlichem Vortexen der Probe und einer nachfolgenden kurzen Sedimentation von bis zu 3 min abgetrennt, indem 20 bis 25 ml Überstand, je nach Kotbeschaffenheit, in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Die restlichen 5-10 ml mit den groben Kotbestandteilen wurden verworfen. Als nächster Schritt wurde das dicht verschlossene Röhrchen in einem Schüttelinkubator in waagerechter Stellung für 30 min bei Raumtemperatur mit 100 Upm geschüttelt und danach in senkrechter Stellung bei Raumtemperatur über Nacht unter Lichtausschluss gelagert. Am zweiten Tag der Aufbereitung wurden die sedimentierten Proben bei Raumtemperatur für 30 min bei 900xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der komplette Überstand abpipettiert und verworfen. Das Sediment wurde in entsprechender Menge mittels abgeschnittenen Eppendorf-Pipettenspitzen auf die gewünschten Nährmedien aufgebracht und mit einer Glaspipette (1 ml) gleichmäßig verteilt. Bei der Beimpfung der Schrägnährmedien (HEYM und ENCLIT) wurden 150-200 µl Kotsediment verwendet. Dem **Fließdiagramm 1** „Schematische Darstellung der Dekontamination von Rinderkot“ (vgl. Ziffer 8.1.1 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte zu entnehmen.

3.2.6 Nährmedien für den mikrobiellen Nachweis und die Anzucht von MAP

3.2.6.1 Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Mycobactin J, Artikelnr. 222232, Fa. Becton Dickinson (BD®)

Zusammensetzung pro Liter Wasser:

- 15,3 g Agar
- 9,0 g Casein (pankreatisch verdaut)
- 4,5 g NaCl
- 4,1 g Natriumpyruvat
- 2,7 g Fleischextrakt
- 0,1 g Malachitgrün
- 0,05 g Amphotericin B
- 0,05 g Nalidixinsäure
- 0,05 g Vancomycin
- 0,002 g Mycobactin J
- 100,0 ml Eigelb
- 27,0 ml Glycerol
- 873,0 ml destilliertes Wasser

Das Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit den Zusätzen Mycobactin J, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin wurde von der Firma Becton Dickinson (BD®) bezogen. Der Zusatz Mycobactin J ist für das Wachstum von MAP unerlässlich. Die antibiotischen (Nalidixinsäure und Vancomycin) bzw. antimykotischen (Amphotericin B) Zusätze ermöglichen aufgrund einer gezielten Unterdrückung der Begleitflora im Rinderkot die erforderliche Stabilität des Nährmediums während der langen Kultivierung von MAP. Die Nährmedien wurden bei +6 °C senkrecht und lichtgeschützt gelagert und innerhalb des vorgeschriebenen Verbrauchsdatums verwendet. Die beimpften Medien wurden zunächst sieben Tage lang bei locker aufgesetztem Deckel in Schräglage und anschließend für den Rest der Bebrütungsdauer in senkrechter Lage bei vollständig verschlossenem Deckel bei +37 °C bebrütet.

3.2.6.2 ENCLIT-Schrägnährmedium, Fa. Artelt-ENCLIT

Zusammensetzung pro Liter Wasser:

- | | |
|--------------------|--------|
| • Salzlösung | 330 ml |
| • Eimasse (Vollei) | 670 ml |
| • Malachitgrün | 0,19 g |
| • Mycobactin J | 2 mg |

- Salzlösung pro Liter Wasser:
 - Kaliumdihydrogenphosphat 4,0 g
 - Magnesiumsulfat-7-hydrat 0,4 g
 - Magnesiumcitrat 1,0 g
 - Asparagin 6,0 g
 - Glycerol 20,0 ml
 - Kartoffelmehl 43,3 g

Der ENCLIT-Schrägagar ist ein sehr preiswertes Nährmedium auf Eibasis zur Anzucht von Mykobakterien, das von der Firma Artelt-ENCLIT als Fertignährmedium bezogen wurde. Die Medien wurden bei +6 °C lichtgeschützt und in senkrechter Stellung gelagert und innerhalb des angegebenen Verbrauchsdatums verwendet. Die beimpften Medien wurden sieben Tage lang bei locker aufgesetztem Deckel in Schräglage und anschließend für den Rest der Bebrütung in senkrechter Lage bei vollständig verschlossenem Deckel und jeweils + 37 °C bebrütet.

3.2.6.3 Middlebrook 7H10-Festnährmedium

Zusammensetzung pro Liter Wasser:

BD Difco™ Middlebrook 7H10-Agar, Artikelnr. 262710, Fa. Beckton Dickinson (BD®)

- Ammoniumsulfat 0,5 g
- Monokaliumphosphat 1,5 g
- Dinatriumphosphat 1,5 g
- Natriumcitrat 0,4 g
- Magnesiumsulfat 0,025 g
- Calciumchlorid 0,0005 g
- Zinksulfat 0,001 g
- Kupfersulfat 0,001 g
- L-Glutaminsäure, Natriumsalz 0,5 g
- Eisen(III)-Ammonium-Citrat 0,04 g
- Pyridoxin-HCL 0,001 g
- Biotin 0,0005 g
- Malachitgrün 0,00025 g
- Agar 15 g

Weiterhin supplementiert wurden:

- BBL MGIT OADC-Supplement, 100 ml
Artikellnr. 245116, Fa. Becton Dickinson (BD®)
Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser:
 - Rinderalbumin 50,0 g
 - Dextrose 20,0 g
 - Katalase 0,03 g
 - Ölsäure 0,6 g
- BBL MGIT PANTA-Supplement, 21 ml
Artikelnr. 245114, Fa. Becton Dickinson (BD®)
Zusammensetzung pro Fläschchen lyophilisiertem PANTA:
 - Polymyxin B 6.000 Einheiten
 - Amphotericin B 600 µg
 - Nalidixinsäure 2.400 µg
 - Trimethoprim 600 µg
 - Azlozillin 600 µg
- Mycobactin J-Supplement, 2 mg
Fa. Symbiotics®
- Glycerin zur Analyse, 5 ml
Artikelnr. 1.04094, Fa. Merck

Die Herstellung des Agarbodens erfolgte in der institutseigenen Nährbodenküche. Im Vorfeld wurde jedes benötigte Fläschchen des Supplements BBL MGIT PANTA (lyophilisiert) in 3 ml destilliertem Wasser rekonstituiert. Das Supplement wurde in lyophilisierter Form bei +6 °C gelagert. Nach erfolgter Rekonstitution wurde das PANTA-Supplement bei Kühlung (+2 bis +8 °C) innerhalb von 72 h oder bei einer Lagerung bei -20 °C innerhalb von 6 Monaten verbraucht. Die oben angeführten antimykotischen und antibiotischen Zusätze des PANTA-Supplements gewährleisteten bei der Anzucht von MAP aus Rinderkot eine langfristige Stabilität des Nährbodens gegenüber einer unerwünschten Begleitkeimflora. Ebenso wurde Mycobactin J (lyophilisiert) in 2 ml absolutem Ethanol gelöst und sorgfältig bis zur völligen Auflösung geschüttelt. Resubstituiertes Mycobactin J wurde bei +6 °C lichtgeschützt gelagert. Das BBL MGIT OADC-Supplement wurde wie vorgeschrieben bei +6 °C im Dunkeln gelagert.

Herstellung:

Die Herstellung des Middlebrook 7H10-Agars erfolgte im Agarklav. Dazu wurden 19 g Middlebrook 7H10-Agar in die Küvette eingewogen, 900 ml destilliertes Wasser und 5 ml Glycerin zugegeben.

Anschließend wurde die Lösung unter ständigem Rühren für 10 min auf +121 °C erhitzt. Nach der Abkühlung der Nährlösung auf eine Temperatur von +50 °C erfolgte unter aseptischen Bedingungen die Zugabe von 100 ml BBL MGIT OADC-, 21 ml BBL MGIT PANTA-Supplement (n = 7 Flaschen) und 2 ml Mycobactin J. Nach einer gründlichen Durchmischung der flüssigen supplementierten Nährlösung wurden je 20 ml mit dem Tachomat 125 Gießautomat in Petrischalen ohne Nocken abgefüllt. Die Nährmedien wurden bei +6 °C dunkel gelagert und innerhalb des vorgesehenen Verbrauchsdatums von vier Wochen verwendet.

3.2.6.4 Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium

Zusammensetzung pro Liter Wasser:

BD Difco™ Middlebrook 7H9-Bouillon, Artikelnr. 271310, Fa. Becton Dickinson (BD®):

- Ammoniumsulfat 0,5 g
- L-Glutaminsäure 0,5 g
- Natriumcitrat 0,1 g
- Pyridoxin 0,001 g
- Biotin 0,0005 g
- Dinatriumphosphat 2,5 g
- Monokaliumphosphat 1,0 g
- Eisen(II)-Ammonium-Citrat 0,04 g
- Magnesiumsulfat 0,05 g
- Calciumchlorid 0,0005 g
- Zinksulfat 0,001 g
- Kupfersulfat 0,001 g
- Pyridoxin 1,0 mg
- Zinksulfat 1,0 mg
- Kupfersulfat 1,0 mg

Weiterhin supplementiert wurden:

- BBL MGIT OADC-Supplement, 100 ml
Artikelnr. 245116, Fa. Becton Dickinson (BD®)
Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser:
 - Rinderalbumin 50,0 g
 - Dextrose 20,0 g
 - Katalase 0,03 g
 - Ölsäure 0,6 g

- Mycobactin J-Supplement, 2 mg
Fa. Symbiotics®
- Tween 80, 40 ml
Artikelnr. 8.17061, Fa. Merck
- Glycerin zur Analyse, 25 ml
Artikelnr. 1.04094, Fa. Merck

Die Herstellung der Bouillon erfolgte ebenfalls in der institutseigenen Nährbodenküche. Das Supplement Mycobactin J wurde, wie bereits in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben, rekonstituiert.

Herstellung:

Die oben beschriebene Rezeptur wurde auf eine Gesamtmenge von 450 ml Bouillon umgerechnet, da nur kleine Mengen des Flüssigmediums gleichzeitig benötigt wurden. 2,35 g Middlebrook 7H9-Bouillon, 1,8 g Tween-80, 12,5 ml Glycerin und 450 ml destilliertes Wasser wurden in eine Küvette eingewogen und bis zur vollständigen Lösung mit dem Magnetrührer vermischt. Nach Zugabe von 1 ml Mycobactin J (1 mg) wurden je 9 ml der Bouillon in Glasbehälter mit Schraubverschluss abgefüllt und für 10 min bei +121 °C autoklaviert. Nach einer angemessenen Abkühlung wurden den Flüssigmedien jeweils 1 ml BBL MGIT OADC-Supplement und 10 Keramikkügelchen zugesetzt. Die Bouillon wurde bei +6 °C dunkel gelagert und innerhalb des vorgesehenen Verbrauchsdatums von vier Wochen verwendet.

3.2.6.5 MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube)-Flüssignährmedium, Artikelnr. 245113, Fa. Becton Dickinson (BD®)

Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser:

- modifizierte
Middlebrook 7H9-Bouillonbasis 5,9 g
- Casein-Peptone 1,25 g

Weiterhin supplementiert wurden:

- BBL MGIT OADC-Supplement, 0,5 ml
Artikelnr. 245116, Fa. Becton Dickinson (BD®)

Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser:

- Rinderalbumin 50,0 g
- Dextrose 20,0 g
- Katalase 0,03 g
- Ölsäure 0,6 g

- BBL MGIT PANTA-Supplement, 0,1 ml
 Artikelnr. 245114, Fa. Becton Dickinson (BD®)
 Zusammensetzung pro Fläschchen lyophilisiertes PANTA:
 - Polymyxin B 6.000 Einheiten
 - Amphotericin B 600 µg
 - Nalidixinsäure 2.400 µg
 - Trimethoprim 600 µg
 - Azlozillin 600 µg
- Mycobactin J-Supplement, 9,42 µl
 Fa. Symbiotics®

Ein MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) enthält 110 µl Fluoreszenzindikator (Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Rutheniumchlorid-Pentahydrat) und 4 ml modifizierte Middlebrook 7H9-Bouillon. Die Röhrchen wurden vor der Beimpfung mit 0,5 ml BBL MGIT OADC, 0,1 ml BBL MGIT PANTA und 9,42 µl Mycobactin J supplementiert und gründlich durchmischt. Die Supplemente BBL MGIT PANTA und Mycobactin J wurden, wie bereits in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben, vor der Verwendung rekonstituiert und gelagert.

3.2.7 Kulturelle Anzuchtung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

3.2.7.1 Kulturelle Anzuchtung von MAP aus Rinderkot auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

In eigenen Voruntersuchungen sowie in Anlehnung an die AVID-Methode (AVID VII/1996) hat sich das Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Mycobactin J-Zusatz im Vergleich zu dem ENCLIT-Schrägnährmedium sowie dem Middlebrook 7H10-Festnährmedium aufgrund der lang andauernden Stabilität der Medien, der guten Produktivität und der zeitsparenderen Handhabung als geeignet für die kulturelle Anzuchtung von MAP aus Rinderkot erwiesen. Deshalb wurde das Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium im Rahmen dieser Arbeit für die kulturelle Anzuchtung von MAP aus nativen Rinderkotproben verwendet. Die Kotproben wurden jeweils im Doppelansatz angelegt. Die jeweils mit 150-200 µl dekontaminiertem Kotsediment beimpften Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedien wurden zunächst sieben Tage lang bei locker aufgesetztem Deckel in Schräglage und anschließend für den Rest der Bebrütungsdauer in senkrechter Lage bei vollständig verschlossenem Deckel bei +37 °C bebrütet. Die Kulturröhrchen wurden wöchentlich auf das Wachstum von MAP und eventuelle Kontaminationen untersucht. Eine abschließende Auswertung erfolgte 16 Wochen nach Untersuchungsbeginn. Als verdächtige Kolonien galten runde, gewölbte, < 0,5 mm große Kolonien mit glatter Oberfläche, die sich zunächst trüb oder durchscheinend darstellen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung erwiesen sich die Kolonien als zunehmend weiß, wachsartig und abgeflacht, teilweise

mit zentralem Knöpfchen („mamillenförmig“) und konnten eine Größe von bis zu 3 mm erreichen. Bei der kulturellen Anzucht von MAP aus Rinderkotproben wurden die positiven Kulturergebnisse je nach Anzahl der gewachsenen MAP-Kolonien in einfach (+), zweifach (++) oder dreifach (+++) positiv unterteilt, um gering-, mittel-, und hochgradig MAP-ausscheidende Rinder voneinander abgrenzen zu können. Dabei wurde folgende Einteilung der Koloniezahlen zugrunde gelegt (Whitlock et al., 2000; Crossley et al., 2005):

positiv (+): < 10 MAP-Kolonien

positiv (++) : 10-50 MAP-Kolonien

positiv (+++) : > 50 MAP-Kolonien

Die Identifizierung verdächtiger Kolonien erfolgte molekularbiologisch mittels TaqMan[®] Real-Time PCR. Das Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium wurde zusätzlich zur Subkultivierung von aus Rinderkot gewonnenen MAP-Isolaten verwendet. Abbildung 8 zeigt das Medium mit 1-2 Millimeter großen, weiß-erhabenen Kolonien von MAP.

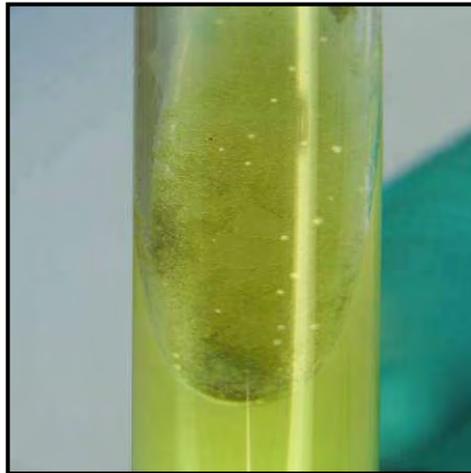


Abbildung 8: Kulturelle Anzucht von MAP aus Rinderkot auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen)

3.2.7.2 Kulturelle Anzucht von MAP aus Rinderkot auf ENCLIT-Schrägnährmedium

Das ENCLIT-Schrägnährmedium wurde als preiswerte Alternative zum Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium für die selektive Isolierung und Differenzierung von MAP aus Rinderkot in Voruntersuchungen eingesetzt und mit diesem verglichen.

In den eigenen Voruntersuchungen zeigten mit dekontaminiertem Rinderkot beimpfte Medien allerdings ausnahmslos nach einer Bebrütungsdauer von zwei bis vier Tagen eine erhebliche Schimmelpilzbelastung bzw. bakterielle Kontamination und erlaubten keine längerfristige Kultivierung von Rinderkotproben. Der ENCLIT-Schrägagar enthält als antimykotisches Supplement Malachitgrün, das offensichtlich nur eine ungenügende Unterdrückung der im Rinderkot enthaltenen

Begleitkeimflora bewirkte. Deshalb wurde das ENCLIT-Schrägnährmedium für weitere Kultivierungen von MAP aus Rinderkotproben ausgeschlossen.

3.2.7.3 Kulturelle Anzucht von MAP aus Rinderkot auf Middlebrook 7H10-Festnährmedium

Das Middlebrook 7H10-Festnährmedium wurde zur Isolierung und Kultivierung von MAP verwendet. Das Nährmedium wurde in Vorversuchen parallel zu den beiden Schrägnährmedien ENCLIT und HEYM für die kulturelle Anzucht des Erregers aus Rinderkot getestet. Ursprünglich sollte dieser Festnährboden eine Quantifizierung vom MAP aus Rinderkot ermöglichen. Eine Zählung der gewachsenen Kolonien war jedoch nicht möglich, da zum einen die sehr kleinen, durchscheinend bis weiß gefärbten Kolonien auf dem hellen Hintergrund des Nährmediums nur schwer zu erkennen waren und zum anderen ein Großteil der Kolonien von dem überimpften Kotsediment überdeckt wurden. Weiterhin ist die komplexe Handhabung des Nährmediums für die langfristige Kultivierung von MAP zu erwähnen, da ein regelmäßiger Verschluss der Petrischalen mit Parafilm (alle zwei bis vier Tage) erforderlich war, um die Medien vor dem Austrocknen zu bewahren. Aufgrund der komplexen Handhabung, der mäßigen Produktivität sowie der erschwerten Auswertung der Medien wurde auf das Middlebrook 7H10-Festnährmedium für die kulturelle Anzucht von MAP aus Rinderkot verzichtet.

Das Medium wurde allerdings zur Quantifizierung und Überprüfung der eingemischten Erregerkonzentrationen der jeweiligen Verdünnungsstufen bei den Einmischversuchen 1 bis 6 eingesetzt. Dafür wurden 100 µl der erregerhaltigen Verdünnungslösung der jeweiligen Verdünnungsstufe vor der artifiziellen Kontamination der Rinderkotproben im Doppelansatz auf dem Middlebrook 7H10-Festnährmedium ausgespatelt. Die Nährböden wurden bei +37 °C bebrütet und wöchentlich auf Wachstum des Erregers und mögliche Kontaminationen überprüft.

3.2.7.4 Kulturelle Anzucht von MAP in Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium

Das Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium mit Tween 80-Lösung und Mycobactin J wurde zur Subkultivierung der MAP-Stämme MAP 423 und J 27 (DSMZ-Nr. 44135) eingesetzt, die für die artifizielle Kontamination der Rinderkotproben in den Einmischversuchen 4 bis 6 verwendet wurden. Um die für MAP typische Klumpenbildung im Medium zu vermeiden, wurden 10 sterile Keramikkügelchen (SiLibeads®) pro Medium zugegeben, das Anreicherungsmedium im Schüttelinkubator (100 Upm) kontinuierlich geschüttelt und bei +37 °C bebrütet (Hughes et al., 2001). So konnte eine möglichst gleichmäßige Verteilung der eingemischten Erregerkonzentrationen in den Rinderkotproben gewährleistet werden.

3.2.7.5 Kulturelle Anzucht von MAP in MGIT-Flüssignährmedium

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit wurde das MGIT-Indikator-Röhrchen zur Subkultivierung von aus Rinderkotproben gewonnenen MAP-Isolaten sowie zur kulturellen Anzucht des MAP-Stammes MAP 423 eingesetzt, der für die artifizielle Kontamination der Rinderkotproben in den Einmischversuchen 1 bis 3 verwendet wurde. Die Bebrütung erfolgte bei +37 °C in senkrechter Stellung bei vollständig verschlossenem Deckel. Die inokulierten Röhrchen wurden ab dem zweiten Bebrütungstag täglich unter einer Langwellen-UV-Lampe bei 366 nm auf Fluoreszenzsignale überprüft. Ein positives Fluoreszenzsignal wird durch den Sauerstoffverbrauch wachsender Erregerzellen ausgelöst und ist ab Erregerkonzentrationen von ca. 10^4 bis ca. 10^7 KBE/ml Flüssigmedium zu erwarten. Weitere Hinweise auf das Wachstum von MAP sind weiße, grob-körnige Ablagerungen auf dem Boden des Kulturröhrchens ohne einheitliche Trübung des Flüssigmediums. Allerdings konnte auch das Wachstum unerwünschter Begleitkeime wie beispielsweise von Schimmelpilzen, Fluoreszenzsignale auslösen. Homogene Trübungen des Flüssigmediums wiesen auf eine Kontamination hin. Abbildung 9 zeigt MGIT-Flüssignährmedien mit positiver (rechts) und negativer (links) Fluoreszenz.



Abbildung 9: MGIT-Flüssignährmedium mit positiver Fluoreszenz nach Wachstum von MAP (rechts); Negativkontrolle (links) (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität)

3.2.8 Archivierung von MAP-Isolaten aus Rinderkotproben

Die MAP-Isolate, die aus den untersuchten Rinderkotproben isoliert werden konnten, wurden nach Subkultivierung als Reinkultur und molekularbiologischer Bestätigung als Lyophilisate sowie als Gefrierkulturen archiviert.

3.2.8.1 Lyophilisierung

Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- Magermilchpulver (Skim Milkpowder, 500 g), Artikelnr. LP0031, Fa. Oxoid
- D-(+)-Glukose (1 kg), Artikelnr. 1.08337.1000, Fa. Merck
- Injektionsflaschen (45 x 22 mm, 10 ml, 100 Stück), Artikelnr. G 50452200B0U7, Fa. MAGV
- Gummiverschlüsse für Gefriertrocknung (20 mm, 100 Stück), Artikelnr. KGF####20A#, Fa. MAGV
- Alu-Bördelkappen (20 mm, 100 Stück), Artikelnr.: KA#A####20#L, Fa. MAGV
- Herstellung der Magermilch-Glukose-Lösung:

125 g Magermilchpulver

7,5 g Glukose

ad 1.000 ml Aqua dest.

Für die Lyophilisierung wurde 1,5 ml sterile Magermilch-Glukose-Lösung in sterile Injektionsflaschen pipettiert und Koloniematerial des jeweiligen MAP-Isolates eingerieben. Das verwendete Koloniematerial der Erreger-Isolate wurde aus subkultivierten Reinkulturen auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium gewonnen.

Nach dem Vorfrieren der erregerhaltigen Injektionsflaschen bei -20 °C für 24 h wurden diese in eine Gefriertrocknungsanlage eingesetzt und dem Inhalt innerhalb von 18-24 h die Flüssigkeit im Vakuum entzogen. Abschließend wurden die Flaschen mit Bördelkappen versehen und lichtgeschützt bei +4 °C gelagert. Die Vermehrungsfähigkeit der Isolate wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Dafür wurden die Lyophilisate mit 1,5 ml sterilem Aqua dest. resuspendiert und auf entsprechende Nährmedien überimpft.

3.2.8.2 Gefrierkulturen

Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- Reaktionsgefäße: Cryovials[®], Artikelnr. 479-4503, Fa. VWR

Für die Gefrierkulturen wurde Koloniematerial der kultivierten MAP-Isolate aus dem MGIT-Flüssigmedium verwendet. Dafür wurden die Medien zunächst sorgfältig durchmischt und die gesamte Flüssigkeit in Reagenzgefäße (Fa. Eppendorf) überführt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 3.000xg wurde der gesamte Überstand mit einer Pasteurpipette abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde danach in 0,5 ml MGIT-Flüssignährmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Cryovials[®]-Reaktionsgefäße mit 0,5 ml Glycerin (87 %ig) befüllt und die Bakteriensuspension hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mischen der Probe wurde diese in einen Cryokasten eingesetzt und bei Gefriertemperaturen von -80 °C gelagert.

3.2.9 Extraktion genomischer DNA aus Mykobakterienkulturen

Chemikalien und Reagenzien:

- DNeasy Blood & Tissue-Kit[®] (50 Reaktionen), Artikelnr. 69504, Fa. Qiagen
- Ethanol Absolut (96-100 %), Rotisolv[®] HPLC Gradient Grade, Fa. Roth
- Lysispuffer, eigene Herstellung gemäß Qiagen-Protokoll:
 - 20mM Tris-Cl (Pufferan[®] $\geq 99,9$ %), Fa. Roth
 - 2 mM EDTA III (Triplex[®] III), Fa. Merck
 - 1,2 % Triton X-100, Fa. Roth

Die DNA-Extraktion aus MAP-Isolaten, die bei der kulturellen Anzucht des Erregers aus Rinderkot auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium gewachsen waren, erfolgte mit zwei unterschiedlichen Extraktionsverfahren. Das **erste Verfahren** zur DNA-Isolierung aus Mykobakterien-Kulturen wurde eingesetzt, wenn eine große Menge an Koloniematerial auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium zur Verfügung stand. Dabei wurden fünf bis zehn Kolonien oder bei Rasenwachstum zwei Impfösen voller Koloniematerial in 200 µl destilliertes Wasser in ein Eppendorf-Gefäß (2 ml) eingerieben und 1 min gevortext. Anschließend folgte ein Erhitzungsschritt bei +100 °C für 20 min zur Lyse der Erreger. Die abgekühlten Proben wurden dann bei 5.000xg für 1 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt. Das Pellet wurde verworfen. In dem Überstand befand sich die gewünschte DNA, die zur molekularbiologischen Bestätigung der subkultivierten MAP-Isolate verwendet werden konnte.

Das **zweite Verfahren** wurde eingesetzt, wenn eine geringe Menge an Koloniematerial auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium zur Verfügung stand. Die DNA-Isolierung erfolgte dabei nach dem Protokoll des DNeasy Blood & Tissue-Kits[®] der Firma Qiagen. Dabei wurden mit einer sterilen Öse zwei bis drei Kolonien von dem Schrägnährmedium aufgenommen und in 180 µl Lysispuffer eingerieben. Anschließend wurden die Proben für mindestens 90 min bei +37 °C in einem Thermomixer schüttelnd inkubiert und danach mit 25 µl Proteinase K sowie 200 µl AL-Puffer versetzt. Nach einer sorgfältigen Durchmischung folgte eine Inkubation für weitere 90 min bei +56 °C und ein Kochschritt bei +100 °C für 15 min. Als nächster Schritt wurden 200 µl Ethanol absolut (96-100 %) zugegeben und nach erneutem Durchmischen der Probe die gesamte Flüssigkeit des Eppendorf-Gefäßes in die QIAamp Spin-Säule (in einem Sammelgefäß) überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 6.000xg, um die Säule zu leeren; der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Für die folgenden zwei Waschschriffe kamen jeweils 500 µl AW1- und AW2-Puffer zum Einsatz, die nacheinander auf die Säule gegeben wurden. Nach Zugabe des AW1-Puffers wurden die Proben für 1 min bei 6.000xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Das Verfahren wiederholte sich für den AW2-Puffer, mit dem Unterschied, dass die Zentrifugation der Proben nach der Zugabe des AW2-Puffers für 3 min

bei 15.800xg (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5415C) erfolgte und nach dem Verwerfen des Durchflusses und dem Überführen der Säule in ein neues Sammelgefäß noch ein zweiter Zentrifugationsschritt für 1 min bei derselben Umdrehungszahl durchgeführt wurde. Der letzte Zentrifugationsschritt bezweckte die Trocknung des Filters innerhalb der Säule. Für die nun folgende Elution wurden die Säulen in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) gesetzt und 200 µl AE-Puffer zugegeben. Nach einer abschließenden einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem Zentrifugationsschritt bei 6.000xg wurde das aufgefangene Eluat mit der gewünschten DNA in dem beschrifteten Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) bei +6°C im Kühlschrank gelagert. In **Fließdiagramm 2** „Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Mykobakterienkulturen“ (vgl. Ziffer 8.1.2 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte dargestellt.

3.2.10 Extraktion genomischer DNA aus Rinderkotproben

Insgesamt wurden in dieser Arbeit vier unterschiedliche DNA-Extraktionsverfahren zur Isolation von MAP-DNA aus artifiziell und nativ kontaminierten Rinderkotproben vergleichend eingesetzt. Zu Beginn der Untersuchungen wurde ein standardisiertes Kit-System der Firma Qiagen zur DNA-Isolierung aus Rinderkotproben verwendet (Q). Dieses erzielte in Kombination mit dem institutseigenen TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren bei den Einmischversuchen 1, 2 und 3 keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Deshalb wurden in Absprache mit der Firma Qiagen Modifikationen des ursprünglichen Protokolls vorgenommen. Das Standard-Extraktionsverfahren (Q) sowie das modifizierte Extraktionsverfahren der Firma Qiagen (Qm) und zwei weitere Extraktionsverfahren der Firma Roche (R und Rm) wurden bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 vergleichend für den molekularbiologischen Nachweis von MAP in artifiziell kontaminierten Rinderkotproben eingesetzt. Mit allen vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren wurden zusätzlich auch native Rinderkotproben untersucht.

3.2.10.1 DNA-Extraktionsverfahren I (Q)

Reagenzien und Chemikalien:

- QIAamp DNA Stool Mini Kit[®] (50 Reaktionen), Artikelnr. 51504, Fa. Qiagen
- Ethanol Absolut (96-100 %), Rotisolv[®] HPLC Gradient Grade, Fa. Roth

Das erste chemisch-thermische Extraktionsverfahren basierte auf dem Protokoll des QIAamp DNA Stool Mini Kits[®] der Firma Qiagen. Dafür wurden jeweils 180 bis 220 mg des gut durchmischten Rinderkots im Doppel- bzw. Dreifachansatz in jeweils ein Eppendorf-Gefäß (2 ml) eingewogen und 1,4 ml ASL-Puffer zugegeben. Im Anschluss wurden die Proben durch kontinuierliches Vortexen für 1 min homogenisiert. Nach einem Erhitzungsschritt bei +95 °C für 5 min wurden die Proben nochmals für 15 s homogenisiert und bei 15.800xg (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5415C) für 1 min zentrifugiert.

1,2 ml des Überstandes wurden abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß (2 ml) überführt, während das Pellet verworfen wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der InhibitEX-Tablette zur Bindung von PCR-Inhibitoren. Danach wurden die Proben gründlich gevortext und nach einer einminütigen Inkubationszeit bei 15.800xg für 3 min zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde abpipettiert und in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt, das Pellet wurde verworfen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 15.800xg für 3 min wurden 200 µl des Überstandes in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) gegeben, das 15 µl Proteinase K enthielt. Zusätzlich wurden 200 µl AL-Puffer zugesetzt und die Probe anschließend gründlich gevortext. Nach einer Inkubation bei +70 °C für 10 min wurden die Proben mit 200 µl absolutem Ethanol (96-100 %) versetzt, durch Vortexen gründlich durchmischt und abschließend die gesamte Flüssigkeit auf die QIAamp Spin-Säule überführt. Nach dem Zentrifugieren der Proben für 1 min bei 15.800xg wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl des AW1- und AW2-Puffers. Nach Zugabe des AW1-Puffers wurden die Proben für 1 min bei 15.800xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Ebenso wurde mit dem AW2-Puffer verfahren, außer dass die Zentrifugation der Proben nach der Zugabe des AW2-Puffers für 3 min bei 15.800xg erfolgte. Nach dem Verwerfen des Durchflusses und Überführen der Säule in ein neues Sammelgefäß wurden die Proben noch ein zweites Mal für 1 min mit derselben Umdrehungszahl zentrifugiert. Für die nachfolgende Elution wurden die Säulen in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) gesetzt und 10 µl AE-Puffer zugegeben. Nach einer abschließenden einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem Zentrifugationsschritt bei 15.800xg für 1 min wurde das aufgefangene Eluat mit der isolierten DNA in dem beschrifteten Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) bei +6 °C im Kühlschrank gelagert. Dem **Fließdiagramm 3** „Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels Standard-DNA-Extraktionsverfahren (Q)“ (vgl. Ziffer 8.1.3 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte zu entnehmen.

3.2.10.2 DNA-Extraktionsverfahren II (Qm)

Reagenzien und Chemikalien:

- QIAamp DNA Stool Mini Kit[®] (50 Reaktionen), Artikelnr. 51504, Fa. Qiagen
- Ethanol Absolut (96-100%), Rotisol[®] HPLC Gradient Grade, Fa. Roth
- DX-Puffer, Fa. Qiagen

Das zweite eingesetzte DNA-Extraktionsverfahren basierte ebenfalls auf dem Protokoll des QIAamp DNA Stool Mini Kits[®] der Firma Qiagen und enthielt zusätzlich Modifikationen wie eine größere Koteinwaage, zwei verlängerte Erhitzungsschritte und eine weitere mechanische Erschließung der Proben mittels Ribolyser.

Je Rinderkotprobe wurde 1 g Kot im Doppel- bzw. Dreifachansatz in jeweils ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) eingewogen und 5 ml ASL-DX-Puffer zugegeben. Der DX-Zusatz im ASL-

Puffer sollte eine vermehrte Schaumbildung während des Schüttelvorganges im Ribolyser verhindern. Nach einem Erhitzungsschritt bei +95 °C für 10 min im Wasserbad wurden 1,4 ml der überstehenden Flüssigkeit des inzwischen sedimentierten Kotes in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) der Firma Biozym, dem zuvor sterile Keramikkügelchen (SiLibeads® der Fa. Sigmund Lindner) zugegeben worden waren, überführt. Als nächster Schritt folgte der mechanische Aufschluss der Proben im Ribolyser (4 x Speed 6 für je 20 s). Nach gründlichem Vortexen der Proben wurde die gesamte Flüssigkeit in ein Eppendorf-Gefäß (2 ml) überführt und anschließend bei 5.000xg für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der komplette Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß (2 ml) gegeben und eine InhibitEx-Tablette aus dem QIamp DNA Stool Mini Kit® zugegeben. Die Tablette wurde durch kräftiges manuelles Schütteln in Lösung gebracht und nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur gründlich gevortext. Im Anschluss wurden die Gefäße bei 20.000xg (Heraeus-Zentrifuge, Typ Multifuge 1S-R) für 3 min zentrifugiert und hierauf der gesamte Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation des Überstandes bei 20.000xg für 3 min wurden 300 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) gegeben, das bereits 20 µl Proteinase K enthielt. Nach Zugabe von 30 µl AL-Puffer wurden die Proben gründlich durchmischt. Danach erfolgte eine Inkubation der Proben für 5-10 min bei +70 °C und ein zweiter Erhitzungsschritt bei +95 °C für 10 min im Wasserbad. Im Anschluss wurde den Proben jeweils 300 µl abs. Ethanol zugesetzt und diese gründlich gevortext. Alle weiteren Schritte erfolgten gemäß den Anweisungen des Standard-Protokolls der Firma Qiagen entsprechend der ersten DNA-Extraktionsmethode Q in Kapitel 3.2.8.1. Allerdings muss bei dem modifizierten Protokoll die Flüssigkeit in zwei Schritten hintereinander über die Säule gegeben werden, da diese nur ein Fassungsvermögen von 500 µl hat. In **Fließdiagramm 4** „Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels modifiziertem DNA-Extraktionsverfahren (Qm)“ (vgl. Ziffer 8.1.4 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte dargestellt.

3.2.10.3 DNA-Extraktionsverfahren III (R)

Reagenzien und Chemikalien:

- High Pure PCR Template Preparation Kit® (100 Reaktionen), Artikelnr. 11796828001, Fa. Roche Applied Science
 - Isopropanol, Fa. Roth
 - S.T.A.R.-Puffer, Fa. Roche Applied Science
- Ansatz der LysozymbLösung: 10 mg/ ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM Tris Puffer (pH = 8); eigene Herstellung

Das dritte DNA-Extraktionsverfahren basierte auf dem Protokoll des High Pure PCR Template Preparation Kits® der Firma Roche Applied Science. Dafür wurden jeweils 1,5 g Rinderkot im Doppelansatz bzw. Dreifachansatz in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) eingewogen und je

5 ml S.T.A.R.-Puffer zugegeben. Im Anschluss wurden die Proben durch kontinuierliches Vortexen für 15 s homogenisiert. Nach einer Zentrifugation der Proben bei 1.000xg für 1 min wurde 1 ml des Überstandes in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt und für 10 min bei +95 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend bei 5.000xg für 5 min zentrifugiert und 200 µl des Überstandes mit 5 µl Lysozym-Lösung versetzt. Nach gründlichem Durchmischen der Proben folgte eine Schüttelinkubation für 15 min bei +37 °C. Unter Zugabe von 200 µl Binding-Puffer und 40 µl Proteinase K-Lösung wurden die Proben erneut gut durchmischt und für 10 min bei +70 °C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde den Proben 100 µl Isopropanol zugegeben, durchmischt und die gesamte Flüssigkeit auf die Säule überführt. Nach einer Zentrifugation bei 8.000xg für 1 min wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 500 µl Removal-Puffer wurden die Probe nochmals für eine Minute bei 8.000xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl Waschpuffer. Nach Zugabe des Waschpuffers wurden die Proben für eine Minute bei 8.000xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Ebenso wurde in dem zweiten Waschschrte verfahren. Im Anschluss wurden die Proben zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers für 10 s bei 15.800xg (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5415C) zentrifugiert. Für die Elution wurden die Säulen in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) gesetzt und 100 µl des zuvor auf +70 °C erwärmten Elutionspuffers zugegeben. Nach einer abschließenden einminütigen Zentrifugation bei 8.000xg wurde das aufgefangene Eluat mit der isolierten DNA in dem beschrifteten Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) bei +6 °C im Kühlschrank gelagert. Dem **Fließdiagramm 5** „Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels Standard sowie modifiziertem DNA-Extraktionsverfahren (R und Rm)“ (vgl. Ziffer 8.1.5 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte zu entnehmen.

3.2.10.4 DNA-Extraktionsverfahren IV (Rm)

Reagenzien und Chemikalien:

- High Pure PCR Template Preparation Kit[®] (100 Reaktionen), Artikelnr. 11796828001, Fa. Roche Applied Science
- Isopropanol, Fa. Roth
- S.T.A.R.-Puffer, Fa. Roche Applied Science
Ansatz der Lysozymlösung: 10 mg/ ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM Tris Puffer (pH = 8) (eigene Herstellung)

Das vierte DNA-Extraktionsverfahren basierte ebenfalls auf dem Protokoll des High Pure PCR Template Preparation Kits[®] der Firma Roche Applied Science. Dafür wurden jeweils 1,5 g Rinderkot im Doppelansatz bzw. Dreifachansatz in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) eingewogen und je 5 ml S.T.A.R.-Puffer zugegeben. Im Anschluss wurden die Proben durch kontinuierliches Vortexen für 15 s homogenisiert und bei 1.000xg für 1 min zentrifugiert.

Bei dem vierten modifizierten DNA-Extraktionsverfahren, basierend auf dem Kit-System der Firma Roche, wurde 1 ml Überstand in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) der Firma Biozym, das Keramikbeads (SiLibeads® der Fa. Sigmund Lindner) enthielt, überführt und im Ribolyser (2 x Speed 6 für je 20 s) mechanisch aufgeschlossen. Danach folgte ein Erhitzungsschritt bei +95 ° C für 10 min. Das weitere Vorgehen des vierten modifizierten DNA-Extraktionsverfahrens Rm entspricht exakt dem dritten DNA-Extraktionsverfahren R basierend auf dem High Pure PCR Template Preparation Kit® (S. Kapitel 3.2.8.3. Dem **Fließdiagramm 5** „Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels Standard sowie modifiziertem DNA-Extraktionsverfahren (R und Rm)“ (vgl. Ziffer 8.1.5 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte zu entnehmen.

3.2.11 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rinderkot

3.2.11.1 Real-Time Polymerasekettenreaktion

Chemikalien und Reagenzien

- DNA AWAY™ zur Beseitigung von unerwünschter DNA auf Oberflächen und Gerätschaften, Artikelnr. X996.1, Fa. Roth
- qPCR™ Mastermix Plus without UNG, Artikelnr. RT-QP2X-005WOU+, Fa. Eurogentec
- TaqMan-MGB®-Sonde F57po, Fa. Applied Biosystems
- TaqMan-MGB®-Sonde IS_IFTN, Fa. Applied Biosystems
- Primer: f57po-244F/f57po-306R bzw. ISMav2-735F/ISMav-896R, Fa. MWG Biotech

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von MAP in Rinderkot wurde das institutseigene TaqMan® Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) zur Detektion der spezifischen MAP-Marker F57 und ISMav2 sowie einer internen Amplifikationskontrolle herangezogen.

a) Primerauswahl für das Real-Time PCR-Verfahren

Für das institutseigene TaqMan® Real-Time PCR-Verfahren wurden selbst ausgewählte Oligonukleotidprimer als Zielregion der MAP-spezifischen Marker F57 und ISMav2 verwendet und mit dem TaqMan-MGB®-Sonden-System detektiert. Für den Nachweis des Markers F57 wurden die Primer „f57po-244F“ und „f57po-306R“, für den Nachweis der Insertionssequenz ISMav2 die Primer „ISMav2-735F“ und „ISMav-896R“ verwendet. Die Primer wurden nach spezifischen, institutseigenen Angaben bei der Firma MWG Biotech in Auftrag gegeben, die diese in lyophilisierter Form zustellte. Nach Vorschrift des Herstellers wurde zunächst aus den jeweiligen Lyophilisaten (f57po-244F/f57po-

306R bzw. ISMav2-735F/ISMav-896R) mit Aqua dest. (für PCR-Zwecke) Stammlösungen von 100 pmol/µl hergestellt. Die Lagerung der Stammlösung erfolgte bei -18 °C und konnte je nach Bedarf über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr verwendet werden. Die TaqMan-MGB[®]-Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen. Vor dem Gebrauch wurden 100 µM der TaqMan-MGB[®]-Sonden auf 2 µM mit Aqua dest. verdünnt.

In den nachfolgenden Tabellen 6 und 7 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer und die zu erwartende Amplifikatgröße bei gleichzeitiger Angabe der Referenz aufgeführt.

