

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ  
ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ  
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
*MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* ΑΠΟ  
ΠΡΟΒΑΤΑ, ΑΙΓΕΣ ΚΑΙ ΜΟΝΟΓΑΣΤΡΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ ΑΓΡΙΑΣ  
ΠΑΝΙΔΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΑΡΙΑΝΝΑ Α. ΦΛΩΡΟΥ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΚΑΡΔΙΤΣΑ, 2007**

*Στην οικογένειά μου*

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ  
ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ  
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
*MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* ΑΠΟ  
ΠΡΟΒΑΤΑ, ΑΙΓΕΣ ΚΑΙ ΜΟΝΟΓΑΣΤΡΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ ΑΓΡΙΑΣ  
ΠΑΝΙΔΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΑΡΙΑΝΝΑ Α. ΦΛΩΡΟΥ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΚΑΡΔΙΤΣΑ, 2007**

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναπλ. Καθηγητής  
Επ. Καθηγητής  
Επ. Καθηγητής  
Καθηγήτρια  
Αναπλ. Καθηγήτρια  
Καθηγητής  
Καθηγητής

Λ. Λεοντίδης  
Χ. Μπιλλίνης  
Ι. Παππάς  
Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου  
Α. Ρόδη-Burriel  
Η. Κραμποβίτης  
Χ. Μπάτζιος

Επιβλέπων  
Μέλος Συμβ. Επιτροπής  
Μέλος Συμβ. Επιτροπής  
Μέλος Εξετ. Επιτροπής  
Μέλος Εξετ. Επιτροπής  
Μέλος Εξετ. Επιτροπής  
Μέλος Εξετ. Επιτροπής

## Περίληψη

### *Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή*

Στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής γίνεται μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά τις προσπάθειες για την αποσαφήνιση του ρόλου της άγριας πανίδας ως δεξαμενής διατήρησης και μετάδοσης του *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) στα κατοικίδια μηρυκαστικά. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται τα είδη αγρίων μηρυκαστικών και μονογαστρικών από τα οποία έχει απομονωθεί ο μικροοργανισμός, τα κλινικά συμπτώματα και οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις που έχουν παρατηρηθεί. Επίσης παρατίθενται λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία και την αξιοπιστία της καλλιέργειας, που αποτελεί τον κύριο τρόπο απομόνωσης του MAP. Επιπλέον γίνεται εκτεταμένη αναφορά στις διαδικασίες και τα αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων τυποποίησης, που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα για τη γενετική σύγκριση των στελεχών του MAP, που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη της άγριας πανίδας. Στο τέλος του κεφαλαίου αυτού αναφέρεται ο σκοπός της παρούσας διατριβής, που αφορά τη διερεύνηση του ρόλου των μονογαστρικών αγρίων ειδών και του περιβάλλοντός τους ως δεξαμενής διατήρησης και μετάδοσης του MAP στα πρόβατα και τις αίγες.

### *Κεφάλαιο 2 – Απομόνωση του Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, που ζουν στους χώρους σταβλισμού και στους βοσκότοπους ελληνικών κοπαδιών προβάτων και αιγών*

Ο σκοπός αυτού του τμήματος της διατριβής ήταν: (1) η ανίχνευση του MAP σε μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, που έρχονταν σε επαφή με πρόβατα και αίγες γαλακτοπαραγωγών φυλών, τεσσάρων ελληνικών, ενδημικά μολυσμένων με παραφυματίωση, κοπαδιών και (2) η γενετική σύγκριση μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από τα άγρια ζώα με εκείνα που απομονώθηκαν από τα μηρυκαστικά των κοπαδιών αυτών. Καλλιεργήθηκαν και εξετάστηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR), για την ανίχνευση της ειδικής για το MAP ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900, ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από 327 άγρια ζώα, που προέρχονταν από 11 διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας. Επίσης, καλλιεργήθηκαν δείγματα κοπράνων από 100 πρόβατα και αίγες από κάθε κοπάδι. Το MAP απομονώθηκε από τα δείγματα 11 προβάτων, 12 αιγών, 2 μυών, 2 επίμυων, ενός λαγού και μίας αλεπούς. Μόνο ένας επίμυς είχε ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Η γενετική τυποποίηση κατηγοριοποίησε 21 στελέχη ως βοείου τύπου και 2, από ένα μυ και μία αίγα, ως πρόβειου τύπου στελέχη. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά απομόνωσης στελέχους MAP πρόβειου τύπου από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας. Τα στελέχη των τρωκτικών και των κατοικίδιων μηρυκαστικών που απομονώθηκαν από το ίδιο κοπάδι, άνηκαν στον ίδιο τύπο MAP. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το λαγό και την αλεπού άνηκαν στον ίδιο τύπο MAP με αυτόν που απομονώθηκε από την πλειοψηφία των κατοικίδιων μηρυκαστικών.

*Κεφάλαιο 3 – Γενετική σύγκριση στελεχών Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis που απομονώθηκαν από ελληνικά πρόβατα και αίγες, από την τροφή και τη στρωμνή τους, καθώς και από συσχετιζόμενα με αυτά μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας.*

Οι σκοποί αυτού του τμήματος της διατριβής ήταν η γενετική σύγκριση στελεχών *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) που απομονώθηκαν από ελληνικά πρόβατα και αίγες, από την τροφή και τη στρωμνή τους, καθώς και από συσχετιζόμενα με αυτά μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας. Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν και συγκρίθηκαν γενετικά με τη μέθοδο της IS1311 αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR) ακολουθούμενη από ανάλυση περιορισμού ενδονουκλεασών (restriction endonuclease analysis - REA) και με προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900. Καλλιεργήθηκαν και εξετάστηκαν με PCR, για την ανίχνευση της ειδικής για το MAP ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900, ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από 327 άγρια ζώα, που προέρχονταν από 11 διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας, τα οποία είχαν αιχμαλωτιστεί ή βρεθεί νεκρά στους στάβλους ή στους βοσκότοπους τεσσάρων ελληνικών κοπαδιών προβάτων και αιγών, ενδημικά μολυσμένων με MAP. Επίσης, από κάθε κοπάδι, καλλιεργήθηκαν 60 δείγματα στρωμνής, 15 δείγματα τροφής καθώς και δείγματα κοπράνων από 100 πρόβατα και αίγες. Επιπλέον, καλλιεργήθηκαν και εξετάστηκαν με IS900-PCR ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από το γαστρεντερικό σύστημα 142 προβάτων και 72 αιγών, που είχαν συλλεχθεί σε τρία σφαγεία, τα οποία έσφαζαν πρόβατα και αίγες από την ευρύτερη περιοχή των υπό διερεύνηση εκτροφών. Το MAP ανιχνεύτηκε σε 1 δείγμα στρωμνής, σε 1 δείγμα τροφής, καθώς και στα δείγματα 6 αγρίων ζώων και 33 μικρών μηρυκαστικών. Η IS1311 PCR-REA κατηγοριοποίησε 25 στελέχη MAP σε βόειο (cattle-C) και 10 σε πρόβειο (sheep-S) τύπο. Γενικά, τα στελέχη των τρωκτικών, της στρωμνής και της τροφής άνηκαν στον ίδιο τύπο MAP με εκείνα των κατοικίδιων μηρυκαστικών, που απομονώθηκαν από το ίδιο κοπάδι. Ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA και η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 ομαδοποίησε 19 στελέχη MAP ανάλογα με την περιοχή της δειγματοληψίας και έδειξε ότι πιθανώς έχει συμβεί μετάδοση των στελεχών μεταξύ της άγριας πανίδας και των προβάτων και των αιγών.

*Κεφάλαιο 4 – Εκτίμηση της ευαισθησίας της καλλιέργειας του Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ανάλογα με τον τύπο του στελέχους σε ελληνικά πρόβατα και αίγες.*

Ο σκοπός αυτού του τμήματος της διατριβής ήταν η εκτίμηση και η σύγκριση της ευαισθησίας (Eu) δύο στερεών καλλιεργητικών υποστρωμάτων, του Herrold's egg - yolk medium (HEYM) και του Lowenstein-Jensen (LJ), για την απομόνωση του MAP, ανάλογα με τον τύπο του στελέχους και το είδος του δείγματος (κόπρανα ή ιστοί) από ελληνικά γαλακτοπαραγωγά πρόβατα και αίγες. Από 400 δείγματα κοπράνων, που συλλέχθηκαν από υποκλινικά μολυσμένα πρόβατα και αίγες 4 κοπαδιών και από 214 δείγματα ομογενοποιημένων ιστών (142 από πρόβατα και 72 από αίγες), που συλλέχθηκαν στα σφαγεία από ζώα μεγαλύτερα του 1 έτους με μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης, απομονώθηκαν 34 στελέχη MAP. Από τα παραπάνω, 18

κατατάχθηκαν στον C και 9 στον S τύπο, με τη μέθοδο της IS1311 PCR-REA. Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes για την εκτίμηση της Ευ των καλλιεργητικών υποστρωμάτων ανάλογα με τον τύπο του στελέχους. Η  $E_{U_{HEYM-C-κόπρανα}} = 17\%$  (95% Διάστημα αξιοπιστίας: 7, 40) ήταν μεγαλύτερη από την  $E_{U_{HEYM-S-κόπρανα}} = 2\%$  (0.3, 11). Επίσης, η  $E_{U_{HEYM-C-κόπρανα}}$  ήταν μεγαλύτερη από την  $E_{U_{LJ-C-κόπρανα}} = 4\%$  (1, 12). Στα ομογενοποιημένα δείγματα ιστών δεν διέφεραν οι Ευ για την απομόνωση διαφορετικών τύπων MAP.

### *Κεφάλαιο 5 – Γενική συζήτηση*

Σε αυτό το τμήμα συνοψίζονται τα ευρήματα αυτής της διατριβής και συζητούνται σε σχέση τόσο με τη προϋπάρχουσα δημοσιευμένη σχετική γνώση όσο και με την προοπτική συνέχισης της έρευνας στο μέλλον

**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF VETERINARY SCIENCE  
LABORATORY OF EPIDEMIOLOGY, BIostatISTICS AND ANIMAL  
HEALTH ECONOMICS**

**ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND  
EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES  
*PARATUBERCULOSIS* STRAINS FROM GREEK SHEEP, GOATS AND  
NONRUMINANT WILDLIFE**

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF VETERINARY  
SCIENCE**

**MARIANNA A. FLOROU  
D.V.M.**



## Summary

### *Chapter 1 - Introduction*

The introductory chapter of this thesis considers the available literature on the role of wildlife as a reservoir for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection of domestic ruminants. More specifically, the wildlife species found to harbour MAP and the observed clinical and pathological findings are presented. Furthermore, the process and the diagnostic accuracy of culture, which is used for MAP isolation, are presented. Finally, the molecular techniques that have been used for the genetic characterization of MAP isolates are presented in detail.

### *Chapter 2 – Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from nonruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats.*

The aim of this chapter was to: (1) investigate whether non-ruminant wildlife interfacing with dairy sheep and goats of four Greek flocks endemically infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) harboured MAP and (2) genetically compare the strains isolated from the wildlife to those isolated from the small ruminants of these flocks. We cultured and screened, by polymerase chain reaction (PCR), pooled-tissue samples from 327 wild animals of 11 species for the MAP-specific IS900 insertion sequence. We also cultured faecal samples from 100 sheep or goats from each of the four flocks. MAP was detected in samples from 11 sheep, 12 goats, two mice, two rats, a hare and a fox. Only one rat had histopathological findings. Genetic typing categorized 21 isolates as cattle-type strains and two, from a house mouse and a goat respectively, as sheep-type strains; this is the first report of a rodent harbouring a sheep-type strain. The MAP-types that were most frequently isolated amongst the sheep and goats of each flock were also the ones isolated from sympatric rodents; those isolated from the fox and hare also belonged to the predominant ruminants strains.

### *Chapter 3 – Genetic comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains isolated from Greek sheep and goats, their feed and litter and associated non-ruminant wildlife*

The aim of this chapter was to genetically compare *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolates from Greek sheep and goats, their compound feed and litter and the associated non-ruminant wildlife. We genetically characterized the strains by using both the IS1311 polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction endonuclease analysis (REA) and the sequence and phylogenetic analysis of a part of the IS900 insertion sequence. We cultured and screened by PCR for the IS900 insertion sequence, pooled-tissue samples from 327 wild animals of 11 species, trapped or found dead in the sheds or on the grazing grounds of four endemically infected with paratuberculosis sheep and goat flocks. We also cultured 60 litter and 15 concentrate feed samples and faecal samples from 100 sheep or goats from each of the four flocks. In addition, we cultured and screened by PCR pooled-tissue samples from the gastrointestinal tracts of 142 sheep and 72 goats, collected at three abattoirs receiving

animals from the region around the flocks. MAP was detected in samples from six wild animals, 33 small ruminants, one litter and one feed sample. IS1311 PCR-REA classified 25 isolates into cattle- and ten into sheep-type strains. Generally, the same MAP type was recovered from feed and litter samples, wildlife and sympatric sheep and goats. The sequence and phylogenetic analysis on a part of the IS900 sequence discriminated 19 MAP strains according to sampling site and showed that interspecies transmission between wildlife and sheep and goats may have occurred.

#### *Chapter 4 – Strain-specific sensitivity estimates of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis culture in Greek sheep and goats*

The aim of this chapter was to estimate and compare strain-, and biologic sample (faeces or pooled-tissue) - specific sensitivities (Ses) of two solid culture media, Herrold's egg yolk medium (HEYM) and Lowenstein-Jensen (LJ), for Map isolation from Greek dairy sheep and goats. From 400 faecal samples collected from subclinically infected sheep and goats of 4 flocks and from 214 pooled-tissue samples (142 from sheep and 72 from goats) collected, at the abattoir, from >1 year-old, routinely slaughtered animals, with gross pathology suggestive of paratuberculosis, we isolated 34 MAP strains. Of those, by the IS1311 PCR, 18 were categorized into the C- and 9 into the S-type; 7 were not typed. We used a Bayesian approach to estimate the strain-specific Ses.  $Se_{HEYM-C-faecal} = 17\%$  (95% credible interval: 7, 40) was higher than  $Se_{HEYM-S-faecal} = 2\%$  (0.3, 11). Also,  $Se_{HEYM-C-faecal}$  was higher than  $Se_{LJ-C-faecal} = 4\%$  (1, 12). In pooled-tissue samples the strain-specific Ses did not differ between the two media.

