

PETER SCHEIBL

Differenzierung klinischer *Mycobacterium paratuberculosis*-Isolate mittels 16S-23S rDNS-Spacer-Analyse und Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

Ziel dieser Arbeit war die Differenzierung klinischer Isolate von *M. paratuberculosis*. Dieser Erreger verursacht bei Wiederkäuern die Paratuberkulose und ist weltweit für hohe wirtschaftliche Verluste bei Rindern verantwortlich. Fünfzehn Isolate wurden aus Kot oder Lymphknoten infizierter Rinder aus verschiedenen Herden isoliert; zusätzlich wurde der Referenzstamm *M. paratuberculosis* ATCC 19698 angezchtet. Die Identität der Isolate wurde durch das langsame und mycobactinabhängige Wachstum und eine IS900-PCR bestätigt. Die Lysis der Mykobakterien wurde durch Modifikation der Methode von WHIPPLE et al. (1987) erreicht und ergab eine DNS-Ausbeute zwischen 25 und 150 µg/g Zellnaßgewicht. Die RAPD-PCR, die Sequenzierung des 16S-23S rDNS-Spacers und die Southern Hybridisierung mit einer IS900-Gensonde wurden auf ihre Eignung zur Differenzierung der Isolate untersucht.

Vierzehn von insgesamt 65 Dekameren mit einem G+C-Gehalt zwischen 60 und 70% ergaben reproduzierbare Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Muster, die aus einer bis vier Einzelbanden bestanden und die Charakterisierung individueller Isolate erlaubten. Indem nur solche Isolate als verschieden angesehen wurden, die mit demselben Primer verschiedene reproduzierbare RAPD-Muster ergaben, konnten sechs Isolate eindeutig charakterisiert werden, sechs weitere Isolate konnten von jeweils einem anderen nicht unterschieden werden und jeweils zwei weitere Isolate waren von zwei oder drei anderen nicht zu unterscheiden. Die PCR mit ERIC-Primern ergab identische Bandenmuster für alle Isolate.

Die Analyse der Nukleotidsequenz des mittels PCR vervielfältigten und dann klonierten 16S-23S rDNS-Spacers ergab identische Sequenzen in elf Isolaten. Von den übrigen fünf Isolaten zeigten drei einen Unterschied in einem Klon und jeweils ein weiteres Unterschiede in zwei oder drei Klonen. Die Differenzierung individueller Isolate konnte mit diesem Verfahren nicht erreicht werden, aber die Sequenzen aller Isolate zeigten einen gemeinsamen Unterschied zur kürzlich publizierten Spacer-Sequenz von *M. paratuberculosis* J2A.

Die Southern Hybridisierung mit einer IS900-Gensonde ergab Bandenmuster ohne ausreichende Unterschiede zur Differenzierung von Isolaten.

Das Ziel dieser Arbeit, die Differenzierung klinischer *M. paratuberculosis*-Isolate, ist mit der RAPD-PCR erreicht worden; diese Methode wird zur Bearbeitung epidemiologischer Fragestellungen zum Ursprung von *M. paratuberculosis* in infizierten Herden empfohlen.

6.1 SUMMARY

PETER SCHEIBL

Differentiation of clinical *Mycobacterium paratuberculosis* isolates by 16S-23S rDNA spacer analysis and random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

Aim of this thesis was the differentiation of clinical isolates of *M. paratuberculosis*. This bacterium causes paratuberculosis, a chronic granulomatous enteritis in ruminants and is responsible for high economic losses in cattle throughout the world. Fifteen isolates were isolated from faeces and lymphnodes of infected cattle in different herds, additionally the reference strain *M. paratuberculosis* ATCC 19698 was cultured. Slow and mycobactin dependent growth and IS900 PCR were used to confirm the identity of isolates. Lysis of mycobacteria was achieved by modifying the method of WHIPPLE et al. (1987) and resulted in 25 to 150 µg DNA/g bacterial wet weight. RAPD-PCR, sequencing of the spacer region between the 16S and 23S genes and Southern hybridization with an IS900 probe were investigated for their applicability in differentiation of isolates.

Fourteen of 65 decamer primers with a G+C-content of 60 to 70% were found to result in reproducible random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns consisting of one to four bands allowing the characterization of individual isolates. Regarding only those isolates as different which gave distinct reproducible RAPD profiles with the same primer, six isolates were unique, six were indistinguishable from one other isolate and two each were indistinguishable from two or three other isolates, respectively. PCR with ERIC primers gave identical banding patterns for all isolates.

Nucleotide sequence analysis of the PCR-amplified and cloned spacer region between the 16S and 23S rRNA genes revealed identical sequences in eleven isolates; among the remaining five isolates three showed a difference in one clone and one each in two or three clones, respectively. Differentiation of individual isolates was not achieved by this method, but all sequences had one common difference in comparison to the sequence previously described for the rDNA spacer of *M. paratuberculosis* J2A.

Southern hybridization with an IS900 probe did not result in banding patterns sufficiently distinct to allow a differentiation of isolates.

The aim of this thesis to differentiate clinical isolates of *M. paratuberculosis* was achieved by RAPD-PCR; this method is recommended for epidemiological studies investigating the origin of *M. paratuberculosis* in infected herds.