Tabelle 6: Angaben über die Primer des MAP-Markers F57

Primer	Zielgen	Primersequenz/Größe	Position	Amplifikatgröße	Referenz
F57-F (Vorwärtsprimer)	F57	5'-TAC GAG CAC GCA GGC ATT C-3' 19mer	244-263 ¹⁾	63 Bp	Schönenbrücher et al., 2008
F57-R (Rückwärtsprimer)		5'-CGG TCC AGT TCG CTG TCA T-3' 19mer	288-307		
F57-TaqMan-Sonde		VIC-CCT GAC CAC CCT TC-MGB 14mer	268-282		

¹⁾Bezogen auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* F57-DNA-Fragment (Genbank-Zugriffs-Nr. AF286339)

Tabelle 7: Angaben über die Primer des MAP-Markers ISMav2

Primer	Zielgen	Primersequenz/Größe	Position	Amplifikatgröße	Referenz
ISMav2-735F (Vorwärtsprimer)	ISMav2	5'-CGG CAA AAT CGA GCA GTT TC-3' 20mer	1645-1665	162 Bp	Schönenbrücher et al., 2008
ISMav2-896R (Rückwärtsprimer)		5'-TGA GCC GGT GTG ATC ATC TTT-3' 21mer	1786-1807		
IS_IFTN-TaqMan [®] -Sonde		6-FAM-CGC TGA GTT CCT TAG-MGB 15mer	1678-1693		

b) DNA-Amplifikationstechniken

Die Beschickung der PCR-Gefäße erfolgte räumlich getrennt von den übrigen Arbeitsbereichen in einem UV-PCR-Kabinett (Fa. Plas-Labs) in der in Tabelle 8 wiedergegebenen Reihenfolge. Die Aliquotierung des Mastermixes wurde unter Kühlung der PCR-Gefäße durchgeführt. Tabelle 9 zeigt die Thermocyclerkonfigurationen an.

Tabelle 8: Pipettierprotokoll für die Real-Time PCR (50 µl-Ansatz)

Bestandteile und deren Konzentration	Pipettiermenge pro Ansatz
qPCR™ Mastermix Plud without UNG (Fa. Eurogentec) (2x)	25,0 µl
Primer: f57po-244F/-306R (10 µM)	je 1,0 µl
Primer: ISMav2-735F/-896R (10 µM)	je 1,0 µl
F57po-/IS_IFTN-TaqMan®-Sonde (2 µM)	je 2,0 µl
F57-Interne Amplifikationskontrolle	5,0 µl
F57-TaqMan® _{mbg} -IAK-Sonde	2,0 µl
Aqua dest.	5,0 µl
Ziel-DNA	5,0 µl
Inhalt pro Reaktionsgefäß	50,0 µl

Tabelle 9: Thermocyclerkonfigurationen für die Real-Time PCR

Thermocyclerprogramm	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen	Thermocycler
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x	ABI 7000
Denaturierung	95 °C	15 s	} 50x	
Annealing/Extension	60 °C	1 min		

c) Kontrollstämme

Bei der TaqMan® Real-Time PCR wurden DNA-Proben der folgenden MAP- bzw. non-MAP-Stämme aus der institutsinternen Stammsammlung als Positiv- und Negativkontrollen bei jedem Untersuchungsgang mitgeführt:

Positivkontrolle: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) D8168/02
(interne Bezeichnung: **MAP 423**)

Negativkontrolle: *Mycobacterium scrofulaceum* 8821/04
(interne Bezeichnung: **Bo 18**)

Mycobacterium smegmatis 8414/02
(interne Bezeichnung: **Bo 16**)

Mycobacterium fortuitum 7157/01
(interne Bezeichnung **Bo 11**)

Entsprechendes Koloniematerial der Bakterienstämme wurde von dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium oder aus dem Flüssigmedium MGIT gewonnen. Die DNA der jeweiligen Referenzstämme wurde mit einem konventionellen DNA-Extraktionskit (DNeasy Tissue Kit®, Fa. Qiagen) isoliert. Das Arbeitsprotokoll ist Kapitel 3.2.7 zu entnehmen. Das gesamte Elutionsvolumen betrug 200 µl. Davon ausgehend wurden Aliquots von jeweils 10-30 µl DNA in Reaktionsgefäße

(1,5 ml) pipettiert und bei -20 °C tiefgefroren. Die Referenz-DNA stand somit jederzeit für die Dauer von mindestens 12 Monaten zur Verfügung.

Weiterhin wurden bei jedem PCR-Ansatz die DNA einer positiven und negativen Aufbereitungskontrolle des jeweiligen Kontrollstammes, die Aufbereitungskontrolle des Leerwertes, ein Leerwert des Mastermixes (ohne Zugabe von Proben-DNA) sowie eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

d) Interne Amplifikationskontrolle (IAK)

Die IAK (F57) wurde mitgeführt, um falsch-negative Ergebnisse, verursacht durch mögliche in der Probe enthaltene Hemmstoffe, auszuschließen. Sie wurde unter dem Einsatz eines kommerziell erhältlichen Plasmids pUC 19 (M11662, Promega) in einem vorgeschalteten PCR-Verfahren passend zu dem Primerpaar f57po-244F/-306R aus der TaqMan® Real-Time PCR gewonnen (Abdulmawjood et al., 2002; Schönenbrücher et al., 2008). Das dabei erhaltene Amplifikat wurde mit dem Purification-Kit der Firma Qiagen nach dem vorgeschriebenen Protokoll aufgereinigt und bei -18 °C gelagert. Das aufgereinigte Amplifikat konnte so über einen Zeitraum von einem Jahr verwendet werden. Um zu gewährleisten, dass ausreichend DNA-Material der Gebrauchsverdünnung 10^{-8} der internen Kontrolle zur Verfügung stand, wurden mehrere Gebrauchsverdünnungen in Portionen von 100 µl mit Aqua dest. für PCR-Zwecke hergestellt und in Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) pipettiert. Zur Signalgebung wurde in der TaqMan® Real-Time PCR die entsprechende TaqMan-Sonde (Universal-IAK-TaqMan®-Sonde, Fa. MWG-Biotech) verwendet.

e) Auswertung der PCR-Ergebnisse

Signalkurven, die unterhalb der Schwellenwertlinie lagen, wurden als negativ beurteilt. Ebenfalls negativ gewertet wurden Signale, die zwar die Schwellenwertlinie überschritten, allerdings Ct-Werte von > 40,00 erzielten. Alle sigmoiden Signalkurven, die die Schwellenwertlinie bis zu einem Ct-Wert von $\leq 40,00$ überschritten, wurden als positiv gewertet. Der Real-Time PCR-Lauf galt nur dann als auswertbar, wenn entsprechende Signale bei der Positivkontrolle und der positiven Aufbereitungskontrolle darstellbar waren. Die Negativkontrolle, der Aufbereitungsleerwert und der Leerwert des Mastermixes durften keinerlei Signale aufweisen. Weiterhin musste die IAK bei der Auswertung von negativen Proben ein positives Signal erzielen, mit Ct-Werten im Bereich von 35,60 bis 39,00. Auch bei schwach-positiven Proben können positive Signale der IAK auftreten.

3.2.11.2 Konventionelle nested-Polymerasekettenreaktion (nPCR)

Chemikalien und Reagenzien:

I) nested-PCR

- Herstellung des dNTP-Mix (je 10 mM), Fa. Roche:
10 µl dATP, Na-salt, PCR Grade (100 mM), Artikelnr.: 1 934 511
+10 µl dCTP, Na-salt, PCR Grade (100 mM), Artikelnr.: 1 934 520
+10 µl dGTP, Na-salt, PCR Grade (100 mM), Artikelnr.: 1 934 538
+10 µl dTTP, Na-salt, PCR Grade (100 mM), Artikelnr.: 1 934 549
wurden mit 60 µl Aqua bidest. (steril filtriert) gemischt.
- AmpliTaqGold™ (5 U/µl) mit GeneAmp® 10x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂), Artikelnr. 808-0242, Fa. Applied Biosystems
- DNA AWAY™ zur Beseitigung von unerwünschter DNA auf Oberflächen und Gerätschaften, Artikelnr. X996.1, Fa. Roth

II) Agargelelektrophorese

- Puffer für die Agargelelektrophorese:
10x TBE (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-Borsäure, EDTA-Puffer (1 Liter):
60 g (0,5 M) Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, Artikelnr. 5429.3, Fa. Roth
30,90 g (0,5 M) Borsäure, Artikelnr. 1.00165.0500, Fa. Merck
2,92 g (10 mM) EDTA (Triplex II), Artikelnr. 1.08417, Fa. Merck
bzw.
1x TBE (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-Borsäure, EDTA-Puffer (2 Liter):
200 ml 10x TBE-Puffer wurden in einen Glaskolben überführt und mit Aqua bidest. auf zwei Liter aufgefüllt.
- Agarosegel für die Agargelelektrophorese:
Für die Gelelektrophorese kamen 1,5 %ige Agarosegele zum Einsatz. Dafür wurden 1,35 g Agarose Standard (Produkt-Nr. AGAH0500, Fa. Q Biogene) in 90 ml 1x TBE durch Erhitzen in der Mikrowelle (Typ: Dimension 4, Fa. Panasonic) aufgelöst. Im Anschluss wurde das Agarosegel mittels Magnetrührer (Typ: RCT-Basic, Fa. KIKA Labordiagnostic), auf +50-55 °C abgekühlt und in den vorbereiteten Gelträger gegossen.

Probenauftragspuffer/Bromphenolblau-Lösung:

- Herstellung der Stammlösungen:

15 %ige Ficoll-Lösung

1,5 g

Ficoll, Artikelnr. F-2878, Fa. Sigma

ad 10 ml Aqua bidest. (steril filtriert)

5 %ige Bromphenolblau-Lösung

0,5 g

Bromphenolblau, Artikelnr. 8122, Fa. Merck

ad 10 ml Aqua bidest. (steril filtriert)

- Herstellung der Gebrauchslösung:

10 ml

15 %ige Ficoll-Lösung

0,25 ml

5 %ige Bromphenolblau-Lösung

- Probenamplifikatvorbereitung für die Gelelektrophorese:

2 µl

Gebrauchslösung

8 µl

PCR-Amplifikat

- Ethidiumbromid-Färbebad:

50 µl

1 %ige Ethidiumbromid-Lösung, Artikelnr. 1.11608.0030, Fa. Merck

1,5 l

Aqua bidest.

Zum qualitativen Nachweis der Insertionssequenz IS900 von MAP aus Rinderkot kam ein konventionelles nested-PCR-Verfahren zum Einsatz (Bull et al., 2003). Die nested-PCR wurde als Vergleichsverfahren zu der TaqMan® Real-Time PCR mitgeführt und ermöglichte die Untersuchung der nativen Rinderkotproben mit einem dritten Marker (IS900). Mit dem Vorwärts- und Rückwärts-Primer des ersten Primerpaares (TJ 1/2) konnte ein 355 Bp-Fragment amplifiziert werden. Mit dem Vorwärts- und Rückwärts-Primer des zweiten Primerpaares (TJ 3/4) wurde ein 294 Bp-Fragment amplifiziert, welches innerhalb des oben genannten 355 Bp-Fragmentes liegt. Für die zweite PCR kamen die Amplifikate des ersten PCR-Laufes in einer Verdünnung von 1:10 mit Aqua dest. für PCR-Zwecke zum Einsatz.

a) Primerauswahl

Nach Bull et al. (2003) wurden für die nested-PCR die Außenprimer TJ 1/2 der Firma MWG Biotech und die Innenprimer TJ 3/4 der Firma MWG Biotech (Tabelle 10) eingesetzt. Nach Vorgaben des Herstellers wurde aus den jeweiligen Lyophilisaten (TJ 1/2 und TJ 3/4) mit Aqua dest. für PCR-Zwecke zuerst eine Stammlösung von 100 pmol/µl hergestellt. Die Lagerung dieser Stammlösung bei

-18 °C ermöglichte die Aufbewahrung für 12 Monate. Dies galt ebenso für die Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 µM, die als 50 µl Aliquots in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) gelagert wurden.

Tabelle 10: Innen- und Außenprimer der nested-PCR nach Bull et al. (2003)

Primer	Zielgen	Primersequenzen/Größe	Amplifikatgröße (Bp)
TJ 1 (Vorwärtsprimer außen)	IS900	5'-GCT GAT CGC CTT GCT CAT-3' 18mer	355 Bp
TJ 2 (Rückwärtsprimer außen)		5'-CGG GAG TTT GGT AGC CAG TA-3' 20mer	
TJ 3 (Vorwärtsprimer innen)		5'-CAG CGG CTG CTT TAT ATT CC-3' 20mer	294 Bp
TJ 4 (Rückwärtsprimer innen)		5'-GGC ACG GCT CTT GTT GTA GT-3' 20mer	

b) Kontrollstämme

Bei der nested-PCR wurden DNA-Proben derselben Kontrollstämme aus der institutseigenen Stammsammlung als Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt wie bei der Real-Time PCR. Bei jedem PCR-Ansatz wurden die DNA einer positiven und negativen Aufbereitungskontrolle des jeweiligen Kontrollstammes, die Aufbereitungskontrolle des Leerwertes, ein Leerwert des Mastermixes (ohne Zugabe von Proben-DNA) sowie eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

c) Pipettierprotokoll

Die Herstellung des Mastermixes erfolgte in einem separaten Raum in einem PCR-Kabinett. Zunächst wurden die benötigten Bestandteile des Mastermixes zum Auftauen in das PCR-Kabinett verbracht. Alle verwendeten Reagenzien wurden während der Herstellung des Mastermixes durchgehend gekühlt (z. B auf Kühlblocks). Die Aliquotierung des Mastermixes erfolgte ebenfalls unter Kühlung der PCR-Gefäße. In vorgeschriebener Reihenfolge (Tabelle 11) wurden die Reagenzien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Im Folgenden ist das Pipettierprotokoll für einen 50 µl Ansatz tabellarisch dargestellt:

Tabelle 11: Pipettierprotokoll für die nested-PCR basierend auf dem MAP-Marker IS900 (50 µl Ansatz)

Bestandteile und deren Konzentrationen	Pipettiermenge pro Ansatz
Aqua dest. für PCR-Zwecke	36,5 µl
10x Polymerase-Puffer 15 mM MgCl ₂ Fa. Applied Biosystems	5,0 µl
dNTP-Mix (10 mM each)	1,0 µl
Primer () TJ 1/ 2 bzw. () TJ 3/ 4 (10 µM)	je 1,0 µl
Polymerase AmpliTaq Gold™ (5 U/µl) Fa. Applied Biosystems	0,5 µl
DNA bzw. 1:10 verdünntes Amplifikat	5,0 µl
Inhalt pro Reaktionsgefäß	50,0 µl

d) Thermocyclerprogramm

Grundsätzlich wurde der Thermocycler Perkin Elmer 9600 (Fa. Applied Biosystems) für die nested-PCR eingesetzt. Alternativ stand der Thermocycler Hybaid TouchDown (Fa. Hybaid) zur Verfügung. Die Thermocycler wurden wie folgt programmiert:

Tabelle 12: Thermocyclerkonfiguration für die nested-PCR

Thermocyclerprogramm	
Initiale Denaturierung	95 °C 10 min
Denaturierung	94 °C 30 s
Annealing	60 °C 30 s
Extension	72 °C 30 s
Finale Extension	72 °C 5 min
Abkühlung auf +	auf 4 °C

} 35 x

Zur Überprüfung der korrekten Thermocycleraufheizung und -temperaturverteilung wurden kommerziell erhältliche Testkits (Sure Cycle® der Firma Congen) verwendet.

e) Darstellung der PCR-Produkte mittels Agargelelektrophorese

Die Auswertung der nested-PCR erfolgte mittels Agargelelektrophorese unter Verwendung 1,5 %iger Agarosegele. Die Herstellung der Gele ist oben bereits beschrieben. Zunächst wurden in den abgedichteten Gelträger die passenden Kämme eingelegt und anschließend die ca. +50-55 °C warme flüssige Agarose unter Vermeidung von Bläschenbildung in den Gelträger eingefüllt. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer verbracht. Die Agarosegele wurden bis zu sieben Tage nach der Herstellung verwendet. Nach dem Ziehen der Kämme wurden die entstandenen Geltaschen mit den jeweiligen vorbereiteten Probenamplifikaten sowie den in der PCR mitgeführten Kontrollen beschickt. In die erste Geltasche wurde ein Molekulargewichtsmarker (Marker XIV (100-1.500 Bp), Fa. Roche) gefüllt, der als Längenstandard mitgeführt wurde. Die angelegte elektrische Spannung variierte zwischen 80 und 130 V. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblaufront eine Laufstrecke von fünf bis sechs Zentimetern bei Einsatz von zwei Kämmen in einem Gel der Größe 13,5 x 14 cm zurückgelegt hatte.

f) Ethidiumbromidfärbung und Fotodokumentation

Die Anfärbung des Agarosegels erfolgte im Anschluss an die Gelelektrophorese und wurde mit Ethidiumbromid durchgeführt. Dafür wurden die Agarosegele über einen Zeitraum von ca. 20 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (Herstellung s. o.) im Schüttelwasserbad gefärbt. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde im weiteren Verlauf durch 20minütiges Schwenken in Aqua dest. entfernt. Zur Auswertung wurde das feuchte Gel unter dem UV-Transilluminator (Fa. Hefer Scientific Instruments) betrachtet. Die Fotodokumentation erfolgte auf einem Polaroidfilm mit der manuellen Fotoanlage MP 4* (Fa. Polaroid) bei vorgewählten Blendengrößen von „11“ bis „16“ und einer Belichtungszeit von drei bis vier Sekunden.

g) Auswertung der PCR-Ergebnisse

Sichtbare Banden wurden anhand der mitgeführten DNA-Molekulargewichtsmarker einer bestimmten Basenpaargröße zugeordnet. Erfolgte ein positiver Nachweis des für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* spezifischen Markers IS900, so stellte sich bei Verwendung des äußeren Primerpaares eine Bande bei 355 Bp und bei Verwendung des inneren Primerpaares eine Bande bei 294 Bp dar. Die Probe galt als „IS900“ positiv, wenn entweder beide Banden oder nur die Bande des inneren Primerpaares nachgewiesen wurden. Sofern keine Banden zu erkennen waren, wurden die Proben als negativ gewertet. Waren nur undeutliche Banden zu erkennen, wurden die Proben als fraglich positiv gewertet. Die PCR galt nur dann als auswertbar, wenn die entsprechenden Banden

auch bei der Positivkontrolle und der positiven Aufbereitungskontrolle darstellbar waren. Die Negativkontrolle, der Aufbereitungsleerwert und der Leerwert des Mastermixes durften keinerlei Banden aufweisen.

3.2.11.3 Vorversuch: Einmischversuche 1, 2 und 3 – molekularbiologische Untersuchungen von artifiziiell kontaminierten Rinderkotproben unter Berücksichtigung eines standardisierten DNA-Extraktionsverfahrens der Firma Qiagen

a) Referenzmaterialien

Der für den Vorversuch benötigte Rinderkot stammte aus einem Paratuberkulose-freien Rinderbestand und erwies sich in Voruntersuchungen auf MAP als kulturell negativ. Für die artifiziielle Kontamination der Rinderkotproben wurde der MAP-Stamm MAP 423 aus der institutseigenen Stammsammlung herangezogen. Das MAP-Feldisolat 423 stellte das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in Koblenz zur Verfügung. Es handelte sich um ein Kotisolat eines Rindes mit klinisch manifester Paratuberkulose.

Die Kultivierung des MAP-Stammes MAP 423 erfolgte auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Zusatz von Mycobactin J und Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin (BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar, Katalog-Nr. 222232, Fa. Becton Dickinson) und in MGIT-Flüssignährmedium. Nach Möglichkeit wurden eine bis drei Einzelkolonien von dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit der Impföse in das MGIT-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte nach Herstellervorgaben bei +37 °C für mindestens 8 Wochen.

b) Artifiziielle Kontamination der Rinderkotproben

Zu Beginn des Modellversuches wurde jeweils eine Reinkultur des MAP-Stammes MAP 423, der zuvor in MGIT-Flüssignährmedium bei +37 °C bebrütet worden war, ausgewählt. Der Keimgehalt des ausgewählten Mediums wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach TÜRCK bestimmt. Die Auszählung von MAP erfolgte unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung. Nach der Zählung konnte ein Keimgehalt von **4,8 x 10⁷ KbE/ml** Flüssigmedium im ersten, **3,6 x 10⁷ KbE/ml** Flüssigmedium im zweiten und **3,0 x 10⁷ KbE/ml** Flüssigmedium im dritten Einmischversuch errechnet werden. Aus 1 ml Flüssigmedium wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁶ angelegt. Nach erfolgter Quantifizierung wurden jeweils 100 µl der Verdünnungsreihe auf das Festnährmedium Middlebrook 7H10 im Doppelansatz mittels Spatelverfahren aufgebracht und bei +37 °C bebrütet. Dieser Schritt dient der bestätigenden Quantifizierung der Erregerkonzentration der jeweiligen Verdünnungsstufe. Zur artifiziiellen Kontamination wurden anschließend 2 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe zu 20 g Rinderkot gegeben und gründlich manuell durchmischt. Im Anschluss wurde der entsprechend gespikte Rinderkot molekularbiologisch untersucht. Dem

Fließdiagramm 6 „Schematische Darstellung zur artifiziiellen Kontamination von Rinderkotproben mit MAP (Einmischversuche 1, 2 und 3)“ (vgl. Ziffer 8.1.6 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte zu entnehmen.

c) DNA-Isolierung und -Nachweis von MAP aus der Erregersuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe

Um die Erregerkonzentrationen der Verdünnungsstufen zu überprüfen, wurde DNA aus der Erregersuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe der Einmischversuche 1, 2 und 3 direkt isoliert. Dafür wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit® (Fa. Qiagen) verwendet (Kapitel 3.2.7).

d) DNA-Isolierung und -Nachweis von MAP aus artifiziiell kontaminierten Rinderkotproben

Im Rahmen des Vorversuches erfolgte die DNA-Extraktion gemäß dem Standard-Protokoll der Firma Qiagen (Kapitel 3.2.8.1). Der Nachweis und die Bestätigung von MAP-DNA erfolgten in dem Vorversuch unter Verwendung des institutseigenen TaqMan® Real-Time PCR-Assays (Schönenbrücher et al., 2008). Dabei wurde die spezifische Zielregion F57 detektiert, die sich gemäß Literaturangaben (O'Mahony et al., 2004; Tasara et al., 2005; Bosshard et al., 2006) sowie eigenen Erfahrungen besonders gut für den Nachweis von MAP aus der Matrix Rinderkot eignet.

Aus allen Verdünnungsstufen (0 – 10⁵ KBE/g Rinderkot) der Einmischversuche 1, 2 und 3 wurde im **Doppelansatz** DNA gemäß dem Standard-Extraktionsverfahren Q isoliert. Daraus ergaben sich 14 DNA-Aufreinigungen je Einmischversuch. Für alle drei Einmischversuche wurden somit insgesamt 42 DNA-Isolierungen durchgeführt. Eine schematische Übersicht zu den DNA-Aufreinigungen der Einmischversuche 1, 2 und 3 zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: Übersicht zu den Einmischversuchen 1, 2 und 3 unter Berücksichtigung des Standard-DNA-Extraktionsverfahrens Q

Proben	MAP KbE/g	Einmischversuch 1**	Einmischversuch 2	Einmischversuch 3	gesamt
Protokoll*		Q	Q	Q	Q
	0 (nativ)	2	2	2	6
	10 ⁰	2	2	2	6
	10 ¹	2	2	2	6
	10 ²	2	2	2	6
	10 ³	2	2	2	6
	10 ⁴	2	2	2	6
	10 ⁵	2	2	2	6
		14	14	14	42

*Protokoll: Q QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

**der DNA-Nachweis erfolgte mittels Real-Time PCR

3.2.12 Hauptversuch I: Einmischversuche 4, 5 und 6 – molekularbiologische Untersuchungen von artifiziell kontaminierten Rinderkotproben unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren Q, Qm, R und Rm

a) Referenzmaterialien

Der für den Hauptversuch I benötigte Rinderkot stammte aus einem Paratuberkulose-freien Rinderbestand und erwies sich in Voruntersuchungen auf MAP als kulturell negativ. Für die artifizielle Kontamination der Rinderkotproben wurden gezielt zwei unterschiedliche MAP-Stämme (MAP 423 und J 27) aus der institutseigenen Stammsammlung herangezogen. Das MAP-Feldisolat 423 wurde vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in Koblenz bezogen und aus dem Kot eines Rindes mit klinisch manifester Paratuberkulose isoliert. Der zweite MAP-Stamm J 27 ist ein DSMZ-Stamm (Nr. 44135). Auch dieses MAP-Isolat wurde ursprünglich aus Rinderkot isoliert.

Die Kultivierung der MAP-Stämme MAP 423 und J 27 erfolgte auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Zusatz von Mycobactin J, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin (BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar, Katalog-Nr. 222232, Fa. Becton Dickinson) sowie in dem Middlebrook 7H9-Flüssigmedium (Hughes et al., 2001). Nach Möglichkeit wurden eine bis drei Einzelkolonien von dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit der Impföse in das Middlebrook 7H9-Flüssigmedium überführt. Die Inkubation erfolgte nach Herstellervorgaben bei +37 °C für mindestens 8 Wochen. In **Fließdiagramm 7** „Schematische Darstellung zur artifiziellen Kontamination von Rinderkotproben mit MAP im Hauptversuch I (Einmischversuche 4, 5 und 6)“ (vgl. Ziffer 8.1.7 im Anhang) sind die einzelnen Arbeitsschritte dargestellt.

b) Artifizielle Kontamination der Rinderkotproben

Zu Beginn des Modellversuches wurde jeweils eine Reinkultur der MAP-Stämme MAP 423 und J 27 (DSMZ-Nr. 44135), die in dem Middlebrook 7H9-Flüssigmedium mit den Zusätzen Tween 80 und Mycobactin J bei +37 °C bebrütet worden waren, ausgewählt. Um die für MAP typische Klumpenbildung im Medium zu vermeiden, wurden 10 sterile Keramikkügelchen (SiLibeads®, Fa. Sigmund Lindner) pro Medium zugegeben und das Anreicherungsmedium im Schüttelinkubator bebrütet. Der Keimgehalt des ausgewählten Mediums wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach TÜRCK bestimmt. Die Auszählung von MAP erfolgte unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung. Nach der Zählung konnten Keimgehalte von $4,9 \times 10^7$, $2,8 \times 10^7$ und $3,5 \times 10^7$ KBE/ml Flüssigmedium für die jeweiligen Einmischversuche 4, 5 und 6 errechnet werden. Bei den Einmischversuchen 4 und 5 kam der Stamm MAP 423, bei dem Einmischversuch 6 der Stamm J 27 zum Einsatz. Aus 1 ml Flüssigmedium wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} angelegt. Nach erfolgter Quantifizierung wurden jeweils 100 µl der einzelnen Verdünnungsstufen der Verdünnungsreihen der Einmischversuche auf das Festnährmedium

Middlebrook 7H10 im Doppelansatz aufgebracht, ausgespatelt und bei +37 °C bebrütet. Dieser Schritt dient der bestätigenden Quantifizierung (KbE/ml) der Erregerkonzentration der jeweiligen Verdünnungsstufe. Zur artifiziellen Kontamination wurden anschließend 2 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe zu 20 g Rinderkot gegeben und gründlich manuell durchmischt. Im Anschluss wurde der entsprechend gespikete Rinderkot molekularbiologisch untersucht.

c) DNA-Isolierung und -Nachweis von MAP aus der Erregersuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe

Um die Erregerkonzentrationen der Verdünnungsstufen zu überprüfen, wurde DNA aus der Erregersuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe der Einmischversuche 4, 5 und 6 direkt isoliert. Dafür wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit[®] der Firma Qiagen verwendet (s. Kapitel 3.2.7).

d) DNA-Isolierung und -Nachweis von MAP aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben

Im Rahmen des Hauptversuches I wurden die vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren Q, Qm, R und Rm (Kapitel 3.2.8.1 bis 3.2.8.4) zur Isolierung von MAP-DNA aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben vergleichend untersucht. Der Nachweis und die Bestätigung von MAP-DNA erfolgten dem Vorversuch entsprechend unter Verwendung des institutseigenen TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahrens (Schönenbrücher et al., 2008) für die spezifische Zielregion F57.

Aus allen Verdünnungsstufen ($0 - 10^4$ KBE/g Rinderkot) der Einmischversuche 4, 5 und 6 wurde im **Dreifachansatz** DNA gemäß den vier unterschiedlichen Extraktionsverfahren isoliert. Daraus ergaben sich 18 DNA-Aufreinigungen je Einmischversuch und DNA-Extraktionsverfahren. Für alle drei Einmischversuche wurden somit insgesamt 216 DNA-Isolierungen durchgeführt. Da die DNA jeder Verdünnungsstufe in jeweils **zwei getrennten PCR-Durchläufen** untersucht wurde, standen 432 PCR-Ergebnisse zur Auswertung zur Verfügung. Eine schematische Übersicht zu den im Hauptversuch I eingesetzten DNA-Extraktionsverfahren ($n = 4$) und den DNA-Aufreinigungen der Einmischversuchen 4, 5 und 6 zeigt Tabelle 14.

Tabelle 14: Übersicht zu den Einmischversuchen 4, 5 und 6 des Hauptversuches I unter Berücksichtigung der vier Extraktionsverfahren Q, Qm, R und Rm

Proben	MAP KbE/g	Einmischversuch 4**				Einmischversuch 5				Einmischversuch 6				gesamt
Protokolle*		Q	Qm	R	Rm	Q	Qm	R	Rm	Q	Qm	R	Rm	
	0 (nativ)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
	10 ⁰	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
	10 ¹	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
	10 ²	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
	10 ³	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
	10 ⁴	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
		18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	216

*Protokolle: Q QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

**der DNA-Nachweis erfolgte Real-Time PCR; die Einmischversuche wurden jeweils wiederholt (gesamte Anzahl der Ergebnisse 2 x 216 = 432)

Zur Beschreibung der Daten des Vorversuches sowie des Hauptversuches I wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Weiterhin erfolgte in Hauptversuch I ein Vergleich der unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren mit Hilfe der logistischen Regression (Programm: BMDPLR; Dixon, 1993).

3.2.13 Hauptversuch II: kulturelle, mikroskopische und molekularbiologische Untersuchung von nativen Rinderkotproben

Insgesamt wurden 206 native Rinderkotproben im Rahmen des Hauptversuches II untersucht. Darunter befanden sich 144 Rinderkotproben von Tieren aus 24 unterschiedlichen Beständen und 62 Kotproben von Einzeltieren aus Hessen (n = 139), Rheinland-Pfalz (n = 21) und Thüringen (n = 46). Die Rinderkotproben wurden von der Klinik für Wiederkäuer und Schweine an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in Koblenz, der Thüringer Tierseuchenkasse in Jena und dem Landesbetrieb Hessisches Landeslabor in Gießen zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Rinderkotproben klinisch auffälliger Rinder und/oder um gezielt auf MAP voruntersuchte Kotproben. Teils lagen nur serologische, kulturelle oder molekularbiologische Untersuchungsergebnisse von Serum- bzw. Kotproben der einzelnen Tiere vor, teils existierten Ergebnisse verschiedener parallel eingesetzter Nachweisverfahren. Bei den serologischen Nachweisverfahren ist zwischen milchserologischen Untersuchungen mittels Milch-ELISA (ELISA (M)) und/oder blutserologischen Untersuchungen mittels Blut-ELISA (ELISA (B)) zu unterscheiden. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen der einzelnen Rinderkotproben finden sich im Anhang Kapitel 8.2 Tabelle 43 dieser Arbeit.

Die Rinderkotproben (n = 206) wurden bei den eigenen Untersuchungen zunächst mikroskopisch mittels Ziehl-Neelsen-Färbung (s. Kapitel 3.2.2) untersucht. Die kulturelle Anzucht von MAP aus

Rinderkot erfolgte im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit dem Zusatz Mycobactin J, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin. Um eine Anzuchtdauer von 16 Wochen gewährleisten zu können, wurden je 3 g Rinderkot im Vorfeld mit 0,75 %igem HPC dekontaminiert (s. Kapitel 3.2.3.2). Die Kulturröhrchen wurden einmal wöchentlich auf Kontaminationen mit Begleitkeimen und Wachstum von MAP untersucht.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen der Rinderkotproben wurde das institutseigene TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren (Schönenbrücher et al., 2008), basierend auf den MAP-Markern F57 und IS*Mav2* sowie einer internen Amplifikationskontrolle, und vergleichend ein konventionelles nested-PCR-Verfahren (Bull et al., 2003), basierend auf dem Marker IS*900*, eingesetzt. Die molekularbiologischen Untersuchungen der nativen Rinderkotproben wurden teilweise parallel zu dem Vorversuch bzw. dem Hauptversuch I durchgeführt. Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte die DNA-Extraktion mit dem Standard-Kitsystem (Q) der Firma Qiagen. Da mit diesem Extraktionsverfahren nur sehr hohe Ct-Werte mittels TaqMan[®] Real-Time PCR erzielt werden konnten und insbesondere Kotproben mit niedrigen Erregerkonzentrationen gehäuft falsch-negativ detektiert wurden, erfolgten gezielte Modifikationen des Standard-Kitsystems. Diese bewirkten eine deutliche Verbesserung der Ct-Werte und die Nachweisrate von geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern erhöhte sich. Zusätzlich zu dem modifizierten DNA-Extraktionsverfahren Qm der Firma Qiagen wurde das Standard-Kitsystem R der Firma Roche sowie die modifizierte Variante Rm bei den Untersuchungen berücksichtigt. Somit wurde die Eignung jedes DNA-Extraktionsverfahrens in Kombination mit der TaqMan[®] Real-Time PCR und der nested-PCR an nativen Rinderkotproben überprüft.

Kotproben, bei denen die DNA-Extraktion mittels Standard-Kitsystem (Q bzw. R) erfolgte und grenzwertige Ct-Werte (≥ 40) mittels TaqMan[®] Real-Time PCR bzw. fragliche Ergebnisse (ungenau Banden) mittels nested-PCR erbrachte, wurden wiederholt mit einem der modifizierten DNA-Extraktionsverfahren untersucht.

Die Ergebnisse der eingesetzten Nachweisverfahren (Ziehl-Neelsen-Färbung, Real-Time PCR und nested-PCR) von MAP aus Rinderkotproben ($n = 206$) mit der kulturellen Anzuchtung als „gold standard“ der Paratuberkulosedagnostik, wurden in Vierfeldertafeln gegenüber gestellt. Die Korrelationen zwischen den Ergebnissen der jeweiligen Nachweisverfahren mit denen des „gold standard“ wurden durch den Kappa-Index beschrieben. Weiterhin wurden 1. die Ergebnisse der Nachweisverfahren im Vergleich zum „gold standard“ mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (Programm: BiAS; Ackermann, 1998) auf Zusammenhang überprüft, und 2. unter Verwendung des McNemar-Tests (Programm: BiAS; Ackermann, 1998) die Häufigkeit abweichender Ergebnisse der jeweiligen Nachweisverfahren verglichen. Für jedes Nachweisverfahren wurde außerdem in Bezug auf die Ergebnisse des „gold standard“ die geschätzte Sensitivität sowie Spezifität angegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse des Vorversuches

Molekularbiologische Untersuchungen – Einmischversuche 1, 2 und 3

Zur Bestimmung der Nachweisrate des Real-Time PCR-Verfahrens in Rinderkot wurden zu Beginn der Untersuchungen die Einmischversuche 1, 2 und 3 durchgeführt. Aufgrund früherer Erfahrungen bei der Untersuchung nativer Rinderkotproben wurde bei den Einmischversuchen 1, 2 und 3 nur der Marker F57 berücksichtigt, da sich dieser besonders gut bewährt hatte. Die DNA-Extraktion aus den artifiziell kontaminierten Rinderkotproben aller drei Einmischversuche erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des QIAamp DNA Stool Mini Kit[®] der Firma Qiagen (Q).

Abbildung 10 zeigt beispielhaft die Amplifikationssignale des Real-Time PCR-Verfahrens der einzelnen Verdünnungsstufen der dekadischen Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6}) des Referenzstammes MAP 423 (ursprüngliche Ausgangskonzentration $3,0 \times 10^7$; Einmischversuch 3) vor der artifiziellen Kontamination des Rinderkotes. Um die Erregerkonzentrationen der Verdünnungsstufen zu überprüfen, wurde DNA aus der Erregersuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe direkt isoliert.



Abbildung 10: Einmischversuch 3 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Berücksichtigung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423, Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6})

Abbildung 11 zeigt repräsentativ für die Einmischversuche 1, 2 und 3 die Standardkurve der oben beschriebenen Verdünnungsreihe des Referenzstammes MAP (Einmischversuch 3). Die Standardkurve gibt die logarithmische Konzentration der isolierten DNA des Erregers in den jeweiligen Verdünnungsstufen an. Die Steigung der Geraden beträgt $-3,94$ und der Korrelationskoeffizient liegt bei $> 0,99$. Damit erwies sich die Verdünnungsreihe für die artifizielle Kontamination der Rinderkotprobe als geeignet.

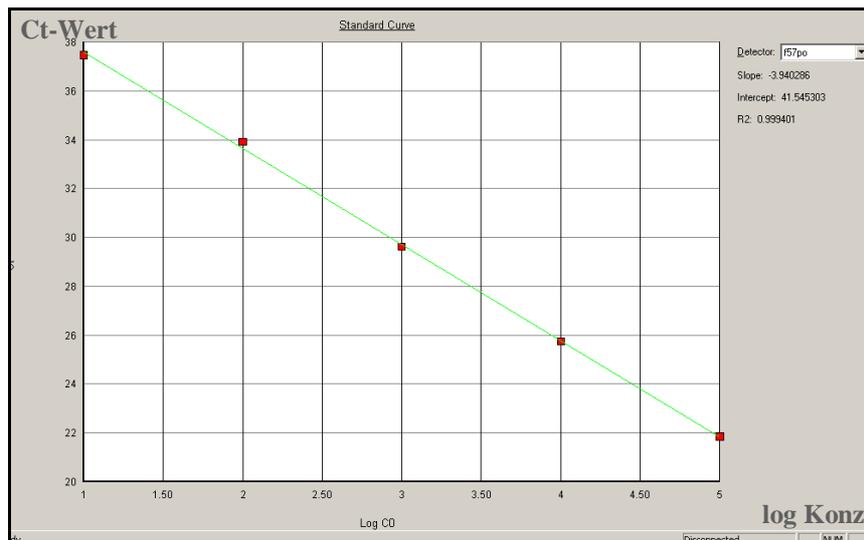


Abbildung 11: Einmischversuch 3 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423

In den Tabellen 15a-c sind die Ct-Werte der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens, bezogen auf den MAP-Marker F57 und das Standard-DNA-Extraktionsverfahren der Firma Qiagen (Q), für die Einmischversuche 1 (Tab. 15a), 2 (Tab. 15b) und 3 (Tab. 15c) gelistet. Dabei wurde sowohl nativer als auch artifiziell kontaminierter Rinderkot molekularbiologisch untersucht. Aus allen Verdünnungsstufen der drei Einmischversuche wurde im Doppelansatz DNA isoliert. Die positiven Fluoreszenzsignale der Real-Time PCR sind dabei farblich unterlegt.

In den Tabellen 16a-c sind Mittelwert und Standardabweichung der Ct-Werte der Einmischversuche 1 (Tab. 16a), 2 (Tab. 16b) und 3 (Tab. 16c) aufgeführt.

Die mit Hilfe der Zählkammer ermittelten ursprünglichen MAP-Ausgangskonzentrationen von $4,8 \times 10^7$ KBE/ml MGIT-Flüssignährmedium des Einmischversuches 1, $3,6 \times 10^7$ KBE/ml MGIT-Flüssignährmedium des Einmischversuches 2 sowie $3,0 \times 10^7$ KBE/ml MGIT-Flüssignährmedium des Einmischversuches 3 konnte durch die kulturelle Anzucht auf dem Middlebrook 7H10-Festnährmedium bestätigt werden.

Tabelle 15 a-c: Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 1, 2 und 3 unter Berücksichtigung des MAP-Markers F57 und des Standard-DNA-Extraktionsverfahrens Q der Fa. Qiagen

a) Einmischversuch 1			b) Einmischversuch 2			c): Einmischversuch 3		
gespikte Kotproben	Marker		gespikte Kotproben	Marker		gespikte Kotproben	Marker	
	F57			F57			F57	
MAP KbE/g	Protokoll Q		MAP KbE/g	Protokoll Q		MAP KbE/g	Protokoll Q	
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	0 (nativ)	n.d.*	n.d.	0 (nativ)	n.d.*	n.d.
4,8 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ⁰	n.d.	n.d.
4,8 x 10 ¹	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ¹	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ¹	n.d.	n.d.
4,8 x 10 ²	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ²	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ²	n.d.	n.d.
4,8 x 10 ³	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ³	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ³	36,44	36,40
4,8 x 10 ⁴	39,38	33,42	3,6 x 10 ⁴	38,09	38,01	3,0 x 10 ⁴	31,58	31,71
4,8 x 10 ⁵	31,48	30,49	3,6 x 10 ⁵	33,55	33,30	3,0 x 10 ⁵	35,84	35,65

*n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Tabelle 16a-c: Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 1, 2 und 3 unter Berücksichtigung des MAP-Markers F57 und Standard-DNA-Extraktionsverfahrens Q der Fa. Qiagen

a) Einmischversuch 1			b): Einmischversuch 2			c): Einmischversuch 3		
gespikte Kotproben	Marker		gespikte Kotproben	Marker		gespikte Kotproben	Marker	
	F57			F57			F57	
MAP KbE/g	\bar{x}	$\pm s$	MAP KbE/g	\bar{x}	$\pm s$	MAP KbE/g	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	0 (nativ)	n.d.*	n.d.	0 (nativ)	n.d.*	n.d.
4,8 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ⁰	n.d.	n.d.
4,8 x 10 ¹	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ¹	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ¹	n.d.	n.d.
4,8 x 10 ²	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ²	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ²	n.d.	n.d.
4,8 x 10 ³	n.d.	n.d.	3,6 x 10 ³	n.d.	n.d.	3,0 x 10 ³	36,42	0,02
4,8 x 10 ⁴	36,40	2,89	3,6 x 10 ⁴	38,05	0,04	3,0 x 10 ⁴	31,65	0,07
4,8 x 10 ⁵	31,00	0,50	3,6 x 10 ⁵	33,43	0,13	3,0 x 10 ⁵	35,75	0,10

*n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Unter Berücksichtigung des Standard-Protokolls Q der Firma Qiagen konnte bei einer Erregerkonzentration von ca. 10⁴ KbE/g Rinderkot eine **Nachweisrate von 100 %** in den Einmischversuchen 1, 2 und 3 erzielt werden.

4.2 Ergebnisse des Hauptversuches I: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen – Einmischversuche 4, 5 und 6

Aufgrund erlangter Erfahrungen bei der Untersuchung nativer Rinderkotproben sowie aus den Einmischversuchen 1, 2 und 3 wurden drei weitere Einmischversuche 4, 5 und 6 durchgeführt, ebenfalls basierend auf dem Marker F57. Bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 wurden vier unterschiedliche DNA-Extraktionsverfahren berücksichtigt, um deren Einfluss auf die Nachweisrate der Real-Time PCR beurteilen zu können:

- **Q:** Standard-Protokoll: QIAamp DNA Stool Mini Kit[®], Firma Qiagen
- **Qm:** modifiziertes Protokoll: QIAamp DNA Stool Mini Kit[®], Firma Qiagen, mit mechanischer Aufbereitung der Fäzesproben
- **R:** Standard-Protokoll: High Pure PCR Template Preparation Kit[®], Firma Roche Applied Science
- **Rm:** modifiziertes Protokoll: High Pure PCR Template Preparation Kit[®], Firma Roche Applied Science, mit mechanischer Aufbereitung der Fäzesproben

Beide Standard-Protokolle (**Q** und **R**) beschreiben ein thermisch-chemisches Extraktionsverfahren, während es sich bei den modifizierten Protokollen (**Qm** und **Rm**) um thermisch-chemisch-mechanische Extraktionsverfahren handelt.

Um chargenbedingte Ungenauigkeiten ausschließen zu können, wurden für die jeweiligen PCR-Ansätze der drei Einmischversuche nur Reagenzien (Oligonukleotide, TaqMan-Sonden, Primer, Mastermix) aus jeweils derselben Charge verwendet.