#### *Chapter 5 – General discussion*

In this chapter the findings of the thesis are summarized and discussed with relevance to both the published research and the future outlook to follow-up research activities

## Ευχαριστίες

Η διδακτορική μου διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Επιδημιολογίας, Βιοστατιστικής και Οικονομίας Ζωικής Παραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή καθηγητή Λ. Λεοντίδη επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, για την ενεργή και ουσιαστική καθοδήγησή του καθώς και για την απαραίτητη οικονομική στήριξη που μου εξασφάλισε με σκοπό την εκπόνηση της διατριβής. Είναι μεγάλη μου τιμή που είχα τη δυνατότητα να συνεργαστώ με ένα τόσο χαρισματικό επιστήμονα και άνθρωπο.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή Χ. Μπιλλίνη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την συνεργασία, καθώς και την παροχή της υλικοτεχνικής υποδομής για την περάτωση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο καθηγητή Ι. Παππά, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για τον συμβουλευτικό του ρόλο κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Ακόμα, ευχαριστώ το συνάδελφο, συνεργάτη και φίλο κ. Π. Κωστούλα, για την βοήθειά και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Θερμά ευχαριστώ τη συνάδελφο, συνεργάτιδα και φίλη κ. Μ. Σοφία, η οποία με την ανιδιοτέλειά της, την ηθική στήριξη και την ανεξάντλητη υπομονή της είχε κεφαλαιώδη συμβολή στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Οφείλω, επίσης, να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που με τις επισημάνσεις τους συνέβαλαν στην αρτιότερη παρουσίαση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Θ. Παπανικολάου, καθώς και την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υπομονή τους.

Οι απαραίτητοι οικονομικοί πόροι για την εκπόνηση της διατριβής αυτής προήλθαν από ανταγωνιστικό ερευνητικό πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (QLK2-CT-2001-00879), καθώς και από το ερευνητικό πρόγραμμα «Ηράκλειτος» του Υπουργείου Παιδείας (κωδ. υποέργου 51712,16).

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	5
Summary .....	9
Ευχαριστίες .....	11
Περιεχόμενα.....	12
<i>Κεφάλαιο 1</i> .....	14
1. Εισαγωγή.....	15
1.1 MAP και άγρια πανίδα.....	16
1.2 Απομόνωση του MAP.....	20
1.3 Μοριακός χαρακτηρισμός MAP .....	22
1.3.1 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης στελεχών MAP .....	25
1.3.1.1 IS900-Πολυμορφισμός Περιορισμού Μήκους Θραυσμάτων (IS900-Restriction Fragment Length Polymorphism) (IS900-RFLP) .....	25
1.3.1.2 IS1311-RFLP και IS1311 PCR-ανάλυση περιορισμού ενδονουκλεασών (IS1311 PCR-Restriction Endonuclease Analysis) (IS1311 PCR-REA).....	26
1.3.1.2 Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης για τις IS900 Περιοχές – Multiplex PCR for IS900 Loci (MPIL).....	27
1.3.1.3 Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένου Θραύσματος (Amplified Fragment Length Polymorphism) (AFLP).....	28
1.3.1.4 Τυχαία Επεκτεινόμενο Πολυμορφικό DNA (Randomly amplified polymorphic DNA) ( RAPD).....	29
1.3.1.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Παλμικού Πεδίου (Pulse field gel electrophoresis) (PFGE).....	30
1.3.1.6 rRNA Γονίδιο και Ανάλυση Περιοχής που έχει Διάστημα .....	30
1.3.1.7 Διαδοχικές Επαναλήψεις Ποικίλου Αριθμού ή Επαναλήψεις Βραχέων Αλληλουχιών (Variable number tandem or short sequence repeats) (VNTRs ή SSRs).....	31
1.3.1.8 Μυκοβακτηριακές Διάσπαρτες Επαναλαμβανόμενες Μονάδες (Mycobacterial interspersed repetitive units) (MIRU) .....	32
1.4 Υπόβαθρο και σκοπός της μελέτης.....	33
1.5 Βιβλιογραφία .....	36
<i>Κεφάλαιο 2</i> .....	49
2.1 Περίληψη .....	51
2.2 Εισαγωγή.....	52
2.3 Υλικά και μέθοδοι.....	53
2.4 Αποτελέσματα.....	57
2.5 Συζήτηση.....	60
2.6 Βιβλιογραφία .....	64
<i>Κεφάλαιο 3</i> .....	67
3.1 Περίληψη .....	69
3.2 Εισαγωγή.....	70
3.3 Υλικά και μέθοδοι.....	71
3.4 Αποτελέσματα.....	74
3.5 Συζήτηση.....	78
3.6 Βιβλιογραφία .....	81
<i>Κεφάλαιο 4</i> .....	83
Έγινε δεκτό για δημοσίευση στο περιοδικό Zoonoses and Public Health .....	84
4.1 Περίληψη .....	85
4.2 Εισαγωγή.....	86

4.3 Υλικά και μέθοδοι.....	86
4.4 Αποτελέσματα.....	88
4.5 Συζήτηση.....	90
4.6 Βιβλιογραφία .....	92
<i>Κεφάλαιο 5</i> .....	94
5.1 Γενική Συζήτηση.....	95
5.2 Προοπτικές μελλοντικής έρευνας.....	98
<i>Παράρτημα</i> .....	99
1. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση κατά Bayes του πραγματικού ποσοστού προσβολής (ΠΠΠ) των κοπράνων και των ιστών από τους διαφορετικούς τύπους στελεχών MAP, λαμβάνοντας υπόψη τη διαγνωστική ευαισθησία της καλλιέργειας.....	100
2. Η κατανομή β.....	101
<i>Άρθρα στην αγγλική γλώσσα</i> .....	103
1. Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from nonruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats .....	104
2. Genetic comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains isolated from Greek sheep and goats, their feed and litter and associated non-ruminant wildlife.....	120
3. Strain-specific sensitivity estimates of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis culture in Greek sheep and goats .....	135

# *Κεφάλαιο 1*

## 1. Εισαγωγή

Η παραφυματίωση είναι μια χρόνια μεταδοτική εντερίτιδα που χαρακτηρίζεται από προοδευτικά επιδεινούμενη διάρροια, απώλεια βάρους, και τελικά θάνατο του προσβεβλημένου ζώου. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους H. A. Johne και L. Frothingham το 1895, παρόλο που ως κλινικό σύνδρομο ήταν γνωστή από τις αρχές του 1800. Ήδη από τις αρχές του 1900 η νόσος εμφανιζόταν σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες και στις Η.Π.Α (Chiodini et al., 1984). Σήμερα, η εξάπλωση της νόσου είναι παγκόσμια και έχει αναφερθεί σε όλα τα είδη κατοικίδιων μηρυκαστικών (Harris and Barletta, 2001). Στην Ελλάδα, η παρουσία της επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση των χαρακτηριστικών παθολογοανατομικών αλλοιώσεων και την καλλιέργεια του υπεύθυνου μικροοργανισμού, του *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), για πρώτη φορά το 1968 (Leontides et al., 1975). Έκτοτε, είναι ένα από τα σπουδαιότερα νοσήματα των αιγών και των προβάτων στη χώρα μας που προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες γιατί μειώνει την παραγωγικότητα των προσβεβλημένων ζώων (Dimarelli et al., 1991). Το MAP είναι ένας gram-θετικός, οξείαντοχος μικροοργανισμός που απαιτεί για τον πολλαπλασιασμό του σίδηρο από το ζώο ξενιστή (Kennedy and Benedictus, 2001), τον οποίο κινητοποιεί με τη βοήθεια ενός ενζύμου, της ρεδουκτάσης του σιδήρου, που παράγει (Homuth et al., 1998). Το MAP, όπως και τα άλλα μυκοβακτηρίδια, διαθέτει κυτταρικό φάκελο με ξεχωριστή δομή και λειτουργία, που παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην υψηλή ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στο περιβάλλον, καθώς το προστατεύει από τις υψηλές θερμοκρασίες, τα απολυμαντικά και τα υδρόφιλα αντιβιοτικά (Sung and Collins, 1998). Το MAP επιβιώνει στο εξωτερικό περιβάλλον σε ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών για μεγάλο χρονικό διάστημα (Kennedy and Benedictus, 2001).

Τα τελευταία χρόνια η παραφυματίωση έχει διαπιστωθεί και σε πολλά είδη αγρίων μηρυκαστικών, ενώ το MAP απομονώθηκε και από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη διερεύνηση της πιθανότητας ύπαρξης νέων δεξαμενών του μικροοργανισμού σε άλλα ζωικά είδη, πλην των κατοικίδιων μηρυκαστικών. Η εμφάνιση της παραφυματίωσης στα άγρια μηρυκαστικά έχει τεκμηριωθεί επαρκώς (Πίνακας 1), ενώ για τα μονογαστρικά είδη υπάρχουν πολύ λιγότερα δεδομένα, καθώς η μελέτη τους ξεκίνησε πρόσφατα (Angus, 1990), παρά το γεγονός ότι η πρώτη απομόνωση του MAP από λαγούς είχε πραγματοποιηθεί πολύ νωρίτερα (Mathews and Sargent, 1977). Γίνονται προσπάθειες για τη διαπίστωση των μονογαστρικών ζωικών ειδών που είναι πιθανό να μολύνονται από το MAP και ταυτοποιούνται γενετικά τα απομονωθέντα από αυτά στελέχη MAP.

**Πίνακας 1.** Τα είδη των αγρίων μηρυκαστικών στα οποία έχει διαπιστωθεί φυσική λοίμωξη από MAP

Είδος	Επιστημονική ονομασία	Αναφορές	
Ελάφια	<i>Cervus elaphus</i>	Temple et al., 1979; VonWeber and Gurke, 1992 ; deLisle et al., 1993; Mereb et al., 1994; Pacetti et al., 1994; Fawcett et al., 1995; Manning et al., 1998; Godfroid et al., 2000; Nebbia et al., 2000; Glawischnig and Khaschabi, 2001	
	<i>Dama dama</i>	Marco et al., 2002	
	<i>Cervus nippon</i>	Temple et al, 1979	
	<i>Odocoileus virginianus</i>	Libke and Walton, 1975	
	<i>Axis axis</i>	Riemann et al., 1979	
	<i>Capreolus capreolus</i>	Sharp et al., 1995 ; Pavlik et al., 2000	
	<i>Cervus elaphus nannodes</i>	Jessup et al., 1981; Rohonczy et al., 1996; Cook et al., 1997; Manning et al., 1998 ; Manning et al., 2003	
	<i>Alces alces</i>	Soltys et al., 1967	
	Άγρια πρόβατα	<i>Ovis musimon</i>	VonMayer and Weiss, 1986
		<i>Ovis canadensis</i>	Williams et al., 1979
Άγριες αίγες	<i>Capra ibex</i>	Weber et al., 1992 ; Ferroglio et al., 2000; Deutz A. et al., 2005	
	<i>Oreamnos americanus</i>	Williams et al., 1979	
	<i>Rupicapra rupicapra</i>	Deutz et al., 2005	
Βίσονες	<i>Bison bison</i>	Buergelt et al., 2000; Whittington et al., 2001a	
Καμελίδες	<i>Lama pacos</i>	Ridge et al., 1995	
	<i>Vicugna pacos</i>	Stehman, 1996	

### 1.1 MAP και άγρια πανίδα

Το MAP απομονώθηκε από πολλά μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, όπως λαγόμορφα [*Lepus europaeus* (Mathews and Sargent, 1977; Beard et al., 2001), *Oryctolagus cuniculus* (Angus, 1990; Greig et al., 1997, 1999; Beard et al., 2001), *Sylvilagus floridanus* (Raizman et al., 2005; Corn et al., 2005), *Lepus timidus* (Deutz et al., 2005)], μύες [*Apodemus sylvaticus* (Beard et al., 2001) και *Apodemus flavicollis* (Deutz et al., 2005)], επίμυες [*Rattus norvegicus* (Beard et al., 2001, Corn et al., 2005) και *Sigmodon hispidus* (Corn et al., 2005)], αλεπούδες (*Vulpes vulpes*), ερμίνες (*Mustela erminea*), ασβούς (*Meles meles*), νυφίτσες (*Mustela nivalis*) (Beard et al., 2001), αγριόχοιρους [*Sus scrofa* (Alvarez et al., 2005)], αγριόγατες (Palmer et al., 2005), αρκούδες [*Ursus arctos* (Kopceva et al., 2006)], ρακούν (*Procyon lotor*), αρμαδίλλους (*Dasyurus novemcinctus*), μαρσιπομύες (*Didelphis virginiana*), μυγαλή (*Blarina brevicauda*), κουνάβι (*Memphitis memphitis*) (Corn et al., 2005), ρινόκερο [*Diceros bicornis* (Cousins et al., 2000)] και κογιότ [*Canis latrans* (Anderson et al., 2007)]. Επίσης, το MAP έχει απομονωθεί και από διάφορα είδη πτηνών όπως *Tetrao urogallus* (Deutz et al., 2005), *Buteo buteo*, *Corvus monedula*, *Corvus frugilegus*, *Corvus corone* (Beard et al., 2001), *Sturnus vulgaris*, *Passer domesticus* και *Gallinago gallinago* (Corn et al., 2005). Τέλος, έχει απομονωθεί και από πρωτεύοντα του γένους *Macaca* από τους McClure et al. (1987).

Η διαπίστωση της φυσικής λοίμωξης από MAP γίνεται με την ανίχνευση των χαρακτηριστικών για την παραφυματίωση, κλινικών συμπτωμάτων και



ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και επιβεβαιώνεται με την απομόνωση του μικροοργανισμού. Τα κλινικά συμπτώματα που έχουν καταγραφεί από όλα σχεδόν τα είδη αγρίων μηρυκαστικών είναι παρόμοια με αυτά των βοοειδών (Williams et al., 1979; Buergelt et al., 2000). Οι Whitlock and Buergelt (1996), πρότειναν την ταξινόμησή τους σε τέσσερα στάδια. Στο πρώτο στάδιο, της αφανούς λοίμωξης, τα προσβεβλημένα ζώα δεν παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα. Στο δεύτερο στάδιο, της υποκλινικής νόσου, δεν εκδηλώνονται κλινικά συμπτώματα, αλλά μπορεί να υπάρχουν στα ζώα ανιχνεύσιμα αντισώματα ή κυτταρικού τύπου ανοσολογική απάντηση. Στο τρίτο στάδιο, της κλινικής νόσου, τα αρχικά συμπτώματα είναι ασαφή, περιλαμβάνοντας σημαντική πτώση της γαλακτοπαραγωγής, ξηρότητα του τριχώματος και σταδιακή απώλεια βάρους παρά τη διατήρηση της όρεξης. Ακολουθεί η εμφάνιση, αρχικά διαλείπουσας, διάρροιας. Αν και ασύνηθες, ζώα αυτού του σταδίου μπορεί να παλινδρομήσουν στο δεύτερο στάδιο και να παραμείνουν σε αυτό για αδιευκρίνιστο χρονικό διάστημα. Ο κανόνας, όμως, είναι η μετάβαση στο επόμενο στάδιο, της κλινικής νόσου τελικού σταδίου, που χαρακτηρίζεται από επιδείνωση των κλινικών συμπτωμάτων με τελική κατάληξη το θάνατο.