Aus allen Verdünnungsstufen der drei Einmischversuche wurde im **Dreifachansatz** DNA gemäß den vier unterschiedlichen Extraktionsverfahren isoliert. Weiterhin wurde jeder der Einmischversuche 4, 5 und 6 einmal wiederholt. Die Erstversuche sind nachfolgend als Einmischversuche **4A**, **5A** und **6A** bezeichnet, die Zweitversuche als Einmischversuche **4B**, **5B** und **6B**.

4.2.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen des Einmischversuches 4

Abbildung 12 zeigt die Amplifikationssignale des Real-Time PCR-Verfahrens der einzelnen Verdünnungsstufen der dekadischen Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6}) des MAP-Stammes MAP 423 vor der artifiziellen Kontamination der Rinderkotprobe, die für den Einmischversuch 4 verwendet wurde. Um die Erregerkonzentrationen zu überprüfen, wurde DNA aus der Erregersuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe direkt isoliert.

Die mit Hilfe der Zählkammer ermittelte ursprüngliche MAP-Ausgangskonzentration von $4,9 \times 10^7$ KBE/ml Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium konnte durch die kulturelle Anzucht auf dem Middlebrook 7H10-Festnährmedium bestätigt werden.

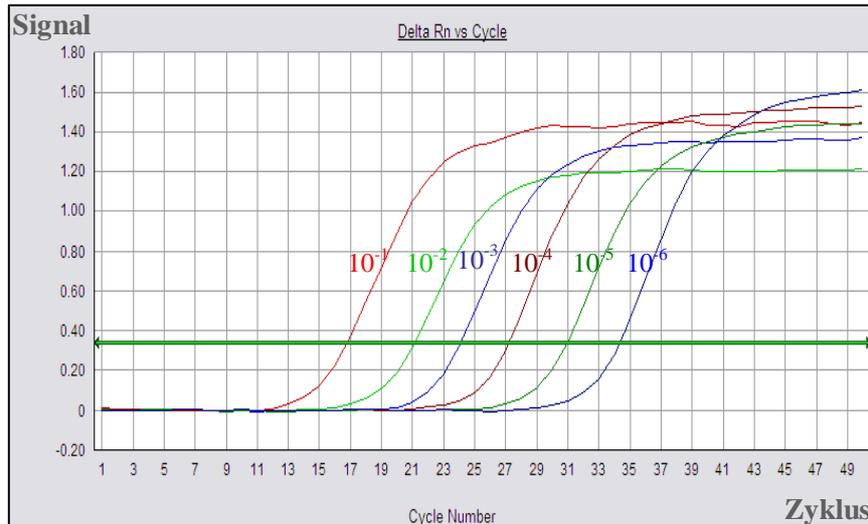


Abbildung 12: Einmischversuch 4 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Berücksichtigung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423, Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻⁶)

Abbildung 13 zeigt die Standardkurve der oben beschriebenen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423. Die Standardkurve gibt die logarithmische Konzentration der isolierten DNA des Erregers in den jeweiligen Verdünnungsstufen an. Die Steigung der Geraden beträgt -3,44 und der Korrelationskoeffizient liegt bei > 0,99. Damit war die Verdünnungsreihe geeignet für die artifizielle Kontamination der Rinderkotprobe.

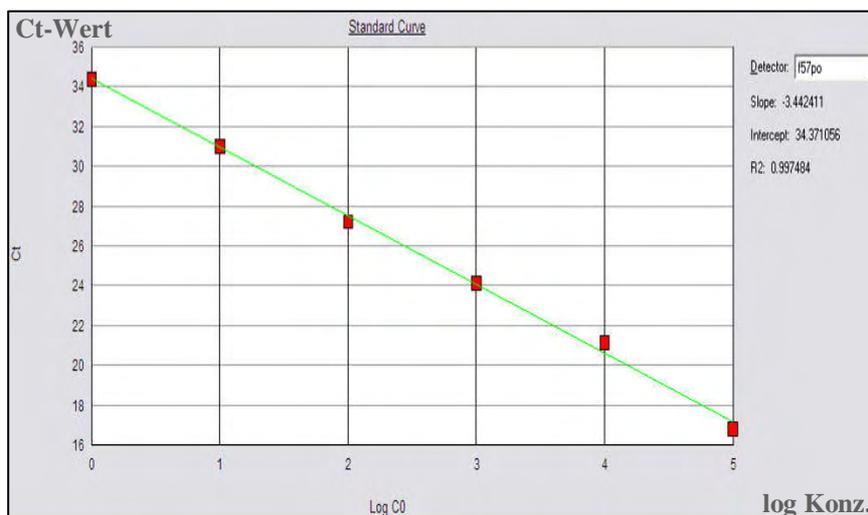


Abbildung 13: Einmischversuch 4 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423

In der Tabelle 17 sind die Ct-Werte der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens – bezogen auf das jeweilige DNA-Extraktionsverfahren – des Einmischversuches 4A

gelistet. Dabei wurde sowohl nativer als auch artifiziell kontaminierter Rinderkot ($4,9 \times 10^0$ bis $4,9 \times 10^4$ KbE/g) molekularbiologisch untersucht. Die positiven Fluoreszenzsignale der Real-Time PCR sind dabei farbig unterlegt. In der Tabelle 18 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ct-Werte des Einmischversuches 4A des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens aufgeführt.

Tabelle 17: Einmischversuch 4A – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)

gespikte Kotproben	Einmischversuch 4A											
	Protokoll Q			Protokoll Qm			Protokoll R			Protokoll Rm		
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$4,9 \times 10^0$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$4,9 \times 10^1$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,53	37,27	n.d.
$4,9 \times 10^2$	36,61	38,09	35,68	36,59	37,13	37,17	38,06	37,17	37,54	33,99	33,85	34,35
$4,9 \times 10^3$	33,75	33,96	34,28	33,05	33,86	33,86	33,97	34,31	34,14	30,87	30,81	31,06
$4,9 \times 10^4$	30,04	29,99	29,41	29,78	30,33	29,89	30,43	30,44	30,50	27,56	27,38	27,41

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar
 Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 18: Einmischversuch 4A – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuch 4A									
gespikte Kotproben	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm		MAP KbE/g
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$4,9 \times 10^0$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$4,9 \times 10^1$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	37,90	0,63	
$4,9 \times 10^2$	36,79	0,99	36,96	0,26	37,59	0,37	34,06	0,21	
$4,9 \times 10^3$	34,00	0,22	33,59	0,38	34,14	0,14	30,91	0,11	
$4,9 \times 10^4$	29,81	0,29	30,00	0,24	30,46	0,03	27,45	0,08	

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar
 Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Analog zu Einmischversuch 4A sind in Tabelle 19 die Ct-Werte der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens – bezogen auf das jeweiligen DNA-Extraktionsverfahren – des Einmischversuches 4B gelistet. Zusätzlich können Tabelle 20 Mittelwert und Standardabweichung der Ct-Werte des Einmischversuches 4B des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens entnommen werden.

Tabelle 19: Einmischversuch 4B – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)

gespikte Kotproben	Einmischversuch 4B											
	Protokoll Q			Protokoll Qm			Protokoll R			Protokoll Rm		
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,42	n.d.	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ²	38,48	38,29	38,08	38,25	37,68	37,90	37,59	37,90	38,16	36,02	35,48	35,20
4,9 x 10 ³	35,02	36,21	35,10	34,94	35,03	35,03	35,17	34,76	34,85	32,48	32,12	32,89
4,9 x 10 ⁴	32,01	31,57	31,04	31,33	31,63	31,47	31,46	31,60	31,55	29,09	29,08	28,95

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 20: Einmischversuch 4B – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

gespikte Kotproben	Einmischversuch 4B							
	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
MAP KbE/g	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,42	0,00	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ²	38,28	0,16	37,94	0,23	37,88	0,23	35,57	0,34
4,9 x 10 ³	35,44	0,54	35,00	0,04	34,93	0,18	32,50	0,31
4,9 x 10 ⁴	31,54	0,40	31,48	0,12	31,54	0,06	29,04	0,06

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der Mittelwerte und Standardabweichungen der Einmischversuche 4A und 4B zusammen.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4A und 4B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuche 4A und 4B								
gespikte Kotproben MAP KbE/g	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,42	0,00	n.d.	n.d.
4,9 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	37,90	0,63
4,9 x 10 ²	37,54	0,58	37,45	0,25	37,74	0,30	34,82	0,28
4,9 x 10 ³	34,72	0,38	34,30	0,21	34,53	0,16	31,71	0,21
4,9 x 10 ⁴	30,68	0,34	30,74	0,18	31,00	0,04	28,25	0,07

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 22 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens sowie die Anzahl der jeweils durchgeführten PCR-Ansätze aus den Einmischversuchen 4A und 4B.

Tabelle 22: Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4A und 4B sowie der jeweils durchgeführten PCR-Ansätze unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuche 4A und 4B					
gespikte Kotproben MAP KbE/g	Protokoll Q	Protokoll Qm	Protokoll R	Protokoll Rm	Gesamt
	0 (nativ)	0/6*	0/6	0/6	0/6
4,9 x 10 ⁰	0/6	0/6	1/6	0/6	1/24
4,9 x 10 ¹	0/6	0/6	0/6	2/6	2/24
4,9 x 10 ²	6/6	6/6	6/6	6/6	24/24
4,9 x 10 ³	6/6	6/6	6/6	6/6	24/24
4,9 x 10 ⁴	6/6	6/6	6/6	6/6	24/24
Gesamt	18/36	18/36	19/36	20/36	75/144

* Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale/Anzahl der untersuchten PCR-Ansätze

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

4.2.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen des Einmischversuches 5

Abbildung 14 zeigt die Amplifikationssignale des Real-Time PCR-Verfahrens der einzelnen Verdünnungsstufen der dekadischen Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6}) des Referenzstammes MAP 423 vor der artifiziellen Kontamination der Rinderkotprobe, die für den Einmischversuch 5 verwendet wurde. Die mit Hilfe der Zählkammer ermittelte ursprüngliche MAP-Ausgangskonzentration von $2,8 \times 10^7$ KbE/ml Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium konnte durch die kulturelle Anzucht auf dem Middlebrook 7H10-Festnährmedium bestätigt werden.

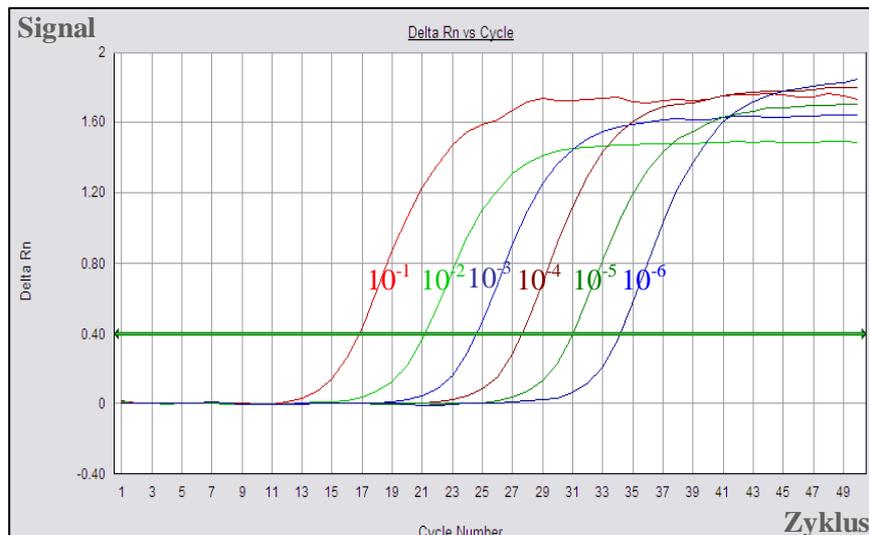


Abbildung 14: Einmischversuch 5 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Verwendung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423, Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6})

In Abbildung 15 ist die zugehörige Standardkurve der Verdünnungsreihe des Referenzstammes MAP 423 der Versuchsserie 5 dargestellt. Die Steigung der Geraden beträgt hier -3,32 und der Korrelationskoeffizient liegt ebenfalls bei $> 0,99$. Damit war auch diese Verdünnungsreihe geeignet für die artifizielle Kontamination der Rinderkotprobe.

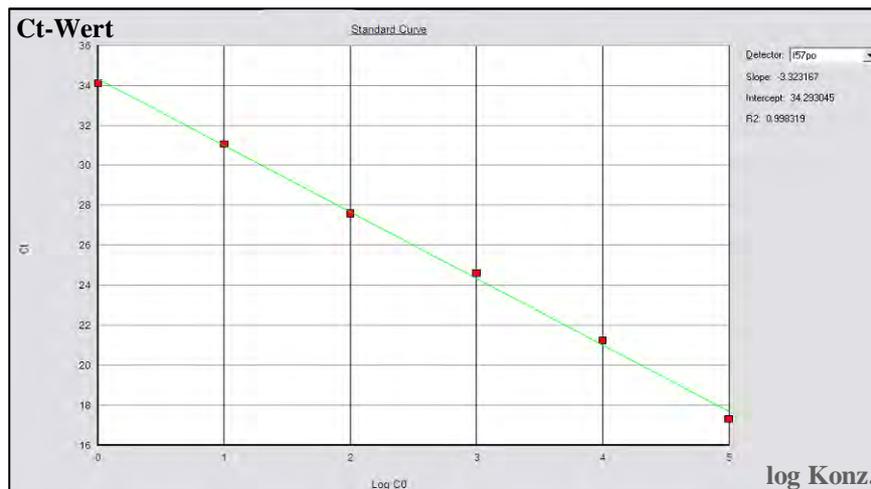


Abbildung 15: Einmischversuch 5 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes MAP 423

In der Tabelle 23 sind die Ct-Werte der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens – bezogen auf das jeweilige DNA-Extraktionsverfahren – des Einmischversuches 5A gelistet. Auch hier wurde nativer und artifiziell kontaminierter Rinderkot untersucht. Dabei lagen die Erregerkonzentrationen der kontaminierten Proben des Einmischversuches 5 bei $2,8 \times 10^0$ bis $2,8 \times 10^4$ KbE/g Rinderkot, was den Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-2} entsprach. Die positiven Fluoreszenzsignale der Real-Time PCR sind wiederum farbig in der Tabelle unterlegt.

In der Tabelle 24 sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Ct-Werte des Einmischversuches 5A des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens aufgeführt.

Analog können den Tabellen 25 und 26 die Ct-Werte der positiven Fluoreszenzsignale der Real-Time PCR bzw. Mittelwerte und Standardabweichungen der Ct-Werte des Einmischversuches 5B entnommen werden.

Tabelle 23:

Einmischversuch 5A – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)

gespikte Kotproben MAP KbE/g	Einmischversuch 5A											
	Protokoll Q			Protokoll Qm			Protokoll R			Protokoll Rm		
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,48**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ²	n.d.	n.d.	n.d.	37,43	36,59	37,01	38,24	37,81	38,89	38,02	37,43	37,53
2,8 x 10 ³	36,70	36,13	36,86	34,41	34,17	34,34	35,50	35,05	34,73	35,05	34,84	34,74
2,8 x 10 ⁴	32,75	33,20	32,68	30,61	30,76	30,71	31,76	31,69	31,76	31,36	31,26	31,28

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

** MAP-kontaminierte native Kotprobe, die sich in nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen als negativ erwies

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 24:

Einmischversuch 5A – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuch 5A								
gespikte Kotproben MAP KbE/g	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ²	n.d.	n.d.	37,01	0,34	38,31	0,44	37,66	0,26
2,8 x 10 ³	36,56	0,31	34,31	0,10	35,09	0,32	34,88	0,13
2,8 x 10 ⁴	32,88	0,23	30,69	0,06	31,74	0,03	31,30	0,04

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 25: Einmischversuch 5B – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)

gespikte Kotproben MAP KbE/g	Einmischversuch 5B											
	Protokoll Q			Protokoll Qm			Protokoll R			Protokoll Rm		
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32,24**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,62	n.d.	35,32	37,40	38,87	38,95
2,8 x 10 ²	36,33	37,81	36,08	35,92	35,05	35,13	37,19	35,61	36,27	35,55	36,17	34,73
2,8 x 10 ³	34,84	34,76	34,42	32,36	32,30	32,20	33,03	33,11	33,06	32,51	31,63	32,21
2,8 x 10 ⁴	30,54	30,71	30,45	28,33	28,52	28,68	29,54	29,41	29,61	28,91	28,76	28,54

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar
 ** MAP-kontaminierte native Kotprobe, die sich in nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen als negativ erwies
 Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 26: Einmischversuch 5B – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuch 5B								
gespikte Kotproben MAP KbE/g	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,89	0,00	n.d.	n.d.
2,8 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,97	1,65	38,41	0,71
2,8 x 10 ²	36,74	0,76	35,37	0,39	36,36	0,65	35,48	0,59
2,8 x 10 ³	34,67	0,18	32,29	0,07	33,07	0,03	32,12	0,37
2,8 x 10 ⁴	30,57	0,11	28,51	0,14	29,52	0,08	28,74	0,15

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar
 Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 27 fasst die Ergebnisse der Mittelwerte und Standardabweichungen der Einmischversuche 5A und 5B zusammen.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 5A und 5B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuche 5A und 5B								
gespikte Kotproben MAP KbE/g	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,8 x 100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,89	0,00	n.d.	n.d.
2,8 x 101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,97	1,65	38,41	0,71
2,8 x 102	36,74	0,76	36,19	0,37	37,34	0,55	36,57	0,42
2,8 x 103	35,62	0,25	33,30	0,08	34,08	0,17	33,50	0,25
2,8 x 104	31,72	0,17	29,60	0,10	30,63	0,06	30,02	0,10

n.d.: not detectable = nicht nachweisbar
 Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 28 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens sowie die Anzahl der jeweils durchgeführten PCR-Ansätze aus den Einmischversuchen 5A und 5B.

Tabelle 28: Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 5A und 5B sowie der jeweils durchgeführten PCR-Ansätze unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuche 5A und 5B					
gespikte Kotproben MAP KbE/g	Protokoll Q	Protokoll Qm	Protokoll R	Protokoll Rm	Gesamt
	0 (nativ)	0/6*	0/6	0/6	0/6
2,8 x 10 ⁰	0/6	0/6	1/6	0/6	1/24
2,8 x 10 ¹	0/6	0/6	2/6	3/6	5/24
2,8 x 10 ²	3/6	6/6	6/6	6/6	21/24
2,8 x 10 ³	6/6	6/6	6/6	6/6	24/24
2,8 x 10 ⁴	6/6	6/6	6/6	6/6	24/24
Gesamt	15/36	18/36	21/36	21/36	75/144

* Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale/Anzahl der untersuchten PCR-Ansätze
 Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

4.2.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen des Einmischversuches 6

Abbildung 16 zeigt die Amplifikationssignale des Real-Time PCR-Verfahrens der einzelnen Verdünnungsstufen der dekadischen Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6}) des MAP-Stammes J 27 (DSMZ-Nr. 44135) vor der artifiziellen Kontamination der Rinderkotprobe, die für den Einmischversuch 6 verwendet wurde. Auch bei Einmischversuch 6 wurde die mit Hilfe der Zählkammer ermittelte ursprüngliche MAP-Ausgangskonzentration von $3,5 \times 10^7$ KbE/ml Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium durch die kulturelle Anzucht auf dem Middlebrook 7H10-Festnährmedium bestätigt.



Abbildung 16: Einmischversuch 6 – Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time PCR unter Verwendung des Zielgens F57 (dekadische Verdünnungsreihe des MAP-Stammes J 27, Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6})

In Abbildung 17 ist die zugehörige Standardkurve der Verdünnungsreihe des MAP-Stammes J 27 des Einmischversuches 6 dargestellt. Die Steigung der Geraden beträgt hier -2,99 und der Korrelationskoeffizient liegt ebenfalls bei $> 0,99$. Damit war diese Verdünnungsreihe gleichermaßen geeignet für die artifizielle Kontamination der Rinderkotprobe.

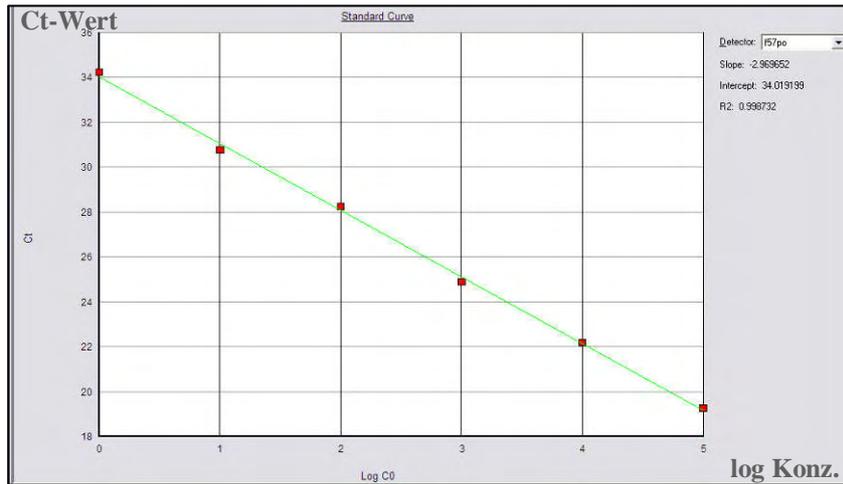


Abbildung 17: Einmischversuch 6 – Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes J 27

In der Tabelle 29 sind die Ct-Werte der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens – bezogen auf das jeweilige DNA-Extraktionsverfahren – des Einmischversuches 6A gelistet. Auch hier wurde nativer und artifizell kontaminierter Rinderkot untersucht. Dabei lagen die Erregerkonzentrationen bei Einmischversuch 6 bei $3,5 \times 10^0$ bis $3,5 \times 10^4$ KbE/g Rinderkot, was ebenfalls den Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-2} entspricht. Die positiven Fluoreszenzsignale der Real-Time PCR sind wiederum farblich in der Tabelle unterlegt.

In der Tabelle 30 sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Ct-Werte des Einmischversuches 6A des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens aufgeführt. Ebenso können den Tabellen 31 und 32 die Ct-Werte der positiven Fluoreszenzsignale der Real-Time PCR bzw. Mittelwerte und Standardabweichungen der Ct-Werte des Einmischversuches 6B entnommen werden.

Tabelle 29: Einmischversuch 6A – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)

gespikte Kotproben MAP KbE/g	Einmischversuch 6A											
	Protokoll Q			Protokoll Qm			Protokoll R			Protokoll Rm		
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$3,5 \times 10^0$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$3,5 \times 10^1$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$3,5 \times 10^2$	n.d.	n.d.	38,35	37,05	36,93	36,10	n.d.	37,42	37,63	36,48	35,74	36,90
$3,5 \times 10^3$	36,70	37,54	37,23	32,53	33,03	33,14	34,74	34,64	34,41	33,78	34,07	33,19
$3,5 \times 10^4$	33,11	33,48	33,32	29,74	29,33	29,34	30,93	30,86	30,95	29,72	29,64	29,48

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar
 Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
 Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
 R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
 Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 30:

Einmischversuch 6A – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuch 6A								
gespikte Kotproben MAP KbE/g	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ²	38,35	0,00	36,69	0,42	37,53	0,11	36,37	0,48
3,5 x 10 ³	37,16	0,35	32,90	0,27	34,60	0,14	33,68	0,37
3,5 x 10 ⁴	33,30	0,15	29,47	0,19	30,91	0,04	29,61	0,10

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 31:

Einmischversuch 6B – Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57; jeweils Dreifach-Ansatz)

gespikte Kotproben MAP KbE/g	Einmischversuch 6B											
	Protokoll Q			Protokoll Qm			Protokoll R			Protokoll Rm		
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ⁰	n.d.	37,32	n.d.	n.d.	n.d.	37,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ¹	n.d.	38,06	n.d.	n.d.	n.d.	37,25	n.d.	36,69	n.d.	n.d.	36,25	n.d.
3,5 x 10 ²	n.d.	n.d.	n.d.	34,28	33,64	32,86	35,32	35,92	35,01	33,44	33,87	35,35
3,5 x 10 ³	37,48	35,53	35,19	31,45	30,61	31,24	32,15	32,90	33,01	31,52	31,82	31,70
3,5 x 10 ⁴	31,13	31,21	31,25	27,58	27,31	26,93	28,87	29,43	29,14	27,65	27,96	27,79

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 32:

Einmischversuch 6B – Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuch 6B								
gespikte Kotproben	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
MAP KbE/g								
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ⁰	37,32	0,00	37,28	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ¹	38,06	0,00	37,25	0,00	36,69	0,00	36,25	0,00
3,5 x 10 ²	n.d.	n.d.	33,59	0,58	35,42	0,38	34,22	0,82
3,5 x 10 ³	36,07	1,01	31,10	0,36	32,69	0,38	31,68	0,12
3,5 x 10 ⁴	31,20	0,05	27,27	0,27	29,15	0,23	27,80	0,13

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 33 fasst die Ergebnisse der Mittelwerte und Standardabweichungen der Einmischversuche 6A und 6B zusammen.

Tabelle 33:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 6A und 6B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuche 6A und 6B								
gespikte Kotproben	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
MAP KbE/g								
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ⁰	37,32	0,00	37,28	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,5 x 10 ¹	38,06	0,00	37,25	0,00	36,69	0,00	36,25	0,00
3,5 x 10 ²	38,35	0,00	35,14	0,50	36,47	0,24	35,30	0,65
3,5 x 10 ³	36,61	0,68	32,00	0,31	33,64	0,26	32,68	0,24
3,5 x 10 ⁴	32,25	0,10	28,37	0,23	30,03	0,13	28,71	0,11

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 34 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens sowie die Anzahl der jeweils durchgeführten PCR-Ansätze aus den Einmischversuchen 6A und 6B.

Tabelle 34:

Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 6A und 6B unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuche 6A und 6B					
gespikte Kotproben	Protokoll Q	ProtokollQm	Protokoll R	Protokoll Rm	Gesamt
MAP KbE/g					
0 (nativ)	0/6*	0/6	0/6	0/6	0/24
3,5 x 10 ⁰	1/6	1/6	0/6	0/6	2/24
3,5 x 10 ¹	1/6	1/6	1/6	1/6	4/24
3,5 x 10 ²	1/6	6/6	5/6	6/6	18/24
3,5 x 10 ³	6/6	6/6	6/6	6/6	24/24
3,5 x 10 ⁴	6/6	6/6	6/6	6/6	24/24
Gesamt	15/36	20/36	18/36	19/36	72/144

* Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale/Anzahl der untersuchten PCR-Ansätze

- Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen
- Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll
- R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche
- Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Einmischversuche 4, 5 und 6

In Tabelle 35 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens für die vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren Q, Qm, R und Rm aus allen drei Einmischversuchen 4, 5 und 6 zusammengefasst. Dabei beziehen sich die Ergebnisse der Real-Time PCR auf den MAP-Marker F57. Die Tabelle zeigt bei allen DNA-Extraktionsverfahren einen kontinuierlichen Anstieg der Ct-Werte in Korrelation zu der dezimalen Reduktion der Erregerkonzentration. Im Vergleich der vier DNA-Extraktionsverfahren erzielten die modifizierten Verfahren Qm und Rm die niedrigeren Ct-Werte.

Tabelle 35:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$) der Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4, 5 und 6 unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Einmischversuche 4, 5 und 6								
gespikte Kotproben	Protokoll Q		Protokoll Qm		Protokoll R		Protokoll Rm	
MAP KbE/g**	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
0 (nativ)	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$3,7 \times 10^0$	37,32	0,00	37,28	0,00	38,64	0,00	n.d.	n.d.
$3,7 \times 10^1$	38,06	0,00	37,25	0,00	36,83	0,83	37,52	0,44
$3,7 \times 10^2$	37,54	0,45	36,26	0,37	37,18	0,36	35,56	0,45
$3,7 \times 10^3$	35,65	0,44	33,20	0,20	34,08	0,20	32,63	0,23
$3,7 \times 10^4$	31,55	0,20	29,57	0,17	30,55	0,08	28,99	0,09

* n.d.: not detectable = nicht nachweisbar

** Erregerkonzentration: \bar{x} aus drei Ansätzen $4,9 \times 10^x$; $2,8 \times 10^x$; $3,5 \times 10^x$

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

In Abbildung 18 sind die gemittelten Ct-Werte der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren aller drei Einmischversuche in einem Säulendiagramm dargestellt. Die Mittelwerte der erzielten Ct-Werte präsentieren Quantität und Qualität der isolierten DNA und spiegeln die Leistungsfähigkeit des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens wider. Aus dem Diagramm geht hervor, dass mit den Standard-Protokollen der Firmen Qiagen (Q) und Roche (R) im Vergleich zu den modifizierten Protokollen Qm und Rm durchgängig höhere Ct-Mittelwerte erzielt wurden, was auf den positiven Effekt einer mechanischen Aufreinigung der Proben schließen lässt. Weiterhin ist festzustellen, dass sowohl das Standard- als auch das modifizierte Extraktionsverfahren der Firma Roche zu niedrigeren gemittelten Ct-Werten führten.

Obwohl bei den Einmischversuchen 4 bis 6 bei der Kultivierung der verwendeten MAP-Isolate im Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium durch den Zusatz von Tween 80 die Nesterbildung von MAP erheblich reduziert wurde, waren in kleinerem Ausmaß Aggregate vorhanden. Dies kann insbesondere bei niedrigen Erregerkonzentrationen zu Nachweisverlusten von Erreger-DNA in der Real-Time PCR führen. Bei sehr niedrigen Erregerkonzentrationen von durchschnittlich $3,7 \times 10^0$ KbE/g Rinderkot ist daher eine zuverlässige Aussage über die Leistungsfähigkeit des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens nicht möglich.

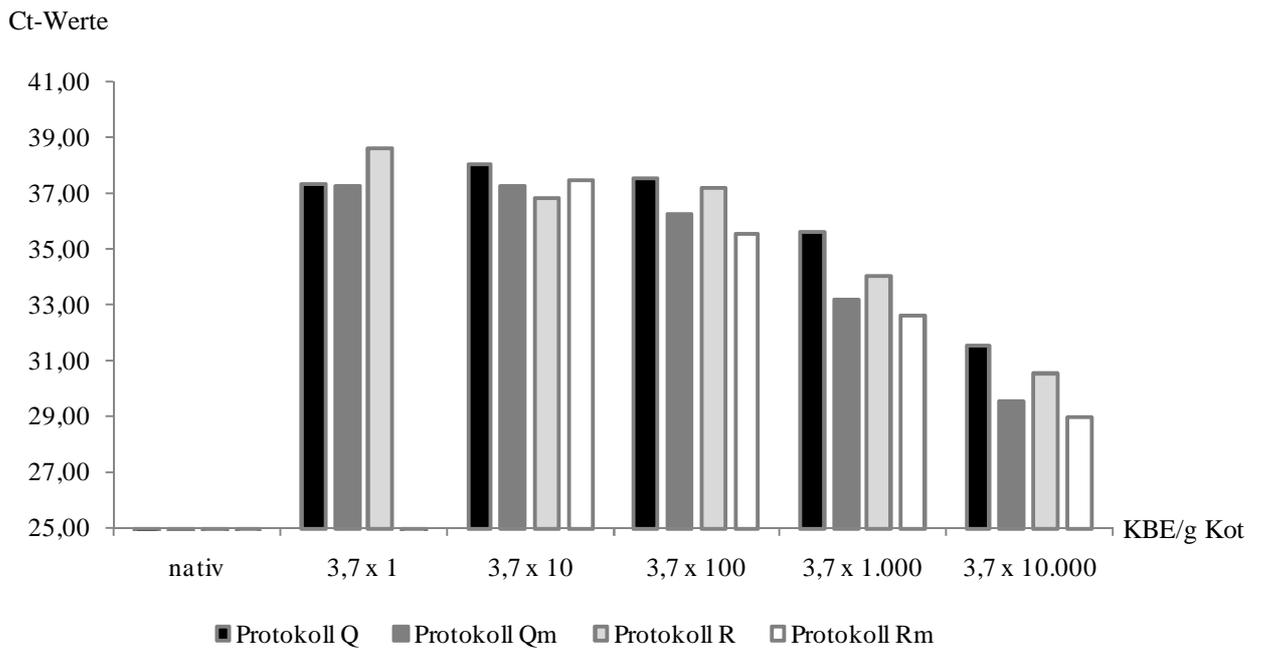


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Ergebnisse der gemittelten Ct-Werte des Real-Time PCR-Verfahrens aus den Einmischversuchen 4, 5 und 6 unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren

Der positive Effekt einer mechanischen Aufreinigung spiegelt sich auch in der Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale (Tabelle 36) der Real-Time PCR in artifiziiell kontaminierten Rinderkotproben wider. Mit den beiden modifizierten DNA-Extraktionsverfahren (Qm bzw. Rm) konnten 18 positive Fluoreszenzsignale von jeweils 18 PCR-Ansätzen bei einer durchschnittlichen Erregerkonzentration von $3,7 \times 10^2$ KBE/g Rinderkot erzielt (Tabelle 36) und damit eine **Nachweisrate von 100 %** ermittelt werden (Tabelle 37).

Tabelle 36: Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale des Real-Time PCR-Verfahrens der Einmischversuche 4, 5 und 6 sowie Anzahl der PCR-Ansätze unter Berücksichtigung der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

MAP-Konz. in KBE/g Kot*	positive Fluoreszenzsignale in der Real-Time PCR				
	$3,7 \times 10^0$	$3,7 \times 10^1$	$3,7 \times 10^2$	$3,7 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$
Protokoll Q	1/18**	1/18	10/18	18/18	18/18
Protokoll Qm	1/18	1/18	18/18	18/18	18/18
Protokoll R	2/18	3/18	17/18	18/18	18/18
Protokoll Rm	0/18	6/18	18/18	18/18	18/18

**Erregerkonzentration: x aus drei Ansätzen $4,9 \times 10^x$; $2,8 \times 10^x$; $3,5 \times 10^x$

* eine Probe von 18 Proben positiv

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Tabelle 37: Nachweisrate beim Einsatz der Real-Time PCR in Abhängigkeit von der MAP-Konzentration in Rinderkotproben unter Berücksichtigung der vier DNA- Extraktionsverfahren (MAP-Marker F57)

Nachweisrate (%) in der Real-Time PCR					
MAP-Konz. in KbE/g Kot*	3,7 x 10 ^{0**}	3,7 x 10 ¹	3,7 x 10 ²	3,7 x 10 ³	3,7 x 10 ⁴
Protokoll Q	5 %	5 %	55 %	100 %	100 %
Protokoll Qm	5 %	5 %	100 %	100 %	100 %
Protokoll R	11 %	16 %	94 %	100 %	100 %
Protokoll Rm	0 %	33 %	100 %	100 %	100 %

* Erregerkonzentration: x aus drei Ansätzen 4,9 x 10^x; 2,8 x 10^x; 3,5 x 10^x

Q: QIAamp DNA Stool Mini Kit Standard-Protokoll der Fa. Qiagen

Qm: QIAamp DNA Stool Mini Kit modifiziertes Protokoll

R: High pure PCR temp. Kit Standard-Protokoll der Fa. Roche

Rm: High pure PCR temp. Kit modifiziertes Protokoll

Wie bereits der Tabelle 37 ist auch der Abbildung 19 zu entnehmen, dass nur mit den beiden modifizierten DNA-Extraktionsverfahren (Qm bzw. Rm) bei einer durchschnittlichen Erregerkonzentration von 3,7 x 10² KbE/g Rinderkot eine **Nachweisrate von 100 %** erzielt werden konnte. In der Abbildung 19 erfolgte ein Vergleich der unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren des Hauptversuches I mit Hilfe der logistischen Regression (Programm: BMDPLR; Dixon, 1993). Gemäß der folgenden Modellgleichung konnten vier unterschiedliche Regressionsgleichungen für die Protokolle Q, Qm, R und Rm errechnet werden:

Modellgleichung:

$$y = \frac{1}{1 + e^{-(a+bx)}}$$

y: Nachweisrate der Real-Time PCR

a: Konstante

b: exponentieller Steigungskoeffizient

Ergebnisse der Modellanpassung (logistische Regressionsgleichungen) für die 4 DNA-Extraktionsverfahren des Hauptversuches I:

Protokoll Q:
$$y = \frac{1}{1 + e^{-(-6,330+2,634x)}}$$

Protokoll Qm:
$$y = \frac{1}{1 + e^{-(-8,765+4,541x)}}$$

Protokoll R:
$$y = \frac{1}{1 + e^{-(-5,068 + 2,754x)}}$$

Protokoll Rm:
$$y = \frac{1}{1 + e^{-(-14,400 + 8,741x)}}$$

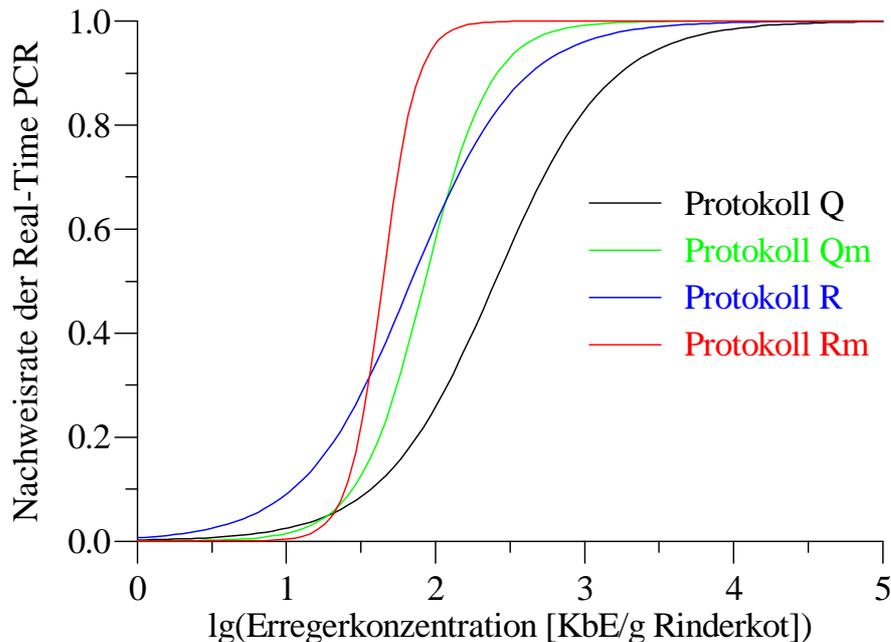


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Resultate der logistischen Regression für die Nachweisrate der Real-Time PCR in Abhängigkeit der MAP-Konzentrationen in Rinderkotproben unter Berücksichtigung der vier DNA-Extraktionsverfahren

Abbildung 19 zeigt, dass die Regressionskurven der Protokolle Qm und Rm, bei denen die untersuchten Rinderkotproben einer zusätzlichen mechanischen Aufreinigung unterzogen wurden, mit exponentiellen Steigungskoeffizienten von $b = 4,541$ und $b = 8,741$ besonders steil verlaufen und sich entsprechend schnell insbesondere bei der Erregerkonzentration von durchschnittlich 10^2 KbE/g Rinderkot dem Wert 1 annähern. Bei dem Vergleich der beiden modifizierten Protokolle Qm und Rm verläuft die Regressionskurve des Protokolls Rm mit einem exponentiellen Steigungskoeffizienten von $b = 8,741$ steiler als die Regressionskurve des Protokolls Qm mit einem exponentiellen Steigungskoeffizienten von $b = 4,541$. Anhand der Regressionskurven konnte somit deskriptiv beobachtet werden, dass die zusätzliche mechanische Aufbereitung der Fäzesproben einen positiven Effekt auf die Nachweisrate der Real-Time PCR hat.

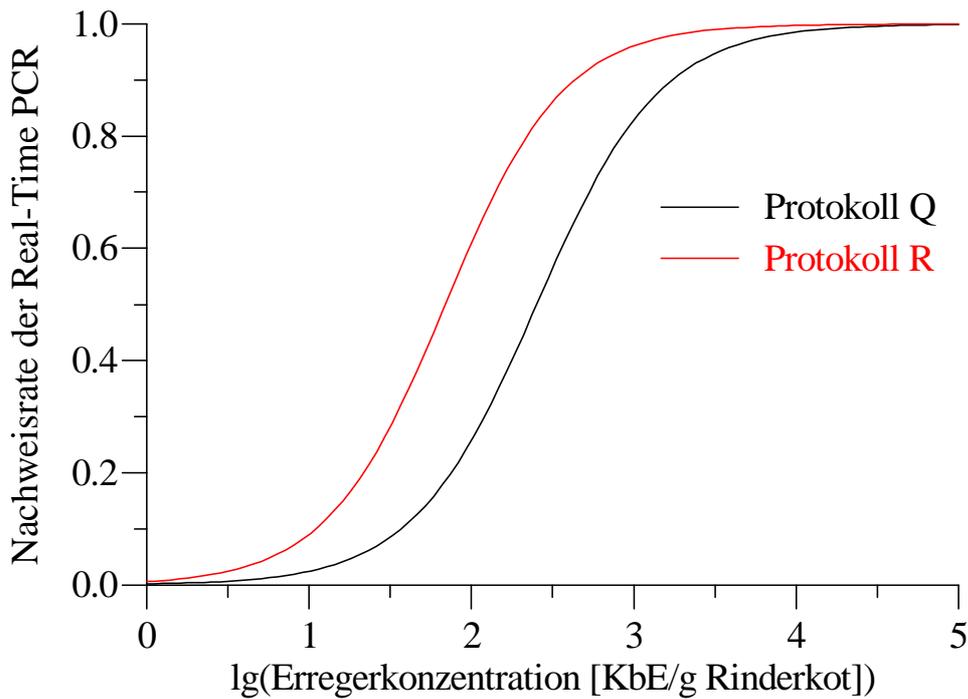


Abbildung 20: Graphische Darstellung der logistischen Regressionskurven für die Nachweisrate der Real-Time PCR in Abhängigkeit der MAP-Konzentrationen in Rinderkotproben unter Berücksichtigung der Standard-DNA-Extraktionsverfahren Q und R

In Abbildung 20 erfolgte ein Vergleich der Standard-DNA-Extraktionsverfahren Q und R mittels logistischer Regression. Die Berechnungen der logistischen Regression (Programm: BMDPLR; Dixon, 1993) ergaben unter Berücksichtigung der Protokolle Q und R einen signifikanten Unterschied ($p = 0,037$). Ein wesentliches Differenzierungsmerkmal dieser beiden DNA-Extraktionsverfahren ist die variierende Koteinwaage pro PCR-Ansatz. Bei dem Protokoll Q wurden pro PCR-Ansatz lediglich 220 mg gespikter Rinderkot für die DNA-Extraktion eingewogen, während bei dem Protokoll R 1,5 g Rinderkot verwendet wurden. Je größer die Koteinwaage für die DNA-Extraktion ist, desto größer ist auch die Nachweiswahrscheinlichkeit des Erregers in den Rinderkotproben. Auch bei den modifizierten DNA-Extraktionsverfahren Qm und Rm wurden mit 1 g (Qm) bzw. 1,5 g (Rm) Rinderkot höhere Koteinwaagen verwendet. Aufgrund der hier dargestellten Regressionsgleichungen sowie den Berechnungen der logistischen Regression kann davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte Koteinwaage beim Nachweis von MAP aus Rinderkot von Vorteil ist.

4.3 Ergebnisse des Hauptversuches II

4.3.1 Ergebnisse der kulturellen Anzuchtung der Rinderkotproben

Da der kulturelle Erregernachweis aus Rinderkot bislang als „gold standard“ der Paratuberkulose-Diagnostik gilt, werden entsprechende kulturelle Untersuchungsergebnisse der nativen Rinderkotproben zu Beginn des Kapitels 4.3 dargestellt. Sie dienen als Referenz für die molekularbiologischen und mikroskopischen Untersuchungen der nativen Rinderkotproben.

Bei den nativen Rinderkotproben (n = 206) handelte es sich um Kotproben klinisch auffälliger Milchrinder aus Paratuberkulose-Problembeständen und/oder um Proben von Milchrindern, die mit unterschiedlichen, teilweise auch mehreren Nachweisverfahren der Paratuberkulose von anderen Institutionen voruntersucht wurden. Entsprechende mikroskopische, milch- und blutserologische, kulturelle sowie molekularbiologische Voruntersuchungen der einzelnen Milchrinder können Tabelle 43 in Kapitel 8.2 des Anhangs dieser Arbeit entnommen werden. Ein Vergleich der Ergebnisse der eigenen – im Hauptversuch II als „gold standard“ anzusehenden – kulturellen Untersuchungen der 206 nativen Rinderkotproben mit den Ergebnissen des jeweiligen MAP-Nachweisverfahrens der Voruntersuchungen ist in Tabelle 38 dargestellt. Zu beachten ist dabei, dass die Kotproben teilweise mit unterschiedlichen Nachweisverfahren gleichzeitig voruntersucht und deshalb entsprechend den jeweiligen Nachweisverfahren mehrfach statistisch berücksichtigt wurden.

Zudem wird deutlich, dass die kulturellen Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mit denen der Voruntersuchungen nahezu vollständige übereinstimmen, während die größten Ergebnisabweichungen gegenüber den serologischen Untersuchungen (Milch- und Blut-ELISA) zu verzeichnen waren.

Tabelle 38: Übereinstimmung der Ergebnisse der eigenen kulturellen Untersuchungen der nativen Rinderkotproben (n = 206) mit den Ergebnissen der unterschiedlichen Nachweisverfahren der Voruntersuchungen

Nachweisverfahren der Voruntersuchungen	Anzahl der Rinderkotproben (gesamt, n = 206)				Summe
	positiv	negativ	falsch-positiv	falsch-negativ	
Kotkultur	79	39	0	1	119
Blut-ELISA	16	77	10	8	111
Milch-ELISA	3	22	7	8	40
PCR	9	1	0	7	17
Ziehl-Neelsen-Färbung	5	0	1	1	7

Wie Abbildung 21 zu entnehmen ist, erwiesen sich bei den eigenen kulturellen Untersuchungen insgesamt **95** Kotproben als Kultur-positiv und **111** Kotproben als Kultur-negativ. Unter den 95 positiven Kotproben konnten **30** geringgradig, **18** mittelgradig und **47** hochgradig MAP-ausscheidende Tiere identifiziert werden.

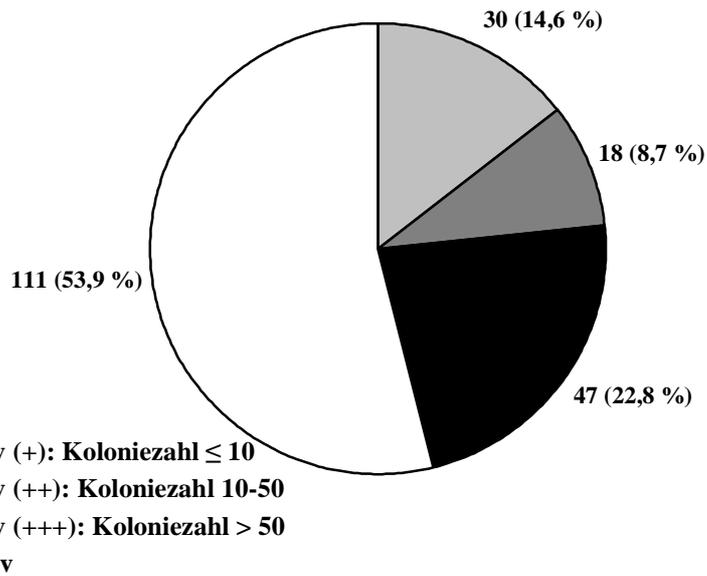


Abbildung 21: Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206); Anzahl der Kultur-positiven (+, ++, +++) und -negativen Kotproben

Die durchschnittliche Kultivierungszeit bis zur makroskopischen Erkennung von MAP-Kolonien (Time To Detection/TTD) auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium aller 95 positiven Rinderkotproben betrug **4,0** Wochen. Die durchschnittliche TTD der 30 geringgradig MAP ausscheidenden Tiere lag bei **4,6** Wochen, die TTD der 18 mittelgradigen Ausscheider lag bei **4,0** Wochen und die der 47 hochgradig MAP ausscheidenden Tiere bei **3,6** Wochen (Abbildung 22).

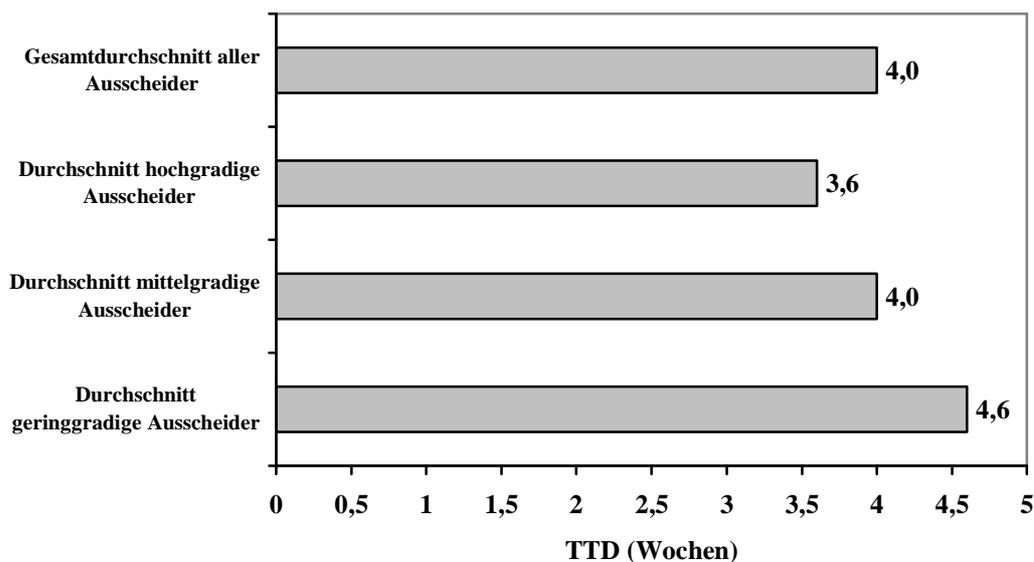


Abbildung 22: Durchschnittliche Kultivierungszeit bis zum Wachstum von MAP-Kolonien (Time To Detection/TTD) auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium der gering-, mittel- und hochgradig MAP-ausscheidenden Rinder sowie aller Ausscheider

Um eine langfristige Kultivierung der Rinderkotproben auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium gewährleisten zu können, wurden die Kotproben gemäß den Angaben in Kapitel 3.2.3.2 im Vorfeld dekontaminiert. Die Anzahl der kontaminierten Medien bezogen auf die jeweilige Kultivierungswoche ist Tabelle 39 zu entnehmen. Dabei ist weiterhin die Anzahl der kontaminierten Medien einer Einzelprobe (A- und/oder B-Ansatz) zu berücksichtigen (s. Abbildung 23).

Tabelle 39: Anzahl der kontaminierten Kulturansätze auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium der 206 Rinderkotproben unter Berücksichtigung der Kultivierungsdauer

Anzahl der kont. Proben	Kultivierungszeit in Wochen															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A- oder B-Ansatz kont.	-	-	-	4	4	1	-	4	1	3	-	5	1	1	3	2
A- und B-Ansatz kont.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	1	-	2

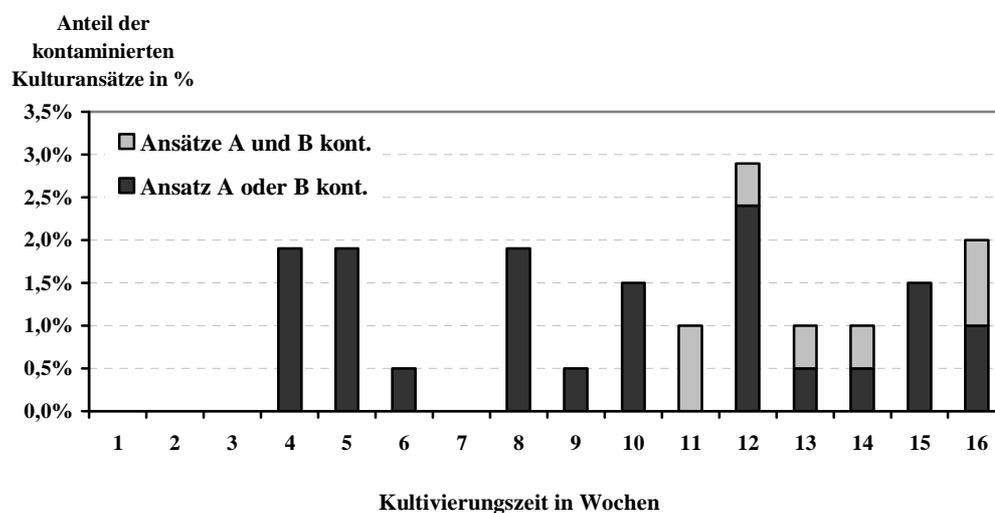


Abbildung 23: Anteil der kontaminierten Kulturansätze (n = 43) auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium (in %) der 206 Rinderkotproben unter Berücksichtigung der Kultivierungsdauer

Wie Tabelle 39 und Abbildung 23 zu entnehmen ist, sind Kontaminationen beider kultureller Ansätze A und B der einzelnen Rinderkotproben nur in der 11. bis 16. Woche aufgetreten. In den Kultivierungswochen 4, 5, 6, 8, 9 und 10 war jeweils nur einer der Kulturansätze A oder B der einzelnen Rinderkotproben kontaminiert, so dass bei diesen Kotproben eine Auswertung

uneingeschränkt erfolgen konnte. Von insgesamt 412 verwendeten Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedien waren 43 während einer Kultivierungsdauer von 16 Wochen kontaminiert. Daraus ergab sich, bezogen auf alle Kulturansätze, eine **Kontaminationsrate von 10,4 %**.

Alle MAP-Isolate aus den untersuchten Rinderkotproben wurden molekularbiologisch bestätigt, subkultiviert und als Lyophilisat und Gefrierkultur gemäß den Angaben in Kapitel 3.2.6.1 und 3.2.6.2 archiviert.

4.3.2 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen der Rinderkotproben

Der mikroskopische Nachweis von MAP aus den Rinderkotproben (n = 206) erfolgte mittels Ziehl-Neelsen-Färbung gemäß den Angaben in Kapitel 3.2.2. Wie aus Tabelle 40 hervorgeht, waren in **37** von 95 Kultur-positiven Rinderkotproben leuchtend-rot angefärbte, säurefeste Stäbchen in Nestern nachweisbar, in **105** Kultur-negativen Rinderkotproben hingegen nicht. Somit wurden im Vergleich zur kulturellen Anzucht **6** der Rinderkotproben falsch-positiv und **58** falsch-negativ detektiert. Unter den 58 mikroskopisch falsch-negativ detektierten Rinderkotproben befanden sich **24** geringgradig, **14** mittelgradig und **20** hochgradig MAP-ausscheidende Milchrinder. In Abbildung 24 sind die mikroskopischen Ergebnisse der 206 untersuchten Rinderkotproben im Vergleich zu den Ergebnissen der kulturellen Untersuchungen bildlich dargestellt.

Tabelle 40: Übersicht der Ergebnisse der mikroskopischen und kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich

	Kultur-positive Proben	Kultur-negative Proben	Summe
Ziehl-Neelsen-Färbung – positive Proben	37 (38,9 %) richtig-positiv	6 (5,4 %) falsch-positiv	43
Ziehl-Neelsen-Färbung – negative Proben	58 (61,1 %) falsch-negativ	105 (94,6 %) richtig-negativ	163
Summe	95	111	206

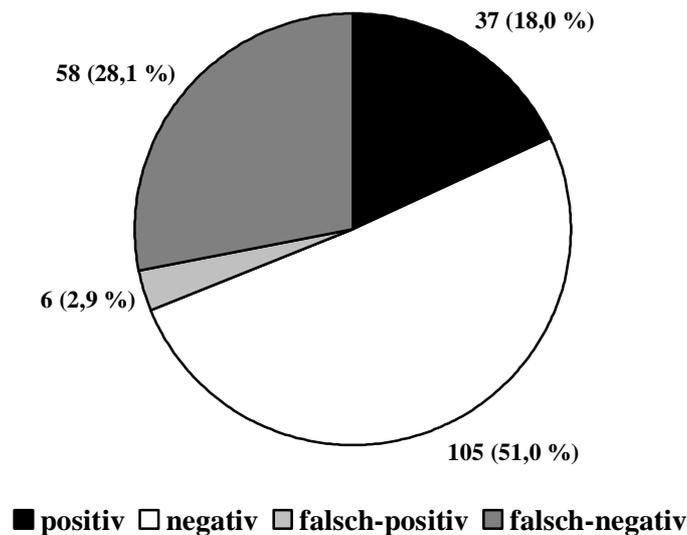


Abbildung 24: Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich zu den kulturellen Untersuchungen

In Bezug auf die kulturellen Untersuchungsergebnisse der 206 Rinderkotproben konnte für den mikroskopischen Nachweis von MAP mittels Ziehl-Neelsen-Färbung eine Sensitivität von 39,0 % ermittelt werden. Allerdings kann durch die mikroskopische Untersuchung von Rinderkotproben keine endgültige Differenzierung nachgewiesener säurefester Stäbchenbakterien und damit auch keine Aussage über die Spezifität dieses Verfahrens zum Nachweis von MAP getroffen werden, da mikroskopisch falsch-positiv detektierte Proben durchaus non-MAP Mykobakterien enthalten können.

Der errechnete **Kappa-Index**, der ein Maß für die Übereinstimmung der Ergebnisse des mikroskopischen und kulturellen Nachweisverfahrens darstellt, beträgt **0,35**. Dieser niedrige Kappa-Wert verdeutlicht die nur schwache Übereinstimmung der Ergebnisse dieser beiden Nachweisverfahren von MAP aus Rinderkot (Sachs, 1992).

Um die Abhängigkeit der beiden Nachweisverfahren zu überprüfen, wurde der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest (Programm: BiAS; Ackermann, 1998) angewendet. Die Berechnungen ($\text{Chi}^2 = 4,87$; $p < 0,0001$) zeigen eine signifikante Abhängigkeit der Nachweisverfahren auf.

Um festzustellen, ob sich die Häufigkeiten der beiden Nachweisverfahren trotzdem signifikant unterscheiden und nicht nur zufällige Ergebnisschwankungen vorliegen, wurde als weiterer statistischer Test der McNemar-Test (Programm: BiAS; Ackermann, 1998) herangezogen. Er spiegelt die Signifikanz des abweichenden Erregernachweises der beiden Verteilungen in Tabelle 40 wider. Die Berechnungen zeigen eine hochsignifikante Abweichung der Ergebnisse ($p < 0,0001$) der beiden Nachweisverfahren auf.

4.3.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der Rinderkotproben

Die molekularbiologische Untersuchung der Rinderkotproben erfolgte mit zwei unterschiedlichen PCR-Systemen, dem TaqMan® Real-Time PCR-Verfahren (Schönenbrücher et al., 2008) zur Detektion der spezifischen MAP-Marker F57 und IS*Mav2* sowie einem nested-PCR-Verfahren (Bull et al., 2003) basierend auf dem Insertionselement IS*900*. Insgesamt wurden somit drei unterschiedliche MAP-spezifische Marker zum molekularbiologischen Nachweis des Erregers in nativen Rinderkotproben herangezogen.

A) Ergebnisse der Real-Time PCR

Tabelle 41 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Real-Time PCR im Vergleich zu den kulturellen Ergebnissen der nativen Rinderkotproben (n = 206). In Übereinstimmung mit den kulturellen Ergebnissen detektierte das Real-Time PCR-Verfahren **87** Kotproben positiv und **111** Proben negativ, wohingegen **8** Proben falsch-negativ und keine Probe falsch-positiv ermittelt wurden. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse des Real-Time PCR-Verfahrens in Bezug auf die Ergebnisse des kulturellen Nachweises graphisch dargestellt.

Tabelle 41: Übersicht der Ergebnisse der Real-Time PCR und der kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich

	Kultur-positive Proben	Kultur-negative Proben	Summe
Real-Time PCR – positive Proben	87 (91,6 %) richtig-positiv	0 (0,0 %) falsch-positiv	87
Real-Time PCR – negative Proben	8 (8,4 %) falsch-negativ	111 (100,0 %) richtig-negativ	119
Summe	95	111	206

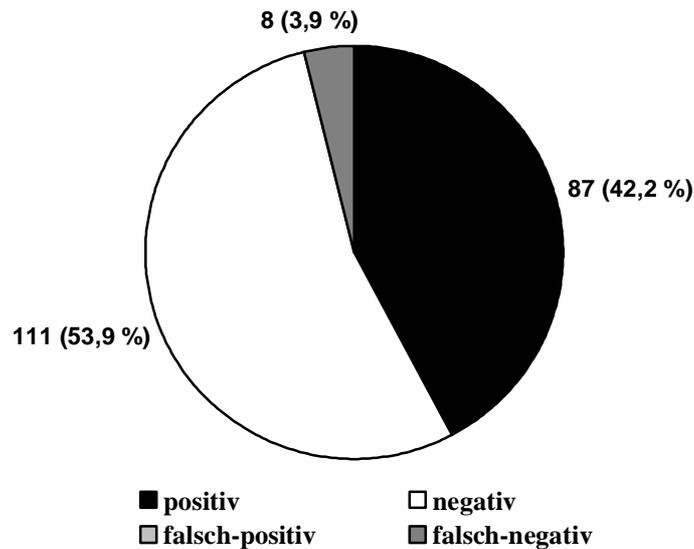


Abbildung 25: Ergebnisse der Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) mittels Real-Time PCR im Vergleich zu den kulturellen Untersuchungen

In Bezug auf die kulturellen Untersuchungsergebnisse der 206 Rinderkotproben konnte für das Real-Time PCR-Verfahren eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 91,6 % ermittelt werden.

Der errechnete **Kappa-Index** betrug bei dem Vergleich der Ergebnisse der Real-Time PCR mit denen der Kotkultur **0,92**. Dieser hohe Kappa-Wert verdeutlicht eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse dieser beiden Nachweisverfahren (Sachs, 1992).

Auch hier konnte mit dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest aufgrund der Berechnungen ($\text{Chi}^2 = 175,97$; $p < 0,0001$; Programm: BiAS; Ackermann, 1998) die Abhängigkeit der beiden Nachweisverfahren festgestellt werden.

Weiterhin wurde der McNemar-Test (Programm: BiAS; Ackermann, 1998) herangezogen, um sicherzustellen, dass sich die Untersuchungsergebnisse der beiden Nachweisverfahren signifikant unterscheiden und nicht nur zufällige Ergebnisschwankungen vorliegen. Die Berechnungen zeigen ($p = 0,0078$) eine signifikante Abweichung der Ergebnisse der beiden Nachweisverfahren auf und schließen einen rein zufälligen Unterschied der Ergebnisse mit großer Sicherheit aus.

B) Ergebnisse der nested-PCR

In Tabelle 42 sind die Ergebnisse der nested-PCR im Vergleich zu den kulturellen Ergebnissen der nativen Rinderkotproben (n = 206) dargestellt. In Übereinstimmung mit den kulturellen Ergebnissen detektierte das nested-PCR-Verfahren **80** Kotproben positiv und **111** Proben negativ. **15** Proben wurden falsch-negativ und keine Probe falsch-positiv detektiert. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse

des nested-PCR-Verfahrens in Bezug auf die Ergebnisse des kulturellen Nachweises graphisch dargestellt.

Tabelle 42: Übersicht der Ergebnisse der nested-PCR und der kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) im Vergleich

	Kultur-positive Proben	Kultur-negative Proben	Summe
nested-PCR – positive Proben	80 (84,2 %) richtig positiv	0 (0,0 %) falsch positiv	80
nested-PCR – negative Proben	15 (15,2 %) falsch-negativ	111 (100,0 %) richtig negativ	126
Summe	95	111	206

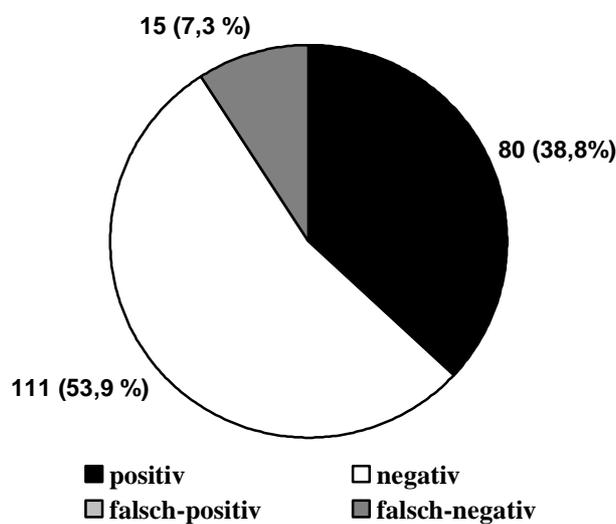


Abbildung 26: Ergebnisse der Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) mittels nested PCR im Vergleich zu den kulturellen Untersuchungen

In Bezug auf die kulturellen Untersuchungsergebnisse der 206 Rinderkotproben konnte für das nested-PCR-Verfahren eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 84,2 % ermittelt werden.

Der errechnete **Kappa-Index** betrug bei dem Vergleich der Ergebnisse der nested-PCR mit denen der Kotkultur **0,59**. Dieser Kappa-Wert verdeutlicht eine starke Übereinstimmung der Ergebnisse dieser beiden Nachweisverfahren (Sachs, 1992).

Um eine signifikante Abhängigkeit der beiden Nachweisverfahren zu bestätigen, wurde auch hier der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest (Programm: BiAS; Ackermann, 1998) angewendet. Die Berechnungen ($\text{Chi}^2 = 152,82$; $p < 0,0001$) zeigen eine signifikante Abhängigkeit der Nachweisverfahren auf.

Die Berechnungen des McNemar-Testes ($p = 0,0003$; Programm: BiAS; Ackermann, 1998) zeigen auch hier eine signifikante Abweichung der Ergebnisse der beiden Nachweisverfahren auf und schließen einen rein zufälligen Unterschied der Ergebnisse mit großer Sicherheit aus.

Die Abbildung 27 zeigt vergleichend die mit dem jeweiligen Nachweisverfahren detektierten hochgradig (> 100 Kolonien), mittelgradig (10-50 Kolonien) und geringgradig (< 10 Kolonien) MAP-ausscheidenden Rinder. Das Real-Time PCR-Verfahren konnte sämtliche hoch- und mittelgradige Ausscheider nachweisen, während 8 geringgradig MAP-ausscheidende Rinder nicht erfasst wurden. Mit dem nested-PCR-Verfahren konnten 2 hoch-, 1 mittel- und 12 geringgradige Ausscheider nicht festgestellt werden.

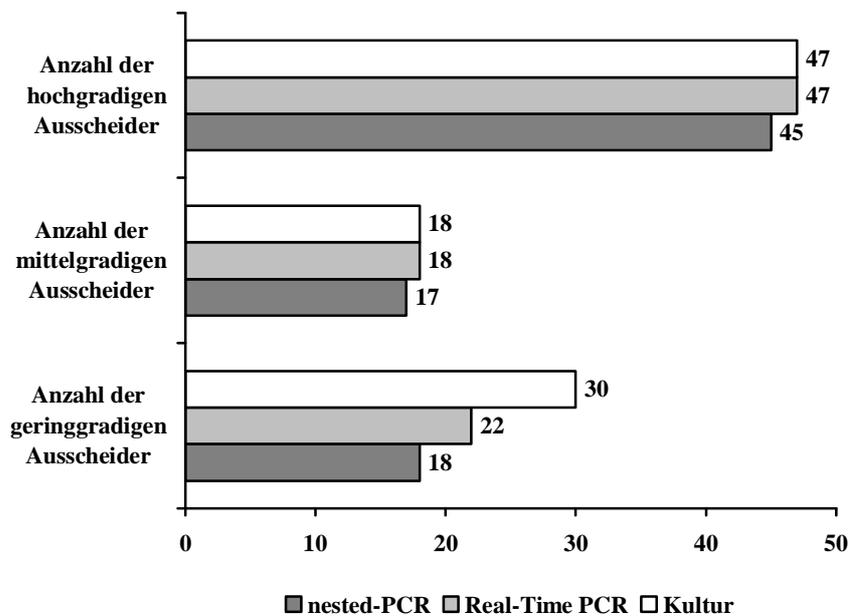


Abbildung 27: Vergleich der mittels kultureller Anzucht, Real-Time PCR und nested-PCR ermittelten gering-, mittel- und hochgradig MAP-ausscheidenden Tiere

5 DISKUSSION

Die Paratuberkulose ist eine weltweit verbreitete, bislang unheilbare Erkrankung der Haus-, Zoo- und Wildwiederkäuer, die in der Regel tödlich verläuft und im landwirtschaftlichen Sektor zu erheblichen finanziellen Verlusten führt. Die diagnostischen Möglichkeiten bei mit MAP infizierten Tieren sind aufgrund der spezifischen Pathogenese der Paratuberkulose begrenzt. Der derzeit als „gold standard“ geltende kulturelle Nachweis des Erregers (Chiodini et al., 1984a; Hietala, 1992; Collins et al., 1993) ist aufgrund der langen Anzuchtdauer von bis zu 16 Wochen bei gleichzeitig hohen Kosten und der Kontaminationsgefahr der Nährmedien problematisch. Erschwerend kommt hinzu, dass persistent infizierte, klinisch unauffällige Rinder, die MAP jahrelang intermittierend mit dem Kot ausscheiden, selbst bei wiederholten kulturellen Kotuntersuchungen als falsch-negativ detektiert werden können (Köhler et al., 2005).

Der direkte mikroskopische Erregernachweis aus Rinderkot mittels Ziehl-Neelsen-Färbung gelingt meist erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und ist, ebenso wie der kulturelle Nachweis, aufgrund der intermittierenden Ausscheidung des Erregers mit dem Kot nicht immer möglich.

Auch der serologische Nachweis von MAP ist mit Schwierigkeiten verbunden, da der Erreger oftmals von Rindern, die sich in der klinisch inapparenten Phase der Erkrankung befinden, intermittierend mit dem Kot ausgeschieden wird, bevor eine Serokonversion nachweisbar ist. Hinzu kommt, dass die in der blutserologischen Diagnostik eingesetzten ELISA-Systeme im Hinblick auf ihre Sensitivität und Spezifität zum Teil erheblich differieren (Köhler, 2005).

Vor dem Hintergrund dieser Schwierigkeiten bei der Paratuberkulosedagnostik in Rinderbeständen kommt den molekularbiologischen Nachweisverfahren eine besondere Bedeutung zu (Stephan, 2007). Die PCR-Technologie ermöglicht einerseits die frühzeitige Bestätigung des mikrobiologischen Befundes und erlaubt andererseits die Analyse unterschiedlicher Probenmatrizes wie Rinderkot ohne zeitintensive Voranreicherung (Collins et al., 1993; Fang et al., 2002). Hier finden überwiegend PCR-Verfahren auf Basis der repetitiven DNA-Insertionssequenz IS900 Verwendung (Kim et al., 2002; Bull et al., 2003). Allerdings konnten in den letzten Jahren nicht nur Homologien zwischen IS900 und verschiedenen anderen Insertionselementen wie IS110 von *Streptomyces coelicolor*, IS116 von *Streptomyces clavuligerus* sowie IS902 von *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* nachgewiesen werden (Green et al., 1989), sondern auch Kreuzreaktionen mit anderen non-MAP-Mykobakterien, die zu falsch-positiven Ergebnissen in der molekularbiologischen Diagnostik führten (Cousin et al., 1999; Englund et al., 2002; Fang et al., 2002; Kim et al., 2002; O'Mahony und Hill, 2002; Khare et al., 2004; O'Mahony et al., 2004; Vansnick et al., 2004). Demgegenüber sind die Zielregionen ISMav2 und F57 mehrfach als geeignet für den spezifischen MAP-Nachweis beschrieben worden (Poupart et al., 1993; Strommenger et al., 2001; Godfroid et al., 2005; Bosshard et al., 2006; Schönenbrücher et al., 2008).

Gegenüber konventionellen PCR-Verfahren weisen Real-Time PCR-Verfahren diverse Vorteile auf. Die Real-Time PCR ermöglicht nicht nur einen qualitativen, sondern gleichzeitig auch einen

quantitativen Erregernachweis. Des Weiteren sinkt die Kontaminationsgefahr der Proben erheblich, da die Probengefäße während der Untersuchung nicht geöffnet werden müssen. Zusätzlich besitzen TaqMan® Real-Time PCR-Verfahren durch das Mitführen der TaqMan® Sonde als drittes spezifisches Oligonukleotid eine höhere analytische Spezifität. Aber auch der Arbeitsaufwand reduziert sich, da keine aufwändige Agargelelektrophorese im Anschluss an den PCR-Lauf erforderlich ist.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein institutseigenes TaqMan® Real-Time PCR-Verfahren basierend auf den MAP-Markern F57 und IS*Mav*2 zum Nachweis von MAP aus Rinderkot verwendet. Weiterhin wurde eine interne Amplifikationskontrolle (IAK) mitgeführt, um falsch-negative Ergebnisse ausschließen zu können. Das Mitführen einer IAK bei einer diagnostischen PCR ist dringend zu fordern. Allerdings weisen bislang die meisten PCR-Systeme keine IAK auf (Stephan, 2007).

Im optimalen Fall erfolgt die PCR-Diagnostik Matrix-unabhängig. Die gesuchte Erreger-DNA wird dabei aus Subkulturen verdächtiger Erregerkolonien, die möglichst als Reinkultur vorliegen sollten, extrahiert. Allerdings ist diese Vorgehensweise bei der Paratuberkulose hinfällig, da aus Kot isolierte MAP-Reinkulturen erst nach mehreren Monaten vorliegen würden. Verschiedene Labore empfehlen eine Kombination von Kotkultur und PCR-Bestätigung (Klarmann und Moss, 2006). Dabei wird frühestens in der 6. Woche der Kultivierung eine Spülung der Medien vorgenommen und die Spülflüssigkeit molekularbiologisch auf das Vorkommen von MAP untersucht. Damit ist die Untersuchung zwar unabhängig von der Matrix, doch liegen die Untersuchungsergebnisse erst nach 6 Wochen vor und durch kontaminierte Medien können Verluste auftreten. Wesentlich schneller, kostengünstiger und unabhängig von Kontaminationen der Medien ist der molekularbiologische Nachweis des Erregers direkt aus der Matrix Rinderkot. Demzufolge konzentrierte sich diese Arbeit auf die Validierung des institutseigenen TaqMan® Real-Time PCR-Verfahrens für den Direktnachweis von MAP aus Rinderkot.

5.1 Analyse des Vorversuches (Einmischversuche 1, 2 und 3)

Das Ziel des Vorversuches (Einmischversuche 1, 2 und 3) war die Bestimmung der Nachweisrate des institutseigenen TaqMan® Real-Time PCR-Verfahrens für die Matrix Rinderkot in Bezug auf die Erregerkonzentration. Eigene Voruntersuchungen von nativen Rinderkotproben haben gezeigt, dass sich der Marker F57 besonders gut für den Nachweis von MAP aus Rinderkot eignet. Deshalb wurden bei den molekularbiologischen Untersuchungen des Vorversuches sowie des Hauptversuches I nur die Ergebnisse des Markers F57 berücksichtigt.

Der molekularbiologische Nachweis von MAP aus Rinderkot stellt eine Herausforderung dar, da diese Matrix mit zahlreichen PCR-Inhibitoren belastet ist (Al-Soud und Radström, 1998). Für die erfolgreiche Anwendung von PCR-Verfahren sind geeignete DNA-Extraktionsverfahren von herausragender Bedeutung (Harris und Barleta, 2001). DNA-Extraktionsverfahren nehmen in hohem

Maße Einfluss auf die Nachweisrate eines PCR-Systems (Harris und Barletta, 2001). Zu den PCR-Inhibitoren im Rinderkot zählt insbesondere die Phytinsäure, die bereits in Mengen von 0,4 mM PCR-Amplifikationsreaktionen vollständig hemmen kann (Thronton und Passen, 2004). Weiterhin weisen Polyphenole, Polysaccharide und Hämin, ein Derivat des Blutfarbstoffes Hämoglobin, sowie deren Abbauprodukte (Bilirubin bzw. Gallensalze) einen inhibitorischen Effekt gegenüber PCR-relevanten Enzymen wie der DNA-Polymerase und Restriktionsenzymen auf (Do und Adams, 1992; Demeke und Adams, 1992; Akane et al., 1994; Monteiro et al., 1997; Al-Soud und Radström, 2001).

a) DNA-Extraktionsverfahren

Vor diesem Hintergrund wurde zu Beginn der Untersuchungen bei den **Einmischversuchen 1, 2 und 3** ein häufig in der Literatur beschriebenes und weiterempfohlenes Standard-Kitsystem der Firma Qiagen (QIAamp DNA Stool Mini Kit[®]) zur DNA-Extraktion aus Rinderkot herangezogen (Le Tallec et al., 2002; O'Mahony und Hill, 2002). Bei der DNA-Isolierung unterscheidet man zwischen **chemischen, thermischen** und **mechanischen Aufbereitungsschritten** der Proben, durch die zum einen die in der Matrix enthaltenen Inhibitoren gezielt entfernt und zum anderen die Erreger-DNA in möglichst hochwertiger Qualität aus der Matrix isoliert werden kann. Bei dem Standard-Kitsystem Q der Firma Qiagen handelt es sich um ein rein **chemisch-thermisches Extraktionsverfahren**. Die **chemische Aufbereitung** der Proben erfolgt dabei mit enzymatischen Puffern, verschiedenen Waschpuffern, Proteinase K, Ethanol und der Zugabe einer InhibitEX-Tablette. Die enzymatischen Puffer bewirken zu Beginn der Probenaufbereitung die Lyse enthaltener Bakterienzellen sowie den Abbau vorhandener Proteinmoleküle. Die InhibitEX-Tablette dient der Neutralisierung von PCR-Inhibitoren wie Häm-Abbauprodukten und komplexen Polysacchariden. Ein weiterer chemischer Aufbereitungsschritt besteht in der Zugabe von Proteinase K, die restliche Proteinmoleküle abbaut und zur Freisetzung von Nukleinsäuren beiträgt. Die gezielte Bindung der DNA-Moleküle wird durch eine Silikagel-Membran gewährleistet. Die entsprechenden Bindebedingungen werden durch hohe Konzentrationen von chaotropen Agenzien wie Salz- und Ethanol-haltigen Puffern gewährleistet (Boom et al., 1990). Nach dem Entfernen sämtlicher Probenreste und Störsubstanzen folgt die Elution der gebundenen DNA-Moleküle durch das Senken der Konzentration der chaotropen Agenzien, wie beispielsweise mit einem nahezu salzfreien Puffer. Auch thermische Einflüsse begünstigen die Freisetzung der DNA aus den Erregerzellen. Da MAP sehr thermostabil ist, wurden die Kotproben im Rahmen der **thermischen Aufbereitung** bei hohen Temperaturen von +95 °C für 5 Minuten inkubiert. Bei den Einmischversuchen 1, 2 und 3 wurden in Abhängigkeit von der Erregerkonzentration der artifiziell kontaminierten Rinderkotproben nur verhältnismäßig hohe Ct-Werte bei der DNA-Isolierung ermittelt und ab der Verdünnungsstufe 10^{-4} mittels Real-Time PCR keine Erreger-DNA mehr nachgewiesen. Hingegen gelang die Isolierung von MAP-DNA direkt aus der Verdünnungsreihe selbst ohne Matrixbeimengung bei der Verdünnungsstufe 10^{-6} . Das verdeutlicht eindrücklich die

DNA-Verluste, die durch PCR-Inhibitoren und das Aufbereitungsprozedere bei der DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit[®] der Firma Qiagen aus der problematischen Matrix Rinderkot hervorgerufen werden.

b) Koteinwaage

Auch die **Koteinwaage** pro PCR-Ansatz nimmt entscheidend Einfluss auf die Nachweisrate eines PCR-Systems. Bei dem Standard-Kitsystem der Firma Qiagen (Q) wurden gemäß Herstellerangaben maximal 220 mg Rinderkot pro PCR-Ansatz verwendet. Höhere Koteinwaagen von 1 g oder 1,5 g Rinderkot, die bei den modifizierten DNA-Extraktionsverfahren der Firmen Qiagen (Qm) und Roche (Rm) sowie dem Standard-DNA-Extraktionsverfahren der Firma Roche (R) eingesetzt wurden, erhöhen die Nachweiswahrscheinlichkeit von MAP in Rinderkot. Beispielsweise konnte in dem Hauptversuch I durch einen Vergleich der Standard-Protokolle Q und R, bei denen die differierende Koteinwaage ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal darstellt, mittels logistischer Regression ein signifikanter Unterschied zwischen den Protokollen errechnet werden (s. Kapitel 5.2).

c) Zellaggregatbildung von MAP

Eine weitere mögliche Erklärung für die hohen Ct-Werte bei der DNA-Isolierung von MAP aus Rinderkot ist die Eigenschaft des Erregers, **Aggregate** zu bilden. Grant et al. (2005) konnten sogar zeigen, dass Zellaggregate des Erregers in Milch, die durch gezielte Homogenisierung deutlich verkleinert wurden, innerhalb kurzer Zeit ihre ursprüngliche Größe wiedererlangten. Sobald keine homogene Verteilung des Erregers in den Kotproben gewährleistet ist, können Erregerverluste in der Koteinwaage für die PCR auftreten und damit zu Verschiebungen der Nachweisrate der Real-Time PCR führen. Weiterhin können Schwankungen der Ct-Werte innerhalb der jeweiligen Verdünnungsstufen der Einmischversuche 1, 2 und 3 auf die inhomogene Verteilung von MAP in den Kotproben zurückgeführt werden. Für die Einmischversuche 1, 2 und 3 erfolgte im Vorfeld die Anzucht des verwendeten MAP-Isolates MAP 423 in dem MGIT-Flüssignährmedium. Insbesondere in diesem Flüssignährmedium neigt MAP zu einer hochgradigen Aggregatbildung. Zur Homogenisierung kann die Erregersuspension unter Zusatz von kleinen Keramikkügelchen gevortext oder mehrfach mit einer kleinkalibrigen Spritze (0,8 x 40 mm) aufgezogen werden (Bögli-Suber et al., 2005). In den Einmischversuche 1, 2 und 3 wurden die Proben mit Keramikkügelchen versehen und gründlich gevortext. Mikroskopische Untersuchungen dieser Suspensionen haben allerdings gezeigt, dass das hier angewandte Verfahren für die Homogenisierung der Erregersuspension als nicht zufriedenstellend beurteilt werden musste. Deshalb wurden die bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 eingesetzten MAP-Isolate MAP 423 und J 27 in einem anderen Flüssignährmedium (Middlebrook 7H9-

Flüssignährmedium) schüttelnd und unter Zugabe von Tween 80 sowie sterilen Keramikkügelchen kultiviert.

d) Schlussfolgerungen

Abschließend bleibt bei den **Einmischversuchen 1, 2 und 3** festzuhalten, dass die ausgeprägte Zellaggregatbildung der ursprünglichen MAP-Suspension aus dem MGIT-Flüssignährmedium entscheidenden Einfluss auf die Nachweisrate der TaqMan[®] Real-Time PCR beim Nachweis von MAP aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben nimmt. Die inhomogene Verteilung des Erregers in den Rinderkotproben der jeweiligen Verdünnungsstufen kann insbesondere bei niedrigen Erregerkonzentrationen zu Nachweisverlusten in der PCR führen, was bei einem Vergleich der Ergebnisse des Vorversuches (Einmischversuche 1, 2 und 3) und denen des Hauptversuches I (Einmischversuche 4, 5 und 6) noch näher erläutert wird. Weiterhin führte die DNA-Extraktion bei den Einmischversuchen 1, 2 und 3, basierend auf dem **Standard-Kitsystem Q** (QIAamp DNA Stool Mini Kit[®]) der Firma Qiagen, zu erheblichen DNA-Verlusten. Dadurch konnte mit der TaqMan[®] Real-Time PCR nur bei einer Erregerkonzentration von **ca. 10⁴ KbE/g Rinderkot** eine **Nachweisrate von 100 %** erreicht werden. Um die Nachweisrate der Real-Time PCR zu verbessern, wurden Modifikationen des Standard-Kitsystems der Firma Qiagen vorgenommen und ein weiteres Standard-Kitsystem sowie ein modifiziertes Kitsystem der Firma Roche in die Untersuchungen mit aufgenommen (Kot-Einmischversuche 4, 5 und 6).

5.2 Analyse des Hauptversuches I (Einmischversuche 4, 5 und 6)

Um die Nachweisrate der TaqMan[®] Real-Time PCR zu verbessern, wurden drei weitere **Einmischversuche 4, 5 und 6** mit einigen gezielten Modifikationen des Arbeitsprotokolles durchgeführt. Das Standard-Kitsystem der Firma Qiagen basierend auf dem QIAamp DNA Stool Mini Kit[®] (Q) wurde weiterhin vergleichend mitgeführt. Zusätzlich wurden im Rahmen des Hauptversuches I drei weitere DNA-Extraktionsverfahren zur Isolierung von MAP-DNA aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben untersucht. Insgesamt wurden somit bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 vier unterschiedliche DNA-Extraktionsverfahren berücksichtigt.

a) DNA-Extraktionsverfahren

Bei beiden Standard-Protokollen (**Q** und **R**) wurden die Proben einer rein **thermisch-chemischen Extraktion** unterzogen, während es sich bei den modifizierten Protokollen (**Qm** bzw. **Rm**) um **thermisch-chemisch-mechanische Extraktionsverfahren** handelte. Bei den Protokollen der Firma Qiagen erfolgte die chemische Aufbereitung der Proben mittels enzymatischer Puffer, verschiedener

Waschpuffer, Proteinase K, Ethanol und der Zugabe einer InhibitEX-Tablette zur Neutralisierung von PCR-Inhibitoren. Da MAP sehr thermostabil ist, wurden die Kotproben bei dem Standard-Protokoll Q der Firma Qiagen, durch eine 5minütige Inkubation bei +95 °C thermisch aufbereitet. Bei dem modifizierten Protokoll Qm der Firma Qiagen erfolgten während des Arbeitsprotokolls zwei Thermisierungsschritte von jeweils 10 Minuten bei +95 °C.

Bei den DNA-Extraktionsverfahren der Firma Roche erfolgt die chemische Aufbereitung der Proben mittels enzymatischer Puffer, verschiedener Waschpuffer, Lysozym, Proteinase K und Isopropanol. Als thermischer Aufbereitungsschritt wurden die Kotproben bei beiden Protokollen R und Rm einer Inkubation bei +95 °C für 10 Minuten unterzogen. Die gezielte Bindung der DNA-Moleküle wurde bei allen DNA-Extraktionsverfahren durch eine Silikagel-Membran gewährleistet.