Σε καμία από τις μελέτες που απομονώθηκε MAP από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας δεν καταγράφηκαν κλινικά συμπτώματα παραφυματίωσης επειδή τα δείγματα που εξετάστηκαν προέρχονταν από άγρια ζώα που είτε συλλέγονταν νεκρά είτε παγιδεύονταν και θανατώνονταν χωρίς καταγραφή κλινικών εκδηλώσεων (Greig et al., 1997, 1999; Beard et al., 2001; Deutz et al., 2005; Corn et al., 2005). Τα δεδομένα, λοιπόν, σχετικά με τις κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από MAP σε μονογαστρικά ζώα προέρχονται από πειραματικές μολύνσεις ορνιθίων (Larsen and Moon, 1972; Valente et al., 1997), ινδικών χοιριδίων (Francis, 1943; Hirsch, 1956; Harding, 1959), μύων (Francis, 1943; Lominski et al., 1956; Chandler, 1961, 1962) και κουνελιών (Francis, 1943; Hirsch, 1956; Rankin, 1958; Harding, 1959; Mokresh et al., 1989; Mokresh and Butler, 1990). Από τα πειραματόζωα αυτά, οι μύες χρησιμοποιήθηκαν πιο εκτεταμένα για τη μελέτη της νόσου, καθώς στα υπόλοιπα δεν αναπαρήχθησαν σταθερά τα κλινικά συμπτώματα και τα παθολογοανατομικά ευρήματα της λοίμωξης. Για παράδειγμα, η μόλυνση κουνελιών από το στόμα με  $10^8$  CFU του MAP είχε ως αποτέλεσμα την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων και παθολογοανατομικών αλλοιώσεων μόνο σε 62-75% των ζώων (Mokresh et al., 1989; Mokresh and Butler, 1990). Τα πειραματικά μοντέλα, με τη χρήση μύων, κατέληξαν στη χρήση γενετικών γραμμών που είχαν υποστεί ανοσοκαταστολή, είτε με γενετικό ανασυνδυασμό είτε με χορήγηση ανοσοκατασταλτικών ουσιών (κυκλοφωσφαμίδη ή πρεδνιζολόνη), καθώς οι μη ανοσοκατασταλμένοι μύες ήταν ανθεκτικοί στη λοίμωξη. Ακόμα όμως και στις περιπτώσεις μόλυνσης ανοσοκατασταλμένων μύων, τα αποτελέσματα ποίκιλαν ανάλογα με την οδό χορήγησης της μολύνουσας δόσης. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση  $10^5$  CFU είχε ως αποτέλεσμα την εκδήλωση τοπικών αλλοιώσεων και την ανίχνευση οξεάντοχων βακίλων 4 εβδομάδες μετά την μόλυνση, ενώ, σε διάστημα 12 εβδομάδων μετά τη χορήγηση, τα ζώα εμφάνισαν σημαντική μείωση του σωματικού βάρους και του ενδοπεριτοναϊκού λίπους, σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίστοιχα, η από του στόματος χορήγηση της ίδιας δόσης είχε ως αποτέλεσμα την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων και μακροσκοπικών αλλοιώσεων μόνο σε ένα από τα 18 ζώα, 26 εβδομάδες μετά τη μόλυνση (συνοψίζονται από τους Harris and Barletta, 2001).

Στα περισσότερα άγρια μηρυκαστικά τόσο οι μακροσκοπικές όσο και οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις της νόσου είναι αντίστοιχες με εκείνες των βοοειδών (Williams et al., 1979; Buergelt et al., 2000). Έτσι, στα αρχικά στάδια της νόσου δεν υπάρχουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή είναι μη ανιχνεύσιμες. Οι πρώιμες

ιστολογικές αλλοιώσεις, που έχουν παρατηρηθεί σε πειραματικά μολυσμένους μόσχους, απαρτίζονται από εστιακά συναθροίσματα από επιθηλιοειδή μακροφάγα ή γιγαντοκύτταρα Langerhans στις πλάκες του Peyer και στις άκρες των εντερικών λαχνών (Payne and Rankin, 1961a, b; Gilmour et al., 1965; Buergelt et al., 1978). Παρόμοιες ιστολογικές αλλαγές του εντέρου, καθώς και προσβολή των μεσεντέριων λεμφαδένων έχουν παρατηρηθεί σε φυσικά μολυσμένα βοοειδή σε υποκλινικά στάδια της νόσου. Στις αλλοιώσεις είναι πιθανό να ανεβρεθούν ή όχι λίγοι οξεάντοχοι μικροοργανισμοί. Στα στάδια κλινικής νόσου οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις περιορίζονται στο έντερο και μπορεί να εκτείνονται από το δωδεκαδάκτυλο ως το ορθό. Συνηθέστερα όμως εντοπίζονται στο τελικό τμήμα του ειλεού. Οι αλλοιώσεις μπορεί να είναι δυσδιάκριτες, αλλά συνήθως το προσβεβλημένο έντερο εμφανίζεται παχυμένο και με έντονες εγκάρσιες πτυχώσεις. Σε ζώα που προσβλήθηκαν με στελέχη MAP που παράγουν χρωστική, ο βλεννογόνος του εντέρου μπορεί να έχει πορτοκαλοκίτρινη απόχρωση (Taylor, 1951, 1953; Watt, 1954; Stuart, 1965a, b). Οι επιχώριοι λεμφαδένες προσβάλλονται και τα λεμφαγγεία εμφανίζονται διογκωμένα και ελικοειδή. Οι συνηθέστερες δευτερογενείς μεταβολές περιλαμβάνουν συλλογή υγρού σε σωματικές κοιλότητες, ατροφία λίπους, γενική απώλεια βάρους και υποδόριο οίδημα. Ιστολογικά η νόσος γενικά περιγράφεται ως μία διάχυτη κοκκιωματώδης ή ιστοκυτταρική εντερίτιδα, χωρίς νέκρωση, υπεραιμία ή ίνωση (Hallman and Witter, 1933; Taylor, 1953; Buergelt et al., 1978). Οι πρώιμες κοκκιωματώδεις διηθήσεις στο έντερο συχνά είναι εστιακές (φυματιώδης μορφή) και στα τελευταία στάδια ενώνονται για να σχηματίσουν διάχυτες (λεπρωματώδης μορφή) διηθήσεις (Chiodini et al., 1984). Οι άκρες των λαχνών συχνά συγχωνεύονται, μειώνοντας την επιφάνεια και την απορροφητική ικανότητα του εντέρου (Whitlock and Buergelt, 1996). Η βάση του επιθηλίου και ο υποβλεννογόνιος του εντέρου εμφανίζουν ποικίλη διήθηση με μακροφάγα. Συχνά παρατηρούνται γιγαντοκύτταρα, κυρίως τύπου Langerhans. Τα επιθηλιοειδή μακροφάγα και τα γιγαντοκύτταρα μπορεί να περιέχουν μεγάλους αριθμούς οξεάντοχων βακίλων (Hallman and Witter, 1933; Stamp and Watt, 1954; Harding, 1957; Rajya and Singh, 1961; Buergelt et al., 1978; Nguyen and Buergelt, 1983). Οι προσβεβλημένοι λεμφαδένες εμφανίζουν κοκκιωματώδη λεμφαδενοίτιδα. Επίσης, είναι πιθανό να παρατηρηθεί κοκκιωματώδης λεμφαγγειίτιδα, αν και εμφανίζεται λιγότερο συχνά στα βοοειδή σε σχέση με τα πρόβατα και τις αίγες. Στα τελευταία στάδια της νόσου μπορεί να υπάρξουν κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις και σε άλλα όργανα με συνηθέστερη εντόπιση στο ήπαρ (Mathews, 1930; Hallman and Witter, 1933; Buergelt et al., 1978; Whitlock and Buergelt, 1996). Στα διάφορα είδη της οικογένειας των καμελίδων έχει επιπλέον παρατηρηθεί νέκρωση και ασβεστοποίηση των λεμφαδένων (Stehman, 1996).

Στα διάφορα είδη ελαφιών οι μακροσκοπικές και ιστολογικές αλλοιώσεις της νόσου προσομοιάζουν με εκείνες των προβάτων και των αιγών (Stehman, 1996). Μακροσκοπικά, στις αίγες και τα πρόβατα, οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις εντοπίζονται στο έντερο και τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια. Είναι όμως ιδιαίτερα ανεπτυγμένες στο τέλος της νήστιδας και τον ειλεό καθώς και στο τυφλό και στα πρόσθια τμήματα του κόλου. Παρατηρείται πάχυνση του βλεννογόνου του εντέρου που μπορεί να αφορά και τον υποβλεννογόνιο. Η πάχυνση μπορεί να κυμαίνεται από απλή μικροκοκκώδη όψη («όψη βελούδου») του βλεννογόνου μέχρι και εγκάρσια πτύχωση. Τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια είναι σταθερά διογκωμένα ωχρά και οίδηματικά. Μερικές φορές μπορεί να παρατηρηθούν εστίες νέκρωσης-τυροειδοποίησης και ασβεστοποίησης (Λεοντίδης, 1978). Επίσης, μπορεί να παρατηρείται πάχυνση των λεμφαγγείων με ή χωρίς οξίδια κατά τη διαδρομή τους

(«όψη κομβολογίου») ή πάχυνσή τους με ελικοειδή πορεία ώστε να καθίστανται ορατά στην εξωτερική επιφάνεια του εντέρου και το μεσεντέριο. Ιστολογικά, η ένταση και το εύρος των παρατηρούμενων αλλοιώσεων είναι ανάλογες του σταδίου εξέλιξης της νόσου. Στο τελικό στάδιο η χαρακτηριστική αλλοίωση που σχηματίζεται μπορεί να έχει τη μορφή είτε μιας χρόνιας κοκκιοματώδους εντερίτιδας στην οποία τα επιθηλιοειδή μακροφάγα κύτταρα που διηθούν το βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο βρίθουν οξεάντοχων μικροοργανισμών (πολυβακιλλική-λεπρωματώδης αλλοίωση) είτε μιας λεμφοκυτταρικής διήθησης στην οποία σπανίζουν οι οξεάντοχοι μικροοργανισμοί και η οποία παρατηρείται στο 30% περίπου των προσβεβλημένων προβάτων (ψευδοβακιλλική ή φυματιώδης αλλοίωση).

Οι Clarke and Little (1996) και Clarke (1997) στα πρόβατα και οι Corpa et al. (2000) και Tafti and Rashidi (2000) στις αίγες πρότειναν ένα σύστημα ταξινόμησης των ιστολογικών αλλοιώσεων σε 3 τύπους (που έχουν και υποτύπους). Πιο συγκεκριμένα:

Στα πρόβατα η ταξινόμηση συνοπτικά περιλαμβάνει:

1) Τις αλλοιώσεις τύπου 1 όπου παρατηρούνται μικρά κοκκιώματα που σχηματίζονται από μακροφάγα και εντοπίζονται αποκλειστικά στις πλάκες του Peyer της ειλεοκυψαλικής μοίρας. Τα μυκοβακτηρίδια είναι διάσπαρτα και ελάχιστα ή απουσιάζουν εντελώς. Οι αλλοιώσεις αυτές παρατηρούνται κυρίως σε πρόβατα που μολύνθηκαν ως αμνοί και λειτούργησε η προστατευτική κυτταρική ανοσία.

2) Τις αλλοιώσεις τύπου 2 όπου εντοπίζονται κοκκιώματα και στο βλεννογόνο που σχετίζεται με τις πλάκες του Peyer. Μυκοβακτηρίδια ανευρίσκονται στην πλειοψηφία των ιστολογικών τομών.

3) Τις αλλοιώσεις τύπου 3 όπου εντοπίζονται κοκκιώματα και σε περιοχές του βλεννογόνου που δε σχετίζονται με τις πλάκες του Peyer. Οι αλλοιώσεις του τύπου αυτού διαιρούνται σε τρεις υπότυπους: α) τον υπότυπο 3<sup>α</sup> όπου παρατηρούνται πολυεστιακά κοκκιώματα σε ποικίλες περιοχές του βλεννογόνου που δε συνδέονται σαφώς με το λεμφικό ιστό και δεν επηρεάζουν τη μορφολογία της προσβεβλημένης περιοχής. Τα μυκοβακτηρίδια ανευρίσκονται στην πλειοψηφία των ιστολογικών τομών, β) τον υπότυπο 3<sup>β</sup> όπου παρατηρείται μεγάλος αριθμός μακροφάγων διεσπαρμένους στο βλεννογόνο. Τα μυκοβακτηρίδια ανευρίσκονται πάντοτε στις ιστολογικές τομές, και γ) τον υπότυπο 3<sup>γ</sup> όπου κυριαρχούν τα λεμφοκύτταρα με λίγα μακροφάγα διεσπαρμένα ανάμεσά τους. Τα μυκοβακτηρίδια είναι ελάχιστα ή απουσιάζουν εντελώς. Ο υποτύπος 3<sup>β</sup> προσομοιάζει στην λεπρωματώδη μορφή αλλοιώσεων ενώ ο τύπος 3<sup>γ</sup> στη φυματιώδη μορφή. Οι αλλοιώσεις τύπου 2 και 3 συνοδεύουν την μετάβαση στην ενηλικίωση και την αποτυχία των προστατευτικών αμυντικών μηχανισμών.

Στις αίγες η ταξινόμηση έγινε με βάση την ένταση των αλλοιώσεων στην τελική μοίρα του ειλεού και τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια και συνοπτικά περιλαμβάνει:

1) Τις αλλοιώσεις ήπιου βαθμού που χαρακτηρίζονται από εστιακές συγκεντρώσεις επιθηλιοειδών μακροφάγων, τα οποία βρίθουν μυκοβακτηριδίων, στο άνω τμήμα του βλεννογόνου και των λαχνών. Οι ίδιες συγκεντρώσεις ανευρίσκονται στην παραφλοιώδη ζώνη των μεσεντέρων λεμφογαγγλίων.

2) Τις αλλοιώσεις μέτριου βαθμού που χαρακτηρίζονται από διήθηση αρχικά της επιπολής και των εν τω βάθος στιβάδων του βλεννογόνου και τελικά όλου του βλεννογόνου από επιθηλιοειδή μακροφάγα και μερικά λεμφοκύτταρα, εωσινόφιλα και πλασμοκύτταρα. Οι λάχνες είναι ελαφρώς ατροφικές. Πολλά επιθηλιοειδή μακροφάγα βρίθουν μυκοβακτηριδίων. Επίσης υπάρχει σημαντική διήθηση των άνω στιβάδων του υποβλεννογόνου με λεμφοκύτταρα περιφερικά των λεμφαγγείων.