Die modifizierten DNA-Extraktionsverfahren Qm und Rm enthielten zusätzlich einen **mechanischen Aufbereitungsschritt**. Dabei wurden die Proben in beiden Protokollen mehrfach im Ribolyser unter Zusatz von Keramikkügelchen geschüttelt. Um eine übermäßige Schaumbildung bei der mechanischen Aufbereitung (4 x Stufe 6 für jeweils 20 Sekunden im Ribolyser) der Kotproben zu vermeiden, wurde bei dem Protokoll Qm nach Absprache mit der Firma Qiagen eine DX-Lösung zu dem üblicherweise eingesetzten ASL-Puffer zugegeben. Die DX-Lösung wurde zu Versuchszwecken zur Verfügung gestellt. Sie stammte aus einem anderen Kit-System der Firma Qiagen und ist einzeln kommerziell nicht erhältlich. Die DX-Lösung wurde nur bei dem DNA-Extraktionsverfahren Qm der Firma Qiagen eingesetzt; bei dem Protokoll Rm der Firma Roche wurde auf den Zusatz der DX-Lösung verzichtet. Um dennoch eine vermehrte Schaumbildung zu vermeiden, wurde die mechanische Aufbereitung der Rinderkotproben modifiziert. Ohne den Zusatz von DX-Lösung wurden die Proben nur 2 x bei Stufe 6 für jeweils 20 Sekunden in dem Ribolyser geschüttelt.

b) Koteinwaage

Ein weiterer bedeutsamer Unterschied zwischen den Protokollen besteht in der **Koteinwaage** zu Beginn der DNA-Extraktion. Bei dem Standard-Protokoll Q der Firma Qiagen wurden gemäß den Vorschriften des Herstellers maximal 220 mg Rinderkot pro Ansatz eingewogen, dagegen bei dem modifizierten Protokoll Qm der Firma Qiagen 1 g und bei den beiden Protokollen der Firma Roche sogar 1,5 g Rinderkot. Durch eine möglichst hohe Koteinwaage pro PCR-Ansatz steigt die Wahrscheinlichkeit des Erregernachweises entsprechend an, was insbesondere für den Nachweis von Rindern, die den Erreger in nur geringen Konzentrationen mit dem Kot ausscheiden von Bedeutung ist.

c) Zellaggregatbildung von MAP

Aber auch die Größe der MAP-Zellaggregate in der Erregersuspension ist entscheidend für die Nachweisrate der Real-Time PCR. Wie bereits erwähnt, wurde bei den Einmischversuchen des Vorversuches das MGIT-Flüssignährmedium, das zu einer hochgradigen **Aggregatbildung** des Erregers neigte, als Anzuchtnährmedium des MAP-Stammes MAP 423 eingesetzt. Um die hochgradige Aggregatbildung des Erregers zu reduzieren, erfolgte dagegen bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 die Kultivierung der MAP-Stämme MAP 423 und J 27 in dem Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium mit den Zusätzen Tween 80 und Mycobactin J. Tween 80 beeinflusst dabei gezielt die mykobakterielle Zellwand und reduziert die Nesterbildung von MAP in dem Flüssignährmedium sowie eine Nesterneubildung in der Matrix Rinderkot (van Boxtel et al., 1990; Wards, 1996). Als weitere Maßnahme zur Reduzierung der Aggregatbildung des Erregers wurden die Flüssigmedien mit den MAP-Stämmen MAP 423 und J 27 für die Einmischversuche 4, 5 und 6 schüttelnd unter Zugabe von sterilen Keramikkügelchen inkubiert. Durch den Einsatz des Middlebrook 7H9-Flüssigmediums mit dem Zusatz von Tween 80 konnte so die Aggregatbildung von MAP gezielt vermindert werden. Weitere mechanische Aufbereitungsschritte zur Homogenisierung der anfänglichen Erregersuspension waren – wie die mikroskopischen Untersuchungen belegten – bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 nicht erforderlich. Obwohl Tween 80 laut Literaturangaben auch einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Mykobakterien nehmen kann, wurde bei den Untersuchungen von Wards (1996), in denen das Wachstum verschiedener *Mycobacterium* spp. inklusive MAP in bzw. auf unterschiedlichen Fest- und Flüssignährmedien getestet wurde, lediglich ein verzögertes Wachstum der Teststämme beobachtet.

Die Ergebnisse der Einmischversuche 1 bis 6 zeigen auf, dass die Zellaggregatbildung von MAP bei der artifiziellen Kontamination von Rinderkot neben dem Einsatz eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens entscheidend Einfluss auf die Nachweisrate der Real-Time PCR nimmt. Allein ein Vergleich der mittels Standard-DNA-Extraktionsverfahren Q der Firma Qiagen erzielten Nachweisrate der Real-Time PCR in Bezug auf die Erregerkonzentration bei den Einmischversuchen 1 bis 6 verdeutlicht den positiven Effekt einer möglichst homogenen Erregerverteilung in der Matrix Rinderkot. Während die TaqMan[®] Real-Time PCR in Kombination mit dem Standard-DNA-Extraktionsverfahren Q bei den Einmischversuchen 1, 2 und 3 lediglich bei einer Erregerkonzentration von ca. 10^4 KbE/g Rinderkot eine Nachweisrate von 100 % erzielte, konnte bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 bereits bei einer Erregerkonzentration von 10^3 KbE/g Rinderkot eine Nachweisrate von 100 % erreicht werden. In Kombination mit den modifizierten DNA-Extraktionsverfahren Qm und Rm erzielte das TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 sogar bei einer Erregerkonzentration von ca. 10^2 KbE/g Rinderkot eine Nachweisrate von 100 %. Jedoch kann die Aggregatbildung des Erregers selbst bei dem Einsatz des Middlebrook 7H9-Flüssignährmediums unter Zusatz von Tween 80 nicht vollkommen beseitigt

werden, so dass insbesondere bei niedrigen Erregerkonzentrationen Nachweisverluste von Erreger-DNA in der Real-Time PCR auftreten können. Deshalb bleibt es bei sehr niedrigen Erregerkonzentrationen von durchschnittlich $3,7 \times 10^0$ KbE/g dem Zufall überlassen, ob sich ein Erreger in der Koteinwaage für die DNA-Isolierung befindet und es kann keine Aussage über die Leistungsfähigkeit des jeweiligen DNA-Extraktionsverfahrens bei derart niedrigen Erregergehalten getroffen werden.

In einer Studie von Bögli-Stuber et al. (2005) wurden ebenfalls artifiziell kontaminierte und native Rinderkotproben mit einem IS900-basierten Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP untersucht. Als Fluorophor kam bei diesem PCR-System SYBR Green zum Einsatz. Eine interne Amplifikationskontrolle zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse wurde nicht mitgeführt. Bögli-Stuber et al. (2005) gelang bei der Untersuchung der artifiziell kontaminierten Rinderkotproben mit der Real-Time PCR der Nachweis einer Erregerkonzentration von 500 KbE/g Rinderkot zu 100 %. Insgesamt wurden 7 Rinderkotproben je Verdünnungsstufe, ausgehend von einer Verdünnungsreihe, gespiked und im Doppelansatz untersucht. Bei dieser Studie erfolgte die kulturelle Anzuchtung des MAP-Stammes ATTCC 19698 für die artifizielle Kontamination der Rinderkotproben auf dem Löwenstein-Jensen-Schrägnährmedium unter Zusatz von Mycobactin J. Zur Vermeidung der Aggregatbildung des Erregers wurden Einzelkolonien des Erregers in 1 ml Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium gerieben und mit einer kleinkalibrigen Nadel 20 x auf- und abgesaugt. Zuletzt wurde die Bakteriensuspension mit 0,5 ml einer 0,02 %igen Tween 80 Lösung versetzt, um eine erneute Aggregatbildung zu reduzieren. Auch bei diesem Einmischversuch wurde somit gezielt der Klumpenbildung entgegengewirkt und eine vergleichbare Nachweisrate in der Real-Time PCR erzielt.

d) Schlussfolgerungen

Bei den Einmischversuchen 4, 5 und 6 konnte mit den beiden modifizierten DNA-Extraktionsverfahren Qm bzw. Rm eine Nachweisrate von 100 % bei einer durchschnittlichen Erregerkonzentration von $3,7 \times 10^2$ KbE/g Rinderkot ermittelt werden. Erregerkonzentrationen von ca. 10^2 KbE/g Rinderkot gelten auch als Nachweisgrenze des „gold standard“, der kulturellen Anzucht von MAP aus Rinderkot (Merkal et al., 1968). Im Vergleich dazu lag die 100 %-Nachweisrate unter Verwendung des Standard-Protokolls der Firma Qiagen Q sowie des Standard-Protokolls der Firma Roche bei einer durchschnittlichen Erregerkonzentration von $3,7 \times 10^3$ KbE/g Rinderkot.

Aus den hier aufgezeigten Ergebnissen wird ersichtlich, dass vor allem die **mechanische Aufbereitung** der Fäzesproben bei der DNA-Extraktion einen positiven Effekt auf die Nachweisrate des TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahrens zum Nachweis von MAP aus Rinderkot hat. Im Vergleich der modifizierten Protokolle Qm und Rm sowie der Standard-Protokolle Q und R erzielten die

modifizierten Extraktionsverfahren niedrigere Ct-Werte in Bezug auf die jeweiligen Erregerkonzentrationen der artifiziell kontaminierten Rinderkotproben. Zusätzlich erzielte das Extraktionsverfahren der Firma Roche Rm von den beiden thermisch-chemisch-mechanischen Aufbereitungsverfahren die niedrigsten gemittelten Ct-Werte (s. Tabelle 35 sowie Abbildung 18 des Kapitels 4.2.4). Aber auch mit Hilfe der erstellten Regressionsgleichungen in Abbildung 19 des Kapitels 4.2.4 konnte der Vorteil einer mechanischen Aufreinigung der Fäzesproben bei der DNA-Isolierung von MAP aus Rinderkot deskriptiv aufgezeigt werden. Der Vergleich der exponentiellen Steigungskoeffizienten der Protokolle Q ($b = 2,634$), R ($b = 2,754$), Qm ($b = 4,541$) und Rm ($b = 8,741$), die zugleich ein Maß für die Steilheit der entsprechenden Regressionskurven der DNA-Extraktionsverfahren darstellen, verdeutlicht den positiven Einfluss einer mechanischen Aufreinigung. Je steiler die Regressionskurven verlaufen, desto schneller wird eine 100 %ige Nachweisrate bei einer niedrigen Erregerkonzentration erreicht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der gemittelten Ct-Werte zeigt auch die Analyse der Regressionskurven der beiden modifizierten Protokolle Qm und Rm, dass das Protokoll Rm mit einem exponentiellen Steigungskoeffizienten von $b = 8,741$ steiler als die Regressionskurve des Protokolls Qm mit einem exponentiellen Steigungskoeffizienten von $b = 4,541$ verläuft. Anhand der Regressionskurven konnte somit deskriptiv beobachtet werden, dass sich die zusätzliche mechanische Aufbereitung der Fäzesproben positiv auf die Nachweisrate der Real-Time PCR auswirkt.

Ebenso nehmen die **Zellaggregatbildung** von MAP, eine **erhöhte Koteinwaage** von 1 bis 1,5 g Rinderkot und die **thermische Aufbereitung** der Proben bei +95 °C für 10 Minuten der Protokolle Qm, R und Rm, die sich ihrerseits deutlich von dem Protokoll Q der Firma Qiagen mit einer Einwaage von maximal 220 mg Kot und einer thermischen Aufbereitung der Proben bei +95 °C für nur 5 Minuten abgrenzen, einen positiven Einfluss auf die Nachweisrate des TaqMan® Real-Time PCR-Verfahrens. In Abbildung 20 des Kapitels 4.2.4 konnte durch den Vergleich der Standard-Protokolle Q und R mittels logistischer Regression ein signifikanter Unterschied zwischen den Protokollen errechnet werden, der die deutliche Überlegenheit des Protokolls R gegenüber dem Protokoll Q bei der DNA-Isolierung von MAP aus Rinderkot belegt.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass für den erfolgreichen molekularbiologischen Nachweis von MAP aus artifiziell kontaminierten Rinderkotproben eine möglichst hohe Koteinwaage, eine thermisch-chemisch-mechanische Aufbereitung der Fäzesproben sowie eine möglichst homogene Erregerverteilung, die beispielsweise durch Kultivierung der ausgewählten MAP-Stämme in dem Middlebrook 7H9-Flüssigmedium unter Zugabe von Tween 80 realisiert werden kann, von entscheidender Bedeutung sind und maßgeblich die Nachweisrate der eingesetzten PCR beeinflussen.

Um Kontaminationen mit MAP-DNA während der Aufbereitung der Rinderkotproben und damit **falsch-positive** Ergebnisse ausschließen zu können, sind exakte Vorgehensweisen bei der DNA-Isolierung und dem Pipetieren der PCR-Ansätze erforderlich. Deshalb ist ein kontinuierliches **Probenmanagement** bzw. „**PCR Troubleshooting**“ bei der molekularbiologischen Diagnostik notwendig und das Mitführen einer Vielzahl von Kontrollen bei jeder PCR-Aufbereitung bzw. jedem PCR-Lauf. In der vorliegenden Untersuchung wurde bei jeder PCR-Aufbereitung die DNA einer positiven und negativen Aufbereitungskontrolle eines jeweiligen Kontroll-Stammes, die Aufbereitungskontrolle des Leerwertes und ein Leerwert des Mastermixes (ohne Zugabe von Proben-DNA) mitgeführt. Zusätzlich wurde bei jedem PCR-Lauf eine Positiv- und Negativkontrolle mituntersucht. Weitere Maßnahmen in Bezug auf ein kontinuierliches Probenmanagement bzw. „PCR Troubleshooting“ sind in Kapitel 5.3.3 näher erläutert.

5.3 Analyse des Hauptversuches II

5.3.1 Bewertung der kulturellen Untersuchungen des Hauptversuches II

Der **kulturelle Nachweis** von MAP gilt bislang trotz der langen Kultivierungszeiten von 8-16 Wochen als „gold standard“ der Paratuberkulose-Diagnostik (Chiodini et al., 1984a; Hietala, 1992; Collins et al., 1993). Aufgrund der intermittierenden Erregerausscheidung mit dem Kot eignet sich die Kultivierung von MAP aus Lymph- und Darmgewebe besser zum Nachweis infizierter Tiere und ist daher als „gold standard“ geeigneter. Allerdings stehen die letztgenannten Matrizes dem Untersuchenden bei der Paratuberkulosedagnostik am lebenden Tier nur selten zur Verfügung.

Im Hauptversuch II wurde der kulturelle MAP-Nachweis aus Kot als „gold standard“ mitgeführt und die molekularbiologischen sowie mikroskopischen Untersuchungsergebnisse der nativen Rinderkotproben (n = 206) mit den Ergebnissen der kulturellen Anzucht verglichen.

a) Dekontamination

In der Mehrheit der Studien (Merkal, 1984; David und Bonner, 1986; Schneider, 2003; Johansen et al., 2006) sowie mit der AVID-Methode (AVID VII/1996) erfolgt der kulturelle Nachweis von MAP aus Rinderkot mit 0,75 %iger Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC)-Lösung in Kombination mit einer 24-stündigen Einwirkzeit. HPC gewährleistet eine zuverlässige Abtötung der im Rinderkot enthaltenen Begleitkeimflora und erleichtert somit die gezielte Selektion von MAP. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Rinderkotproben für den kulturellen Nachweis von MAP ebenfalls mit einer 0,75 %igen HPC-Lösung mit einer Einwirkzeit von 24 Stunden dekontaminiert. In verschiedenen Studien konnte durch zusätzliche Zentrifugation der Proben während der Dekontamination vorteilhafte

Anzuchtergebnisse erzielt werden (Ridge, 1993; Stabel et al., 1997; Reddacliff et al., 2003). Demzufolge wurde auch bei dieser Arbeit ein Zentrifugationsschritt in das Dekontaminationsverfahren integriert.

b) Nährmedium

Das Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit dem Zusatz von Mycobactin J ist derzeit für den kulturellen Nachweis von MAP aus Rinderkot am besten geeignet (Merkal et al., 1987; Nielsen et al., 2004; Köhler und Gierke, 2006). In einer Studie am Referenzzentrum für Paratuberkulose in Jena, in der die kulturelle Anzüchtung von MAP aus Rinderkot auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit der kulturellen Anzüchtung in automatisierten Flüssigkultursystemen verglichen wurde, konnte gezeigt werden, dass das Festnährmedium Herrold's Egg Yolk durch Flüssigkulturen nicht ersetzt werden kann (Köhler und Gierke, 2006).

Das Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ermöglicht durch seine Zusammensetzung und insbesondere durch den Zusatz von Eigelb das Wachstum anspruchsvoller Erreger wie MAP und gewährleistet als Schrägnährmedium Schutz vor einer Austrocknung des Mediums während der erforderlichen Kultivierungszeiten. Der Zusatz von Mycobactin J (MJ) ist bei der kulturellen Anzüchtung von MAP unerlässlich, da dieser Erreger nicht in der Lage ist, MJ eigenständig zu synthetisieren (Merkal und McCullough, 1982). Weiterhin enthält das Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium in angemessenen Konzentrationen antibiotische sowie antimykotische Zusätze (ANV-Lösung), die während der langfristigen Kultivierungsphase restliche, im Kot enthaltene Begleitkeime und Schimmelpilze inaktivieren bzw. deren Wachstum und Vermehrung unterdrücken. Diese ANV-Lösung beinhaltet das Antimykotikum Amphothericin B sowie die Antibiotika Nalidixinsäure und Vancomycin. Eigene Untersuchungen bestätigten die Wirksamkeit der ANV-Lösung bei der kulturellen Anzüchtung von MAP aus Rinderkot. Bei Vergleichsstudien hinsichtlich der Eignung verschiedener Nährmedien für die Kultivierung von MAP aus Rinderkotproben wurde vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen auch das ANV-freie ENCLIT-Schrägnährmedium getestet. Dieses Nährmedium enthielt keinerlei antibiotische Zusätze, lediglich das Antimykotikum Malachitgrün. Trotz Dekontamination der Rinderkotproben traten bereits zwei Tage nach dem Beimpfen der Medien massive Kontaminationen auf. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass der Zusatz der ANV-Lösung zu Nährmedien für die kulturelle Anzüchtung von MAP aus Rinderkot unbedingt erforderlich ist.

Ebenfalls konnte durch Untersuchungen am Institut gezeigt werden, dass die direkte Einwirkung von ANV-Lösung selbst in höheren Konzentrationen als dies bei dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium der Fall ist, keinen Einfluss auf das Wachstum und die Vermehrung von MAP nimmt (Fernandez und Akineden, 2007, persönliche Mitteilung). Auch in einer weiteren Studie am Referenzzentrum für Paratuberkulose in Jena, bei der unterschiedliche Dekontaminationsverfahren zum kulturellen Nachweis von MAP aus Rinderkot miteinander verglichen wurden, konnte keine nachteilige Beeinflussung des Wachstums sowie der Vermehrung von MAP durch die Einwirkung von ANV-Lösung beobachtet werden.

Dabei waren die Rinderkotproben nach einer 24-stündigen Dekontamination mit 0,75 %igem HPC direkt mit ANV-Lösung versetzt worden (Gierke und Köhler, 2006). Die Einwirkzeit der ANV-Lösung betrug ebenfalls 24 Stunden.

Für die eigenen kulturellen Untersuchungen wurden ausschließlich industriell verfügbare Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedien mit dem Zusatz von ANV-Lösung und MJ verwendet, die von der Firma Becton Dickinson® bezogen wurden.

c) Spezifität der kulturellen Anzuchtung

Die **Spezifität** der kulturellen Anzuchtung von MAP aus Rinderkot liegt als „gold standard“ bei 100 % (Crossley et al., 2005). Allerdings können falsch-positive Befunde von Tieren, die nicht mit MAP infiziert sind, sondern den Erreger lediglich passagieren, insbesondere in einer erregerbelasteten Umgebung nicht ausgeschlossen werden (Hoffmann, 2007). Da bislang der kulturelle Erregernachweis aus Kot als „gold standard“ der Paratuberkulose gilt, können kulturell falsch-positiv detektierte Tiere, die den Erreger nur passagieren, erst nach ihrem Tod durch die Untersuchung von Sektionsmaterial als solche identifiziert werden. Für die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen ist die Merzung positiv detektierter Rinder von entscheidender Bedeutung, insbesondere von gering- bis mittelgradig MAP-ausscheidenden Tieren, die keine klinischen Symptome aufweisen und dennoch über Jahre hinweg den Erreger mit dem Kot ausscheiden.

d) Sensitivität der kulturellen Anzuchtung

Gegenüber der Spezifität des kulturellen MAP-Nachweises ist die **Sensitivität** der kulturellen Nachweismethode gering. In der Literatur schwanken die Angaben über die Sensitivität zwischen 40 % und 90 % (Hietala, 1992; Sockett et al., 1992). Eine Sensitivität von 90 % wurde allerdings nur erreicht, wenn die zu untersuchenden Tiere auch klinisch erkrankt waren. Die Ursachen für die niedrige Sensitivität des kulturellen MAP-Nachweises aus Kot sind vielfältig.

Eine wesentliche Rolle dabei spielt die **intermittierende Ausscheidung** von MAP mit dem Kot, die selbst bei klinisch auffälligen Tieren zu beobachten ist (Hietala, 1992; Sockett et al., 1992). Dadurch können MAP-positive Tiere verfehlt werden. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, müssten wiederholte kulturelle Untersuchungen der betroffenen Bestände erfolgen, da nur so fälschlicherweise negativ detektierte Rinder aufgespürt werden können. Doch wiederholte kulturelle Untersuchungen sind sehr kosten- und überaus zeitintensiv.

Aber auch durch die **Dekontamination** der Rinderkotproben für die kulturelle Anzuchtung von MAP können ein verzögertes Wachstum oder sogar Erregerverluste auftreten, die vor allem bei geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern zu falsch-negativen Untersuchungsergebnissen führen (Merkal und Curran, 1974; Nielsen et al., 2001; Reddacliff et al., 2003; Stich et al., 2004; Johansen et al., 2006).

In Untersuchungen am Institut konnte in einem Modellversuch zum kulturellen Nachweis von MAP aus Rinderkot, in dem der Wirkungseffekt einer 0,9 %igen HPC-Lösung sowie unterschiedlicher Einwirkzeiten (24, 48 und 72 Stunden) berücksichtigt wurden, gezeigt werden, dass mit Erregerverlusten von bis zu 10 % durch die Dekontamination der Rinderkotproben gerechnet werden muss (Fernandez und Akineden, 2007, persönliche Mitteilung). In einer Studie mit artifiziell kontaminierten Milchproben (n = 18) konnte durch die Dekontamination mit 0,75 %iger HPC-Lösung und einer Einwirkzeit von fünf Stunden eine Reduktion der Erregerkonzentration bewirkt werden (Grant und Rowe, 2004). Vergleichend wurden die 18 Milchproben jeweils mit und ohne Dekontamination kultiviert. Während 8 von 18 Milchproben ohne Dekontamination MAP-positiv waren, erwies sich nur eine von 18 Milchproben mit Dekontamination als positiv.

Weiterhin können **Kontaminationen** der Kulturmedien durch Begleitkeime wie Schimmelpilze zu Sensitivitätsverlusten bei der kulturellen Anzucht von MAP führen (Gierke und Köhler, 2006). Eine aktuelle Studie verglich die Effektivität sieben verschiedener HPC-Dekontaminationsverfahren miteinander. Dabei wurden die getesteten Rinderkotproben mit 0,75 %iger HPC-Lösung durchmischt und im Anschluss sieben verschiedenen Prozeduren unterzogen: a) 24 Stunden Einwirkzeit, b) 48 Stunden Einwirkzeit, c) 72 Stunden Einwirkzeit, d) 96 Stunden Einwirkzeit, e) 24 Stunden Dekontamination mit 0,75 %iger HPC-Lösung, Zentrifugation und anschließend eine 24 stündige Dekontamination in einer Amphotericin B-Nalidixinsäure-Vancomycin (ANV)-Lösung, f) 24 Stunden Dekontamination mit 0,75 %iger HPC-Lösung, Zentrifugation und anschließend eine 24 stündige Dekontamination in einer hochkonzentrierten Amphotericin-B-Lösung sowie g) die sog. Cornel-Methode, bei der die Proben für 24 Stunden in $\frac{1}{2}$ Hirn-Herz Bouillon (HHB)-0,9 %iger HPC-Lösung dekontaminiert, anschließend zentrifugiert und erneut 24 Stunden in einer Amphotericin B-Nalidixinsäure-Vancomycin (ANV)-Lösung inkubiert wurden (Gierke und Köhler, 2006). Gemäß diesen Untersuchungen konnte trotz Vorbehandlung der Rinderkotproben eine Kontaminationsrate der Medien von durchschnittlich ~36,7 % ermittelt werden. Ein verzögertes Wachstum der Begleitkeimflora durch eine verlängerte Einwirkung der HPC-Lösung bzw. durch den zusätzlichen Einsatz von ANV-Lösung konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei den kulturellen Untersuchungen der Rinderkotproben (n = 206) des Hauptversuches II sind Kontaminationen beider kultureller Ansätze A und B der einzelnen Rinderkotproben nur in der 11. bis 16. Woche aufgetreten. In den Kultivierungswochen 4, 5, 6, 8, 9 und 10 war jeweils nur einer der Kulturansätze A oder B einzelner Rinderkotproben kontaminiert, so dass bei diesen Kotproben eine kulturelle Auswertung uneingeschränkt erfolgen konnte. Da die Time To Detection/TTD der 95 positiven Rinderkotproben auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium durchschnittlich **4,0** Wochen betrug, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Kontaminationen keine falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnisse verursacht wurden. Von insgesamt 412 verwendeten Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedien waren 43 während der Kultivierungsdauer von 16 Wochen kontaminiert. Daraus ergab sich bezogen auf alle Kulturansätze eine **Kontaminationsrate** von **10,4 %**.

Auch die **Anzahl der Kulturansätze**, die für die Untersuchung einer Einzelkotprobe herangezogen werden, nehmen Einfluss auf die Sensitivität des kulturellen MAP-Nachweises. Das AVID-Verfahren (AVID VII/1996) sieht drei bis vier Kulturansätze pro Einzelkotprobe vor. Nur auf diese Weise konnte ein möglichst sicherer Nachweis von insbesondere geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern gewährleistet werden. Da MAP die Eigenschaft besitzt, Nester zu bilden und nicht homogen im Rinderkot verteilt vorliegt, besteht gerade bei niedrigen Erregerkonzentrationen im Kot die Gefahr, falsch-negative Ergebnisse zu erhalten. Bei mehreren parallelen Kulturansätzen wird die Untersuchungsmenge der Matrix Kot entsprechend vergrößert. In der genannten Studie am Referenzzentrum für Paratuberkulose in Jena, konnte bei Verwendung von drei Kulturröhrchen eine Sensitivität von durchschnittlich ~80,4 % ermittelt werden. Bei Verwendung von nur einem Kulturröhrchen hingegen betrug die Sensitivität nur ~49,3 % (Gierke und Köhler, 2006). Allerdings sind auch die Kosten sowie der Zeit- und Arbeitsaufwand an die Anzahl der Kulturröhrchen gekoppelt.

Im Hauptversuch II wurde die Anzahl der Kulturröhrchen pro Rinderkotprobe auf zwei beschränkt, da die Kotproben von voruntersuchten Rindern stammten und bei den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen im Vergleich zu den Ergebnissen der Kultur keinerlei falsch-positive Ergebnisse erzielt wurden. Bei den Voruntersuchungen der einzelnen Rinderkotproben (n = 206) traten überwiegend Abweichungen zwischen den blut- bzw. milchserologischen und den eigenen kulturellen Untersuchungsergebnissen der Rinderkotproben auf. 10 Blut-ELISA-positive sowie 7 Milch-ELISA-positive Ergebnisse erzielten im kulturellen Erregernachweis aus Kot ein negatives Ergebnis, welches durch die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Proben bestätigt werden konnte. Deshalb ist eher davon auszugehen, dass es sich hierbei um falsch-positive ELISA-Ergebnisse handelt und nicht um falsch-negative Ergebnisse der kulturellen Anzucht.

Obwohl zahlreiche Studien belegen, dass MAP in der Lage ist, selbst äußerst **niedrige Lagerungstemperaturen** von -70 bis -80 °C für Monate zu überdauern (Richards und Thoen, 1977), können Erregerverluste nicht ausgeschlossen werden. Deshalb nehmen auch niedrige Lagerungstemperaturen einen negativen Einfluss auf die Sensitivität des kulturellen Erregernachweises. Bei einem Ringversuch des Referenzlabors für Paratuberkulose in Jena zum kulturellen Nachweis von MAP aus Rinderkotproben (Anonymus, 2006) wurden von 23 teilnehmenden Laboren 15 nativ kontaminierte, tiefgefrorene Rinderkotproben kulturell sowie teilweise molekularbiologisch untersucht. Unter diesen 15 Kotproben befanden sich 8 Proben, die den Erreger in nur geringen Konzentrationen enthielten. Zwei dieser 8 Proben mit besonders niedrigen Erregerkonzentrationen waren nur von wenigen Laboren als MAP-positiv detektiert worden. In wiederholten Untersuchungen des Referenzlabores wurden diese beiden Rinderkotproben ebenfalls nicht regelmäßig Kultur-positiv detektiert. Es konnte nicht sicher festgestellt werden, ob die falsch-negativen Kulturergebnisse auf die Nesterbildung des Erregers in diesen Kotproben oder aber auf die niedrigen Lagerungstemperaturen der Proben zurückzuführen waren. Die Reduzierung der MAP-Zellen bei natürlich kontaminierten, tiefgefrorenen Kotproben ist gemäß Literaturangaben weniger deutlich

ausgeprägt als bei entsprechender Lagerung artifiziell kontaminierter Kotproben. Vermutlich liegt ein Teil der Erreger in natürlich kontaminierten Kotproben in phagozytierter Form innerhalb von Makrophagen vor, was eine Art „Schutzeffekt“ der Bakterien vor äußeren widrigen Umwelteinflüssen bewirken könnte (Richards, 1981). Alle Rinderkotproben des Hauptversuches II dieser Arbeit waren kurzfristig bei -20 °C gelagert worden, so dass Erregerverluste nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Allerdings wurde keine der Rinderkotproben mittels Real-Time PCR und mittels nested-PCR falsch-positiv getestet, was auf den Nachweis toter Bakterienzellen schließen lassen könnte.

Wie Abbildung 21 in Kapitel 4.3.1 zu entnehmen ist, wurden **95** Proben Kultur-positiv und **111** Proben Kultur-negativ detektiert. Unter den Kultur-positiven Tieren befanden sich **30** geringgradig, **18** mittelgradig und **47** hochgradig MAP-ausscheidende Rinder. Die durchschnittliche Kultivierungszeit bis zum Wachstum von MAP-Kolonien (Time To Detection/TTD) der 95 kulturell-positiven Kotproben lag bei **4,0** Wochen. Aus den errechneten Wachstumszeiten der gering- (4,6 Wochen), mittel- (4,0 Wochen) und hochgradig (3,6 Wochen) MAP-ausscheidenden Rinder ging hervor, dass die Wachstumszeit mit steigender Erregerkonzentration kontinuierlich abnahm. Das bedeutet, je mehr Erreger in einer Kotprobe enthalten waren, desto schneller konnten gewachsene Kolonien auf den Medien identifiziert werden. Allerdings wurde bei den Untersuchungen des Hauptversuches II eine Mindestwachstumszeit von 21 Tagen von keiner der Proben unterschritten. Weiterhin nicht zu vernachlässigen in Bezug auf die Wachstumszeit sind Stamm-spezifische Unterschiede. Die Arbeit mit zahlreichen Labor- und Wildstämmen hat gezeigt, dass Stamm-spezifische Wachstumsunterschiede bestehen hinsichtlich der Kulturmorphologie und der Wachstumsgeschwindigkeit. Wie der Tabelle 44 in Kapitel 8.2 des Anhangs zu entnehmen ist, konnte auch bei Kotproben, die den Erreger nur in geringen Konzentrationen enthielten (Nrn. 149, 151), bereits in der 3. Kultivierungswoche MAP-Kolonien identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte vereinzelt bei Kotproben, die den Erreger in hohen oder mittleren Konzentrationen enthielten, erst nach 5 oder 6 Wochen ein Koloniewachstum beobachtet werden (Tabelle 44 in Kapitel 8.2 des Anhangs: Nrn. 65, 166, 171, 174). Diese Proben verdeutlichen die Wachstumsunterschiede von MAP-Isolaten.

e) Schlussfolgerungen

Der derzeit als „gold standard“ geltende kulturelle Nachweis des Erregers aus Rinderkot gestaltet sich aufgrund der zeitintensiven Anzuchtdauer, der hohen Kosten und der in diesem Kapitel ausführlich dargestellten Sensitivitätsverluste als schwierig. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden von 95 Kultur-positiv detektierten Rinderkotproben 91 ebenfalls molekularbiologisch positiv detektiert. 87 Proben erwiesen sich in der Real-Time PCR und 80 Proben in der nested-PCR als positiv. Nur 8 Proben wurden mittels Real-Time PCR und 15 Proben mittels nested-PCR in Bezug auf die Kultur falsch-negativ detektiert. Unter den molekularbiologisch falsch-negativ detektierten Proben befanden

sich nahezu ausschließlich Kotproben von Milchrindern, die MAP nur in äußerst geringen Konzentrationen ausschieden. Die Ergebnisse bestätigen, dass insbesondere bei Kotproben mit niedrigen Erregerkonzentrationen der kulturelle MAP-Nachweis weiterhin das sensitivste Nachweisverfahren darstellt.

Auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Voruntersuchungen der Rinderkotproben erzielte die Kultur der eigenen Untersuchungen die größten Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der kulturell voruntersuchten Kotproben (n = 119). Bei dem Vergleich der eigenen kulturellen Ergebnisse und den kulturellen Ergebnissen der Voruntersuchungen trat nur bei einer Probe eine Ergebnisabweichung auf (Tabelle 43 in Kapitel 8.2 des Anhangs). Im Gegensatz dazu konnten bei dem Vergleich der Ergebnisse der serologischen Voruntersuchungen mit den Ergebnissen der eigenen kulturellen Untersuchungen zahlreiche Ergebnisabweichungen beobachtet werden. Die milch- bzw. blutserologischen Ergebnisse der Voruntersuchungen der in dieser Arbeit berücksichtigten Milchrinder zeigten bei insgesamt 33 Tieren keine Übereinstimmung mit den eigenen kulturellen Untersuchungsergebnissen. Bei 18 von 111 blutserologischen und 15 von 40 milchserologischen Voruntersuchungen traten Abweichungen zu den eigenen kulturellen Untersuchungsergebnissen der jeweiligen Rinderkotproben auf. Diese Ergebnisse bestätigen die häufig in der Literatur geschilderte Problematik der Paratuberkulose diagnostik basierend auf serologischen Nachweisverfahren (Collins und Sockett, 1993; Rossiter und Burhans, 1996; Böttcher et al., 2005). Die derzeit zugelassenen ELISA-Verfahren unterscheiden sich sowohl in ihrer Sensitivität als auch in ihrer Spezifität. Deshalb gewährleiten die durch diese unterschiedlichen Tests ermittelten Seroprävalenzen keine verlässlichen Rückschlüsse auf die tatsächliche Prävalenz der Paratuberkulose in Rinderherden (Köhler, 2005). Eine Serokonversion ist bei Rindern oftmals erst ab einem Alter von bis zu drei Jahren nachweisbar und kann von Tier zu Tier stark variieren. Somit können falsch-positive und falsch-negative serologische Untersuchungsergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Sweeney et al. (2005) konnten belegen, dass die Ausscheidung des Erregers mit dem Kot bereits in der klinisch inapparenten Phase der Paratuberkulose oftmals vor einer nachweisbaren Serokonversion möglich ist.

Vor diesem Hintergrund ist nach wie vor der kombinierte Einsatz verschiedener Nachweisverfahren (Kultur, ELISA oder PCR) zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen zu empfehlen. Muskens et al. (2003) konnten zeigen, dass die Kombination unabhängiger Testverfahren zum Nachweis der Paratuberkulose die Aussagekraft der Labordiagnostik erheblich verbessert. Von Nachteil sind die Kosten, die beim gleichzeitigen Einsatz verschiedener Nachweisverfahren entstehen. Die alleinige Ermittlung der Seroprävalenz lässt derzeit noch keine sicheren Rückschlüsse auf die tatsächliche Prävalenz in Rinderherden zu und ist längst nicht ausreichend für die Ermittlung des Infektionsstatus von Einzeltieren. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit wurde die Sensitivität des kulturellen Erregernachweises aus Kot weder von dem eingesetzten Real-Time PCR-Verfahren noch von dem nested-PCR-Verfahren übertroffen und ist nach wie vor für den Nachweis von insbesondere geringgradig MAP-ausscheidenden Milchrindern als „gold standard“ zu betrachten.

5.3.2 Bewertung der mikroskopischen Untersuchungen des Hauptversuches II

Bislang ist die Ziehl-Neelsen-Färbung die Methode der Wahl für den **mikroskopischen Nachweis** von säurefesten Mykobakterien (Rolle und Mayr, 2002). Die Mikroskopie findet häufig Anwendung bei postmortalen Untersuchungen von Darm- und Lymphgewebe und ermöglicht dabei einen zuverlässigen Erregernachweis (Merkal, 1973; Coetsier et al., 2000). Allerdings kann durch diese mikroskopische Untersuchung keine endgültige Differenzierung säurefester Stäbchenbakterien und damit auch keine Aussage über die Spezifität dieses Verfahrens zum Nachweis von MAP getroffen werden (Benazzi et al., 1996), da mikroskopisch positiv detektierte Proben durchaus non-MAP Mykobakterien enthalten können (Benazzi et al., 1996).

a) Sensitivität

Im Vergleich zu serologischen, kulturellen und molekularbiologischen Nachweisverfahren des Erregers aus Rinderkot besitzt die Mikroskopie eine geringe **Sensitivität** (Zimmer et al., 1999). Dabei wirkt sich bei der mikroskopischen Untersuchung von Rinderkot wie auch bei der Kotkultur die **intermittierende Ausscheidung** des Erregers mit dem Kot nachteilig auf die Sensitivität aus, da selbst Rinder, die MAP in großen Mengen ausscheiden, kulturell negativ erscheinen.

Auch in den eigenen Untersuchungen nativer Rinderkotproben wurde in Bezug auf die Ergebnisse der Kultur nur eine niedrige Sensitivität (39 %) ermittelt. Von insgesamt 95 Kultur-positiven Kotproben wurden nur 37 mikroskopisch positiv bestätigt. Unter den falsch-negativ detektierten Proben (n = 58) befanden sich 20 hochgradig, 14 mittelgradig und 24 geringgradig ausscheidende Tiere.

Der errechnete **Kappa-Index**, der ein Maß für die Übereinstimmung der Ergebnisse des mikroskopischen und kulturellen Nachweisverfahrens darstellt, betrug **0,35** und verdeutlicht die nur schwache Übereinstimmung der Ergebnisse dieser beiden Nachweisverfahren. Ebenfalls konnten durch den McNemar-Test zufällige Ergebnisschwankungen der beiden Nachweisverfahren ($p < 0,0001$) ausgeschlossen werden.

Die eigenen Untersuchungen ergaben weiterhin bei 6 Proben ein mikroskopisch falsch-positives Ergebnis. Bei den nachgewiesenen säurefesten Stäbchen dieser Kotproben könnte es sich um non-MAP-Mykobakterien handeln, die ebenso wie MAP ubiquitär in der Umwelt anzutreffen sind und somit auch im Rinderkot nachweisbar sein können. Aber auch Infektionen mit *M. avium* ssp. *avium* oder *M. bovis* wären denkbar. Dagegen spricht allerdings das kulturelle Untersuchungsergebnis dieser Proben, da keine schnell wachsenden Mykobakterien kulturell nachgewiesen werden konnten. Die molekularbiologischen Ergebnisse dieser Kotproben sind erwartungsgemäß negativ. Aber auch Erfahrungswerte sind beim mikroskopischen Nachweis des Erregers von entscheidender Bedeutung, um säurefeste Stäbchenbakterien (MAP oder non-MAP-Mykobakterien) gezielt von Färbeartefakten sowie untypischen non-Mykobakterien (Sporenbildnern) zu unterscheiden und somit falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

b) Schlussfolgerungen

Abschließend bleibt festzuhalten, dass der mikroskopische Nachweis von MAP aus Rinderkotproben aufgrund der niedrigen Sensitivität nicht das Nachweisverfahren der Wahl ist, um positive, insbesondere geringgradig MAP-ausscheidende Rinder in den Beständen zu detektieren.

5.3.3 Bewertung der molekularbiologischen Untersuchungen des Hauptversuches II

Die Schwierigkeiten bei der Paratuberkulosedagnostik wurden bereits ausführlich am Anfang von Kapitel 5 erörtert. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, ein molekularbiologisches Nachweisverfahren zum Direktnachweis von MAP aus Rinderkot zu validieren. Der Vorversuch und der Hauptversuch I verdeutlichen die Leistungsfähigkeit des institutseigenen TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahrens (Schönenbrücher et al., 2008) in Kombination mit geeigneten DNA-Extraktionsverfahren an artifiziell kontaminierten Rinderkotproben. Um die Leistungsfähigkeit der Real-Time PCR für native Rinderkotproben zu überprüfen, wurden durch Voruntersuchungen definierte, native Rinderkotproben (n = 206) molekularbiologisch untersucht. Bei dem Hauptversuch II wurde das institutseigene TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren, basierend auf den MAP-Markern F57 und IS*Mav2* (Schönenbrücher et al., 2008), verwendet und eine interne Amplifikationskontrolle (IAK) mitgeführt, um falsch-negative Ergebnisse ausschließen zu können. Die Auswahl der Marker erfolgte gezielt. Da die MAP-Marker F57 und IS*Mav2* mehrfach für den spezifischen MAP-Nachweis als geeignet beschrieben (Poupart et al., 1993; Strommenger et al., 2001; Godfroid et al., 2005; Bosshard et al., 2006; Schönenbrücher et al., 2008) und bei diesen Markern bislang keine Kreuzreaktionen zu anderen Mykobakterien beschrieben wurden.

Im Gegensatz dazu konnten bei der häufig verwendeten DNA-Insertionssequenz IS900 mehrfach Kreuzreaktionen zu anderen non-MAP-Mykobakterien nachgewiesen werden, die zu falsch-positiven Ergebnissen in der molekularbiologischen Diagnostik führten (Cousin et al., 1999; Englund et al., 2002; Fang et al., 2002; Kim et al., 2002; O'Mahony und Hill, 2002; Khare et al., 2004; O'Mahony et al., 2004; Vansnick et al., 2004). Die Vorteile der Real-Time PCR gegenüber konventionellen PCR-Verfahren wurden bereits am Anfang von Kapitel 5 dargestellt. Insbesondere die Reduktion der Kontaminationsgefahr der Proben durch die Anwendung eines Real-Time PCR-Verfahrens ist für den genbasierten Nachweis von MAP von herausragender Bedeutung.

Bei den molekularbiologischen Untersuchungen der nativen Rinderkotproben des Hauptversuches II wurde ergänzend und vergleichend ein konventionelles nested-PCR-Verfahren basierend auf dem Marker IS900 mitgeführt. Damit stützten sich die Untersuchungen auf drei unterschiedliche MAP-Marker und gewährleisteten so ein besonders hohes Maß an Sicherheit für den molekularbiologischen Nachweis des Erregers in den nativen Rinderkotproben.

Da bislang der kulturelle MAP-Nachweis aus Rinderkot als „gold standard“ der Paratuberkulosedagnostik gilt, wurden die molekularbiologischen Ergebnissen der nativen Rinderkotproben mit den Ergebnissen der Kultur verglichen. Die molekularbiologischen Untersuchungen der nativen Rinderkotproben wurden teilweise parallel zu dem Vorversuch bzw. dem Hauptversuch I durchgeführt. Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte die DNA-Extraktion mit dem Standard-Kitsystem Q der Firma Qiagen. Da mit diesem Extraktionsverfahren nur sehr hohe Ct-Werte mittels TaqMan® Real-Time PCR erzielt werden konnten und insbesondere Kotproben mit niedrigen Erregerkonzentrationen gehäuft falsch-negativ detektiert wurden, erfolgten gezielte Modifikationen dieses Standard-Kitsystems Q, die eine deutliche Verbesserung der Ct-Werte bewirkten und die Nachweisrate von geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern deutlich erhöhte. Zusätzlich zu dem modifizierten DNA-Extraktionsverfahren Qm der Firma Qiagen wurde das Standard-Kitsystem R der Firma Roche sowie die modifizierte Variante Rm bei den Untersuchungen berücksichtigt. Somit wurde die Eignung jedes der vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren in Kombination mit der TaqMan® Real-Time PCR und der nested-PCR an nativen Rinderkotproben überprüft. Kotproben, bei denen die DNA-Extraktion mittels Standard-Kitsystem Q bzw. R erfolgte und die grenzwertige Ct-Werte mittels TaqMan® Real-Time PCR bzw. fragliche Ergebnisse mittels nested-PCR erzielten, wurden mit einem der modifizierten DNA-Extraktionsverfahren wiederholt untersucht.

a) DNA-Extraktionsverfahren

Für die erfolgreiche Anwendung von PCR-Systemen ist das eingesetzte **DNA-Extraktionsverfahren** ausschlaggebend, das in hohem Maße Einfluss auf die Nachweisrate der PCR nimmt (Harris und Barletta, 2001). Dabei sollte das DNA-Extraktionsverfahren einerseits die in der Matrix Rinderkot vielfach enthaltenen PCR-Inhibitoren wie Phytinsäure, Polyphenole, Polysaccharide und Hämin zuverlässig beseitigen und andererseits die Gewinnung von MAP-DNA in guter analytischer Qualität aus der Matrix gewährleisten. Auf die relevanten PCR-Inhibitoren in der Matrix Rinderkot wurde detailliert in Kapitel 5.1 eingegangen, ebenso auf die vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden. Aus den Ergebnissen des Vorversuches sowie des Hauptversuches I wird ersichtlich, dass insbesondere eine **erhöhte Koteinwaage**, eine zusätzliche **mechanische Aufreinigung** sowie eine intensive **thermische Aufbereitung** der Rinderkotproben bei der DNA-Extraktion einen positiven Effekt auf die Nachweisrate des TaqMan® Real-Time PCR-Verfahrens haben (vgl. Kapitel 5.1 und 5.2). Aber auch bei nativen Rinderkotproben konnte durch die modifizierten DNA-Extraktionsverfahren in Kombination mit dem institutseigenen TaqMan® Real-Time PCR-Verfahren und dem eingesetzten nested-PCR-Verfahren eine deutliche Verbesserung der Nachweisrate von geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern gewährleistet werden. Von insgesamt 30 kulturell bestätigten geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern konnten 26 molekularbiologisch positiv bestätigt werden. Davon

erzielte die TaqMan[®] Real-Time PCR 22 positive und die nested-PCR 18 positive Ergebnisse. 14 Proben wurden in Übereinstimmung der beiden PCR-Verfahren positiv detektiert, 8 Proben erwiesen sich allein in der Real-Time PCR und 4 Proben allein in der nested-PCR als positiv.

b) falsch-positive Ergebnisse – Spezifität

Um Kontaminationen während der Aufbereitung von Rinderkotproben und damit **falsch-positive Ergebnisse** ausschließen zu können, ist eine ausgesprochene Sorgfalt bei der DNA-Isolierung und dem Pipettieren der PCR-Ansätze erforderlich. Jedes Arbeitsgerät und jede Lösung kann Quelle einer Kontamination sein, so dass ein kontinuierliches **Probenmanagement** bzw. „**PCR Troubleshooting**“ bei der molekularbiologischen Diagnostik zwingend ist. Vor diesem Hintergrund wurde bei jeder molekularbiologischen Untersuchung von Rinderkot eine negative Aufbereitungskontrolle, eine Aufbereitungskontrolle des Leerwertes, eine Negativkontrolle und ein Mastermix-Leerwert mitgeführt. Die Aufbereitungskontrollen garantieren die Reinheit der eingesetzten Reagenzien sowie den Ausschluss möglicher Kontaminationen während der Aufbereitung. Die Negativkontrolle und der Mastermix-Leerwert zeigen die Funktionsfähigkeit der Amplifikation und ebenfalls Kontaminationen im Bereich der PCR-Vorbereitung auf. Die Aufbereitungen der Proben, die PCR-Vorbereitungen (PCR-Kabinett) und die PCR-Nachbereitung bei konventionellen PCR-Verfahren haben unter räumlicher Trennung zu erfolgen. Die räumliche Trennung ist ein wesentlicher Faktor zur Vermeidung von Kontaminationen und wurde bei den vorliegenden molekularbiologischen Untersuchungen stets eingehalten. Um Laborkontaminationen mit Erreger-DNA zu vermeiden, erfolgte die Pipettierung der PCR-Ansätze in einem allseits umschlossenen PCR-Kabinett. Nach den Aufbereitungen wurde durch die langfristige Einwirkung von UV-Strahlen die Eliminierung von Rest-DNA sichergestellt. Weiterhin wurden die Räumlichkeiten regelmäßig einer Grundreinigung unterzogen, um die Ansammlung von grobem Schmutz und Staub zu vermeiden. Vor Beginn und nach Beendigung der Arbeiten wurden alle Kontaktflächen und Gerätschaften gereinigt und desinfiziert. Während der Aufbereitung der Proben wurden stets Schutzkleidung und Handschuhe getragen und diese regelmäßig desinfiziert bzw. gewechselt, insbesondere vor sensiblen Arbeiten wie der Zugabe von isolierter DNA. Bei dem Überführen probenhaltiger Reagenzien wurden ausschließlich sterile, gestopfte Pipettenspitzen verwendet, um die Kontamination der Pipetten selbst durch DNA- bzw. Erregerhaltige Aerosole zu vermeiden. Es kamen dabei ausschließlich kalibrierte Pipetten zum Einsatz, um ihre Funktionsfähigkeit sowie die Aufnahme der gewünschten Volumina zu garantieren. Die Arbeitsschritte der Extraktionsverfahren wurden vorausschauend vorbereitet. Dabei ist die Bildung von Aerosolen beim Öffnen der Probengefäße stets zu vermeiden. Weiterhin wurde gewährleistet, dass nur jeweils ein Probengefäß geöffnet wurde und dieses so wenig und so kurz wie möglich. Sämtliche autoklavierbare Gerätschaften (Probengefäße, Pipettenspitzen etc.) und Lösungen, die bei den molekularbiologischen Untersuchungen der Rinderkotproben zum Einsatz kamen, wurden

autoklaviert. Falls Kontaminationen durch Aerosole beim Öffnen bzw. durch versehentliches Verschütten von Probengefäßen auftraten, wurden die kontaminierten Flächen bzw. Gerätschaften desinfiziert und abschließend mit DNA AWAY™ (Firma Roth), einer Lösung, die gezielt auf Oberflächen, Gerätschaften und auch Reaktionsgefäßen unerwünschte DNA beseitigt, versetzt. Geeignete Maßnahmen bei erfolgten Kontaminationen in der molekularbiologischen Diagnostik sind der gezielte Austausch oder die Überprüfung von Reagenzien bzw. Lösungen, die bei den Untersuchungen zum Einsatz kamen. Durch die mitgeführten Kontrollen, wie die negative Aufbereitungskontrolle, die Aufbereitungskontrolle des Leerwertes oder den Mastermix-Leerwert, kann eventuell die Quelle der Kontamination lokalisiert bzw. eingegrenzt werden. Bei fraglichen Ergebnissen, schwachen Signalen der internen Amplifikationskontrolle oder der Positivkontrolle sollte der PCR-Lauf wiederholt werden. Bei mehrfach unstimmgigen oder fraglichen Ergebnissen sollten fehlerhafte Volumina vor allem von Puffern, Enzymen sowie Mastermixes während der Aufbereitung und der PCR-Vorbereitung der Proben, defekte Pipetten, verunreinigte oder beschädigte Primer, eine falsche Programmwahl beim Bestücken des Cyclers, ungewollte Temperaturschwankungen bei Ablauf der Amplifikation im Cycler sowie Cycler-Ausfälle ausgeschlossen werden.

Bei den Untersuchungen der nativen Rinderkotproben des Hauptversuches II wurde mittels TaqMan® Real-Time PCR sowie mittels nested-PCR keine der 111 Kultur-negativen Proben falsch-positiv detektiert. Damit wurden von beiden PCR-Systemen **Spezifitäten von jeweils 100 %** erzielt.

c) falsch-negative Ergebnisse – Sensitivität

Um **falsch-negative Ergebnisse** bei den molekularbiologischen Untersuchungen ausschließen zu können, wurde eine positive Aufbereitungskontrolle, eine Positivkontrolle und eine interne Amplifikationskontrolle (IAK) bei jedem Durchgang der Probenaufbereitung bzw. jedem PCR-Lauf mitgeführt. Die positive Aufbereitungskontrolle garantiert dabei die Funktionsfähigkeit des Aufbereitungsprozederes und der DNA-Isolierung aus den Rinderkotproben. Die Positivkontrolle und die IAK stellen die Funktionsfähigkeit der Milieu-Bedingungen bzw. Amplifikation der Ziel-DNA im Cycler sicher. Eine Probe kann nur bei Vorhandensein einer IAK als definitiv negativ befunden werden, da so eine Hemmung der PCR-Reaktion ausgeschlossen werden kann. Vereinzelt kann die Futter-bedingte Kotbeschaffenheit bei der molekularbiologischen Untersuchung von Rinderkotproben zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Auffällig ist dabei, dass meistens alle Kotproben von Tieren eines Bestandes betroffen sind. Diese Rinderkotproben enthalten PCR-Inhibitoren, die durch die üblichen Prozedere der DNA-Extraktion nicht entfernt werden und zu leichten Grünverfärbungen des Eluates führen. Derartige Eluate sind molekularbiologisch nicht auswertbar.

Bei den Untersuchungen der nativen Rinderkotproben des Hauptversuches II wurden mit der TaqMan® Real-Time PCR von insgesamt 95 Kultur-positiven Rinderkotproben 8 Kotproben von geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern und mit der nested-PCR 12 Kotproben von geringgradig

MAP-ausscheidenden Rindern, 1 Kotprobe eines mittelgradig MAP-ausscheidenden Rindes sowie 2 Kotproben von hochgradig MAP-ausscheidenden Rindern im Vergleich zu den Ergebnissen der Kotkultur falsch-negativ detektiert. Damit wurde von der TaqMan[®] Real-Time PCR eine **Sensitivität** von 91,6 % und von der nested-PCR eine **Sensitivität** von 84,2 % erzielt.

d) Vergleich mit anderen PCR-Verfahren

In den letzten Jahren wurden vereinzelt Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP in Rinderkot eingesetzt. Wie in dieser Arbeit wurden auch in einer Studie von Bögli-Stuber et al. (2005) artifiziell kontaminierte und native Rinderkotproben mit einem Real-Time PCR-Verfahren untersucht. Deren Real-Time PCR-Verfahren erzielte bei der Untersuchung von artifiziell kontaminierten Rinderkotproben, ähnlich der Real-Time PCR dieser Arbeit, eine Nachweisrate von 100 % bei einer Erregerkonzentration von 5×10^2 KbE/g Rinderkot. Bei ihren Untersuchungen der nativen Rinderkotproben (n = 310) erwiesen sich 20 Proben in der Kotkultur und 31 Proben in der Real-Time PCR als positiv. 12 Rinderkotproben wurden in Übereinstimmung dieser beiden Nachweisverfahren positiv detektiert. Damit erzielte das Real-Time PCR-Verfahren eine Sensitivität von 60 % und eine Spezifität von 93,4 %. Im Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Nachweisverfahren konnte ein Kappa-Wert von 0,42 ermittelt werden. Die DNA-Extraktion basierte auf dem High Pure PCR Template Preparation Kit[®] der Firma Roche. Als thermische Komponente des DNA-Extraktionsverfahrens wurden die Proben abwechselnd in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend erhitzt, um einen möglichst vollständigen Aufschluss der mykobakteriellen Zellwand zu gewährleisten. Obwohl bei den Untersuchungen der artifiziell kontaminierten Rinderkotproben mit dem Real-Time PCR-Verfahren bei einer vergleichbaren Erregerkonzentration eine 100 %ige Nachweisrate erzielt werden konnte, gewährleistete dieses molekularbiologische Nachweisverfahren mit einer Sensitivität von 60 % und einer Spezifität von 93,4 % bei der Untersuchung von nativen Rinderkotproben keinen zuverlässigen Nachweis von MAP aus Rinderkot.

In einer weiteren Studie detektierte ein IS*Mav*2-basiertes Real-Time PCR-Verfahren 23 % der Kulturpositiven Proben (n = 1.481). Dabei wurden 60 (76 %) von 79 Rindern, die den Erreger in hohen Konzentrationen mit dem Kot ausschieden und 10 (4,1 %) von 244 Rindern, die den Erreger in geringen Konzentrationen mit dem Kot ausschieden, molekularbiologisch positiv detektiert (Wells et al., 2006). Die DNA-Extraktion basierte auf dem QIAamp DNA Stool Mini Kit[®] der Firma Qiagen. Die Koteinwaage betrug 1 g, weitere Modifikationen des DNA-Extraktionsverfahrens wurden nicht vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen die Problematik der molekularbiologischen Nachweisverfahren bei der Detektion von insbesondere geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern. Ebenso untersuchten Christopher-Hennings et al. (2003) 63 Rinderkotproben kulturell und molekularbiologisch. Die Ergebnisse des kulturellen MAP-Nachweises aus Kot wurden als „gold

standard“ gewertet. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche DNA-Extraktionsverfahren mit einer IS900-basierten nested-PCR sowie einer IS900-basierten Real-Time PCR kombiniert. Das erste DNA-Extraktionsverfahren erfolgte gemäß dem Standard-Protokoll des HerdChek *Mycobacterium paratuberculosis* DNA Test-Kit® der Firma IDEXX Laboratories. Dabei wurde 1 g Rinderkot als Einwaage verwendet und eine mechanische Aufbereitung der Proben mit dem Ribolyser (30 sec, 5,5 m/sec) vorgenommen. Bei dem zweiten DNA-Extraktionsverfahren handelte es sich um ein universitätsinternes Protokoll. Hierbei wurde ebenfalls 1 g Rinderkot untersucht und ein mechanischer Aufschluss der Proben im Mini-Bead-Beater (3 min bei Höchstgeschwindigkeit) unter Zugabe von Zirconium-Keramikkügelchen durchgeführt. Als wesentlicher Unterschied zwischen den eingesetzten DNA-Extraktionsverfahren erfolgte die DNA-Aufbereitung bei dem Standard-Protokoll der Firma IDEXX Laboratories säulenbasiert, was eine gezielte Beseitigung der in den Proben enthaltenen PCR-Inhibitoren gewährleistete. Die Autoren schließen aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen, dass mit dem ersten DNA-Extraktionsverfahren, basierend auf dem kommerziellen Kit der Firma IDEXX Laboratories, durch die gezielte Eliminierung von PCR-Inhibitoren insbesondere in Bezug auf die nested-PCR weniger falsch-negative Ergebnisse im Vergleich zur Kultur erreicht werden konnten als mit dem universitätsinternen Protokoll. Unter Verwendung des Standard-Protokolls der Firma IDEXX Laboratories konnte die nested-PCR eine Sensitivität und eine Spezifität von jeweils 100 % erlangen, während sich mit dem universitätsinternen Protokoll eine Sensitivität von 82 % und eine Spezifität von 95 % ergaben. Demgegenüber erzielte die Real-Time PCR unter Verwendung des Standard-Protokolls der Firma IDEXX Laboratories eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 100 %, während mit dem universitätsinternen Protokoll eine Sensitivität von 98 % und eine Spezifität von 95 % errechnet wurde. Widersprüchlich ist allerdings, dass die Real-Time PCR in Kombination mit dem universitätsinternen DNA-Extraktionsverfahren eine höhere Sensitivität erreichte als mit dem Standard-Protokoll. Die Autoren schließen daraus, dass die Real-Time PCR weniger empfindlich gegenüber PCR-Inhibitoren zu sein scheint als die nested-PCR. Zusätzlich nimmt die Anzahl der positiven sowie negativen Proben einen wesentlichen Einfluss auf die Sensitivität und die Spezifität eines PCR-Verfahrens. Unter den 63 untersuchten Rinderkotproben befanden sich 19 Kultur-negative und 44 Kultur-positive Kotproben. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei Rinderkotproben, die den Erreger in geringen Konzentrationen enthalten. In der Kotkultur konnten von 44 positiven Kotproben 10 Proben identifiziert werden, die den Erreger in geringen Konzentrationen enthielten (Christopher-Hennings et al., 2003). Die oben aufgeführten Sensitivitätsverluste der beiden PCR-Systeme in Kombination mit dem jeweiligen DNA-Extraktionsverfahren sind auf den mangelnden Nachweis von geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern (n = 10) zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass die Anzahl der molekularbiologisch falsch-negativen Ergebnisse bei einer größeren Anzahl von Kotproben mit niedrigen Erregerkonzentrationen ansteigen würde. Somit verdeutlicht auch diese Studie die Problematik der molekularbiologischen Nachweisverfahren bei der Erfassung von insbesondere geringgradig MAP-ausscheidenden Rindern.

e) Schlussfolgerungen

Abschließend ist festzuhalten, dass das institutseigene TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren, basierend auf den MAP-Markern F57 und IS*Mav*2, beim Nachweis von MAP aus nativen Rinderkotproben (n = 206) in Bezug auf den „gold standard“ der Paratuberkulosedagnostik, dem kulturellen MAP-Nachweis aus Kot, eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 91,6 % erzielte, während für das mitgeführte nested-PCR-Verfahren basierend auf dem MAP-Marker IS*900* eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 84,2 % errechnet wurden. Beim Vergleich der Ergebnisse der Kultur und dem TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren konnte durch die Berechnung des Kappa-Index eine nahezu vollständige Übereinstimmung ($\kappa = 0,92$), bei dem Vergleich mit dem nested-PCR-Verfahren nur eine große Übereinstimmung ($\kappa = 0,59$) der Ergebnisse nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass das institutseigene TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren in Kombination mit modifizierten und weiterentwickelten DNA-Extraktionsverfahren einen zuverlässigen Erregernachweis aus der problematischen Matrix Rinderkot gewährleistet. Der Einsatz von zwei unterschiedlichen Markern ist insbesondere für den Nachweis von Rindern, die den Erreger in geringen Konzentrationen mit dem Kot ausscheiden, zu empfehlen.

Das führt zu dem Schluss, dass dieses molekularbiologische Verfahren zum Nachweis von MAP aus Rinderkot bei einer deutlichen Verkürzung der Bearbeitungszeit und einem geringeren Kostenaufwand mit dem kulturellen Erregernachweis aus Rinderkot konkurrieren kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Paratuberkulose des Rindes wird von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen. Da eine Beteiligung von MAP am Krankheitsgeschehen des Morbus Crohn beim Menschen nicht auszuschließen, dieser Erreger in Tierbeständen weit verbreitet ist und insbesondere Lebensmittel tierischen Ursprungs als Vektoren in Verdacht stehen, ist die Etablierung eines zuverlässigen und schnellen Verfahrens zum frühzeitigen Nachweis des Erregers in Milchrinderbeständen von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein institutseigenes TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren (Schönenbrücher et al., 2008), basierend auf den spezifischen MAP-Markern F57 und ISMav2, in Kombination mit vier unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren zum Nachweis von MAP aus artifiziell kontaminierten sowie nativen Rinderkotproben vergleichend untersucht. Bei den vier DNA-Extraktionsverfahren handelte es sich um zwei Standard- sowie zwei modifizierte DNA-Extraktionsverfahren mit einer zusätzlichen mechanischen Aufreinigung der Fäzesproben. Die Ergebnisse der artifiziell kontaminierten Rinderkotproben lassen klar erkennen, dass die mechanische Aufreinigung der Rinderkotproben sowie eine erhöhte Koteinwaage bei der DNA-Isolierung aus der Matrix Rinderkot einen entscheidenden Vorteil beim molekularbiologischen Nachweis von MAP bietet. Unter Berücksichtigung der modifizierten thermisch-chemisch-mechanischen DNA-Extraktionsverfahren konnte mit dem institutseigenen TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren eine Nachweisrate von 100 % bereits bei einer Erregerkonzentration von 10² KBE/g Rinderkot erzielt werden.

Bei der Untersuchung von 206 voruntersuchten, nativen Rinderkotproben wurde mit dem TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 91,6 % im Vergleich zu der kulturellen Anzucht, dem „gold standard“ der Paratuberkulosedagnostik, bestimmt. Vergleichend wurde bei den Untersuchungen dieser nativen Rinderkotproben ein nested-PCR-Verfahren (Bull et al., 2003) basierend auf dem MAP-Marker IS900 mitgeführt, das eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 84,2 % erreichte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass das institutseigene TaqMan[®] Real-Time PCR-Verfahren, kombiniert mit weiterentwickelten und modifizierten DNA-Extraktionsverfahren, einen zuverlässigen Erregernachweis aus der Matrix Rinderkot gewährleistet. Mit diesem molekularbiologischen Nachweissystem kann eine sensitive, spezifische und zugleich schnelle Methode für die Routinediagnostik von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderkotproben zur Verfügung gestellt werden.

7 SUMMARY

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the aetiological agent of paratuberculosis. It has also been implicated as a possible cause of Morbus Crohn; MAP is widely spread in dairy herds; particularly foods of animal origin are suspected to be acting as vectors by transferring this pathogen. On account of this, establishing a reliable and fast method to detect MAP in dairy herds is of essential importance.

In this study a TaqMan[®] real-time PCR-assay (Schönenbrücher et al., 2008) based on the MAP species-specific markers F57 and IS*Mav*2 was combined with four different protocols for DNA-extraction to detect MAP in experimentally and naturally contaminated faecal samples. Two standard and two modified protocols for DNA-extraction were applied. The two modified protocols included a mechanical disruption of the faecal samples. Results of the experimentally contaminated faecal samples clarified the advantages of the mechanical disruption of the faecal samples and a higher content of faeces for DNA-extraction. The detection limit of the TaqMan[®] real-time PCR-assay in consideration of the modified DNA-extraction protocols was consistently found to be 10² CFU/g faeces.

For the detection of MAP in well-selected naturally faecal samples (n = 206) the specificity and the sensitivity of the TaqMan[®] real-time PCR-assay were determined to be 100 % and 91,6 %. In comparison with these results the specificity and the sensitivity of a nested-PCR-assay based on the MAP species-specific marker IS900 were determined to be 100 % and 84,2 % for the identical faecal samples.

Results from these studies approve that the TaqMan[®] real-time PCR-assay in combination with enhanced and modified DNA-extraction techniques is a sensitive, specific and fast method for routine MAP screening of faecal samples.

8 ANHANG

8.1 Fließdiagramme

8.1.1 Fließdiagramm 1: Schematische Darstellung der Dekontamination von Rinderkot in Anlehnung an die AVID-Methode (AVID VII /1996)

1.Tag:

3 g Rinderkot in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen



Zentrifugenröhrchen mit der Kotsuspension auf **30 ml** Gesamtvolumen mit 0,75 %iger HPC-Lösung auffüllen, Probe anschließend gründlich vortexen



kurze Sedimentation der Probe für **wenigen Minuten**, dann 20 ml Überstand dekantieren und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen, Zentrifugenröhrchen mit groben Kotpartikeln verwerfen



Zentrifugenröhrchen **30 min** schütteln in einem **Schüttelinkubator (100 Upm)** anschließend Probe **über Nacht** in senkrechter Lage bei Raumtemperatur **sedimentieren** lassen



2.Tag:

Zentrifugation der Probe für **30 min** bei **900xg** und Raumtemperatur



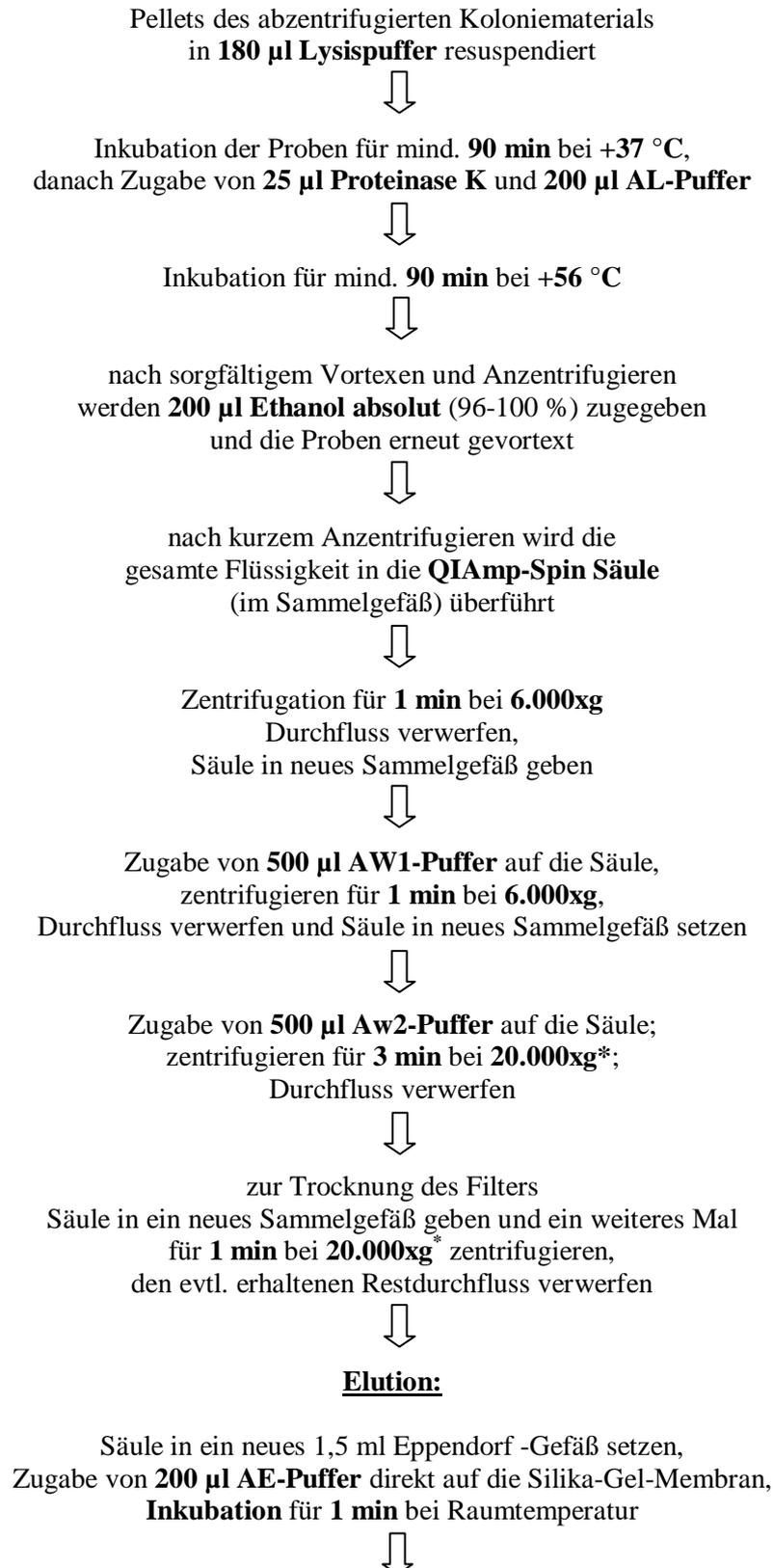
klaren Überstand der Probe verwerfen, bis auf **1 ml Restflüssigkeit** und den **Bodensatz**



definierte Menge des **Bodensatzes** auf entsprechende **Nährmedium** überführen

8.1.2 Fließdiagramm 2: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Mykobakterienkulturen mittels konventionellem Kitsystem (DNeasy Blood & Tissue Kit® der Fa. Qiagen)

Arbeitsprotokoll:



zentrifugieren für **1 min** bei **6.000xg**



aufgefangenes Eluat enthält die DNA,
kann direkt in der PCR eingesetzt werden, zur längeren
Aufbewahrung bei mind. -20 °C tiefrieren

*Beachte: Ab Einsatz der Säulen wurde nicht mehr mit 20.000xg zentrifugiert sondern mit 15.800xg in der Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5415 C.

8.1.3 Fließdiagramm 3: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels Standard-DNA-Extraktionsverfahren Q (QIAamp DNA Stool Mini Kit® der Fa. Qiagen)

Vor Gebrauch des Kits zu beachten:

Der ASL-Puffer ist vor Gebrauch gut zu mischen; falls ein Niederschlag im Gefäß zu erkennen ist, sollte der Puffer bei +70 °C inkubiert werden, bis sich der Niederschlag aufgelöst hat.

Die Puffer AW1 und AW2 müssen vor dem Erstgebrauch gemäß Handbuch mit Alkohol aufgefüllt werden.

Vor Gebrauch müssen alle Puffer auf Kristallbildung (Niederschlag) überprüft werden und gegebenenfalls unter warmem fließendem Wasser oder bei +55 °C bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle erwärmt werden. Der ASL-Puffer kann bis +70 °C erwärmt werden.

Alle Arbeitsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Sorgfältiges Vortexen erfolgt über einen Zeitraum von 15 Sekunden.

Arbeitsprotokoll:

Einwaage von **180-220 mg Kot** in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß



Zugabe von **1,4ml ASL-Puffer** und Probe sorgfältig, kontinuierlich **1 min** vortexen bis die Probe vollständig homogen ist



Inkubation 5 min bei +95 °C,
vortexen der Proben für **15 s**,
anschließend für **1 min** bei **20.000xg** zentrifugieren



1,2 ml Überstand abpipettieren und
in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß geben,
Pellet verwerfen



InhibitEX Tablette zufügen, sorgfältig **1 min** kontinuierlich
bis zur homogenen Auflösung der Tablette vortexen,
anschließend **1 min** bei Raumtemperatur inkubieren



nach **Zentrifugation** für **3 min** bei **20.000xg**,
gesamten Überstand in ein
1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführen und
das Pellet verwerfen



Überstand erneut für **3 min** bei **20.000xg** zentrifugieren



15 µl Proteinase K in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorlegen,
Zugabe von **200 µl Überstand** aus dem letzten Zentrifugationsschritt,
Zugabe von **200 µl AL-Puffer**,
15 s vortexen,
anschließend kurz anzentrifugieren



Inkubation der Probe bei **+70 °C** für **10 min**,
anschließend kurz vortexen und anzentrifugieren



Zugabe von **200 µl absolutem Ethanol** (96-100 %),
gründlich vortexen und kurz anzentrifugieren



gesamte Flüssigkeit auf **QIAamp-Spin Säule** überführen
und für **1 min** bei **20.000 xg** zentrifugieren,
Durchfluss verwerfen,
Säule in neues Sammelgefäß geben



Zugabe von **500 µl AW1-Puffer** auf die Säule,
Zentrifugieren für **1 min** bei **20.000*xg**,
Durchfluss verwerfen und Säule in ein neues Sammelgefäß setzen



Zugabe von **500 µl Aw2-Puffer** auf die Säule,
Zentrifugieren für **3 min** bei **20.000xg***,
Durchfluss verwerfen



Zur Trocknung des Filters
Säule in ein neues Sammelgefäß geben und ein weiteres Mal
für **1 min** bei **20.000xg*** zentrifugieren,
den evtl. erhaltenen Restdurchfluss verwerfen



Elution:

Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß setzen,
Zugabe von **100 µl AE-Puffer** direkt auf die Silika-Gel-Membran
Inkubation für **1 min** bei Raumtemperatur



Zentrifugation für **1 min** bei **20.000xg***



aufgefangenes Eluat enthält die DNA,
kann direkt in der PCR eingesetzt werden, zur längeren
Aufbewahrung bei mind. -20 °C einfrieren

*Beachte: Ab Einsatz der Säulen wurde nicht mehr mit 20.000xg zentrifugiert sondern mit 15.800xg in der Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5415 C.

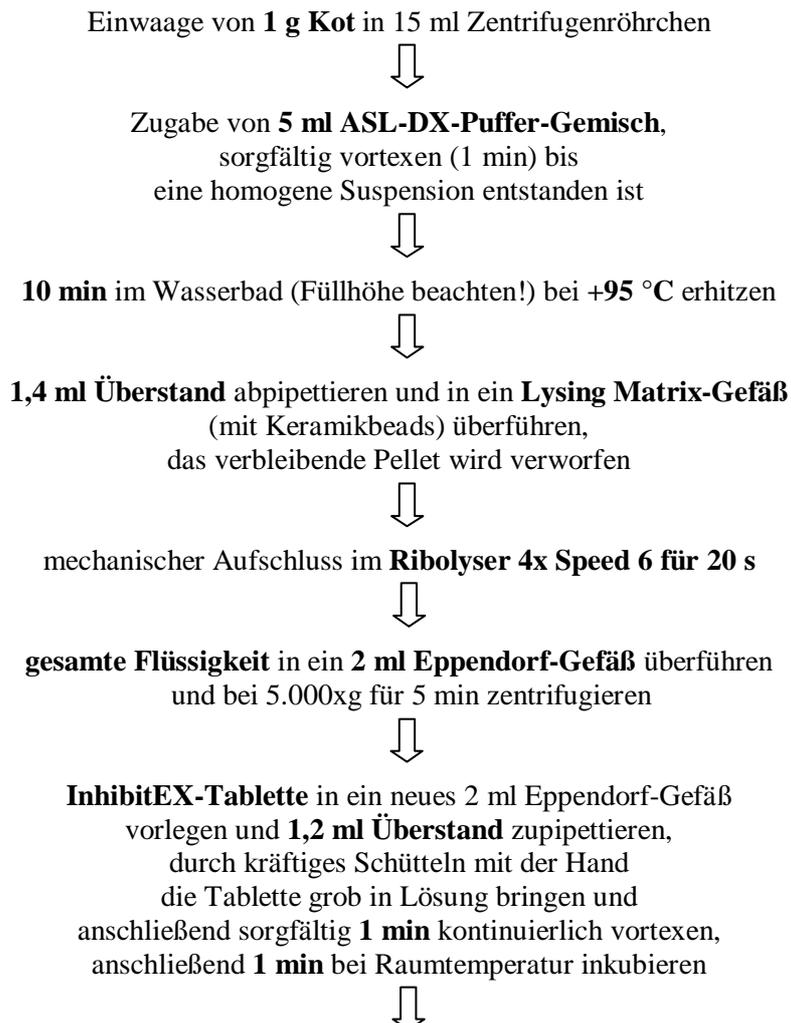
8.1.4 Fließdiagramm 4: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels modifiziertem DNA-Extraktionsverfahren Qm (QIAamp DNA Stool Mini Kit® der Fa. Qiagen)

Vor dem Gebrauch zu beachten:

Herstellung der **Gebrauchslösung ASL-DX (Fa. Qiagen)**: 140 ml ASL Puffer wurden auf +70 °C erwärmt und anschließend 350 µl DX-Puffer zugegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt und bei Raumtemperatur gelagert. Das ASL-DX Gemisch ist zügig zu verbrauchen! Falls ein Niederschlag im ASL-Puffer zu erkennen ist, sollte der Puffer bei +70 °C inkubiert werden, bis sich der Niederschlag aufgelöst hat.

Die Puffer AW1 und AW2 müssen vor dem Erstgebrauch gemäß Handbuch mit Alkohol aufgefüllt werden. Vor Gebrauch müssen alle Puffer auf Kristallbildung überprüft werden und gegebenenfalls unter warmem fließendem Wasser oder bei +55 °C bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle erwärmt werden. Alle Arbeitsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Sorgfältiges Vortexen erfolgt über einen Zeitraum von 15 Sekunden.

Arbeitsprotokoll:



Zentrifugation für 3 min bei 20.000xg
und **gesamten Überstand** in ein
1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführen,
das Pellet verwerfen



den Überstand erneut für **3 min bei 20.000xg** zentrifugieren



20 µl Proteinase K in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorlegen,
Zugabe von **300 µl Überstand** aus dem letzten Zentrifugationsschritt,
Zugabe von **300 µl AL-Puffer**,
15 s vortexen



Inkubation der Probe für **5-10 min** bei **+70 °C**,
anschließend für weitere **10 min** bei **+95 °C** inkubieren,
kurz vortexen und anzentrifugieren



Zugabe von **300 µl absolutem Ethanol** (96-100 %),
erneut gründlich vortexen und anzentrifugieren



gesamte Flüssigkeit in 2 Schritten (je ca. 500 µl) auf
QIAamp-Spin Säule überführen
und für jeweils **1 min** bei **20.000xg*** zentrifugieren,
Durchfluss verwerfen,
Säule in ein neues Sammelgefäß geben



Zugabe von **500 µl AW1-Puffer** auf die Säule,
zentrifugieren für **1 min** bei **20.000xg***,
Durchfluss verwerfen und Säule in neues Sammelgefäß setzen



Zugabe von **500 µl Aw2-Puffer** auf die Säule,
zentrifugieren für **3 min** bei **20.000xg***,
Durchfluss verwerfen



zur Trocknung des Filters
Säule in ein neues Sammelgefäß geben und ein weiteres Mal
für **1 min bei 20.000xg*** zentrifugieren,
den evtl. erhaltenen Restdurchfluss verwerfen



Elution:

Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß setzen,
Zugabe von **100 µl AE-Puffer** direkt auf die Silika-Gel-Membran
Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur



zentrifugieren für **1 min bei 20.000* xg**

aufgefangenes Eluat enthält die DNA,
kann direkt in der PCR eingesetzt werden, für längere
Aufbewahrung bei mind. -20 °C eingefrieren

*Beachte: Ab Einsatz der Säulen wurde nicht mehr mit 20.000xg zentrifugiert sondern mit 15.800xg in der Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5415 C.

8.1.5 Fließdiagramm 5: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus Rinderkot mittels Standard sowie modifiziertem DNA-Extraktionsverfahren R und Rm (High Pure PCR Template Preparation Kit® der Fa. Roche unter Verwendung des S.T.A.R. Puffers)

Vor dem Gebrauch zu beachten:

- Vorwärmen des Elution-Puffers auf +70 °C,
- Zugabe von 20 ml absolutem Ethanol zum Inhibitor Removal-Puffer
- Zugabe von 80 ml absolutem Ethanol zum Washing-Puffer
- Ansatz der LysozymbLösung (10 mg/ ml in 10 mM Tris-HCl pH 8,0):
- Auflösen des Proteinase K-Lyophilisates nach Vorschriften:
10000 U/mg, Fa. Merck

Arbeitsprotokoll:

Einwaage von 1,5 g Rinderkot in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen
Zugabe von je **5 ml S.T.A.R. Puffer** und
sorgfältiges Homogenisieren der Probe (15 s vortexen),
laut Pufferbegleitzettel können so vorbereitete Proben
5 Tage bei +15 bis +25 °C gelagert werden



Proben nach erneutem Vortexen
1 min bei **1.000xg** zentrifugiert

A: nicht modifiziertes Protokoll

1 ml des Überstandes in ein
1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführen



B: modifiziertes Protokoll

1 ml des Überstandes in ein
2 ml Reaktionsgefäß
(Fa. Biozym) mit
Keramikbeads überführen



Mechanischer Aufschluss im
Ribolyser 2x Speed 6 für 20 s



danach Proben bei **+95 °C 10 min** inkubieren und
anschließend **5 min** bei **5.000xg** zentrifugieren



200 µl des Überstandes
mit **5 µl LysozymbLösung** versetzen,
vortexen und **15 min** bei **+37 °C**
im **Thermomixer** unter Schütteln inkubieren



Zugabe von **200 µl Binding Puffer** und
40 µl Proteinase K-Lösung, gut mischen/vortexen und
10 min bei **+70 °C** im Thermomixer unter Schütteln inkubieren,
nach Anzentrifugieren Zugabe von **100 µl Isopropanol**,

Probe anschließend gründlich vortexten



Säule in ein Sammelgefäß setzen und
Probe in die **Säulen** überführen,
Zentrifugation für **1 min** bei **8.000xg**,
Durchfluss verwerfen,
Säule in neues Sammelgefäß setzen



Zugabe von **500 µl Inhibitor Removal Puffer**
Zentrifugation für **1 min** bei **8.000xg**,
Durchfluss verwerfen,
Säule in neues Sammelgefäß setzen



Zugabe von **500 µl Washing Puffer**,
Zentrifugation für **1 min** bei **8.000xg**,
Durchfluss verwerfen,
Säule in neues Sammelgefäß setzen



erneute Zugabe von **500 µl Washing Puffer**,
Zentrifugation für **1 min** bei **8.000xg**,
Durchfluss verwerfen,
Säule in neues Sammelgefäß geben



zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers
noch einmal **10 s** bei **20.000xg*** zentrifugieren,
den evtl. erhaltenen Restdurchfluss wieder verwerfen



Elution:

Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß setzen,
Zugabe von **100 µl** des auf **+70 °C** vorgewärmten **Elution Puffers**,
Zentrifugation für **1 min** bei **8.000xg**



Eluat enthält DNA; Aufbewahrung bei
+2 bis +8 °C oder -15 bis -25 °C

*Beachte: Ab Einsatz der Säulen wurde nicht mehr mit 20.000xg zentrifugiert sondern mit 15.800xg in der Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5415 C.