Επιπλέον, μικροκοκκιώματα επιθηλιοειδών μακροφάγων ανευρίσκονται στην παραφλοιώδη ζώνη και στους επιχείλιους λεμφόκολπους των μεσεντέριων λεμφογαγγλίων. Τα τελευταία περιέχουν μικρό αριθμό μικροοργανισμών.

3) Τις αλλοιώσεις έντονου βαθμού που χαρακτηρίζονται από διήθηση του βλεννογόνου, του υποβλεννογόνιου και ακόμα και του μυϊκού και του ορογόνου χιτώνα από πολλά επιθηλιοειδή μακροφάγα, λίγα γιγαντοκύτταρα και πολλά λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα, εωσινόφιλα και μερικές φορές λίγα ουδετερόφιλα. Ολόκληρος ο βλεννογόνος επικυριαρχείται από πληθώρα επιθηλιοειδών μακροφάγων που συμπίεζον τις κρύπτες του Lieberkuhn. Οι λάχνες είναι ατροφικές. Τα επιθηλιοειδή μακροφάγα βρίθουν μικροοργανισμών. Επιπλέον, παρατηρείται λεμφογαγγειίτιδα με συγκέντρωση λεμφοκυττάρων, πλασμοκυττάρων και λίγων μακροφάγων περιμετρικά των λεμφογαγγείων και ιδίως του ορογόνου. Στους μεσεντέριους λεμφαδένες, επιθηλιοειδή μακροφάγα και γιγαντοκύτταρα τύπου Langhans έχουν υποκαταστήσει την υποκαψική περιοχή και την περιοχή του φλοιού. Επίσης παρατηρούνται εστιακές έως και διάχυτες περιοχές νέκρωσης με ή χωρίς απασβέστωση. Λίγα μόνο επιθηλιοειδή κύτταρα και γιγαντοκύτταρα περιέχουν μικρό αριθμό μυκοβακτηριδίων.

Σε φυσικά μολυσμένες αίγες σπανίζουν οι εστιακές αλλοιώσεις ενώ η συχνότητα εμφάνισης διάχυτων αλλοιώσεων είναι υψηλή (Corra et al., 2000) σε σχέση με αντίστοιχες μελέτες σε φυσικά μολυσμένα πρόβατα (Perez et al., 1996).

Πολύ ηπιότερες αλλοιώσεις έχουν περιγραφεί στα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας από τα οποία έχει απομονωθεί ο μικροοργανισμός. Μακροσκοπικές αλλοιώσεις έχουν παρατηρηθεί μόνο σε αγριοκούνελα (*Oryctolagus cuniculus*) στα οποία διαπιστώθηκε, σε ποσοστό 33% των ζώων από τα οποία απομονώθηκε ο μικροοργανισμός, πάχυνση του βλεννογόνου του εντέρου και διόγκωση των μεσεντέριων λεμφογαγγλίων (Greig et al., 1997). Στα αγριοκούνελα υπήρχαν, επίσης, μικροσκοπικές αλλοιώσεις του εντέρου και των μεσεντέριων λεμφογαγγλίων ήπιου, μέτριου και έντονου βαθμού, όπως περιγράφονται για τις αίγες, καθώς επίσης και πολλαπλές εστίες χρόνιας κοκκιωματώδους φλεγμονής στο ήπαρ, αποτελούμενες από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα. Οι δύο τελευταίοι τύποι κυττάρων περιείχαν μεγάλο αριθμό οξεάντοχων μικροοργανισμών. Ήπιες μικροσκοπικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν σε αλεπούδες (*Vulpes vulpes*), ερμίνες (*Mustela erminea*) και νυφίτσες (*Mustela nivalis*) (Beard et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε η παρουσία, στο λεμφοειδή ιστό του βλεννογόνου του εντέρου και στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια, μικρών κοκκιωμάτων, τα οποία αποτελούνταν από κύτταρα τύπου μακροφάγων (macrophage-like cells), που περιείχαν μικρό αριθμό οξεάντοχων βακίλων. Επίσης, οξεάντοχοι μικροοργανισμοί μέσα σε μακροφάγα του εντέρου και των μεσεντερίων λεμφογαγγλίων, χωρίς την ύπαρξη άλλων ιστολογικών αλλοιώσεων, παρατηρήθηκαν σε ένα κοράκι (*Corvus corone*) και σε έναν μυ του δάσους (*Apodemus sylvaticus*) (Beard et al., 2001). Στα υπόλοιπα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας από τα οποία απομονώθηκε MAP, δεν διαπιστώθηκαν μακροσκοπικές ή ιστολογικές αλλοιώσεις (Beard et al., 2001; Deutz et al. 2005; Corn et al., 2005; Palmer et al., 2005).

## 1.2 Απομόνωση του MAP

Η καλλιέργεια θεωρείται η μέθοδος επιλογής για την απομόνωση του μικροοργανισμού από όλα τα είδη ζώων. Επιπλέον, αποτελεί το απαραίτητο αρχικό βήμα για τη μετέπειτα εφαρμογή των περισσότερων μοριακών τεχνικών, με σκοπό

την ταυτοποίηση και τυποποίηση των στελεχών του μικροοργανισμού (Chiodini et al., 1984; Whittington et al., 1999; Motiwala et al., 2005). Μετά την πρώτη in vitro απομόνωση του MAP (Twort and Ingram, 1912) τα καλλιεργητικά πρωτόκολλα και υποστρώματα βελτιώθηκαν και έτσι σήμερα υπάρχει ποικιλία μεθόδων για την καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Ο μικροοργανισμός δεν παράγει φορείς του σιδήρου (μυκοβακτίνες) και επομένως χρειάζεται για την ανάπτυξή του in vitro την παροχή μυκοβακτινών (Homuth et al., 1998). Οι καλλιεργητικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την απομόνωση του MAP διακρίνονται στις συμβατικές μεθόδους, που χρησιμοποιούν στερεά υποστρώματα και στις ραδιομετρικές μεθόδους, που χρησιμοποιούν υγρά υποστρώματα. Στις συμβατικές μεθόδους γίνεται ενοφθαλμισμός σε στερεό υπόστρωμα ανάπτυξης και η περίοδος επώασης, μέχρι την εμφάνιση ορατών αποικιών, κυμαίνεται από 3 (Chiodini et al., 1984) έως 6-8 μήνες (Collins et al., 1993). Χρησιμοποιούνται διάφορα στερεά υποστρώματα: 1) υποστρώματα με βάση το αυγό, όπως είναι το Herrold's egg-yolk medium (HEYM) (Kim et al., 1989) και το Löwenstein-Jensen medium (LJ) (Jorgensen, 1982), 2) υποστρώματα ορού όπως είναι το Dubos medium (Saxegaard, 1985) και 3) συνθετικά υποστρώματα όπως είναι το Middlebrook και το Watson-Reid medium (Damato and Collins, 1990). Στις ραδιομετρικές μεθόδους καλλιέργειας τα δείγματα αναμειγνύονται με πολυμυξίνη Β, αμφοτερικίνη Β, ναλιδιξικό οξύ, τριμεθοπρίμη και αζλοκιλλίνη (polymyxin B-amphotericin B-nalidixic acid-trimethoprim-azlocillin, PANTA) και με ένα ειδικό υγρό υπόστρωμα, που περιέχει παλμιτικό οξύ επισημασμένο με  $^{14}\text{C}$ . Το επισημασμένο με  $^{14}\text{C}$  διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται κατά το μεταβολισμό του  $^{14}\text{C}$ -παλμιτικού οξέος από τα μυκοβακτηρίδια, ανιχνεύεται με ειδικό εξοπλισμό (Collins et al., 1990b). Οι ραδιομετρικές μέθοδοι καλλιέργειας επιτρέπουν τη γρηγορότερη σε σχέση με τις συμβατικές (8 εβδομάδες) ανίχνευση του MAP (Whittington et al., 1999), αλλά χρησιμοποιούνται από περιορισμένο αριθμό εργαστηρίων, γιατί προϋποθέτουν ακριβό εξοπλισμό και χρήση ραδιοϊσοτόπων. Τόσο οι συμβατικές όσο και οι ραδιομετρικές μέθοδοι καλλιέργειας απαιτούν περαιτέρω επιβεβαίωση της ανάπτυξης MAP, με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) για την ανίχνευση ειδικών για το μικροοργανισμό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Παρά το γεγονός ότι η καλλιέργεια θεωρείται η «χρυσή» μέθοδος για την διάγνωση της νόσου, η ευαισθησία της μεθόδου είναι γενικά χαμηλή. Οι Merkal et al. (1970) ανέφεραν ότι η καλλιέργεια κοπράνων βοοειδών έχει διαγνωστική ευαισθησία 50% και ότι ανιχνεύει ζώα που απεκκρίνουν περισσότερες από 100 cfu/gr κοπράνων. Άλλοι ερευνητές εκτίμησαν την ευαισθησία διαφόρων μεθόδων καλλιέργειας κοπράνων βοοειδών και ανέφεραν ευαισθησίες που κυμαίνονταν από 25-55% (Sockett et al., 1992; Stabel, 1997; Eamens et al., 2000; Whitlock et al., 2000). Τελευταία, οι Kostoulas et al. (2006) υπολόγισαν χαμηλές ευαισθησίες της μεθόδου για την ανίχνευση υποκλινικά προσβεβλημένων προβάτων και αιγών ελληνικών εκτροφών (14,7 και 16,1% σε πρόβατα και αίγες, αντίστοιχα).

Τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των αποικιών του MAP στα στερεά καλλιεργητικά υποστρώματα διαφέρουν ανάλογα με το είδος του ζώου. Σε καλλιέργειες δειγμάτων από βοοειδή, αίγες και διάφορα είδη της άγριας πανίδας οι αποικίες του μικροοργανισμού έχουν βραδεία ανάπτυξη (3 μήνες), τραχεία εμφάνιση και είναι ανομοιομορφες και άχρωμες. Σε καλλιέργειες δειγμάτων από πρόβατα οι αποικίες έχουν πολύ βραδεία ανάπτυξη (6 μήνες ή και περισσότερο), είναι μικρές, λείες, ομοιομορφες και συνήθως έχουν πορτοκαλί-κίτρινο χρώμα (Taylor, 1951; Taylor, 1953; Stamp and Watt, 1954; Stevenson et al., 2002). Η μεγάλη δυσκολία απομόνωσης του μικροοργανισμού από τα πρόβατα σε σχέση με τα άλλα είδη ζώων

αντικατοπτρίζεται σε πολλές αναφορές ερευνητών από την Ευρώπη, την Αφρική, τις Η.Π.Α. και την Αυστραλία με πολύ χαμηλά ποσοστά απομόνωσης MAP από μολυσμένα πρόβατα (2-30%) και με ποικίλους χρόνους επώασης των καλλιέργειών, έως την εμφάνιση ορατών αποικιών, από 4-9 μήνες. Σε λίγες μόνο αναφορές από την Ασία υπάρχουν ικανοποιητικά ποσοστά απομόνωσης MAP από μολυσμένα πρόβατα (57-86%) (Whittington et al., 1999). Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν σε διαφορετικές υποθέσεις σχετικά με την επάρκεια του καλλιεργητικού υποστρώματος για την απομόνωση του μικροοργανισμού από πρόβατα. Οι Aduriz et al. (1995) πρότειναν το υπόστρωμα LJ με την προσθήκη πυρουμενικού νατρίου, ως το καταλληλότερο για την καλλιέργεια δειγμάτων από πρόβατα, ενώ οι Whittington et al. (1999) το Middlebrook 7H10 και 7H11, καθώς και το ραδιομετρικό υπόστρωμα BACTEC 12B.

Η ύπαρξη δυο φαινοτυπικά διαφορετικών ποικιλιών του MAP, με διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης στην καλλιέργεια και φαινομενική ειδικότητα ξενιστού, οδήγησαν στην υπόθεση ότι υπάρχουν διαφορετικές γενετικές ποικιλίες (στελέχη) του MAP, οι οποίες, πιθανόν, μολύνουν διαφορετικά ζωικά είδη (Collins et al., 1990a). Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής κρίθηκε αναγκαία η πλήρης χαρτογράφηση του γονιδιώματος του μικροοργανισμού καθώς και η εφαρμογή ποικίλων μοριακών μεθόδων, με σκοπό την τυποποίηση διαφορετικών στελεχών του μικροοργανισμού, οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια.

### 1.3 Μοριακός χαρακτηρισμός MAP

Ο μοριακός χαρακτηρισμός και η γενετική σύγκριση των στελεχών ενός μικροοργανισμού παρέχει σημαντικές πληροφορίες στις επιδημιολογικές μελέτες, που στοχεύουν στην κατανόηση της προέλευσης μιας μόλυνσης, στην αναγνώριση των παραγόντων επικινδυνότητας για τη μετάδοση της νόσου, στην αποσαφήνιση της παθογένειας και στην καλύτερη εκτίμηση των μέτρων ελέγχου της νόσου (Motiwala et al., 2006b). Για το MAP, η υπόθεση της ύπαρξης διαφορετικών στελεχών του μικροοργανισμού με ειδικότητα ξενιστού, αποτέλεσε την αρχή για την ανάπτυξη μιας μεγάλης ποικιλίας μοριακών τεχνικών, με σκοπό την τυποποίηση των στελεχών που είχαν απομονωθεί τόσο από κατοικίδια, όσο και από άγρια ζώα, αλλά και από τον άνθρωπο. Παράλληλα, ξεκίνησε και η προσπάθεια χαρτογράφησης ολόκληρου του γονιδιώματος του MAP, η οποία ολοκληρώθηκε μόλις πρόσφατα (Li et al., 2005). Για την χαρτογράφηση επιλέχθηκε το στέλεχος K10, που είχε απομονωθεί από βοοειδή με κλινική νόσο στο Wisconsin στα μέσα της δεκαετίας του '70, γιατί είναι λοιμογόνο και χαμηλής διόδου. Εκτός από την ανάλυση του γονιδιώματος του K10, πραγματοποιήθηκε και σύγκρισή του με το γονιδίωμα του στελέχους H37Rv του *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (GenBank, αριθμός καταχώρησης NC\_000962) και του στελέχους 104 του *Mycobacterium avium* (Cole and Barrell, 1998; Cole et al., 1998) (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Σύγκριση των κυριότερων χαρακτηριστικών του γονιδιώματος του στελέχους MAP K10 με άλλα είδη μυκοβακτηριδίων