8.1.6 Fließdiagramm 6: Schematische Darstellung zur artifiziellen Kontamination von Rinderkotproben mit MAP (Einmischversuche 1, 2 und 3)

Arbeitsprotokoll:

- 1) **1 MGIT-Röhrchen** des ausgewählten MAP-Stammes MAP 423 (Bebrütungsdauer möglichst 8-12 Wochen) gründlich **vortexen**
- 2) **1 ml des Flüssigmediums entnehmen** mittels 1 ml Glaspipette und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml Eppendorf-Gefäß) geben
- 3) **Zentrifugation** des Gefäßes für 2 min bei 7.000xg
- 4) Überstand **abpipettieren** und Pellet **resuspendieren** in 1 ml steriler isotoner NaCl-Lösung mittels Eppendorf-Pipette und gründlich **vortexen** bis der Pellet vollständig aufgelöst ist, anschließend Zugabe von Keramik-Kügelchen und gründliches Vortexen der Probe
- 5) Anlegen der **dekadischen Verdünnungsreihe für die artifizielle Kontamination des Rinderkotes mit den Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6}**
- 6) **Keimgehalt** (MAP 423) **des MGIT-Flüssigmediums** in der Zählkammer nach TÜRCK bestimmen
- 7) 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufen im Doppelansatz auf **Middlebrook 7H10-Festmedium** ausspateln und bei +37 °C bebrüten
- 8) **Spiken** der eingewogenen Kotprobe (jeweils 20 g pro Verdünnungsstufe) mit 2 ml jeder Verdünnungsstufe; kontaminierte Kotproben **gut manuell mischen** und **stomachern (mind. 2 min)**
- 9) anschließend Abwiegen der entsprechenden Kotmengen für die DNA-Isolierung und weiteres Vorgehen gemäß der jeweiligen Arbeitsanweisungen

Handhabung der Zählkammer nach Türk:

- Zählkammer vor dem Gebrauch mit Alkohol entfetten
- erhobene Glasbalken befeuchten und sauberes Deckglas aufpressen bis Newtonsche Ringe erscheinen
- beidseitig im Zählbereich seitlich des Deckglases einen Tropfen Keimsuspension auf die Zählkammer auftragen (dieser wird automatisch eingesaugt)
- Auszählung der Keime unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung, Auszählung und Berechnung erfolgen wie bei der Zählkammer nach Neubauer:
 - 5 Erythrozyten-Zählfelder mit jeweils 16 Kleinstquadraten werden ausgezählt
- Nach der Zählung, Zählkammer mit Deckglas auf Papiertuch legen und gut einsprühen mit Desinfektionsmittel, dann Deckglas werfen und Zählkammer reinigen und abtrocknen

8.1.7 Fließdiagramm 7: Schematische Darstellung zur artifiziellen Kontamination von Rinderkotproben mit MAP im Hauptversuch I (Einmischversuche 4, 5 und 6)

Arbeitsprotokoll:

- 1) **jeweils 1 Flasche** des Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium des ausgewählten MAP-Stammes MAP 423 bzw. J 27 (Bebrütungsdauer möglichst 8-12 Wochen) gründlich **vortexen**
- 2) **1 ml des Middlebrook 7H9-Flüssigmediums entnehmen** mittels 1 ml Glaspipette
- 3) Anlegen der **dekadischen Verdünnungsreihe für die artifizielle Kontamination des Rinderkotes mit den Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6}**
- 4) **Keimgehalt** (MAP-Stamm MAP 423 oder J 27 (DSMZ-Nr. 44135)) **des Middlebrook 7H9-Flüssigmediums** in Zählkammer nach TÜRCK bestimmen
- 5) 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe im Doppelansatz auf **Middlebrook 7H10-Festmedium**, ausspateln und bei +37 °C bebrüten
- 6) **Spiken** der eingewogenen Kotprobe (jeweils 20 g pro Verdünnungsstufe) mit 2 ml jeder Verdünnungsstufe; kontaminierte Kotproben **gut manuell mischen** und **stomachern (mind. 2 min)**
- 7) anschließend Abwiegen der entsprechenden Kotmengen für die DNA-Isolierung; weiteres Vorgehen gemäß der jeweiligen Arbeitsanweisungen

Handhabung der Zählkammer nach Türck siehe Fließdiagramm 6

8.2 Ergebnistabellen

Tabelle 43:

Ergebnisübersicht der mikroskopischen, kulturellen und molekularbiologischen Untersuchungen von voruntersuchten, nativen Rinderkotproben auf MAP (n = 206)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzucht ⁴	Voruntersuchungen ⁵
1	Bestand 1	negativ	negativ	positiv	positiv (+) ⁶	ELISA-B ⊕
2	Bestand 1	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ⊕
3	Bestand 1	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ⊕
4	Bestand 1	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ⊕
5	Bestand 1	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ⊕
6	Bestand 1	positiv	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ⊕
7	Bestand 1	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	ELISA-B ⊕
8	Bestand 1	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-B ⊕
9	Bestand 1	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	ELISA-B ⊕
10	Bestand 1	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	ELISA-B ⊕
11	Bestand 1	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	ELISA-B ⊕
12	Bestand 1	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ⊕
13	Bestand 2	negativ	negativ	negativ	positiv (+)	ELISA-M/B -/Kotkultur ⊕
14	Bestand 2	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
15	Bestand 2	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
16	Bestand 2	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
17	Bestand 2	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	ELISA-B -/Kotkultur ⊕
18	Bestand 2	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	ELISA-M/B -/Kotkultur ⊕
19	Bestand 2	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-M/B -/Kotkultur ⊕
20	Bestand 2	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
21	Bestand 2	positiv	positiv	positiv	positiv (+)	ELISA-M/B -/Kotkultur ⊕
22	Bestand 3	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
23	Bestand 3	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
24	Bestand 3	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
25	Bestand 3	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzucht von MAP im Doppelsatz auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR; ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++): 10-50; (+++): >50)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzüchtung ⁴	Voruntersuchungen ⁵
26	Bestand 3	positiv	positiv	positiv	positiv (++) ⁶	Kotkultur ⊕
27	Bestand 3	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
28	Bestand 3	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
29	Bestand 3	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
30	Bestand 3	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
31	Bestand 3	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
32	Bestand 3	positiv	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
33	Bestand 4	positiv	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
34	Bestand 4	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
35	Bestand 4	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	Kotkultur ⊕
36	Bestand 4	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
37	Bestand 4	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	Kotkultur ⊕
38	Bestand 5	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
39	Bestand 5	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
40	Bestand 5	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
41	Bestand 5	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
42	Bestand 5	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
43	Bestand 5	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
44	Bestand 6	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-M -/Kotkultur ⊕
45	Bestand 6	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-M ⊕/Kotkultur ⊕
46	Bestand 6	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M -/Kotkultur -
47	Bestand 6	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M ⊕/Kotkultur -
48	Bestand 6	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M -/Kotkultur -
49	Bestand 6	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M -/Kotkultur -
50	Bestand 6	negativ	negativ	positiv	positiv (+)	ELISA-M -/Kotkultur ⊕

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR; ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++): 10-50; (+++): >50)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzuchtung ⁴	Voruntersuchungen ⁵
51	Bestand 7	negativ	positiv	positiv	positiv (+) ⁶	ELISA-B ⊕/Kotkultur ⊕
52	Bestand 7	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-B ⊕/Kotkultur ⊕
53	Bestand 7	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-B ⊕/Kotkultur ⊕
54	Bestand 7	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-B ⊕/Kotkultur ⊕
55	Bestand 7	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-B ⊕/Kotkultur ⊕
56	Bestand 8	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
57	Bestand 8	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
58	Bestand 8	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
59	Bestand 9	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
60	Bestand 9	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
61	Bestand 10	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
62	Bestand 10	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
63	Bestand 11	positiv	positiv	positiv	positiv (+)	Kotkultur ⊕
64	Bestand 11	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	Kotkultur ⊕
65	Bestand 11	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕
66	Bestand 12	positiv	positiv	negativ	positiv (+++)	klinisch auffällig/Kotkultur ⊕
67	Bestand 12	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	klinisch auffällig Kotkultur ⊕
68	Bestand 13	positiv	positiv	negativ	positiv (+)	ELISA-B -/Kotkultur ⊕
69	Bestand 13	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -/Kotkultur -
70	Bestand 14	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-M/B ⊕/Kotkultur ⊕
71	Bestand 14	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA M/B -/Kotkultur -
72	Bestand 15	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	ELISA-B ⊕/Kotkultur ⊕
73	Bestand 15	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -/Kotkultur -
74	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
75	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
76	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
77	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
78	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISM_{av2}

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzuchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR; ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++): 10-50; (+++): >50)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzucht ⁴	Voruntersuchungen ⁵
79	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ ⁶	ELISA-B -
80	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
81	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ⊕
82	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
83	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ±
84	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
85	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
86	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
87	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
88	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
89	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
90	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
91	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
92	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
93	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
94	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
95	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
96	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
97	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
98	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
99	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
100	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B ±
101	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
102	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
103	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
104	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
105	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzucht von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR; ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++): 10-50; (+++): >50)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzüchtung ⁴	Voruntersuchungen ⁵
106	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ ⁶	ELISA-B ⊕
107	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
108	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
109	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
110	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
111	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
112	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
113	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
114	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
115	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
116	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
117	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
118	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
119	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
120	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
121	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
122	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
123	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
124	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
125	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
126	Bestand 16	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -
127	Bestand 17	positiv	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B ⊕/-/Kotkultur -
128	Bestand 17	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
129	Bestand 17	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
130	Bestand 17	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B ⊕/-/Kotkultur -
131	Bestand 18	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
132	Bestand 18	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR; ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++): 10-50; (+++): >50)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzüchtung ⁴	Voruntersuchungen ⁵
133	Bestand 19	negativ	negativ	negativ	negativ ⁶	ELISA-M/B ⊕/-/Kotkultur -
134	Bestand 19	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
135	Bestand 20	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B -/Kotkultur -
136	Bestand 20	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B ⊕/-/Kotkultur -
137	Bestand 21	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B ⊕/-/Kotkultur -
138	Bestand 21	positiv	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B ⊕/-/Kotkultur -
139	Bestand 22	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
140	Bestand 22	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
141	Bestand 23	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B ⊕/-/Kotkultur -
142	Bestand 23	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
143	Bestand 24	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
144	Bestand 24	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B -/Kotkultur -
145	Einzeltier	positiv	negativ	negativ	positiv (+) ⁶	klinisch auffällig
146	Einzeltier	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	klinisch auffällig
147	Einzeltier	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	ELISA-M/B -/Kotkultur ⊕
148	Einzeltier	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	Kotkultur ⊕
149	Einzeltier	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
150	Einzeltier	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	ELISA-B ⊕/Kotkultur ⊕
151	Einzeltier	negativ	negativ	positiv	positiv (+)	ELISA-M/B -/Kotkultur ⊕
152	Einzeltier	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	ELISA-M/B ⊕/Kotkultur ⊕
153	Einzeltier	positiv	positiv	negativ	positiv (+++)	klinisch auffällig/Kotkultur ⊕
154	Einzeltier	negativ	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
155	Einzeltier	positiv	positiv	positiv	positiv (+++)	Kotkultur ⊕
156	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
157	Einzeltier	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
158	Einzeltier	positiv	negativ	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
159	Einzeltier	positiv	positiv	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMap2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR; ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++): 10-50; (+++): >50)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzuchtung ⁴	Voruntersuchungen ⁵
160	Einzel tier	positiv	positiv	positiv	positiv (++++) ⁶	Kotkultur ⊕
161	Einzel tier	positiv	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur ⊕
162	Einzel tier	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
163	Einzel tier	positiv	positiv	negativ	positiv (++)	Kotkultur ⊕
164	Einzel tier	negativ	negativ	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
165	Einzel tier	positiv	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur ⊕/PCR -/ZN ⊕
166	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur ⊕/PCR ⊕
167	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur ⊕/PCR ⊕
168	Einzel tier	positiv	positiv	positiv	positiv (++++)	PCR -/ZN⊕
169	Einzel tier	positiv	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur -/PCR -/ZN ⊕
170	Einzel tier	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
171	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	PCR ⊕
172	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	PCR ⊕
173	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	PCR ⊕
174	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++)	Kotkultur ⊕/PCR -
175	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	PCR ⊕
176	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur ⊕/PCR ⊕
177	Einzel tier	negativ	positiv	negativ	positiv (+)	Kotkultur ⊕
178	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur ⊕/PCR ⊕
179	Einzel tier	positiv	positiv	positiv	positiv (++++)	Kotkultur ⊕/PCR -/ZN⊕
180	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	PCR -/ZN⊕
181	Einzel tier	negativ	negativ	positiv	positiv (+)	Kotkultur ⊕
182	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (++++)	PCR ⊕
183	Einzel tier	negativ	positiv	positiv	positiv (+)	Kotkultur ⊕/PCR -/ZN-
184	Einzel tier	positiv	negativ	negativ	negativ	PCR -/ZN ⊕
185	Einzel tier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
186	Einzel tier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzuchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR; ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++): 10-50; (+++): >50)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Ziehl-Neelsen-Färbung	Real-Time PCR ²	nested-PCR ³	kulturelle Anzuchtung ⁴	Voruntersuchungen ⁵
187	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ ⁶	klinisch auffällig
188	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
189	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
190	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-B-/Kotkultur -
191	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B-/Kotkultur -
192	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
193	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
194	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
195	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
196	Einzeltier	positiv	negativ	negativ	negativ	Kotkultur -
197	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	Kotkultur -
198	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B-/Kotkultur -
199	Einzeltier	positiv	negativ	negativ	negativ	ELISA-M/B-/Kotkultur -
200	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
201	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
202	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	klinisch auffällig
203	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	Kotkultur -
204	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	Kotkultur -
205	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	Kotkultur -
206	Einzeltier	negativ	negativ	negativ	negativ	Kotkultur -

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

⁴kulturelle Anzuchtung von MAP im Doppelansatz auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen

⁵Voruntersuchungen: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): ELISA-M: Milch-ELISA; ELISA-B: Blut-ELISA; Kotkultur (ohne Berücksichtigung der Koloniezahlen); PCR: ZN (Ziehl-Neelsen-Färbung); ⊕: positiv/-: negativ

⁶Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herold's Egg Yolk-Schrägnährmedium (⊕): <10: (⊕⊕): 10-50; (⊕⊕⊕): >50)

Tabelle 44: Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen von voruntersuchten, nativen Rinderkotproben auf MAP (n = 206)

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Anzahl gewachsener Kolonien ²	TTD ³	Kontaminationen ⁴
1	Bestand 1	3/4	4 Wochen	-
2	Bestand 1	negativ	-	-
3	Bestand 1	negativ	-	-
4	Bestand 1	negativ	-	B-Ansatz kont./12. Woche
5	Bestand 1	negativ	-	-
6	Bestand 1	negativ	-	-
7	Bestand 1	30/28	3 Wochen	A-Ansatz kont./14. Woche
8	Bestand 1	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
9	Bestand 1	15/21	3 Wochen	-
10	Bestand 1	6/8	4 Wochen	-
11	Bestand 1	30/42	3 Wochen	-
12	Bestand 1	negativ	4 Wochen	B-Ansatz kont./15. Woche
13	Bestand 2	5/0	6 Wochen	B-Ansatz kont./12. Woche
14	Bestand 2	negativ	-	-
15	Bestand 2	negativ	-	-
16	Bestand 2	negativ	-	A/B-Ansatz kont./11. Woche
17	Bestand 2	9/6	4 Wochen	-
18	Bestand 2	1/0	4 Wochen	-
19	Bestand 2	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	B-Ansatz kont./12. Woche
20	Bestand 2	negativ	-	-
21	Bestand 2	3/2	4 Wochen	-
22	Bestand 3	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
23	Bestand 3	79/83	4 Wochen	-
24	Bestand 3	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
25	Bestand 3	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	A-Ansatz kont./16. Woche
26	Bestand 3	38/53	4 Wochen	-
27	Bestand 3	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
28	Bestand 3	1 x Rasenwachstum	3 Wochen	A-Ansatz kont./5. Woche
29	Bestand 3	25/18	4 Wochen	-
30	Bestand 3	29/42	4 Wochen	-
31	Bestand 3	215/130	4 Wochen	-
32	Bestand 3	2/30	4 Wochen	A-Ansatz kont./5. Woche
33	Bestand 4	5/18	4 Wochen	-
34	Bestand 4	67/0	4 Wochen	B-Ansatz kont./5. Woche
35	Bestand 4	2/1	4 Wochen	-
36	Bestand 4	8/13	4 Wochen	B-Ansatz kont./15. Woche
37	Bestand 4	5/0	4 Wochen	A-Ansatz kont./5. Woche
38	Bestand 5	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
39	Bestand 5	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
40	Bestand 5	15/18	4 Wochen	-
41	Bestand 5	12/11	4 Wochen	A/B-Ansatz kont./16. Woche
42	Bestand 5	73/96	4 Wochen	-
43	Bestand 5	1 x Rasenwachstum	3 Wochen	B-Ansatz kont./6. Woche

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen; Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++) : 10-50; (+++) : >50)

³TTD: Time to detection/Dauer bis zum Wachstum von MAP-Kolonien auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

⁴Kontaminationen der jeweiligen Kulturansätze durch Begleitkeime (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) sowie Zeitpunkt

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Anzahl gewachsener Kolonien ²	TTD ³	Kontaminationen ⁴
44	Bestand 6	84/35	4 Wochen	A-Ansatz kont./12. Woche
45	Bestand 6	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	A/B-Ansatz kont./12. Woche
46	Bestand 6	negativ	-	A/B-Ansatz kont./13. Woche
47	Bestand 6	negativ	-	B-Ansatz kont./8. Woche
48	Bestand 6	negativ	-	A/B-Ansatz kont./11. Woche
49	Bestand 6	negativ	-	-
50	Bestand 6	4/7	5 Wochen	-
51	Bestand 7	0/1	5 Wochen	A-Ansatz kont./8. Woche
52	Bestand 7	112/98	4 Wochen	-
53	Bestand 7	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
54	Bestand 7	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
55	Bestand 7	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
56	Bestand 8	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
57	Bestand 8	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
58	Bestand 8	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
59	Bestand 9	58/63	4 Wochen	-
60	Bestand 9	78/105	4 Wochen	-
61	Bestand 10	11/16	4 Wochen	-
62	Bestand 10	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
63	Bestand 11	0/8	5 Wochen	-
64	Bestand 11	2/2	5 Wochen	-
65	Bestand 11	13/15	5 Wochen	-
66	Bestand 12	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
67	Bestand 12	45/36	3 Wochen	B-Ansatz kont./12. Woche
68	Bestand 13	3/0	5 Wochen	-
69	Bestand 13	negativ	-	-
70	Bestand 14	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
71	Bestand 14	negativ	-	-
72	Bestand 15	5/4	4 Wochen	-
73	Bestand 15	negativ	-	-
74	Bestand 16	negativ	-	A-Ansatz kont./8. Woche
75	Bestand 16	negativ	-	-
76	Bestand 16	negativ	-	-
77	Bestand 16	negativ	-	-
78	Bestand 16	negativ	-	-
79	Bestand 16	negativ	-	B-Ansatz kont./4. Woche
80	Bestand 16	negativ	-	B-Ansatz kont./9. Woche
81	Bestand 16	negativ	-	B-Ansatz kont./4. Woche
82	Bestand 16	negativ	-	-
83	Bestand 16	negativ	-	-
84	Bestand 16	negativ	-	-
85	Bestand 16	negativ	-	-
86	Bestand 16	negativ	-	-
87	Bestand 16	negativ	-	-
88	Bestand 16	negativ	-	A-Ansatz kont./10. Woche
89	Bestand 16	negativ	-	-
90	Bestand 16	negativ	-	-
91	Bestand 16	negativ	-	-
92	Bestand 16	negativ	-	-
93	Bestand 16	negativ	-	-
94	Bestand 16	negativ	-	-

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen; Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++) : 10-50; (+++) : >50)

³TTD: Time to detection/Dauer bis zum Wachstum von MAP-Kolonien auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

⁴Kontaminationen der jeweiligen Kulturansätze durch Begleitkeime (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) sowie Zeitpunkt

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Anzahl gewachsener Kolonien ²	TTD ³	Kontaminationen ⁴
95	Bestand 16	negativ	-	A-Ansatz kont./8. Woche
96	Bestand 16	negativ	-	-
97	Bestand 16	negativ	-	-
98	Bestand 16	negativ	-	-
99	Bestand 16	negativ	-	-
100	Bestand 16	negativ	-	A-Ansatz kont./10. Woche
101	Bestand 16	negativ	-	-
102	Bestand 16	negativ	-	-
103	Bestand 16	negativ	-	-
104	Bestand 16	negativ	-	-
105	Bestand 16	negativ	-	-
106	Bestand 16	negativ	-	-
107	Bestand 16	negativ	-	-
108	Bestand 16	negativ	-	-
109	Bestand 16	negativ	-	-
110	Bestand 16	negativ	-	-
111	Bestand 16	negativ	-	-
112	Bestand 16	negativ	-	B-Ansatz kont./10. Woche
113	Bestand 16	negativ	-	-
114	Bestand 16	negativ	-	-
115	Bestand 16	negativ	-	-
116	Bestand 16	negativ	-	-
117	Bestand 16	negativ	-	-
118	Bestand 16	negativ	-	-
119	Bestand 16	negativ	-	-
120	Bestand 16	negativ	-	-
121	Bestand 16	negativ	-	-
122	Bestand 16	negativ	-	-
123	Bestand 16	negativ	-	-
124	Bestand 16	negativ	-	-
125	Bestand 16	negativ	-	-
126	Bestand 16	negativ	-	-
127	Bestand 17	negativ	-	-
128	Bestand 17	negativ	-	-
129	Bestand 17	negativ	-	-
130	Bestand 17	negativ	-	-
131	Bestand 18	negativ	-	-
132	Bestand 18	negativ	-	-
133	Bestand 19	negativ	-	-
134	Bestand 19	negativ	-	-
135	Bestand 20	negativ	-	-
136	Bestand 20	negativ	-	-
137	Bestand 21	negativ	-	-
138	Bestand 21	negativ	-	-
139	Bestand 22	negativ	-	-
140	Bestand 22	negativ	-	-
141	Bestand 23	negativ	-	-
142	Bestand 23	negativ	-	-
143	Bestand 24	negativ	-	-
144	Bestand 24	negativ	-	-

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen; Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++) : 10-50; (+++) : >50)

³TTD: Time to detection/Dauer bis zum Wachstum von MAP-Kolonien auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

⁴Kontaminationen der jeweiligen Kulturansätze durch Begleitkeime (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) sowie Zeitpunkt

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Anzahl gewachsener Kolonien ²	TTD ³	Kontaminationen ⁴
145	Einzel tier	1/3	5 Wochen	-
146	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
147	Einzel tier	5/7	4 Wochen	-
148	Einzel tier	7/8	4 Wochen	A-Ansatz kont./15. Woche
149	Einzel tier	5/8	3 Wochen	-
150	Einzel tier	9/7	4 Wochen	-
151	Einzel tier	5/10	3 Wochen	A-Ansatz kont./13. Woche
152	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
153	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
154	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	A-Ansatz kont./4. Woche
155	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
156	Einzel tier	5/1	5 Wochen	-
157	Einzel tier	5/7	4 Wochen	-
158	Einzel tier	6/6	4 Wochen	-
159	Einzel tier	4/8	4 Wochen	-
160	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	A-Ansatz kont./4. Woche
161	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
162	Einzel tier	1/2	4 Wochen	-
163	Einzel tier	17/13	4 Wochen	-
164	Einzel tier	3/5	6 Wochen	-
165	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
166	Einzel tier	90/72	5 Wochen	-
167	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
168	Einzel tier	67/85	4 Wochen	-
169	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
170	Einzel tier	3/0	6 Wochen	-
171	Einzel tier	31/5	6 Wochen	-
172	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
173	Einzel tier	20/80	4 Wochen	-
174	Einzel tier	38/45	5 Wochen	-
175	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
176	Einzel tier	76/84	4 Wochen	-
177	Einzel tier	1/1	6 Wochen	-
178	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
179	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
180	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	3 Wochen	-
181	Einzel tier	7/0	6 Wochen	-
182	Einzel tier	2 x Rasenwachstum	4 Wochen	-
183	Einzel tier	2/0	6 Wochen	-
184	Einzel tier	negativ	-	-
185	Einzel tier	negativ	-	-
186	Einzel tier	negativ	-	-
187	Einzel tier	negativ	-	-
188	Einzel tier	negativ	-	A/B-Ansatz kont./14. Woche
189	Einzel tier	negativ	-	-
190	Einzel tier	negativ	-	-
191	Einzel tier	negativ	-	-
192	Einzel tier	negativ	-	-
193	Einzel tier	negativ	-	-
194	Einzel tier	negativ	-	-

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen; Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++) : 10-50; (+++) : >50)

³TTD: Time to detection/Dauer bis zum Wachstum von MAP-Kolonien auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

⁴Kontaminationen der jeweiligen Kulturansätze durch Begleitkeime (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) sowie Zeitpunkt

Proben-Nr.	Zuordnung¹	Anzahl gewachsener Kolonien²	TTD³	Kontaminationen⁴
195	Einzel tier	negativ	-	A-Ansatz kont./16. Woche
196	Einzel tier	negativ	-	-
197	Einzel tier	negativ	-	-
198	Einzel tier	negativ	-	-
199	Einzel tier	negativ	-	-
200	Einzel tier	negativ	-	A/B-Ansatz kont./16. Woche
201	Einzel tier	negativ	-	-
202	Einzel tier	negativ	-	-
203	Einzel tier	negativ	-	-
204	Einzel tier	negativ	-	-
205	Einzel tier	negativ	-	-
206	Einzel tier	negativ	-	-

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²kulturelle Anzüchtung von MAP im Doppelansatz auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium über 16 Wochen; Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium ((+): <10; (++) : 10-50; (+++) : >50)

³TTD: Time to detection/Dauer bis zum Wachstum von MAP-Kolonien auf dem Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

⁴Kontaminationen der jeweiligen Kulturansätze durch Begleitkeime (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) sowie Zeitpunkt

Tabelle 45:

**Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen von
voruntersuchten, nativen Rinderkotproben auf MAP (n = 206)**

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Real-Time PCR ² Marker F57	Real-Time PCR ² Marker ISMav2	nested-PCR ³ Primer TJ 1/2	nested-PCR ³ Primer TJ 3/4
1	Bestand 1	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/positiv
2	Bestand 1	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
3	Bestand 1	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
4	Bestand 1	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
5	Bestand 1	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
6	Bestand 1	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
7	Bestand 1	39,00/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
8	Bestand 1	33,29/33,65	32,79/33,04	positiv/positiv	positiv/positiv
9	Bestand 1	negativ/38,20	39,74/38,62	negativ/negativ	positiv/positiv
10	Bestand 1	negativ/39,00	negativ/negativ	negativ/negativ	positiv/negativ
11	Bestand 1	38,64/negativ	39,90/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
12	Bestand 1	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
13	Bestand 2	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
14	Bestand 2	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
15	Bestand 2	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
16	Bestand 2	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
17	Bestand 2	38,21/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
18	Bestand 2	35,28/36,62	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
19	Bestand 2	34,33/34,40	33,00/33,17	positiv/positiv	positiv/positiv
20	Bestand 2	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
21	Bestand 2	negativ/36,55	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/positiv
22	Bestand 3	38,99/negativ	39,31/negativ	negativ/negativ	negativ/positiv
23	Bestand 3	37,76/39,00	39,76/37,36	negativ/negativ	positiv/positiv
24	Bestand 3	36,49/36,18	35,98/37,16	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
25	Bestand 3	29,15/28,78	28,10/27,67	positiv/positiv	positiv/positiv
26	Bestand 3	38,39/negativ	negativ/38,94	negativ/negativ	positiv/positiv
27	Bestand 3	34,14/34,76	33,03/33,19	positiv/positiv	positiv/positiv
28	Bestand 3	34,00/33,84	32,65/33,14	positiv/positiv	positiv/positiv
29	Bestand 3	negativ/39,14	39,07/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
30	Bestand 3	negativ/38,03	negativ/38,66	negativ/negativ	positiv/positiv
31	Bestand 3	34,51/35,08	35,10/335,80	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
32	Bestand 3	39,55/38,70	39,39/39,31	negativ/negativ	positiv/positiv
33	Bestand 4	negativ/negativ	38,87/37,20	negativ/negativ	positiv/positiv
34	Bestand 4	negativ/38,41	36,78/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
35	Bestand 4	negativ/39,36	negativ/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
36	Bestand 4	38,48/negativ	38,22/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
37	Bestand 4	37,20/37,96	37,77/negativ	(positiv)/negativ	positiv/positiv
38	Bestand 5	29,17/28,62	27,44/27,22	positiv/positiv	positiv/positiv
39	Bestand 5	35,25/35,47	34,93/35,00	negativ/negativ	positiv/positiv
40	Bestand 5	39,03/negativ	38,77/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
41	Bestand 5	39,12/negativ	negativ/38,49	negativ/negativ	positiv/positiv
42	Bestand 5	36,36/36,50	35,03/36,37	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
43	Bestand 5	37,86/37,91	39,02/39,29	negativ/negativ	positiv/positiv

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

Proben-Nr.	Zuordnung ¹	Real-Time PCR ² Marker F57	Real-Time PCR ² Marker ISMav2	nested-PCR ³ Primer TJ 1/2	nested-PCR ³ Primer TJ 3/4
44	Bestand 6	negativ/negativ	38,72/negativ	negativ/negativ	negativ/positiv
45	Bestand 6	34,94/36,11	36,13/35,68	negativ/negativ	positiv/positiv
46	Bestand 6	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
47	Bestand 6	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
48	Bestand 6	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
49	Bestand 6	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
50	Bestand 6	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/positiv
51	Bestand 7	negativ/38,19	39,59/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
52	Bestand 7	37,06/37,71	37,10/36,00	negativ/negativ	positiv/positiv
53	Bestand 7	34,00/34,33	34,32/33,79	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
54	Bestand 7	34,59/34,18	34,30/34,32	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
55	Bestand 7	34,71/34,71	33,34/33,92	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
56	Bestand 8	31,06/30,87	31,00/30,67	negativ/negativ	positiv/positiv
57	Bestand 8	35,50/35,06	35,05/34,69	negativ/negativ	positiv/positiv
58	Bestand 8	33,49/33,48	33,15/34,17	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
59	Bestand 9	37,10/36,80	36,30/37,19	negativ/negativ	positiv/positiv
60	Bestand 9	38,60/37,48	negativ/38,13	negativ/negativ	positiv/positiv
61	Bestand 10	38,75/negativ	37,10/37,83	negativ/negativ	positiv/positiv
62	Bestand 10	33,01/33,20	32,50/32,38	negativ/negativ	positiv/positiv
63	Bestand 11	negativ/negativ	38,24/negativ	negativ/negativ	positiv/negativ
64	Bestand 11	38,42/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
65	Bestand 11	negativ/38,10	39,41/39,03	negativ/negativ	positiv/positiv
66	Bestand 12	36,48/37,09	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
67	Bestand 12	30,55/31,31	29,72/30,58	positiv/positiv	positiv/positiv
68	Bestand 13	38,51/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
69	Bestand 13	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
70	Bestand 14	38,82/38,28	39,70/38,93	negativ/negativ	positiv/positiv
71	Bestand 14	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
72	Bestand 15	39,15/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
73	Bestand 15	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
74	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
75	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
76	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
77	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
78	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
79	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
80	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
81	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
82	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
83	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
84	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
85	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
86	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
87	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
88	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
89	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
90	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
91	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
92	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
93	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
94	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
95	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

Proben-Nr.	Zuordnung¹	Real-Time PCR² Marker F57	Real-Time PCR² Marker ISMav2	nested-PCR³ Primer TJ 1/2	nested-PCR³ Primer TJ 3/4
96	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
97	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
98	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
99	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
100	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
101	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
102	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
103	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
104	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
105	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
106	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
107	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
108	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
109	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
110	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
111	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
112	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
113	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
114	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
115	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
116	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
117	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
118	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
119	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
120	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
121	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
122	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
123	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
124	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
125	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
126	Bestand 16	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
127	Bestand 17	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
128	Bestand 17	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
129	Bestand 17	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
130	Bestand 17	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
131	Bestand 18	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
132	Bestand 18	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
133	Bestand 19	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
134	Bestand 19	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
135	Bestand 20	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
136	Bestand 20	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
137	Bestand 21	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
138	Bestand 21	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
139	Bestand 22	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
140	Bestand 22	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
141	Bestand 23	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
142	Bestand 23	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
143	Bestand 24	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
144	Bestand 24	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

Proben-Nr.	Zuordnung¹	Real-Time PCR² Marker F57	Real-Time PCR² Marker ISMav2	nested-PCR³ Primer TJ 1/2	nested-PCR³ Primer TJ 3/4
145	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
146	Einzel tier	33,75/31,82	33,36/31,13	positiv/positiv	positiv/positiv
147	Einzel tier	38,27/37,49	negativ/39,78	negativ/negativ	negativ/positiv
148	Einzel tier	negativ/37,00	negativ/38,00	negativ/negativ	negativ/positiv
149	Einzel tier	negativ/37,25	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
150	Einzel tier	negativ/38,39	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/positiv
151	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/positiv
152	Einzel tier	27,03/27,25	30,00/31,04	negativ/negativ	positiv/positiv
153	Einzel tier	35,40/36,90	negativ/39,20	negativ/negativ	negativ/negativ
154	Einzel tier	34,97/37,06	35,10/35,87	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
155	Einzel tier	35,56/36,01	34,57/35,80	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
156	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
157	Einzel tier	negativ/negativ	39,42/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
158	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
159	Einzel tier	38,91/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
160	Einzel tier	30,84/31,30	31,03/31,33	negativ/negativ	positiv/positiv
161	Einzel tier	32,81/32,75	32,13/32,86	negativ/negativ	negativ/(positiv)
162	Einzel tier	negativ/39,90	negativ/38,61	negativ/negativ	negativ/negativ
163	Einzel tier	38,15/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
164	Einzel tier	negativ/39,00	negativ/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
165	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/39,58	positiv/positiv	positiv/positiv
166	Einzel tier	29,88/29,87	29,65/29,70	positiv/positiv	positiv/positiv
167	Einzel tier	31,16/31,46	30,95/31,02	positiv/positiv	positiv/positiv
168	Einzel tier	34,04/33,74	34,02/34,25	positiv/positiv	positiv/positiv
169	Einzel tier	32,18/33,00	31,18/32,07	positiv/positiv	positiv/positiv
170	Einzel tier	34,20/34,27	33,77/34,17	negativ/negativ	positiv/positiv
171	Einzel tier	39,10/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
172	Einzel tier	32,39/31,97	31,15/31,00	positiv/positiv	positiv/positiv
173	Einzel tier	34,28/35,52	34,18/34,32	negativ/negativ	positiv/positiv
174	Einzel tier	negativ/37,51	38,48/39,00	negativ/negativ	positiv/positiv
175	Einzel tier	34,03/34,27	34,65/34,86	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
176	Einzel tier	34,65/34,86	34,90/34,23	(positiv)/(positiv)	positiv/positiv
177	Einzel tier	negativ/39,62	negativ/39,50	negativ/negativ	positiv/positiv
178	Einzel tier	35,49/35,27	34,51/34,50	positiv/positiv	positiv/positiv
179	Einzel tier	30,55/30,49	29,39/29,50	negativ/negativ	positiv/positiv
180	Einzel tier	33,74/33,90	33,00/32,81	positiv/positiv	positiv/positiv
181	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
182	Einzel tier	32,23/32,02	35,78/35,40	positiv/positiv	positiv/positiv
183	Einzel tier	negativ/negativ	37,93/negativ	negativ/negativ	positiv/positiv
184	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
185	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
186	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
187	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
188	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
189	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
190	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
191	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
192	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
193	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
194	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
195	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
196	Einzel tier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

Proben-Nr.	Zuordnung¹	Real-Time PCR² Marker F57	Real-Time PCR² Marker ISMav2	nested-PCR³ Primer TJ 1/2	nested-PCR³ Primer TJ 3/4
197	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
198	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
199	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
200	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
201	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
202	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
203	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
204	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
205	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ
206	Einzeltier	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ	negativ/negativ

¹Zuordnung der Proben zu Beständen oder Einzeltieren (aus Datenschutzgründen sind weitere Details zur Identifizierung der Tiere hier nicht aufgeführt, sind aber verfügbar)

²Real-Time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) für die MAP-Marker F57 und ISMav2

³nested-PCR nach Bull et al (2003) für den MAP-Marker IS900

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdulmawjood, A., Roth, S., Bülte, M. (2002): Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probes* **16**, 335-339
- Ackermann, H. (1998): BiAS für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 7.0, Epsilon-Verlag. Hochheim, Darmstadt.
- Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., Kimura, K. (1994): Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstrains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Foren. Sci.* **39**, 362-372.
- Akineden, Ö., Hassan, A. A., Schneider, E., Usleber, E. (2006): Kultureller Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Säuglingsnahrung. Abstract-Band, 47. DVG-Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 113.
- Albien, A. (1910): Über die Züchtung des Erregers der Enteritis chronica infectiosa bovis. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **26**, 793-794.
- Albiston, H. E., Talbot, C. (1936): Johne's disease in Victoria. *Austral. Vet. J.* **12**, 125-138.
- Al-Soud, W. A., Radström, P. (1998): Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3748-3753.
- Al-Soud, W. A., Radström, P. (2001): Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 485-493.
- Anonymus (2006): Ringversuch 2005 zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus Rinderkot - Besprechung der Ergebnisse. Arbeitstreffen beim Nationalen Referenzlabor Paratuberkulose, Jena, 07. Dezember 2005.
- Avarbock, D., Salem, J., Li, L. S., Wang, Z. M., Rubin, H. (1999): Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* **233**, 261-269.
- 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.
- Ayele, W. Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I. (2005): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1210-1214.
- Baker, J., Brown, M. R. (1994): Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.* **140**, 1253-1259.
- Bang, B. (1906): Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berl. Tierärztl. Wschr.* **42**, 759-763.

- Bang, O. (1909): Das Geflügeltuberkulin als diagnostisches Mittel bei der chronischen pseudotuberkulösen Darmentzündung des Rindes (Johne's disease). Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. **51**, 450-455.
- Bannantine, J. P., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L., Kapur, V. (2002): Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. J. Clin. Microbiol. **40**, 1303-1310.
- Barclay, R., Ratledge, C. (1983): Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and Mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. J. Bacteriol. **153**, 1138-1146.
- Bardouniotis, E., Ceri, H., Olson, M. E. (2003): Biofilm formation and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. Curr. Microbiol. **46**, 28-32.
- 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.
- Beach, B. (1930): Johne's disease. Vet. Med. **25**, 80-81.
- Beard, P. M., Henderson, D., Daniels, M. J., Pirie, A., Buxton, D., Greig, A., Hutchings, M. R., McKendrick, I., Rhind, S., Stevenson, K., Sharp, J. M. (1999): Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). Vet. Rec. **145**, 612-613.
- 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 non ruminant wildlife in Scotland. J. Clin. Microbiol. **39**, 1517-1521.
- Becker-Follmann, J., Baas, D. (2004): PCR - eine Methode, drei Schritte. BIOSpektrum **1**.
- Beerwerth, W. (1967): Die Züchtung von Mykobakterien aus dem Kot der Haustiere und ihre Bedeutung für die Epidemiologie der Tuberkulose. Prax. Pneumol. **21**, 189-202.
- Belletti, G., Arrigoni, N., Sali, G. (1992): Johne's disease in cattle: clinical and epidemiological investigations and experiences of a control program. Tierärztliche Umschau **47**, 328-330.
- Benazzi, S., el Hamidi, M., Schliesser, T. (1996): Paratuberculosis in sheep flocks in Morocco: a serological, microscopical and cultural survey. Zentralbl. Veterinärmed. B. **43**.
- Benedictus, G., Dijkhuizen, A. A., Stelwagen, J. (1987): Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet. Rec. **121**, 142-146.
- Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbuddhe, S., Novak, M., Mikula, I. (2006): IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. Vet. Microbiol. **112**, 33-41.
- Bierbaum, A. (1950): Die Paratuberkulose des Rindes im Regierungsbezirk Arnberg. Vet. Med. Diss., Gießen.

- Bisping, W., Amtsberg, G. (1988): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Verlag Parey, Berlin, Hamburg.
- Blanchard, D. C., Syzdek, L. (1970): Mechanism for the water-to-air transfer and concentration of bacteria. *Science* **170**, 626-628.
- Bleumink-Pluym, N. M., Houwers, D. J., Peeters-van Gent, S. D. (1994): Sample preparation for *M. paratuberculosis* polymerase chain reaction in faeces and tissues. *Vet. Rec.* **135**, 120.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J. P., Berkvens, D., Godfroid, J. (2000): Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* **77**, 269-281.
- Bögli-Stuber, K., Kohler, C., Seitert, G., Glanemann, B., Antognoli, M. C., Salman, M. D., Wittenbrink, M. M., Wittwer, M., Wassenaar, T., Jemmi, T., Bissig-Choisat, B. (2005): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 587-597.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., van der Noordaa, J. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 495-503.
- Bose, M., Chander, A., Das, R. H. (1993): A rapid and gentle method for the isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Nucleic. Acids Res.* **21**, 2529-2530.
- Bosshard, C., Stephan, R., Tasara, T. (2006): Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Protec.* **69**, 1662-1667.
- Böttcher, J., Hoffmann, D., Gangl, A. (2005): Paratuberkulose - Ein serologisches Untersuchungskonzept. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005.
- Brakmann, S., Nöbel, N. (2003): FRET in der Biochemie. *Nachrichten aus der Chemie* **51**.
- Brennan, J. P., Nikaido, H. (1995): The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29-63.
- Brown, M. R., Smith, A. W., Baker, J., Humphrey, T. J., Dixon, B. (2002): *E. coli* O157 persistence in the environment. *Microbiol.* **148**, 1-2.
- Bugge, G., Cordson, A. (1908): Einige Beobachtungen über die Enteritis chronica bovis pseudotuberculosis. *Zschr. Inf. Krankh. Haustiere* **5**, 133-143.
- Bull, T. J., McMinn, E. J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003): 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.
- Bülte, M., Schönenbrücher, H., Abdulmawjood, A. (2005): From farm to fork - *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) as zoonotic agent? *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**, 377-385.

- Burnham, W. R., Lennard-Jones, J. E., Stanford, J. L., Bird, R. G. (1978): Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. *Lancet* **2**, 693-696.
- Carter, G., Wu, M., Drummond, D. C., Bermudez, L. E. (2003): Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J. Med. Microbiol.* **52**, 747-752.
- Carter, G., Young, L. S., Bermudez, L. E. (2004): A subinhibitory concentration of clarithromycin inhibits *Mycobacterium avium* biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4907-4910.
- Chamberlin, W., Graham, D. Y., Hulten, K., El-Zimaity, H. M., Schwartz, M. R., Naser, S., Shafran, I., El-Zaatari, F. A. (2001): Review article: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* a one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol. Ther.* **15**, 337-346.
- Chiodini, R. J. (1986): Biochemical characteristics of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 1442-1445.
- Chiodini, R. J. (1991): Cellular immunology of intracellular infections. Proc. 3th Int. Coll. Paratuberculosis, Orlando, Florida, 269-283.
- Chiodini, R. J. (1996): Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**, 313-343.
- Chiodini, R. J. (1998): Chron's disease and the mycobacteriosis: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**, 90-117.
- Chiodini, R. J., Hermon-Taylor, J. (1993): The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**, 629-631.
- Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J. (1983): Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**, 168-169.
- Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S. (1984a): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* **74**, 218-262.
- Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S., Thayer, W. R. Jr., Coutu, J. A. (1984b): Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 966-971.
- Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J., Thayer, W. R., Coutu, J. A. (1986): Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 357-363.
- Christopher-Hennings, J., Dammen, M. A., Weeks, S. R., Epperson, W. B., Singh, S. N., Steinlicht, G. L., Fang, Y., Skaare, J. L., Larsen, J. L., Payeur, J. B., Nelson, E. A. (2003): Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**, 87-93.
- Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S., Bermudez, L. E. (1997): Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* **65**, 3759-3767.
- Clark, D. (2005): Microbe-laden aerosols. *Microbiol. Today* **32**, 172-173.