Ιδιότητες	MAP	<i>M.avium</i>	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.bovis</i>	<i>M.leprae</i>	<i>M.smegmatis</i>
Μέγεθος γονιδιώματος (bp)	4.829.781	5.475.738	4.411.532	4.345.492	3.268.203	6.988.209
G+C (%)	69,30	68,99	65,61	65,63	57,79	67,40
Κωδικοποίηση πρωτεϊνών %	91,30	NA	90,80	90,59	49,50	92,42
Ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια	4.350	NA	3.959	3.953	1.604	6.897
Πυκνότητα γονιδιώματος (bp / γονίδιο)	1.112	NA	1.114	1.099	2.037	1.013
Μέσο μέγεθος γονιδίων (bp)	1.015	NA	1.012	995	1.011	936
tRNAs	45	45	45	45	45	47
tRNA operon	1	1	1	1	1	2

Η ανάλυση έδειξε ότι το γονιδίωμα του στελέχους K10 απαρτίζεται από μία μονόκλωνη και κυκλική DNA αλληλουχία, αποτελούμενη από 4.829.781 ζεύγη βάσεων με περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) 69.3% (Εικόνα 1). Οι βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη κατανέμονται σχετικά ομοιόμορφα κατά μήκος του γονιδιώματος. Το γονιδίωμα του K10 περιέχει 4.350 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 144 έως 19.155 ζεύγη βάσεων (base pairs-bp), και τα οποία αποτελούν το 91.5% του συνολικού γονιδιώματος. Η ανάλυση έδειξε ότι το 60% των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του MAP είναι ομόλογο με άλλες μικροβιακές πρωτεΐνες με γνωστές λειτουργίες, ενώ το 25% εμφανίζει ομολογία με πρωτεΐνες που δεν έχουν γνωστή λειτουργία. Από τις παραπάνω, οι 39 είναι μοναδικές για το MAP, ενώ περίπου το 75% είναι ομόλογες με αυτές που αναγνωρίστηκαν στο Mtb. Το γονιδίωμα του MAP κωδικοποιεί ένζυμα για πολλά μεταβολικά μονοπάτια στα οποία περιλαμβάνεται αυτό της γλυκόλυσης, της πεντόζης φωσφατάσης, του κύκλου του καρβοξυλικού οξέος και του κύκλου της γλυκοξυλάτης. Ορισμένα γονίδια και μεταβολικά μονοπάτια, όμως, που έχουν περιγραφεί στο Mtb, λείπουν από το γονιδίωμα του MAP, όπως, για παράδειγμα, τα απαραίτητα γονίδια για την παραγωγή ουρεάσης. Επομένως, η ικανότητά του να παράγει άζωτο από ουρία πιθανόν διαφέρει από αυτή του Mtb και άλλων βακτηρίων που παράγουν ουρεάση. Η ανάλυση έδειξε μεγαλύτερο αριθμό ρυθμιστικών γονιδίων (n=150) στο γονιδίωμα του MAP, σε σχέση με το Mtb (n=100), γεγονός που συνδέεται με την ικανότητα του MAP να επιβιώνει σε μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών (Cole et al., 1998).

Περίπου το 1.5% (ή 72.2 kb) του γονιδιώματος του MAP αποτελείται από ένθετες επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και πολυγονιδιακές οικογένειες. Οι ένθετες αλληλουχίες, ή κινητά γενετικά στοιχεία, είναι σχετικά μικρά τμήματα του DNA ικανά να μεταφέρονται μεταξύ και εντός του γονιδιώματος των προκαρυωτών, προκαλώντας συχνά ένθετες μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Dombek et al., 2000). Μέχρι πριν την ολοκλήρωση της

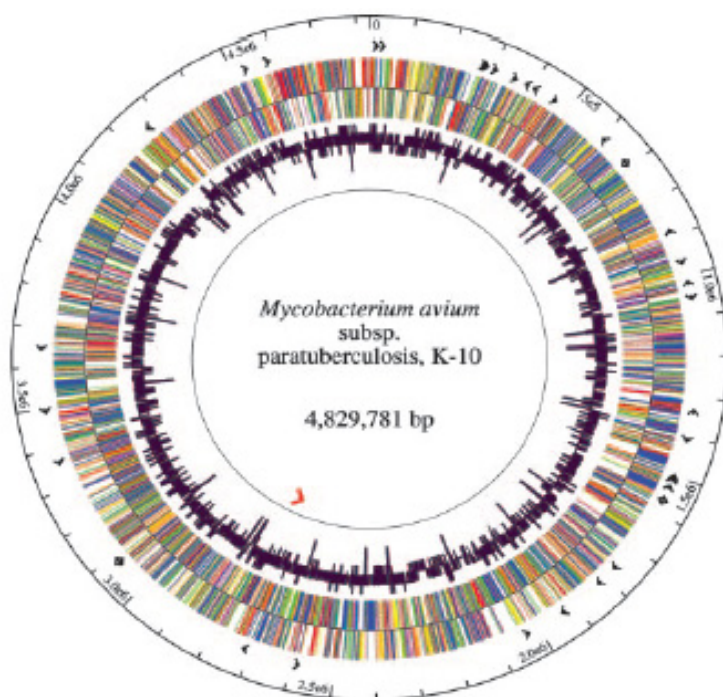
χαρτογράφησης του γονιδιώματος του στελέχους MAP K10, στο γονιδίωμα του MAP είχαν αναγνωρισθεί οι ένθετες αλληλουχίες IS900 και IS1311 (Green et al., 1989; Roiz et al., 1995). Κατά την ανάλυση του γονιδιώματος του K10, αναγνωρίστηκαν 19 διαφορετικές ένθετες αλληλουχίες με 58, συνολικά, αντίγραφα. Η ανάλυση αναγνώρισε 17 αντίγραφα της ένθετης αλληλουχίας IS900 και επτά αντίγραφα της IS1311. Η IS900, η πρώτη ένθετη αλληλουχία του συμπλέγματος του *M. avium*, που ανακαλύφθηκε πριν 18 χρόνια σε στελέχη του MAP, αποδείχθηκε ότι είναι αποκλειστική αυτού του υποείδους (Green et al., 1989; Collins et al., 1989). Η αλληλουχία IS900 αποτελείται από 1451 ζεύγη βάσεων και έχει βρεθεί σε 14-18 αντίγραφα στο γονιδίωμα του MAP. Η αυθεντική IS900 αλληλουχία (αριθμός εγγραφής στη GenBank: X16293) (Green et al., 1989) εμφανίζει τέσσερις νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε σχέση με τις 15 από τις 17 IS900 αλληλουχίες που βρέθηκαν στο γονιδίωμα του K10 (Li et al., 2005). Επιπρόσθετα, ποικίλες ερευνητικές ομάδες έχουν περιγράψει 8 διαφορετικές παραλλαγές IS900 αλληλουχιών που διαφέρουν κατά έναν ή περισσότερους νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς από την αυθεντική IS900 αλληλουχία και από αυτές του K10 (Pickup et al., 2005; Sivakumar et al., 2005; Bhide et al., 2006).

Η ένθετη αλληλουχία IS1311 δεν είναι αποκλειστική του γονιδιώματος του MAP, αφού έχει βρεθεί επίσης στο γονιδίωμα του *Mycobacterium avium* και του *Mycobacterium intracellulare* (Roiz et al., 1995; Collins et al., 1997). Στο γονιδίωμα του MAP η IS1311 υπάρχει σε 7-10 αντίγραφα (Collins et al., 1997; Whittington et al., 1998). Το μέγεθός της είναι 1317 bp και δεν εμφανίζει καμία ομολογία με την IS900 σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων.

Η χρήση των ένθετων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ως ανιχνευτές προάγει τη διάκριση των στελεχών, εξαιτίας της τάσης των αντιμετατιθέμενων αυτών στοιχείων να εισέρχονται τυχαία και να καταλαμβάνουν πολλαπλά σημεία στο γονιδίωμα. Σε ορισμένους μικροοργανισμούς, όπως είναι τα διάφορα είδη μυκοβακτηριδίων, οι ένθετες αλληλουχίες εντοπίζονται σχετικά σταθερά σε καθορισμένες θέσεις του γονιδιώματος, γεγονός που επιτρέπει τη χρήση τους για την τυποποίηση στελεχών για επιδημιολογικούς σκοπούς (Dombek et al., 2000). Οι αλληλουχίες IS900 και IS1311, οι πρώτες που ανακαλύφθηκαν στο γονιδίωμα του MAP, έχουν χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτές σε ποικίλες μοριακές τεχνικές, με σκοπό την τυποποίηση των στελεχών του μικροοργανισμού, οι οποίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.



**Εικόνα 1.** Κυκλική απεικόνιση του στελέχους MAP K10 όπως έχει περιγραφεί από τους Li et al. (2005). Κόκκινο βέλος: rRNA operon. Σκούρο μωβ ιστόγραμμα: περιεκτικότητα σε G+C. Πολύχρωμο ιστόγραμμα: ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια κωδικοποιημένα ανάλογα με την λειτουργική τους κατηγορία (μπλε: μεταβολισμός μικρών μορίων. Κόκκινο: κυτταρικές διεργασίες. Μωβ: άλλες διεργασίες. Κίτρινο: υποθετικές διεργασίες. Πράσινο: άγνωστες διεργασίες. Το εξωτερικό χρωματιστό ιστόγραμμα υποδεικνύει την ίδια κατεύθυνση μεταγραφής με την αρχή της αντιγραφής. Το εσωτερικό χρωματιστό ιστόγραμμα υποδεικνύει την αντίθετη κατεύθυνση μεταγραφής από την αρχή της αντιγραφής. Μαύρα βέλη: 45 tRNAs



### 1.3.1 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης στελεχών MAP

#### 1.3.1.1 IS900-Πολυμορφισμός Περιορισμού Μήκους Θραυσμάτων (IS900-Restriction Fragment Length Polymorphism) (IS900-RFLP)

Η αποκάλυψη του αριθμού των αντιτύπων των ένθετων αλληλουχιών στο γονιδίωμα συνήθως πραγματοποιείται με πολυμορφισμό περιορισμού μήκους θραυσμάτων που ακολουθείται από υβριδισμό Southern των περιορισμένων θραυσμάτων. Η ομοιότητα (ή η διαφορά) των προτύπων των ζωνών που προκύπτουν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση στελεχών. Η μετάφραση των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι δύσκολη εξαιτίας του μεγάλου αριθμού θραυσμάτων, που συχνά δημιουργούν πολύπλοκα πρότυπα ζωνών. Για το λόγο αυτό, συχνά χρησιμοποιούνται ανιχνευτές που στοχεύουν μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος του υπό διερεύνηση μικροοργανισμού. (Kanduma et al., 2003; Dvorska et al., 2004).

Η τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί πιο εκτεταμένα για τη μοριακή τυποποίηση των στελεχών του MAP είναι ο IS900-RFLP. Ο IS900-RFLP έχει

χρησιμοποιηθεί συχνά και σαν τεχνική αναφοράς για την εκτίμηση της διακριτικής ικανότητας νέων τεχνικών τυποποίησης του MAP (Bull et al., 2000; Overduin et al., 2004). Σε όλες τις μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο IS900-RFLP, τα στελέχη του MAP κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο κύριες ομάδες. Στη μία ομάδα κατατάχθηκαν στελέχη που είχαν απομονωθεί κυρίως από βοοειδή, αίγες και διάφορα είδη της άγριας πανίδας και χαρακτηρίστηκαν ως βοείου (cattle-C) ή τύπου II στελέχη, ενώ η δεύτερη περιέλαβε στελέχη κυρίως από πρόβατα, τα οποία ονομάστηκαν πρόβειου (sheep-S) ή τύπου I στελέχη (Collins et al., 1990a). Ο μοριακός αυτός διαχωρισμός των στελεχών ήταν σύμφωνος και με προηγούμενες παρατηρήσεις που αφορούσαν τα διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης του μικροοργανισμού στην καλλιέργεια, ανάλογα με το αν τα δείγματα προέρχονταν από πρόβατα ή άλλα είδη ζώων. Με εξαίρεση τον παραπάνω διαχωρισμό, οι περισσότερες μελέτες δεν αναγνώρισαν κάποιον ειδικό του ζωικού είδους RFLP-τύπο του MAP στα κατοικίδια μηρυκαστικά, στην άγρια πανίδα ή στον άνθρωπο. Η ανάλυση στελεχών MAP που απομονώθηκαν από αγριοκούνελα και βοοειδή 22 εκτροφών, που έγινε πρόσφατα με IS900-RFLP και άλλες μοριακές τεχνικές, που θα αναφερθούν στη συνέχεια, δεν έδειξε διαφορές μεταξύ των στελεχών από κουνέλια και βοοειδή της ίδιας ή διαφορετικών εκτροφών (Greig et al., 1999). Επίσης, στελέχη που απομονώθηκαν από γάτες και βοοειδή που ζούσαν στις ίδιες εκτροφές, στις Η.Π.Α., κατατάχθηκαν στον ίδιο IS900-RFLP τύπο (Palmer et al., 2005).

Οι ερευνητές, που χρησιμοποίησαν τον IS900-RFLP, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ένας μοναδικός κυρίαρχος τύπος MAP είναι ικανός να μολύνει πολλά διαφορετικά είδη σε ξεχωριστές γεωγραφικές περιοχές στον κόσμο (συνοψίζονται από τους Motiwala et al., 2006b). Εναλλακτικά, ίσως ο IS900-RFLP δεν είναι επαρκής να ανιχνεύσει πιθανή γενετική ποικιλομορφία στους πληθυσμούς στελεχών MAP.

Παρά το γεγονός ότι η διακριτική ικανότητα του RFLP, με τη χρήση άλλων ένθετων αλληλουχιών ως ανιχνευτές, ήταν αρκετά ικανοποιητική σε άλλα είδη μυκοβακτηριδίων (van Embden et al., 1993) η μοριακή τυποποίηση του MAP με IS900-RFLP περιορίζεται από την πολύ αργή ανάπτυξη των περισσότερων στελεχών, καθώς και από την παντελή έλλειψη ανάπτυξης άλλων, κυρίως στελεχών προβάτων, σε συμβατικές καλλιέργειες, καθώς η τεχνική απαιτεί μεγάλες ποσότητες υψηλής ποιότητας DNA. Επιπλέον, εξαιτίας της έλλειψης πολυμορφισμού ανάμεσα στα διαφορετικά ζωικά είδη που περιλαμβάνονται στις δύο μεγάλες ομάδες, η ανάλυση με IS900-RFLP μάλλον έχει περιορισμένο ρόλο στις επιδημιολογικές μελέτες της νόσου του Johne's (Motiwala et al., 2006b).