- Clark, D. L. Jr., Anderson, J. L., Koziczkowski, J. J., Ellingson, J. L. (2006): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol. Cell. Probes* **20**, 197-202.
- 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., Vannuffel, P., Blondeel, N., Deneff, J.-F., Cocito, C., Gala, J.-L. (2000): Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3048-3054.
- Collins, D. M., Stephens, D. M., de Lisle, G. W. (1993): Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* **36**, 289-299.
- Collins, D. M., Sockett, D. C., Goodger, W. J., Conrad, T., A., Thomas, C. B., Carr, D. J. (1994): Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine Paratuberculosis in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **204**, 636-641.
- Collins, M. T. (1996): Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**, 208-210.
- Collins, M. T. (1997): *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? *J. Dairy Sci.* **80**, 3445-34458.
- 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. (1993): Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **203**, 1456-1463.
- Cooper, R., Fraser, S. M., Sturrock, R. D., Gemmell, C. G. (1988): Raised titres of anti-klebsiella Ig A in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, and inflammatory bowel disease. *Br. Med. J.* **296**, 1432-1434.
- Corn, J., L., Manning, E. J., 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.
- Corner, L. A., Pfeiffer, D. U., Abbott, K. A. (2004): The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* **82**, 170-173.

- Cousins, D. V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R. J., Kluver, P. (1999): *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implication for diagnosis. *Mol. Cell. Probes.* **13**, 431-442.
- Crohn, B., Ginzburg, L., Oppenheimer, G. (1932): Regionalis ileitis. *J. Am. Med. Assoc.* **99**, 1323-1329.
- Crossley, B. M., Zagmutt-Vergara, F. J., Fyock, T. L., Whitlock, R. H., Gardner, I. A. (2005): Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet. Microbiol.* **107**, 257-263.
- Dalziel, T. (1913): Chronic intestinal enteritis. *Br. Med. J.* **2**, 1068-1070.
- Damato, J. J., Collins, M. T. (1990): Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet. Microbiol.* **22**, 31-42.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., Colombel, J. F. (1998): Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterol.* **115**, 1405-1413.
- David, C., Bonner, M. (1986): Diagnostic experimental de la paratuberculose-maladie chez les bovines. *Le point veterinaire* **18**, 215-217.
- Demeke, T., Adams, R. P. (1992): The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* **12**, 332-334.
- Detry, R., Ballet, T., Hennaut, M., Kestens, P. J., Fiasse, R. (1985): Digestive fistulas in Crohn's disease. *Acta. Chir. Belg.* **85**, 193-197.
- Deutz, A., Spargser, J., Wagner, P., Rosengarten, R., Köfer, J. (2005): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bei Wildtieren und Rindern in der Steiermark. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005.
- Dick, T., Lee, B. H., Murugasu-Oei, B. (1998): Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 159-164.
- Dimareli-Malli, Z., Sarris, K. (2001): Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. *Aust. Vet. J.* **79**, 47-50.
- Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (2003): *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 4. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin.
- Dixon, W. J. (1993): *BMDP Statistical Software Manual*, Volume 1 and 2. University of California. Berkeley, Los Angeles, London.
- Do, N., Adams, R. P. (1991): A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *Biotechniques* **10**, 162-166.
- Doll, K. (2006): Die Paratuberkulose - eine epidemiologische Herausforderung. Kongressband zur Fortbildung am 06.05.2006, Hessische Landestierärztekammer, 106-113.

- Domingue, G. J., Woody, H. B. (1997): Bacterial persistence and expression of disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 320-344.
- Donaghy, J. A., Totton, N. L., Rowe, M. T. (2004): Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4899-4905.
- Dreier, S., Khol, J. L., Stein, B., Fuchs, K., Gutier, S., Baumgartner, W. (2006): Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *J. Vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health* **53**, 477-481.
- Dunkin, G. W. (1928): A diagnostic agent for the detection of Johne's disease and its method of preparation. *J. Comp. Pathol.* **41**, 94-108.
- Eamens, G., J., Whittington, R., J., Marsh, I. B., Turner, M. J., Saunders, V., Kemsley, P., D., Rayward, D. (2000): Comparative sensitivity of various fecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.* **77**, 357-367.
- Edwards, J. T. (1926): Some recent advances in the protection of cattle and other animals against disease. 4. Johne's disease. *Agricult. J. of India* **21**, 6-13.
- Ellingson, J. L., Anderson, J. L., Koziczowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E., Sullivan, N. M. (2005): Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Protec.* **68**, 966-972.
- 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.
- Elschner, M. (2005): Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005.
- Englund, S., Ballagi-Pordany, A., Bölske, G., Johansson, K. E. (1999): Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 163-171.
- Englund, S., Bölske, G., Johansson, K. E. (2002): An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**, 267-271.
- Eppleston, J., Reddacliff, L. A., Windsor, P. A., Whittington, R. J., Jones, S. (2005): Efficacy of a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine for the control of OJD in Australian sheep flocks. *Proc. 8th Int. Coll. Paratuberculosis*, Copenhagen, Denmark.
- Erichsen, C. (1926): Die Paratuberculose der Rinder, ihre Diagnose und Bekämpfung. *Vet. Med. Diss.*, Hannover.
- Ernest, L. B. (1927): Recent developments in the control of Johne's disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **71**, 742-749.

- Erume, J., Spergser, J., Rosengarten, R. (2001): Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *Afr. Health Sci.* **1**, 83-89.
- Falkinham, J. O. III., Norton, C. D., LeChevallier, M. W. (2001): Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1225-1231.
- Fang, Y., Wu, W. H., Pepper, J. L., Larsen, J. L., Marras, S. A., Nelson, E. A., Epperson, W. B., Christopher-Hennings, J. (2002): Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 287-291.
- Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Meliclarek, I., Weston, R. T., Pavlik, I. (2001): Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med. Vet. Entomol.* **15**, 208-211.
- Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Weston, R. T., Pavlik, I. (2004): Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis* and *M. a. hominisuis*. *Med. Vet. Entomol.* **18**, 116-122.
- Francis, J., Macturk, H. M., Madinaveitia, J., Snow, G. A. (1953): Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. J.* **55**, 596-607.
- Franken, P. (2006): Paratuberculosis control in the Netherlands. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005.
- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., Odumeru, J. (2002): Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Dairy Sci.* **85**, 3198-3205.
- Garrido, J. M., Cortabarria, N., Oguiza, J. A., Juste, R. A. (2000): Use of PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* **77**, 379-386.
- Gasteiner, J., Wenzl, H., Fuchs, K., Jark, U., Baumgartner, W. (1999): Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *Zentralbl. Veterinärmed.* **46**, 457-466.
- Gay, J. M., Sherman, D. M. (1992): Factors in the epidemiologie and control of ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.* **87**, 1133-1139.
- Gerlach, G.-F. (2002): Paratuberkulose: Erreger und Übertragungswege. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **109**, 504-506.
- Gerlach, G.-F., Valentin-Weigand (1998): Bovine paratuberculosis: history and results of new efforts to control an old disease. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **111**, 368-373.
- Geue, L., Köhler, H., Conraths, F. J. (2005): Zur Epidemiologie der Paratuberkulose. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005.

- Gierke, F., Köhler, H. (2006): Einflussfaktoren auf die Sensitivität der Anzüchtung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rinderkot auf HEYM mit Mycobactin J. 3. Arbeitsstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Friedrich-Löffler-Institut, Jena, 11. und 12. Oktober 2006.
- Glanemann, B., Hoelzle, L. E., Bögli-Stuber, K., Jemmi, T., Wittenbrink, M. M. (2004): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **146**, 409-415.
- Godfroid, J., Boelaert, F., Heier, A., Clavareau, C., Wellemans, V., Desmecht, M., Roels, S., Walravens, K. (2000): First evidence of Johne's disease in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Belgium. *Vet. Microbiol.* **77**, 283-290.
- Godfroid, J., Delcorps, C., Irengé, L. M., Walravens, K., Marche, S., Gala, J.-L. (2005): Definitive differentiation between single and mixed mycobacterial infections in red deer (*Cervus elaphus*) by a combination of duplex amplification of p34 and f57 sequences and Hpy 188I enzymatic restriction of duplex amplicons. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4640-4648.
- Graham, D. Y., Markesich, D. C., Yoshimura, H. H. (1987): Mycobacteria and inflammatory bowel disease: results of culture. *Gastroenterol.* **92**, 436-442.
- Grange, J. M. (1996): The biology of the genus *Mycobacterium*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **8**, 1-9.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (1996a): Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 631-636.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (1996b): High temperature, short time (HTST) pasteurization of milk containing low levels of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proc. 5th Int. Coll. Paratuberculosis*, Madison, Wisconsin.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (1999): Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 461-465.
- Grant, I. R., Pope, C. M., O' Riordan, L. M., Ball, H. J., Rowe, M. T. (2000): Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet. Microbiol.* **77**, 369-378.
- Grant, I. R., Rowe, M. T., Dundee, L., Hitchings, E. (2001): *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* **54**, 2-13.
- Grant, I. R., Hitchings, E. I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M. T. (2002a): Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 602-607.

- Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (2002b): Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2428-2435.
- Grant, I. R., Rowe, M. T. (2004): Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. *Lett. Appl. Microb.* **38**, 283-288.
- Grant, I. R., Williams, A. G., Rowe, M. T., Muir, D. D. (2005): Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2853-2861.
- Green, E. P., Tizard, M.L., 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., Perez, V., Pirie, A. A., Grant, J. M., Sharp, J. M. (1997): Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* **140**, 141-143.
- Gupta, S., Pandit, S. B., Srinivasan, N., Chatterji, D. (2002): Proteomics analysis of carbon-starved *Mycobacterium smegmatis*: induction of Dps-like protein. *Protein Eng.* **15**, 503-511.
- Gwozdz, J. M., Reichel, M. P., Murray, A., Manktelow, W., West, D. M., Thompson, K. G. (1997): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **57**, 233-244.
- Hacker, U., Hutter, K., Konow, M. (2004): Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommern, Germany. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **117**, 140-144.
- Hall-Stoodley, L., Brun, O. S., Polshyna, G., Barker, L. P. (2006): *Mycobacterium marinum* biofilm formation reveals cording morphology. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**, 43-49.
- Hammer, P. (2000): Pasteurisierung von Milch und Überlebensfähigkeit von *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proc. Internationale Perspektiven der mikrobiologischen Lebensmittelsicherheit*, BgVV Berlin, 10. und 11. Oktober 2000, 104-115.
- Hammer, P., Knappstein, K. (1998): *Mycobacterium paratuberculosis* als Zoonoseerreger. *Kiel Milchwirtsch. Forschungsber.* **50**, 235-247.
- Hammer, P., Knappstein, K., Hahn, G. (1998): Significance of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Bulletin - FLI-IDF, International Dairy Federation No.* **330**, 12-16.
- Hammer, P., Kiesner, C., Walte, H.-G., Knappstein, K., Teufel, P. (2002): Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. *Kiel Milchwirtsch. Forschungsber.* **54**, 275-303.

- Harb, O. S., Gao, L.-Y., Abu Kwaik, Y. (2000): From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ. Microbiol.* **2**, 251-265.
- Harris, J. E., Lammerding, A. M. (2001): Crohn's Disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: current issues. *J. Food Protec.* **64**, 2103-2110.
- Harris, N. B., Barletta, R. G. (2001): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 489-512.
- Hendrick, S., Duffield, T., Leslie, K., Lissemore, K., Archambault, M., Kelton, D. (2005): The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. *Can. Vet. J.* **46**, 1126-1129.
- Herthnek, D., Bölske, G. (2006): New PCR system to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Microbiol.* **6**, 87.
- Hietala, S. K. (1992): The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.* **87**, 1122-1132.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol. (NY)* **10**, 413-417.
- Hilbink, F., West, D. M., de Lisle, G. W., Kittelberger, R., Hosie, B. D., Hutton, J., Cooke, M. M., Penrose, M. (1994): Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet. Microbiol.* **41**, 107-116.
- Hoffmann, D. (2007): Untersuchungen zur Eignung einer sequentiellen kombinierten Serodiagnostik für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Infektionen in bayerischen Milchviehbeständen. *Vet. med. Diss., München.*
- Hole, N. H. (1956): *Johne's disease*. Verlag OEEC. Paris.
- Hope, A. F., Tulk, P. A., Condrón, R. J. (1996): Pasteurization of *Mycobacterium paratuberculosis* in whole milk. *Proc. 5th Int. Coll. on Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.*
- Horne, H. (1908): Enteritis chronica pseudotuberculosa bovis oder die "Johne'sche Seuche" konstatiert in Norwegen. *Berl. Tierärztl. Wschr.* **13**, 235-236.
- Hughes, V. M., Stevenson, K., Sharp, J. M. (2001): Improved preparation of high molecular weight DNA for pulsed-field gel electrophoresis from mycobacteria. *J. Microbiol. Methods* **44**, 209-215.
- Hurley, S. S., Splitter, G. A., Welch, R. A. (1987): Rapid lysis technique for mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 2227-2229.
- Hutter, B., Dick, T. (1999): Up-regulation of *narX*, encoding a putative 'fused nitrate reductase' in anaerobic dormant *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**, 63-69.
- Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W. Y., Roubal, P., Lukas, J., Cook, N., Gazouli, M. (2005): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8934-8936.

- Johansen, K. A., Hugen, E. E., Payeur, J. B. (2006): Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the presence of hexadecylpyridinium chloride, natamycin, and vancomycin. *J. Food Protec.* **69**, 878-883.
- Johne, H. A., Fortingham, L. (1895): Ein eigentümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Z. Thiermed. Vergl. Path.* **21**, 438-454.
- Johnson, Y. J., Kaneene, J. B., Gardiner, J. C., Lloyd, J. W., Sprecher, D. J., Coe, P. H. (2001): The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.* **84**, 2188-2194.
- Johnson-Ifeorlundu, 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.* **24**, 267-270.
- Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Davidson, R. S., Hutchings, M. R. (2006): Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 398-403.
- Juste, R. A., Garcia Marin, J. F., Peris, B., Saez de Ocariz, C. S., Badiola, J. J. (1994): Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* **110**, 185-194.
- Kallinowski, E., Wassmer, A., Hofmann, M. A., Harmsen, D., Heesemann, J., Karch, H., Herfarth, C., Buhr, H. J. (1998): Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterol.* **45**, 1552-1558.
- Khare, S., Ficht, T. A., Santos, R. L., Romano, J., Ficht, A. R., Zhang, S., Grant, I. R., Libal, M., Hunter, D., Adams, L. G. (2004): Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1075-1081.
- Kim, S. G., Shin, S. J., Jacobson, R. H., Miller, L. J., Harpending, P. R., Stehman, S. M., Rossiter, C. A., Lein, D. A. (2002): Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Invest.* **14**, 126-131.
- Klarmann, D., Moss, A. (2006): Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Rindern in Niedersachsen - Erkenntnisse nach Untersuchungen im Rahmen des Niedersächsischen Sanierungsverfahrens. 3. Arbeitsstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Friedrich-Löffler-Institut, Jena, 11. und 12. Oktober 2006.

- Klawonn, W., Cußler, K., Dräger, K. G., Gyra, H., Köhler, H., Zimmer, K., Heß, R. G. (2002): Zur Bedeutung vom allergischem Hauttest mit Johnin, Antikörper-ELISA, kulturelle Kotuntersuchung sowie der Impfung für die Sanierung dreier chronisch Paratuberculose-infizierter Milchviehherden in Rheinland-Pfalz. Dtsch. tierärztl. Wschr. **109**, 510-516.
- Klawonn, W., Dräger, K., Köhler, H., Labohm, R. (2007): Paratuberculosebekämpfung - Erste Erfahrungen mit dem inaktivierten Impfstoff SILIRUM. 6. Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberculose-Bekämpfung, Stendal, 07. bis 09. März 2007.
- Klee, W. (1986): Paratuberculose beim Rind: Diagnose und Bekämpfung. Prakt. Tierarzt **68**, 55-57.
- Klee, W. (2000): Paratuberculose (JOHNEsche Krankheit; Johne's Disease). <http://www.vetmed.uni-muenchen.de>.
- Köhler, H. (2005): Diagnostik und Bekämpfung der Paratuberculose - mehr Fragen als Antworten. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberculose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005.
- Köhler, H., Burkert, B. (2003): Validierung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Rindern. IVD-Info der BFAV Insel Riems **3**, 6-9.
- Köhler, H., Möbius, P., Moser, I., Heller, M. (2004): Aktuelle Methoden zur Diagnostik der Paratuberculose - Bedeutung für Monitoring und Bekämpfung. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, 27-30.
- Köhler, H., Gierke, F. (2006): Ist die Flüssigkultur die Methode der Wahl für die Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Kotproben von Rindern? 3. Arbeitsstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberculose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberculose, Friedrich-Löffler-Institut, Jena, 11. und 12. Oktober 2006.
- Kreeger, J. M. (1991): Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration. J. Vet. Diagn. Invest. **3**, 373-382.
- 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.
- Lambrecht, R. S., Collins, M. T. (1992): *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **15**, 239-246.
- Landt, O. (2006): Genotypisierung - sondenbasierte Methoden im Vergleich. BIOSpektrum **1**, 101-102.
- Lange, L., Prescatore, H. (1937): Beobachtungen über die Gewinnung und das Verhalten von Reinkulturen des Paratuberculosebazillus (Johne'scher Bazillus). Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. **140**, 1-22.
- Larsen, A. B., Johnson, H. W. (1949): Studies on johnin. VII. Frequency of intradermal testing as related to local desensitization. Am. J. Vet. Res. **31**, 255-257.

- 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. **36**, 255-257.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., Moon, H. W. (1974): Evaluation of a paratuberculosis vaccine given to calves before infection. Am. J. Vet. Res. **35**, 367-369.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., Vardaman, T. H. (1956): Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. **17**, 549-551.
- Larsen, A. B., Moyle, A. I., Himes, E. M. (1978): Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. Am. J. Vet. Res. **39**, 65-69.
- Larsen, A. B., Stalheim, O. H., Hughes, D. E., Appell, L. H., Richards, W. D., Himes, E. M. (1981): *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. J. Am. Vet. Med. Assoc. **179**, 169-171.
- Lawrence, W. E. (1956): Congenital infection with *Mycobacterium johnei* in cattle. Vet. Rec. **68**, 312-314.
- Le Tallec, B., Sache, S., Harlay, T., Guerin, B., Mollet, C. (2002): A rapid, automated protocol for detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in bovine feces and tissues. Qiagen News **6**, 13-16.
- Leclainche (1907): Die chronische hypertrophierende Enteritis der Boviden. Rev. Gen. Med. Vet. **9**, 305.
- Lepper, A. W., Wilks, C. R., Kotiw, M., Whitehead, J. T., Swart, K. S. (1989): Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. Aust. Vet. J. **66**, 50-55.
- Li, L., Bannantine, J. P., Zahng, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V. (2005): The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**, 12344-12349.
- Liu, Y., van Kruiningen, H. J., West, A. B., Cartun, R. W., Cortot, A., Colombel, J.-F. (1995): Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. Gastroenterol. **108**, 1396-1404.
- Lloyd, J. B., Whittington, R. J., Fitzgibbon, C., Dobson, R. (2001): Presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium. Vet. Rec. **148**, 261-263.
- Lovell, R., Levi, M., Francis, J. (1944): Studies on the survival of Johne's bacilli. J. Comp. Pathol. **54**, 120-129.
- Löwenstein, E. (1924): Beitrag zur Leistungsfähigkeit der direkten Züchtung der Tuberkelbazillen aus dem infektiösen Material mit einem Beitrag zur Geflügeltuberkulose im Menschen. Wien. klin. Wschr. **37**, 231-233.

- Lund, B. M., Gould, G. W., Rampling, A. M. (2002): Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *Int. J. Food Microbiol.* **77**, 135-145.
- Manning, E. J., Kucera, T. E., Gates, N. B., Woods, L. M., Fallon-McKnight, M. (2003): Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *J. Wildl. Dis.* **39**, 323-328.
- Markesich, D. C., Graham, D. Y., Yoshimura, H. H. (1988): Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid-fast bacilli isolated from intestinal tissues. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 1600-1603.
- Markus, E. (1904): Eine spezifische Darmentzündung des Rindes wahrscheinlich tuberkulöser Natur. *Dtsch. Zschr. Tiermed* **1**, 68-76.
- Marsh, I. B., Whittington, R. J. (2001): Progress towards a rapid polymerase chain reaction diagnostic test for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. *Mol. Cell. Probes* **15**, 105-118.
- Marsollier, L., Stinear, T., Aubry, J., Saint Andre, J. P., Robert, R., Legras, P., Manceau, A. L., Audrain, C., Bourdon, S., Kouakou, H., Carbonnelle, B. (2004): Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1097-1103.
- Martinez, A., Torello, S., Kolter, R. (1999): Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.* **181**, 7331-7338.
- Mason, O., Marsh, I. B., Whittington, R. J. (2001): Comparison of immunomagnetic bead separation-polymerase chain reaction and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep faeces. *Aust. Vet. J.* **79**, 497-500.
- Mattman, L. H. (1970): Cell wall deficient forms of mycobacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **174**, 852-861.
- Mayberry, J. F., Hitchens, R. A. N. (1978): Distribution of Crohn's disease in Cardiff. *Soc. Sci. Med.* **12**, 137-138.
- 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. Infect. Dis.* **155**, 1011-1019.
- McDonald, W. L., O'Riley, K. J., Schroen, C. J., Condon, R. J. (2005): Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1785-1789.
- 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.
- McFadyean, J., Sheater, A. L. (1916): Johne's disease. *J. Comp. Pathol. and Therap.* **29**, 134-139.

- Merkal, R. S. (1973): Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **8**, 1100-1102.
- Merkal, R. S. (1984): Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **8**, 939-943.
- Merkal, R. S., Curran, B. J. (1974): Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.* **28**, 276-279.
- Merkal, R. S., McCullough, W. G. (1982): A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Current Microbiol.* **7**, 333-335.
- Merkal, R. S., Kopecky, K. E., Larsen, A. B., Thurston, J. R. (1964): Improvements in the technique for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* **25**, 1290-1294.
- Merkal, R. S., Larsen, A. B., Kopecky, K. E. (1968): Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. *Am. J. Vet. Res.* **29**, 1533-1538.
- Merkal, R. S., Whipple, D. L., Sacks, J. M., Snyder, G. R. (1987): Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 676-680.
- Metzger-Boddien, C., Khaschabi, D., Schönbauer, M., Boddien, S., Schlederer, T., Kehle, J. (2006): Automated high-throughput immunomagnetic separation-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk. *Int. J. Food Microbiol.* **110**, 201-208.
- Meyer, K. F. (1908): Über die durch säurefeste Bakterien hervorgerufene diffuse Hypertrophie der Darmschleimhaut des Rindes (Enteritis hypertrophica bovis specif.). *Vet. med. Diss., Zürich.*
- Meylan, M., Nicolet, J., Busato, A., Burnens, A., Martig, J. (1995): The prevalence of paratuberculosis in the Plateau de Diesse region. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **137**, 22-25.
- Meylan, M., Rings, D. M., Shulaw, W. P., Kowalski, J. J., Bech-Nielsen, S., Hoffsis, G. F. (1996): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am. J. Vet. Res.* **57**, 1580-1585.
- Michailova, L., Kussovski, V., Radoucheva, T., Jordanova, M., Berger, W., Rinder, H., Markova, N. (2005): Morphological variability and cell-wall deficiency in *Mycobacterium tuberculosis* 'heteroresistant' strains. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **9**, 907-914.
- Miessner, H. (1908): Der chronische infektiöse Darmkatarrh des Rindes. Veröffentlichung aus den Jahresveterinärberichten der beamteten Tierärzte Preußens für das Jahr 1908, 2. Teil **9**, 49-108.
- Millar, D. S., Withey, S. J., Tizard, M. L., Ford, J. G., Hermon-Taylor, J. (1995): Solid-phase hybridization capture of low-abundance target DNA sequences: application to the polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *Anal. Biochem.* **226**, 325-330.

- 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 cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3446-3452.
- Miltner, E. C., Bermudez, L. E. (2000): *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1990-1994.
- Minett, F. C. (1942): The diagnosis of Johne's disease of cattle by cultural methods. *J. Bact. Path.* **54**, 209-219.
- 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.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Megraud, F. (1997): Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 995-998.
- Morgan, M. A., Horstmeier, C. D., de Young, D. R., Roberts, G. D. (1983): Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 384-388.
- Moss, M. T., Green, E. P., Tizard, M. L., Malik, Z. P., Hermon-Taylor, J. (1991): Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut.* **32**, 395-398.
- Munoz, M., Garcia Marin, J. F., Garcia-Pariente, C., Reyes, L. E., Verna, A., Moreno, O., Fuertes, M., Doce, J., Puentes, E., Garrido, J., Perez, V. (2005): Efficacy of killed vaccine (SILIRUM) in calves challenged with MAP. *Proc. 8th Int. Coll. Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark*, 208-217.
- 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* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 854-859.
- Muskens, J., Mars, M. H., Elbers, A. R., van Maanen, K., Bakker, D. (2003): The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *J. Vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health* **50**, 231-234.
- NCBI Taxonomy Browser (2008): www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
- Naser, S. A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J. F. (2004): Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**, 1039-1044.
- Nielsen, S. S., Thamsborg, S. M., Houe, H., Bitsch, V. (2000): Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* **44**, 1-7.

- Nielsen, S. S., Nielsen, K. K., Huda, A., Condrón, R., Collins, M. T. (2001): Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bull. Int. Dairy Fed.* **362**, 5-17.
- Nielsen, S. S., Kolmos, B., Christoffersen, A. B. (2004): Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 149-153.
- Niza-Ribeiro, J., Gomes, C., Afonso, C., Barbosa, A., Madeira, H., Pereira, A., Sousa, J. (2006): Prevalence estimate of paratuberculosis in dairy herds of the north of Portugal using an ELISA test. World Buiatrics Congress 2006, Nice, France.
- Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M., Mutharia, L. (2001): Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can. J. Vet. Res.* **65**, 201-205.
- Olsen, I., Johansen, T. B., Billman-Jacobe, H., Nilsen, S. F., Djonne, B. (2004): A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **98**, 297-306.
- Olsen, J. E., Jörgensen, J. B., Nansen, P. (1985): On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic digestion. *Agric. Wastes* **13**, 273-280.
- O'Mahony, J., Hill, C. (2002): A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and Light Cycler. *J. Microbiol. Methods* **51**, 283-293.
- O'Mahony, J., Hill, C. (2004): Rapid real time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4561-4568.
- Ortmann, G., Homuth, M., Ehlert, F., Strutzberg-Minder, K., Huhold, K. (2005): Serologische Untersuchungen zur Diagnostik der bovinen Paratuberkulose im Land Brandenburg. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005.
- Ott, S. L., Wells, S. J., Wagner, B. A. (1999): Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* **40**, 179-192.
- Paine, E. (1908): Die Johne'sche Krankheit (chronische Darmtuberkulose). *Agr. Journ. Cape Good Hope*, 31.
- Park, K. T., Ahn, J., Davis, W. C., Koo, H. C., Kwon, N. H., Jung, W. K., Kim, J. M., Hong, S. K., Park, Y. H. (2006): Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. *J. Vet. Sci.* **7**, 349-354.
- Patterson, D. S., Berrett, S. (1969): Malabsorption in Johne's disease in cattle: an in vitro study of L-histidine uptake by isolated intestinal tissue preparations. *J. Med. Microbiol.* **2**, 327-334.

- Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, 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., Matlova, L., Bartl, J., Svastova, P., Dvorsak, L., Whitlock, R. (2000): Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet. Microbiol.* **77**, 309-324.
- Pearson, J. K. L., McClelland, T. G. (1955): Uterine infection and congenital Johne's disease in cattle. *Vet. Rec.* **67**, 615-616.
- Pearson, L. (1908): Das Vorkommen der chronischen bakteriellen Dysenterie bei amerikanischen Rindern. *Am. Vet. Rev.* **32**, 602.
- Pfyffer, G. E. (2001): BACTEC MGIT 960-neues Verfahren für Kultur und Resistenzprüfung von *Mycobacterium tuberculosis*. *News, Universitäres Zentrum für Labormedizin und Pathologie, Zürich*, November 2001, **4**, 9-11.
- Philpott, M. (1993): The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.* **149**, 339-369.
- Pickup, R. W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T. J., Weightman, A., Hurley, M., Hermon-Taylor, J. (2005): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2130-2139.
- Pohlenz, J. (1991): Krankheiten der Verdauungsorgane. In Schulz, L. C. (Ed.): *Pathologie der Haustiere Band 1*, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Poupart, P., Coene, M., van Heuverswyn, H., Cocito, C. (1993): Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1601-1605.
- Primm, T. P., Lucero, C. A., Falkinham, J. O. III (2004): Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 98-106.
- Rademaker, J. L. W., Vissers, M., Meeuwisse, J., Hoolwerf, J., te Griffel, M. (2005): Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk. *Proc. 8th Int. Coll. Paratuberculosis*, Copenhagen, Denmark.
- Ravva, S. V., Stanker, L. H. (2005): Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. *J. Microbiol. Methods* **63**, 305-317.
- Reddacliff, L. A., Vadali, A., Whittington, R. J. (2003): The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* **95**, 271-282.

- Reichel, M. P., Kittelberger, R., Penrose, M. E., Meynell, R. M., Cousins, D., Ellis, T., Mutharia, L. M., Sugden, E. A., Johns, A. H., de Lisle, G. W. (1999): Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet. Microbiol.* **66**, 135-150.
- Richards, W. D. (1981): Effects of physiol and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **14**, 587-588.
- Richards, W. D., Thoen, C. O. (1977): Effects of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* **6**, 392-395.
- Ridge, S., Morgan, I. R. (1991): Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic tests for Johne's disease and other disease with long incubation or latent periods. Proc. 3th Int. Coll. Paratuberculosis, Orlando, Florida.
- Ridge, S. E. (1993): Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples by using elements of the Roche MB Check system. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 400-405.
- Rohde, R. F., 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.
- Rolle, M., Mayr, A. (2002): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart.
- Rossiter, C. A., 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., Grant, I. R. (2006): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**, 305-311.
- Sachs, L. (1992): Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden. 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- Sartor, R. B. (1997): Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **92**, 5-11.
- Saxegaard, F. (1990): Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* **102**, 149-156.
- Schaaf, E. (1957): Zur Züchtung und Identifizierung des *M. paratuberculosis*. *Vet. Med. Diss.*, Gießen.
- Schaaf, J., Beerwerth, W. (1960): Die Bedeutung der Generalisation der Paratuberkulose, der Ausscheidung des Erregers mit der Milch und der kongenitalen Übertragung für die Bekämpfung der Seuche. *Mh. Tierheilk., Rindertuberkulose* **9**, 115-124.
- Schaaf, J., Beerwerth, W., Grodde, S. (1956): Über die Paratuberkulose des Rindes, ihre Verbreitung, Diagnose und Bekämpfung. *Mh. Tierheilk., Rindertuberkulose* **5**, 144-154.
- Schliesser, T., Schaal, E. (1983): Prevalence and diagnosis of paratuberculosis in the federal republic of Germany. Commission of the European Communities, Agriculture. Report Eur. 9000 EN, 103-112.

- Schmailzl, K. J. G. (1995): Harrison's Innere Medizin 2.13. Aufl., Blackwell Verlag, Berlin.
- Schneider, F. (2003): Entwicklung einer "seminested" PCR und einer "Real-Time-PCR" zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Rindern. Vet. med. Diss., München.
- Schönenbrücher H., Abdulmawjood, A., Failing, K., Bülte, M. (2008): New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. **74**, 2751-2758
- Schreiber, S., Stange, E. (1997): Morbus Crohn und Colitis ulcerosa - neue Erkenntnisse zur Immunpathogenese. Dt. Ärztebl. **94**, 1268-1274.
- Scott, H. M., Sorensen, O., Wu, J., Chow, E. Y., Manninen, K. (2006): Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, *Bovine leukemia virus*, and *Bovine viral diarrhea virus* infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. Can. Vet. J. **47**, 981-991.
- Seitz, S. E., Heider, L. E., Heuston, W. D., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M., Spangler, L. (1989): Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. **194**, 1423-1426.
- Sivakumar, P., Tripathi, B. N., Singh, N. (2005): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. Vet. Microbiol. **108**, 263-270.
- 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., Conrad, T. A., Thomas, C. B., Collins, M. T. (1992): Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. J. Clin. Microbiol. **5**, 1134-1139.
- Sons, H. U., Dannberg, A., Jerosch, J., Dellmann, A. (1990): Orthopedic aspects of Crohn disease. Examples of extra-intestinal organ manifestation. Beitr. Orthop. Traumatol. **37**, 539-544.
- Spahr, U., 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.
- Stabel, J. R. (1996): Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. J. Vet. Diagn. Invest. **8**, 345-350.
- Stabel, J. R., 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.
- Stabel, J. R., Steadham, E. M., Bolin, C. A. (1997): Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl. Environ. Microbiol. **63**, 4975-4977.

- Stabel, J. R., Pearce, L., Chandler, R., Hammer, P., Klijn, N., Collin, M. T., Heggum, C., Murphy, P. (2001): Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. In *Mycobacterium paratuberculosis*. Bull. Intl. Dairy Fed. **362**, 53-60.
- Stabel, J. R., Bosworth, T. L., Kirkbride, T. A., Forde, R. L., Whitlock, R. H. (2004): A simple, rapid and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. **16**, 22-30.
- Stark, K. D., Frei-Staheli, C., Frei, P. P., Pfeiffer, D. U., Danuser, J., Audige, L., Nicolet, J., Strasser, M., Gottstein, B., Kihm, U. (1997): Frequency and cost of health problems in Swiss dairy cows and their calves (1993-1994). Schweiz. Arch. Tierheilkd. **139**, 343-353.
- Stawarski, A., Iwanczak, B., Krzesiek, E., Iwanczak, F. (2006): Intestinal complications and extraintestinal manifestations in children with inflammatory bowel disease. Pol. Merkur. Lekarski. **20**, 22-25.
- Stein, M. (2003): Morbus Crohn durch Mycobakterien. VETImpuls **18**, 15-17.
- Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F. (1998): *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2256-2261.
- Stephan, R. (2007): Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Verbr. Lebensm., 222-227.
- Sternberg, L. S., Larsson, B., Melin, L., Bölske, G. (2006): Screening the Swedish sheep population for paratuberculosis. Proc. 8th Int. Coll. Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 76.
- Stich, R. W., Byrum, B., Love, B., Theus, N., Barber, L., Shulaw, W. P. (2004): Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. J. Microbiol. Methods **56**, 267-275.
- Strahl, E. D., Gillaspay, G. E., Falkinham, J. O. III (2001): Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. Appl. Environ. Microbiol. **67**, 4432-4439.
- 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* subspecies *paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. **196**, 31-37.
- Sung, N., Collins, M. T. (1998): Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol. **64**, 999-1005.

- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Buckley, C. L., Spencer, P., Rosenberger, A. E., Hutchinson, L. J. (1994): Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am. J. Vet. Res.* **55**, 905-909.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., McAdams, S. (2005): Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and uninfected herd mates. Proc. 8th Int. Coll. Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Rosenberger, A. E. (1992): *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 477-480.
- Taddei, S., Robbi, C., Cesena, C., Rossi, I., Schiano, E., Arrigoni, N., Vicenzoni, G., Cavirani, S. (2004): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**, 503-508.
- Tanaka, S., Sato, M., Taniguchi, T., Yokomizo, Y. (1996): Relationship of acid phosphatase activity to ultrastructural features in mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* **114**, 81-91.
- Tasara, T., Hoelzle, L. E., Stephan, R. (2005): Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 279-287.
- Tasara, T., Stephan, R. (2005): Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5957-5968.
- Taylor, A. W. (1953): Experimental Johne's disease in cattle. *J. comp. Path.* **63**, 355-367.
- Thorel, M. F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V. V. (1990): Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 254-260.
- Thronton, C. G., Passen, S. (2004): Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *J. Microbiol. Methods.* **59**, 43-52.
- Tonelli, P. (1995): Perforation in Crohn's ileitis and its consequences in the natural history of disease. 2. Consequences of perforation in the peritoneal cavity: diffuse septic peritonitis, abscesses, external and internal fistulas. *Ann. Ital. Chir.* **66**, 457-466.
- Trautwein, G. (1991): Pathologie der Haustiere Band 1, 1. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Truant, J. P., Brett, W. A., Thomas, W. Jr. (1962): Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford. Hosp. Med. Bull.* **10**, 287-296.

- Tunkl, B., Aleraj, Z. (1965): The recovery of *M. johnei* in the semen of bull from one station for artificial insemination. *Veterinarski Glasnik*. **19**, 845-849.
- Twort, F. W., 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 pseudotuberculous enteritis of bovines. *Proc. Roy. Soc.* **84**, 517-543.
- Udou, T., Ogawa, M., Mizuguchi, Y. (1982): Spheroplast formation of *Mycobacterium smegmatis* and morphological aspects of their reversion to the bacillary form. *J. Bacteriol.* **151**, 1035-1039.
- Udou, T., Ogawa, M., Mizuguchi, Y. (1983): An improved method for the preparation of mycobacterial spheroplasts and the mechanism involved in the reversion to bacillary form: electron microscopic and physiologic study. *Can. J. Microbiol.* **29**, 60-68.
- van Boxel, R. M., Lambrecht, R. S., Collins, M. T. (1990): Effects of colonial morphology and tween 80 on antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2300-2303.
- van Schaik, G., Kalis, C. H., Benedictus, G., Dijkhuizen, A. A., Huirne, R. B. (1996): Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* **139**, 624-627.
- van Schaik, G., Schukken, Y. H., Crainiceanu, C., Muskens, J., van Leeuwen, J. A. (2003): Prevalence estimates for paratuberculosis adjusted for test variability using Bayesian analysis. *Prev. Vet. Med.* **60**, 281-295.
- Vansnick, E., de Rijk, P., Vercammen, F., Rigouts, L., Portaels, F., Geysen, D (2004): Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *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.* **5**, 933-937.
- Vishnevskii, P. P., Mamatsev, E. G., Chernyshev, V. V., Chernyshev, N. S. (1940): The viability of the bacillus of Johne's disease. *Sov. Vet.* **12**, 89-93.
- Viske, D., Larsson, B., Engvall, A., Bölske, G. (1996): Paratuberculosis in Sweden. *The Paratuberculosis News Lett.* **8**, 29.
- Visuvanathan, S., Moss, M. T., Stanford, J. L., Hermon-Taylor, J., McFadden, J. J. (1989): Simple enzymic method for isolation of DNA from diverse bacteria. *J. Microbiol. Methods* **10**, 59-64.
- Wall, S., Kunze, Z. M., Saboor, S., Soufleri, I., Seechurn, P., Chiodini, R., McFadden, J. J. (1993): Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1241-1245.
- Wang, H., Chen, Z. (2001): Observations of properties of the L-form of *M. tuberculosis* induced by the antituberculosis drugs. *Zhonghua Jie He He Hu Za Zhi.* **24**, 52-55.

- Wards, B. J. (1996): Valuation of defined media suitable for isolation of auxotrophic mutants of mycobacteria. *J. Basic Microbiol.* **36**, 355-362.
- Wayne, L. G., Hayes, L. G. (1996): An in vitro model for sequential study of shift-down of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* **64**, 2062-2069.
- Wayne, L. G., Sramek, H. A. (1994): Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2054-2058.
- Weber, A., Roth, M., Gürke-Werner, R. (1991): Partuberkulose beim Damwild. *Vet.* **9**, 21-23.
- Wells, S. J., Collins, M. T., Faaberg, K. S., Wees, C., Tavoranpanich, S., Petrini, K. R., Collins, J. E., Cernicchiaro, N., Whitlock, R. H. (2006): Evaluation of a rapid fecal PCR test for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 1125-1130.
- Wentink, G. H., Bongers, J. H., Zeeuwen, A. A., Jaartsveld, F. H. (1994): Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl. Veterinärmed. B.* **41**, 517-522.
- Whan, L., 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.
- Whan, L., Grant, I. R., Rowe, M. T. (2006): Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol.* **6**, 63.
- Whitlock, R. H., Buergelt, C. (1996): Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**, 345-356.
- Whitlock, R. H., Well, S. J., Sweeney, R. W., van Tiem, J. (2000): ELISA and fecal culture for paratuberculosis (John's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* **77**, 387-398.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., Reddacliff, L. A. (2005): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5304-5308.
- Whittington, R. J., Marsh, I., McAllister, S., Choy, E., Eamens, G. J., Marshall, D. J., Ottaway, S. (1998): Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 701-707.
- Whittington, R. J., Reddacliff, L. A., Marsh, I., Saunders, V. (1999): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* **77**, 392-397.
- 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.

- Wilson, D. J., Rossiter, C., Han, H. R., Sears, P. M. (1993): Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* **54**, 1851-1857.
- Winkler, R., Wittmer, A., Heusermann, U. (2002): Das Karzinom beim Morbus Crohn. *Gastroenterol.* **40**, 569-576.
- Wu, C., Livesey, M., Schmoller, S. K., Manning, E. J., Steinberg, H., Davis, W. C., Hamilton, M. J., Talaat, A. M. (2007): Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect. Immun.* **75**, 2110-2119.
- Yamazaki, Y., Danelishvili, L., Wu, M., Macnab, M., Bermudez, L. E. (2006): *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 819-825.
- Zimmer, K., Dräger, K. G., Klawonn, W., Hess, R. G. (1999): Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and commercially available DNA-probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zentralbl. Veterinärmed.* **46**, 137-140.
- Zurbrick, B. G., Czuprynski, C. J. (1987): Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **116**, 1588-1593.

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. M. Bülte gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas, für die zahlreichen Stunden seiner Zeit, die er mir bei der Betreuung und Korrektur dieser Arbeit gewidmet hat, für die gewährte Unterstützung bei den Arbeiten sowie für die gute Förderung und die Möglichkeiten der umfassenden Weiterbildung.

Ferner danke ich Dr. A. Abdulmawjood für seine fortwährende Unterstützung und fachliche Beratung bei den Arbeiten.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde für die Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit auch über das fachliche hinaus. Insbesondere danke ich Frau C. Walter und K. Simon für die praktische und technische Unterstützung bei der Bearbeitung der Proben.

Ein besonderer Dank gilt der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Professur für Krankheiten der Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen, insbesondere Prof. K. Doll und Dr. T. Seger, dem Landesbetrieb Hessisches Landeslabor in Gießen, dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in Koblenz und der Thüringer Tierseuchenkasse in Jena für die Bereitstellung von Probenmaterial.

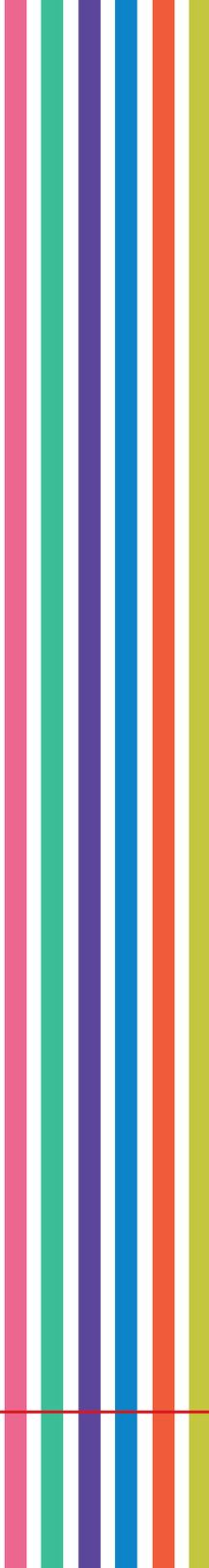
Herrn Dr. K. Failing und Frau M. Sparenberg danke ich für die Beratung und statistischen Auswertungen der Daten.

Dr. Thomas Fuchs, Lars Meier und Stefanie Rosa danke ich herzlich für das unermüdliche Korrekturlesen, die Hilfestellungen am Computer sowie ihre Geduld in der stressigen Endphase dieser Arbeit.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Oma, deren beständige Unterstützung mir die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

**Erklärung gemäß § 10 Abs. 5 der Promotionsordnung des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität vom 6. Februar 2002**

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



edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5442-3

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



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 4 4 2 7 1