### **1.3.1.2 IS1311-RFLP και IS1311 PCR-ανάλυση περιορισμού ενδονουκλεασών (IS1311 PCR-Restriction Endonuclease Analysis) (IS1311 PCR-REA)**

Ανάμεσα στις άλλες ένθετες αλληλουχίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τυποποίηση στελεχών MAP είναι η IS1311. Η ανάλυση Southern blot των προτύπων RFLP, με τη χρήση της IS1311 ως ανιχνευτή, έδειξε ότι υπάρχουν 7-10 αντίτυπα της IS1311 στο γονιδίωμα του MAP (Whittington et al., 1998). Ο IS1311-RFLP κατηγοριοποίησε τα στελέχη MAP στις ίδιες κύριες ομάδες (C και S τύπο) όπως ο IS900-RFLP (Collins et al., 1997). Η ανάλυση στελεχών MAP με IS1311-RFLP με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών ενζύμων περιορισμού (*Bst*ΕΙΙ, *Bam*ΗΙ, *Pst*Ι και *Pvu*ΙΙ) έδειξε ότι η τεχνική έχει μικρότερη διακριτική ικανότητα, συγκρινόμενη με τον IS900-RFLP, όσον αφορά την περαιτέρω διάκριση των στελεχών (Whittington et

al., 1998). Παρόλο που ο IS1311-RFLP διαχωρίζει, όπως και ο IS900-RFLP, τα στελέχη MAP σε C και S τύπο, έχει, μάλλον, περιορισμένη χρήση στις επιδημιολογικές μελέτες, γιατί η IS1311 αλληλουχία δεν είναι αποκλειστική του MAP, εμφανίζεται σε λιγότερα αντίγραφα στο γονιδίωμα του (πιθανώς λόγω μικρότερης αντιμεταθετικής δραστηριότητας) και, για το λόγο αυτό, η τεχνική διαχωρίζει τα στελέχη σε λιγότερες υποομάδες σε σχέση με τον IS900-RFLP.

Οι Marsh et al. (1999) περιέγραψαν μια τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, σε συνδυασμό με ανάλυση περιορισμού ενδονουκλεασών [IS1311 PCR-Restriction Endonuclease Analysis (IS1311 PCR-REA)], η οποία καθιστά ικανή, όπως και στην περίπτωση του IS900-RFLP, τη διάκριση των στελεχών MAP σε C και S τύπο. Το πρότυπο περιορισμού που δημιουργήθηκε μετά από κοπή με το ένζυμο *HinfI*, προέκυψε εξαιτίας της μετάλλαξης μιας κυτοσίνης σε θυμίνη στη θέση 223 (σύμφωνα με τον αριθμό εγγραφής στην Genbank U16276) σε κάποια από τα αντίγραφα της IS1311 σε C τύπου στελέχη MAP. Η μετάλλαξη αυτή δεν υπάρχει σε κανένα από τα αντίγραφα της IS1311 στα στελέχη MAP S τύπου. Σε μια επιπλέον μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε η ίδια τεχνική, αναγνωρίστηκε ένας νέος γενότυπος, στον οποίο η C223T μετάλλαξη υπήρχε σε όλα τα αντίγραφα της αλληλουχίας. Αυτός ο γενότυπος παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε 16 στελέχη από Βίσονες, που προέρχονταν από 9 ζώα (Whittington et al., 2001). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτερα, σε σχέση με τον IS900-RFLP, για τον μοριακό διαχωρισμό των στελεχών σε S και C τύπο, γιατί είναι λιγότερο χρονοβόρα, απαιτεί μικρότερες ποσότητες DNA και μπορεί για το λόγο αυτό να εφαρμοστεί ευκολότερα σε στελέχη βραδείας ανάπτυξης, όπως αυτά που απομονώνονται κυρίως από πρόβατα (Motiwala et al., 2006b).

### **1.3.1.2 Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης για τις IS900 Περιοχές – Multiplex PCR for IS900 Loci (MPIL)**

Μια εναλλακτική μέθοδος, που χρησιμοποιήθηκε για την τυποποίηση στελεχών MAP, είναι η πολλαπλή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για τις IS900 περιοχές (MPIL). Οι Bull et al. (2000) προσδιόρισαν τη αλληλουχία των νουκλεοτιδίων 14 IS900 αλληλουχιών, καθώς και των περιοχών που βρίσκονται εκατέρωθεν κάθε IS900 αλληλουχίας και αξιοποίησαν τις πληροφορίες, για την ανάπτυξη μιας πολυσύνθετης PCR τυποποιητικής μεθόδου. Οι MPIL τύποι, που προέκυψαν, αντιστοιχούσαν σε στελέχη MAP, τα οποία, είτε στερούνταν μία ή περισσότερες IS900 αλληλουχίες, είτε παρουσίαζαν μια γενομική αναδιάταξη κάποιας IS900 αλληλουχίας ή/και της εκατέρωθεν της αλληλουχίας περιοχής. Οι 7 από τις 14 IS900 αλληλουχίες, καθώς και οι εκατέρωθεν περιοχές, ήταν διατηρημένες σε όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν, τα οποία προέρχονταν από βοοειδή, πρόβατα, αίγες και ανθρώπους. Η MPIL τυποποίηση, επίσης, διαχώρισε τα στελέχη σε C και S τύπο, όπως και ο IS900-RFLP.

Σε μια μεγαλύτερη μελέτη που έγινε στις Ηνωμένες Πολιτείες, στην οποία χρησιμοποιήθηκε MPIL τυποποίηση, διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία των στελεχών MAP (201 από τα 210 που αναλύθηκαν) ομαδοποιήθηκαν σε έναν κλάδο. Τα αμερικάνικα βόεια στελέχη, σε ποσοστό 78%, συμπεριλαμβανομένων και αυτών από την Αργεντινή και τη Νέα Σκωτία, κατατάχθηκαν σ' αυτή τη μεγάλη ομάδα δείχνοντας σημαντικό βαθμό ομοιομορφίας των στελεχών που μολύνουν βοοειδή. Τα στελέχη MAP που είχαν απομονωθεί από άλλα μηρυκαστικά, όπως αίγες και ελάφια, καθώς και ένα στέλεχος από μω, κατατάχθηκαν επίσης στην ίδια ομάδα. Δεκατέσσερα από

τα στελέχη, που προέρχονταν από πρόβατα διεσπάρησαν σε όλο το δενδρόγραμμα, με το 50% να ομαδοποιούνται μαζί με τα βόεια στελέχη. Η ανάλυση αναγνώρισε καθαρή γενετική διακύμανση μεταξύ των πρόβειων στελεχών, ενώ υπήρχαν περιορισμένες διαφορές ανάμεσα στα στελέχη από βοοειδή και άλλα ζωικά είδη, τα οποία προέρχονταν από ποικίλες γεωγραφικές περιοχές.

Η ανάλυση MPIL απαιτεί πολύ μικρές ποσότητες DNA και είναι εφαρμοστέα, σε υποβαθμισμένα δείγματα DNA, καθώς και σε μη καλλιεργήσιμα στελέχη MAP που δεν είναι κατάλληλα για RFLP ανάλυση. Ένα μειονέκτημα της τεχνικής MPIL είναι ότι η παρουσία περιορισμένου αριθμού ένθετων θέσεων για την IS900 μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη σύγκλιση των MPIL τύπων. Παρά τα κάποια τεχνικά πλεονεκτήματα η MPIL δεν παρέχει κάποια επιπλέον διάκριση των στελεχών σε σχέση με τον IS900-RFLP, και συνεπώς έχει μάλλον περιορισμένη εφαρμογή στην τυποποίηση στελεχών του MAP (Motiwala et al., 2006b).

### 1.3.1.3 Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένου Θραύσματος (Amplified Fragment Length Polymorphism) (AFLP)

Ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένου θραύσματος (AFLP) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει την τυποποίηση υψηλής ανάλυσης του γονιδιώματος με σκοπό τη γρήγορη διερεύνηση της γενετικής διακύμανσης. Ο AFLP περιλαμβάνει τον περιορισμό του DNA με δύο ένζυμα περιορισμού, που ακολουθείται από επιλεκτική επέκταση με PCR μιας υποομάδας των θραυσμάτων περιορισμού που προκύπτουν. Αυτά τα θραύσματα γίνονται ορατά σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με αυτοραδιογραφία και, πιο πρόσφατα, με μεθόδους βασιζόμενες σε φθορισμό. Η μεγάλη διαθεσιμότητα σε ένζυμα περιορισμού και αντίστοιχους συνδυασμούς εκκινητών καθιστά ικανή τη δημιουργία ποικίλων AFLP θραυσμάτων για τη διερεύνηση πολυμορφισμών, την ποιοτική ανάλυση κληρονομήσιμων περιοχών (QTL) και τη γενετική χαρτογράφηση. Ένα άλλο πλεονέκτημα της τεχνολογίας AFLP είναι η υψηλή της ευαισθησία για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Η ανάλυση, με τη χρήση AFLP, 104 στελεχών MAP, από διαφορετικά ζωικά είδη και ποικίλες γεωγραφικές περιοχές, που αντιπροσώπευαν διαφορετικούς MPIL τύπους (Motiwala et al., 2003), έδειξε ότι το 72% των στελεχών κατατάχθηκε σε δύο κύριους κλάδους. Αυτοί οι κλάδοι περιλάμβαναν το 90% των βόειων στελεχών MAP καθώς επίσης και τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από αίγες και μύες. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι δύο κύριοι κλάδοι περιλάμβαναν μόνο ένα από τα τέσσερα στελέχη, που είχαν απομονωθεί από πρόβατα. Τα στελέχη του συμπλέγματος *M. avium* που είχαν απομονωθεί από ασθενείς με νόσο του Crohn και από άλλους άγνωστους ξενιστές, κατατάχθηκαν σε ξεχωριστούς κλάδους, υπονοώντας ξεκάθαρο διαχωρισμό. Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Pavlik et al., 1995; Whittington et al., 2000; Motiwala et al., 2003), τα AFLP προφίλ τυποποίησης των ανθρώπινων στελεχών MAP ήταν μοναδικά και δεν κατατάχθηκαν μαζί με τα βόεια ή τα πρόβεια στελέχη. Η μελέτη έδειξε υψηλό βαθμό γενετικής ομοιότητας των στελεχών MAP που είχαν απομονωθεί από βοοειδή, αίγες και μύες, ανεξάρτητα από τη γεωγραφική τους προέλευση. Επιπλέον, η ανάλυση υπέδειξε γενετική ετερογένεια των στελεχών MAP που είχαν απομονωθεί από ανθρώπους και πρόβατα.

Η τυποποίηση με AFLP, με τη χρήση 96 ομάδων εκκινητών, 20 στελεχών MAP και του στελέχους MAP 19698 (O'Shea et al., 2004) αποκάλυψε 11 διαφορετικούς γενότυπους. Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Pavlik et al.,

1995; Whittington et al., 2000; Bannantine et al., 2002 ; Motiwala et al., 2003; Bannantine et al., 2003), τα αποτελέσματα κατέδειξαν υψηλό βαθμό γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ των στελεχών. Εξαιτίας της έλλειψης πληροφοριών όσον αφορά τα είδη των ξενιστών και τις γεωγραφικές περιοχές ήταν δύσκολο να αποτιμηθεί εάν η κατάταξη είχε επιδημιολογική σημασία.

Παρόλο που ο AFLP φαίνεται να έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με την τυποποίηση στελεχών MAP με MPIL και RFLP, περιορίζεται από το γεγονός ότι η αλληλομορφική ποικιλομορφία καταδεικνύεται σε ανώνυμες διαλληλομορφικές περιοχές. Επιπρόσθετα, η χαμηλή επαναληψιμότητα και η μεγάλη διακύμανση των αποτελεσμάτων μεταξύ των εργαστηρίων περιορίζουν την εκτεταμένη εφαρμογή του στην τυποποίηση στελεχών MAP (Motiwalā et al., 2006b).

#### **1.3.1.4 Τυχαία Επεκτεινόμενο Πολυμορφικό DNA (Randomly amplified polymorphic DNA) ( RAPD)**

Η ανάλυση του τυχαία επεκτεινόμενου πολυμορφικού DNA (RAPD), όπως περιγράφηκε από τον Williams et al. (1990), χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες γενετικής διακύμανσης στελεχών. Η τεχνική αυτή βασίζεται σε χαμηλής ακρίβειας επέκταση με PCR, γενωμικού DNA, με τη χρήση ενός μοναδικού βραχέως εκκινητή (10 – 22 βάσεις) αυθαίρετης αλληλουχίας, που καταλήγει στη δημιουργία θραυσμάτων που είναι χαρακτηριστικά του είδους ή του στελέχους από το οποίο προήλθε το DNA. Είναι μια απλή και φτηνή μέθοδος, η οποία έδωσε καλά αποτελέσματα στην αναγνώριση και τυποποίηση στελεχών του *Streptococcus* (Gillespie et al., 1997), του *Mycoplasma* (Charlton et al., 1999), όπως επίσης και πολλών μυκοβακτηριδίων, συμπεριλαμβανομένου του Mtb (Lee et al., 1994; Linton et al., 1994) και του *M. avium* (Matsiota-Bernard et al., 1997).

Η πρώτη περιγραφή ανάλυσης RAPD για την αναγνώριση και διαφοροποίηση στελεχών MAP από τη Γερμανία (Scheibl et al., 1997) περιλάμβανε 60 δεκαμερή εκκινητές με G+C περιεκτικότητα 60-70%. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη (Pillai et al., 2001), ένα εμπορικό σετ, που περιλάμβανε 20 δεκαμερείς, τυχαίας αλληλουχίας, εκκινητές, χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή ενός δεκαμερή εκκινητή, ο οποίος επέτρεψε την αναγνώριση και τυποποίηση του MAP και του *M. avium*. Η ανάλυση ήταν ικανή να διαφοροποιήσει τα στελέχη MAP C και S τύπου. Άλλες σχετικές τεχνικές περιλαμβάνουν την αυθαίρετως εκκινούμενη PCR (arbitrary primed PCR, AP-PCR ) (Welsh et al., 1990) και την ταυτοποίηση επεκτεινόμενου DNA (Caetano-Anolles et al., 1991). Αυτές οι μέθοδοι διαφέρουν από το RAPD όσον αφορά το μήκος των εκκινητών, τις συνθήκες της PCR και τη μέθοδο διαχωρισμού και ανίχνευσης των θραυσμάτων. Τα πρότυπα που δημιουργήθηκαν με την AP-PCR ήταν ίδια για τέσσερα στελέχη MAP, που απομονώθηκαν από ασθενείς με νόσο του Crohn, και για 8 από τα 11 στελέχη MAP (τα οποία αντιπροσώπευαν διαφορετικά πρότυπα RFLP), που είχαν απομονωθεί από βοοειδή και αίγες με νόσο του John's (Francois et al., 1997). Ο γενετικός χαρακτηρισμός με AP-PCR τριών στελεχών MAP από ελάφια έδειξε παρόμοιους γενετικούς πολυμορφισμούς με εκείνους βόειων στελεχών, που είχαν απομονωθεί σε διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας (Nebbia et al., 2000).

Τα δεδομένα από τη χρήση των παραπάνω τεχνικών ήταν ανεπαρκή για να εδραιώσουν τη χρήση τους στην τυποποίηση στελεχών MAP (Motiwalā et al., 2006b).

### 1.3.1.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Παλμικού Πεδίου (Pulse field gel electrophoresis) (PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος παλμικού πεδίου (PFGE) είναι μια προσαρμογή του συμβατικού RFLP. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα ένζυμο περιορισμού το οποίο δημιουργεί θραύσματα υψηλού μοριακού βάρους. Παρομοίως με τη συμβατική ηλεκτροφόρηση πηκτώματος, τα θραύσματα διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της PFGE, ο σχετικός προσανατολισμός της γέλης και του ηλεκτρικού πεδίου μεταβάλλονται περιοδικά, επιτρέποντας τον αποτελεσματικό διαχωρισμό θραυσμάτων DNA μεγέθους μέχρι και αρκετών μεγαβάσεων. Ο κύριος περιορισμός της τεχνικής είναι ότι δεν μπορεί να ανιχνεύσει μικρούς πολυμορφισμούς, που είναι χαρακτηριστικοί για τα μυκοβακτηρίδια.

Η μετάδοση στελεχών MAP μεταξύ κουνελιών και βοοειδών σε 22 εκτροφές μελετήθηκε πρόσφατα με τη χρήση PFGE, IS900-RFLP και χημειοτυπικά προφίλ (Greig et al., 1999). Τα PFGE προφίλ, που προέκυψαν με τη χρήση δύο διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, δεν ήταν διαφορετικά μεταξύ των στελεχών από τα κουνέλια και τα βοοειδή της ίδιας εκτροφής ή μεταξύ διαφορετικών εκτροφών και ήταν πανομοιότυπα με αυτά που έχουν ήδη περιγραφεί για τα βόεια στελέχη (Feizabadi et al., 1997).

Η τυποποίηση στελεχών MAP που παράγουν χρωστική και στελεχών MAP που δεν παράγουν χρωστική με τη χρήση PFGE (Stevenson et al. 2002), διαχώρισε τα στελέχη σε δύο ξεχωριστές ομάδες. Ο διαχωρισμός αυτός ήταν σύμφωνος με την προηγούμενη διάκριση των στελεχών MAP σε C και S τύπο, δεδομένου ότι τα στελέχη που παράγουν χρωστική απομονώνονται κυρίως από πρόβατα, ενώ αυτά που δεν παράγουν, συνήθως προέρχονται από βοοειδή και άλλα είδη ζώων (Collins et al., 1990a; Bauerfeind et al., 1996). Στην ανάλυση περιλαμβάνονταν στελέχη που είχαν απομονωθεί από διάφορα μονογαστρικά άγρια ζώα, όπως μύες, αλεπούδες, λαγούς, επίμυες, νυφίτσες, ερμίνες, αγριοκούνελα, ασβούς και σαρκοφάγα πτηνά, τα οποία δεν παρήγαγαν χρωστική και κατατάχθηκαν στην ίδια ομάδα. Τα στελέχη MAP που παράγουν χρωστική διαχωρίστηκαν, επιπλέον, σε 13 διαφορετικά PFGE προφίλ. Η αναγνώριση αρκετών καινούριων γενότυπων σε αυτή τη μελέτη υποδεικνύει ότι ο διαχωρισμός που επιτεύχθηκε με την PFGE ήταν μεγαλύτερος από αυτόν που είχε επιτευχθεί με το RFLP. Παρόλα αυτά, υπήρχαν ανεπαρκείς πληροφορίες στη δημοσίευση για να επιβεβαιώσουν την χρησιμότητα της τεχνικής στην τυποποίηση στελεχών MAP (Motiwala et al., 2006b).

### 1.3.1.6 rRNA Γονίδιο και Ανάλυση Περιοχής που έχει Διάστημα

Η ανάλυση RFLP της rRNA γονιδιακής περιοχής (Chiodini et al., 1990) με τη χρήση του 5S rRNA γονιδίου από την *Escherichia coli* ως ανιχνευτή και 11 διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, κατέληξε σε δυσδιάκριτα θραύσματα περιορισμού της 5S rRNA γονιδιακής περιοχής σε όλα τα στελέχη MAP που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι τα στελέχη MAP κατέχουν ένα μοναδικό αντίγραφο των rRNA γονιδίων μέσα στο γονιδίωμά τους. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν έλλειψη θέσεων περιορισμού (και για τα 11 ένζυμα περιορισμού που εξετάστηκαν) μέσα στο 5S rRNA γονίδιο, στην περιοχή του που έχει διάστημα και στο κεντρικό τέλος του 23S rRNA. Η έλλειψη διαφοροποίησης ανάμεσα στα στελέχη MAP που απομονώθηκαν από ανθρώπους, από πρωτεύοντα και

από διάφορα είδη ζώων, υπέδειξε ότι τα στελέχη MAP ήταν γενετικά ίδια, ανεξάρτητα από το ζωικό είδος και την γεωγραφική προέλευση.

Πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει την αλληλουχία 16S rDNA για να διαφοροποιήσουν βακτήρια σε επίπεδο είδους ή στελέχους. Παρόλα αυτά, οι 16S rDNA αλληλουχίες δεν ποικίλουν σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ειδών. Παρομοίως, η ομολογία της 16S rDNA αλληλουχίας μεταξύ του MAP και του *M. avium* είναι 99.7% (εννέα νουκλεοτιδικές διαφορές), γεγονός που δείχνει πολύ στενή συγγένεια ανάμεσα σε αυτά τα μυκοβακτηρίδια (van der Giessen et al., 1994). Αντίθετα, το εσωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα ανάμεσα στο 16S rDNA και στο 23S rDNA εμφανίζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία (Suzuki et al., 1988). Σε βραδείας ανάπτυξης μυκοβακτηρίδια, συμπεριλαμβανομένων των MAP και *M. avium*, πρόκειται για μια περιοχή ενός μοναδικού αντιγράφου, μεγέθους 278bp (Bercovier et al., 1986). Η περιοχή αυτή εμφανίζει μόνο δύο νουκλεοτιδικές διαφορές ανάμεσα στο MAP και στο *M. avium* (van der Giessen et al., 1994). Η ανάλυσή της αλληλουχίας αυτής σε 16 βόεια στελέχη MAP έδειξε ότι ήταν πανομοιότυπη σε όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν (Scheibl et al., 1997).

### **1.3.1.7 Διαδοχικές Επαναλήψεις Ποικίλου Αριθμού ή Επαναλήψεις Βραχέων Αλληλουχιών (Variable number tandem or short sequence repeats) (VNTRs Ή SSRs)**

Επαναλαμβανόμενα στοιχεία του βακτηριακού DNA χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτες για τη διαφοροποίηση και τυποποίηση βακτηριακών παθογόνων (van Belkum et al., 1998; van Belkum, 1999). Οι επαναλήψεις βραχέων αλληλουχιών (short sequence repeats-SSRs) αποτελούνται από απλές ομοπολυμερείς εκτάσεις ενός μοναδικού νουκλεοτιδίου (μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις), ή πολυμερικές εκτάσεις (ομογενείς ή ετερογενείς επαναλήψεις), καθώς επίσης και από δι- ή τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (Wiid et al., 1994). Πολλές από αυτές τις αλληλουχίες παρουσιάζουν αλληλομορφική υπερποικιλομορφία σχετιζόμενη με τον αριθμό των επαναλήψεων και την ενδοαλληλομορφική ποικιλομορφία των αλληλουχιών και ονομάζονται ποικίλος αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων (VNTRs). Η ποικιλομορφία των επαναλήψεων πιστεύεται ότι δημιουργείται κατά τη σύζευξη ή τον αναδιπλασιασμό του DNA (Strand et al., 1993), από τη γενετική αστάθεια των πολυνουκλεοτιδικών εκτάσεων, κυρίως των πολύ-G+T (Henderson and Petes, 1992), και από τον ανασυνδυασμό του DNA μεταξύ επαναλήψεων ομόλογων αλληλουχιών (van Belkum et al., 1998). Οι VNTRs έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση διαφόρων ειδών μυκοβακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *Mtb* (Wiid et al., 1994; Kremer et al., 1999; Gascoyne-Binzi et al., 2001; Mazars et al., 2001) και του *M. bovis* (Roring et al., 2002), όπως επίσης και άλλων βακτηριακών ειδών με πολύ μικρή γενετική διακύμανση στελεχών όπως η *Yersinia pestis* (Adair et al., 2000; Klevytska et al., 2001), η *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ορότυπος *typhimurium* (Lindstedt et al., 2003), και ο *Bacillus anthracis* (Adair et al., 2000; Keim et al., 2000; Klevytska et al., 2001; Kim et al., 2002; Lindstedt et al., 2003).

Μία *in silico* ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους MAP K10 αναγνώρισε 78 τέλειες επαναλήψεις (Amonsin et al., 2004) διασπαρμένες σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Μια σύνθετη ανάλυση, που αναγνώρισε και χρησιμοποίησε επαναλήψεις βραχέων αλληλουχιών πολλαπλών περιοχών (Multilocus short sequence repeats-MLSSRs) από έντεκα πολυμορφικές περιοχές, ήταν ικανή να διαχωρίσει 33 στελέχη MAP σε C και S τύπο. Επίσης, διαφοροποίησε περαιτέρω σε 20 τύπους τα

στελέχη που είχαν καταταχθεί νωρίτερα στους ίδιους MPIL και AFLP γενότυπους υποδεικνύοντας μια σχετικά μεγαλύτερη ικανότητα διάκρισης σε σχέση με τις τεχνικές MPIL και AFLP (Motiwala et al., 2003). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η πλειοψηφία των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων παρατηρήθηκε σε ένα στέλεχος που είχε απομονωθεί από πρόβατο.

Μια μοναδική SSR (G- επανάληψη) περιοχή χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση στελεχών MAP από 33 διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας (Motiwala et al., 2004), τα οποία είχαν επίσης τυποποιηθεί με την εφαρμογή MPIL (Bull et al., 2000; Motiwala et al., 2003). Με την τεχνική αυτή τα στελέχη των αγρίων ζώων, που είχαν καταταχθεί στον ίδιο MPIL κλάδο, διαφοροποιήθηκαν σε 7 διαφορετικούς αλληλομορφικούς τύπους, ανάλογα με το ζωικό είδος από το οποίο απομονώθηκαν. Η ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση ανάμεσα στους αλληλομορφικούς τύπους και τις γεωγραφικές ζώνες. Αυτό αποδόθηκε στην πιθανότητα τα αιχμάλωτα ζώα να απέκτησαν τη μόλυνση στην περιοχή που γεννήθηκαν πριν τη μεταφορά τους στον ζωολογικό τύπο. (Motiwala et al., 2003). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, η χρήση δύο διαφορετικών SSRs (G-επανάληψης και GGT-επανάληψης) για την τυποποίηση 29 στελεχών MAP από 12 διαφορετικά μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας κατέληξε στη διαφοροποίησή τους σε 11 διαφορετικούς αλληλομορφικούς τύπους οι οποίοι δεν σχετίζονταν με το είδος του ζώου, καθώς στελέχη από το ίδιο ζωικό είδος κατατάχθηκαν σε διαφορετικούς τύπους (Corn et al., 2005). Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η αξιολόγηση SSR περιοχών στελεχών MAP από κατοικίδια και άγρια μηρυκαστικά, από άγρια μονογαστρικά είδη και από ανθρώπους με νόσο του Crohn. Στην ανάλυση αυτή, τα στελέχη από τα άγρια ζώα κατατάχθηκαν σε έξι αλληλομορφικούς τύπους, μη σχετιζόμενους με το ζωικό είδος και την γεωγραφική προέλευση. Τα ανθρώπινα στελέχη είχαν τη μικρότερη γενετική διακύμανση, καθώς, σχεδόν όλα (10/11) κατατάχθηκαν σε έναν αλληλομορφικό τύπο, ο οποίος περιλάμβανε και στελέχη από άλλα ζωικά είδη (Ghadiali et al., 2004).

Η VNTR ή η SSR προσέγγιση κατέδειξε μεγαλύτερου βαθμού διάκριση των στελεχών MAP σε σχέση με άλλες τυποποιητικές μεθόδους. Απαιτούνται, όμως περισσότερες μελέτες για να εκτιμηθεί η επιδημιολογική σημασία των αποτελεσμάτων της.

### **1.3.1.8 Μυκοβακτηριακές Διάσπαρτες Επαναλαμβανόμενες Μονάδες (Mycobacterial interspersed repetitive units) (MIRU)**

Μέθοδοι βασισμένες σε γενωμικούς μικροδορυφόρους, που περιέχουν ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (VNTRs), έχουν φανεί να είναι αποτελεσματικές για την τυποποίηση του Mtb (Supply et al., 1997). Οι μυκοβακτηριακές διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες μονάδες (MIRU) αποτελούνται από ποικίλο αριθμό βραχέων διαδοχικών επαναλήψεων, οι οποίες βρίσκονται σε πολλαπλές περιοχές του γονιδιώματος (Supply et al., 1997). Η φυλογενετική ανάλυση στελεχών του *M. bovis* BCG με τη χρήση MIRU τυποποίησης, έδειξε ότι οι MIRU αποτελούν από τα πιο εύπλαστα στοιχεία μέσα σε αυτά τα μυκοβακτηριακά γενόματα (Supply et al., 2000).

Η χρήση 18 καλά συντηρημένων MIRUs για τη διάκριση των στελεχών του MAP δεν κατάφερε να διαφοροποιήσει επαρκώς τα στελέχη. Παρόλο που η MIRU τυποποίηση εξυπηρέτησε ως απλή και γρήγορη διαδικασία τη διαφοροποίηση των στελεχών του Mtb (Barlow et al., 2001; Cowan et al., 2002), μάλλον δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των στελεχών του MAP.



## 1.4 Υπόβαθρο και σκοπός της μελέτης

Ο ρόλος των μονογαστρικών αγρίων ζώων στην επιδημιολογία της παραφυματίωσης των κατοικίδιων μηρυκαστικών έχει γίνει αντικείμενο ευρείας μελέτης, μετά την πρώτη απομόνωση του μικροοργανισμού από λαγούς (Mathews and Sargent, 1977) και κυρίως έπειτα από την αναγνώριση αλλοιώσεων παραφυματίωσης σε αγριοκούνελα που συμβίωναν με ελάφια, τα οποία είχαν εκδηλώσει τη νόσο (Angus, 1990). Από τότε και, ιδιαίτερα, την τελευταία 10ετία ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από διάφορα είδη μονογαστρικών αγρίων ζώων. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν ολοένα και περισσότερο την υπόθεση ότι τα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας είναι πιθανό να αποτελούν δεξαμενή του MAP για κάποιους πληθυσμούς κατοικίδιων μηρυκαστικών. Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να αφορούν την απομόνωση και το μοριακό χαρακτηρισμό στελεχών του μικροοργανισμού από διάφορους ύποπτους πληθυσμούς άγριων μονογαστρικών και πληθυσμούς-στόχους κατοικίδιων μηρυκαστικών. Μοναδική εξαίρεση αποτελούν τα αποτελέσματα ερευνών στη Σκωτία, όπου διαπιστώθηκε ότι τα αγριοκούνελα συνιστούν δεξαμενή συντήρησης και μετάδοσης του MAP στα βοοειδή, με τα οποία συμβίωναν στα ίδια βοσκοτόπια (Greig et al., 1997, 1999; Daniels et al., 2001, 2003; Judge et al., 2005, 2006). Τα στελέχη MAP που απομονώθηκαν από τους δύο πληθυσμούς άνηκαν στον ίδιο RFLP και PFGE τύπο, ενώ τα αγριοκούνελα απέκκριναν MAP σε ικανές ποσότητες, τόσο για τη μόλυνση άλλων αγριοκούνελων όσο και για τη μόλυνση των βοοειδών, ενώ τα βοοειδή δεν απέφευγαν την κατανάλωση κοπράνων αγριοκούνελων κατά τη βόσκηση. Σε μία άλλη μελέτη που αφορούσε την απομόνωση MAP από αγριόγατες και βοοειδή της ίδιας εκτροφής, στις ΗΠΑ, διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους δύο πληθυσμούς κατηγοριοποιήθηκαν με RFLP στον ίδιο τύπο (Palmer et al., 2005). Ο ρόλος τους όμως στην επιδημιολογία της παραφυματίωσης των βοοειδών δεν αποσαφηνίστηκε, καθώς οι μολυσμένες αγριόγατες δεν είχαν παθολογοανατομικές αλλοιώσεις και το MAP απομονώθηκε σε πολύ μικρές ποσότητες από το έντερο και τους μεσεντέριους λεμφαδένες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απέκκριση μπορεί να είναι ανεπαρκής για τη μόλυνση των βοοειδών. Οι παραπάνω μελέτες αφορούν τη μετάδοση του MAP από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας σε βοοειδή. Όμως, δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες για τα πρόβατα και τις αίγες. Καθώς τα δύο αυτά ζωικά είδη εμφανίζουν διαφορετική από τα βοοειδή παθογένεια της παραφυματίωσης (Clarke and Little, 1996; Clarke, 1997; Corra et al., 2000; Tafti and Rashidi, 2000) και έχουν αναφερθεί στελέχη MAP με τροπισμό στα πρόβατα (Collins et al., 1990a; Stevenson et al., 2002), δεν θα ήταν σωστό να αναγάγουμε ευθέως τα αποτελέσματα των μελετών, που αφορούν τα βοοειδή, στα πρόβατα και τις αίγες.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί πληθώρα μοριακών τεχνικών με σκοπό την τυποποίηση των στελεχών του MAP που έχουν απομονωθεί από διάφορα ζωικά είδη, καθώς και από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Με όλες σχεδόν τις τεχνικές επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των στελεχών στους δύο κύριους τύπους του MAP, το C και τον S (Motiwala et al., 2006b). Η γενετική τυποποίηση των στελεχών, όμως, δεν έχει καταλήξει μέχρι στιγμής σε περαιτέρω συμπεράσματα που να βοηθούν στην αποσαφήνιση της επιδημιολογίας του μικροοργανισμού σε διάφορους πληθυσμούς-στόχους. Ίσως αυτό να οφείλεται στη μεγάλη γενετική ομοιογένεια των στελεχών του μικροοργανισμού, γεγονός που καθιστά δύσκολο το διαχωρισμό τους με τις τεχνικές τυποποίησης του βακτηριακού γενώματος (Motiwala et al., 2006b). Η πιο ακριβής μέθοδος για τη διάκριση των βακτηριακών στελεχών παραμένει ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA, ο οποίος προσφέρει πολλά

πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους τυποποίησης που βασίζονται σε ένζυμα περιορισμού. Καταρχήν, καθώς λαμβάνεται υπόψη ξεχωριστά κάθε γενετικός χαρακτήρας, εντοπίζονται μεγαλύτεροι αριθμοί μοναδικών για ένα στέλεχος πολυμορφικών περιοχών, γεγονός που συμβάλλει στην αξιοπιστία της αναγνώρισης ενός συγκεκριμένου στελέχους. Επιπλέον, η εξέταση των νουκλεοτιδίων είναι πιθανό να αποκαλύψει αρκετή ποικιλομορφία ώστε να καταστήσει ικανή μια διάκριση, σε περιπτώσεις όπου τα στελέχη εμφανίζουν τους ίδιους φαινοτύπους και δεν διακρίνονται γενετικά με τις τεχνικές τυποποίησης. Τέλος, τα συμπεράσματα είναι σαφή και δεν βασίζονται σε δευτερογενείς μετρήσεις, όπως το μέγεθος των ζευγών βάσεων. Αυτό δεν συμβαίνει στις τεχνικές τυποποίησης, όπου δύο ζώνες, οι οποίες εμφανίζονται ίδιες σε μέγεθος, μπορεί να κατέχουν διαφορετικές θέσεις στο βακτηριακό χρωμόσωμα (Carrington and Hoelzel, 2001). Ενώ οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες είχαν αποφασιστικό ρόλο στην αποκάλυψη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ της διαφορετικής καταγωγής βακτηρίων, η ανάλυση του DNA μόνο πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση ξεχωριστών γενοτύπων σε επίπεδο στελεχών (Ochman and Wilson, 1987; Lloyd and Sharp, 1993; Kaltenboeck et al., 1993). Η πρόσφατη χαρτογράφηση του γενόματος του MAP (Li et al., 2005), έχει πυροδοτήσει νέες μελέτες που αφορούν τον προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA διαφόρων περιοχών και τη σύγκριση τους με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων ειδών μυκοβακτηριδίων ή την αποσαφήνιση του ρόλου πρωτεϊνών του MAP με άγνωστη λειτουργία (Bannantine and Paustian, 2006; Marsh and Whittington, 2007; Motiwala et al., 2006a). Δεν υπάρχουν, όμως, μελέτες που να αφορούν τον προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας περιοχών του DNA με σκοπό τη σύγκριση διαφορετικών στελεχών του μικροοργανισμού.

Η μελέτη του ρόλου των μονογαστρικών αγρίων ζώων στην επιδημιολογία της παραφυματώσεως των κατοικιδίων μηρυκαστικών δυσχεραίνεται και από τη δυσκολία απομόνωσης του μικροοργανισμού στην καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα των ερευνών που αφορούν την απομόνωση του μικροοργανισμού ποικίλουν ανάλογα με το είδος του ζώου από το οποίο προέρχονται τα δείγματα (Manning and Collins, 2001), το είδος του προς καλλιέργεια δείγματος (Sockett et al., 1992; Whitlock and Buergelt, 1996; Whitlock et al., 2000; Whittington and Sergeant, 2001b), καθώς και τον τύπο του στελέχους (C ή S) (Collins et al., 1990a). Υπάρχει διαφωνία μεταξύ των ερευνητών για την ευαισθησία των διαφόρων υποστρωμάτων για την απομόνωση του MAP από πρόβατα (Juste et al., 1991; Aduriz et al., 1995; Whittington et al., 1999; Kostoulas et al., 2006) ή βοοειδή (Whipple et al., 1991; Nielsen et al., 2004). Οι διαφωνίες αποδόθηκαν στη διαφορετική καλλιεργησιμότητα των διαφορετικών τύπων στελεχών του MAP, καθώς είναι γνωστό ότι τα S τύπου στελέχη απομονώνονται κυρίως από πρόβατα (Stevenson et al., 2002), ενώ τα στελέχη C τύπου απομονώνονται κυρίως από βοοειδή και αίγες (Collins et al., 1990a; Whipple et al., 1990; Thoresen and Olsaker, 1994; Pavlik et al., 1995; Cousins et al., 2000). Πρόσφατα, οι de Juan et al. (2006) συγκρίνοντας τέσσερα διαφορετικά στερεά καλλιεργητικά υποστρώματα για την απομόνωση στελεχών MAP S και C τύπου από δείγματα ιστών βοοειδών και αιγών έδειξαν ότι πιθανά δεν υπάρχει ειδικότητα ξενιστή των στελεχών και ότι υπάρχει διαφορά στην καλλιεργησιμότητα των διαφορετικών τύπων στελεχών MAP ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα. Τα αποτελέσματα, όμως, της παραπάνω μελέτης καθώς και άλλων πρόσφατων ερευνών (Sevilla et al., 2007) για τα ενδεικνυόμενα, ανάλογα με τον τύπο του στελέχους, καλλιεργητικά πρωτοκόλλα, βασίστηκαν είτε σε ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από θετικά στην ELISA ζώα (de Juan et al., 2006) είτε σε στελέχη που απομονώθηκαν από ομογενοποιημένα δείγματα ιστών ή/και κοπράνων (Sevilla et

al., 2007). Δεν λάμβαναν υπόψη τους τη γενετική και παθογενετική ετερογένεια των στελεχών MAP στον πληθυσμό των ζώων από τον οποίο προέρχονταν τα δείγματα (Verna et al., 2007) και δεν υπολόγισαν τις, ανάλογες με τον τύπο του στελέχους, Ευ των καλλιεργητικών πρωτοκόλλων.

Με βάση παλιότερες αντιλήψεις, ένα ζωικό είδος χαρακτηρίζεται ως δεξαμενή ενός μικροοργανισμού, όταν ο μικροοργανισμός ζει φυσιολογικά και πολλαπλασιάζεται σε αυτό και, για το λόγο αυτό, αποτελεί πηγή μόλυνσης για άλλα είδη ζώων (Thrusfield, 1986). Πρόσφατα, όμως, οι Haydon et al. (2002) πρότειναν ο ορισμός της δεξαμενής να συσχετίζεται με τον εκάστοτε πληθυσμό-στόχο και να μην περιορίζεται μόνο σε κάποιο ζωικό είδος αλλά να περιλαμβάνει έναν ή περισσότερους επιδημιολογικά συσχετιζόμενους ζωικούς πληθυσμούς ή/και περιβάλλοντα, όπου ο παθογόνος μικροοργανισμός μπορεί να διατηρηθεί μόνιμα και να μεταδοθεί στον ζωικό πληθυσμό-στόχο. Ο μικροοργανισμός, βέβαια, μπορεί να είναι ή να μην είναι παθογόνος για τον ή τους ζωικούς πληθυσμούς που συγκροτούν τη δεξαμενή. Για την επιβεβαίωση της εμπλοκής του ή των ζωικών ειδών και του περιβάλλοντός τους στη δεξαμενή, οι Haydon et al. (2002) πρότειναν μια διαδικασία τεσσάρων σταδίων: 1) Στο πρώτο στάδιο πρέπει να υπάρχουν επιδημιολογικοί συσχετισμοί μεταξύ του/των συγκεκριμένων ζωικών ειδών και του περιβάλλοντός τους με τον πληθυσμό-στόχο, 2) Στο δεύτερο στάδιο πρέπει να υπάρχουν ενδείξεις φυσικής λοίμωξης από τον μικροοργανισμό του/των, εκτός του πληθυσμού στόχου, ζωικών ειδών και μόλυνσης του περιβάλλοντός τους, 3) Στο τρίτο στάδιο ακολουθεί η γενετική σύγκριση των στελεχών που απομονώθηκαν από τον πληθυσμό-στόχο και από τον/τους ζωικούς πληθυσμούς και το περιβάλλον που διερευνούνται ως πιθανή δεξαμενή του μικροοργανισμού και 4) Στο τελευταίο στάδιο εκτιμώνται τα αποτελέσματα παρεμβάσεων που στοχεύουν στην απομόνωση του πληθυσμού-στόχου από την πιθανή δεξαμενή του μικροοργανισμού.

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν η διερεύνηση του ρόλου των μονογαστρικών αγρίων ζώων και του περιβάλλοντός τους ως πιθανής δεξαμενής συντήρησης και μετάδοσης του MAP σε πρόβατα και αίγες ελληνικών εκτροφών (πληθυσμός-στόχος). Γι αυτό, και ακολουθώντας την προταθείσα από τους Haydon et al. (2002) διαδικασία, επιλέχθηκαν 4 ενδημικά προσβεβλημένες εκτροφές προβάτων και αιγών (πληθυσμός-στόχος) από όπου συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν δείγματα μονογαστρικών αγρίων ζώων που συμβιούσαν με τα κατοικίδια μηρυκαστικά είτε στους χώρους σταβλισμού των είτε στους βοσκοτόπους των. Επιπλέον, συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν δείγματα από το περιβάλλον διαβίωσης των ύποπτων μονογαστρικών. Τα στελέχη MAP που απομονώθηκαν από την πιθανή δεξαμενή (μονογαστρικά και περιβάλλον τους) και τον πληθυσμό-στόχο χαρακτηρίστηκαν και συγκρίθηκαν γενετικά με τη μέθοδο της IS1311 PCR-REA και με προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900. Τέλος, υπολογίστηκε και συγκρίθηκε η ευαισθησία (Eu) των διαδικασιών απομόνωσης των διαφορετικών τύπων στελεχών του MAP (C και S) σε δύο ευρύτατα διαδεδομένα καλλιεργητικά υποστρώματα, του Herrold's egg - yolk medium (HEYM) και του Lowenstein-Jensen (LJ), που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των δειγμάτων (κόπρανα και ιστοί), τα οποία συλλέχθηκαν από τον πληθυσμό στόχο (αίγες και πρόβατα).

## 1.5 Βιβλιογραφία

1. Adair, D.M., Worsham, P.L., Hill, K.K., Klevytska, A.M., Jackson, P.J., Friedlander, A.M., Keim, P., 2000. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1516-1519.
2. Aduriz, J.J., Juste, R.A., Cortabarria, N., 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45, 211–217.
3. Alvarez, J., de Juan, L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Mateos, A., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet. Rec.* 156, 212-213.
4. Amonsin, A., Li, L.L., Zhang, Q., Bannantine, J.P., Motiwala, A.S., Sreevatsan, S., Kapur, V., 2004. Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis strains. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1694-1702.
5. Anderson, J.L., Meece, J.K., Koziczkowski, J.J., Clark, D.L.Jr., Radcliff, R.P., Nolden, C.A., Samuel, M.D., Ellingson, J.L., 2007. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Scavenging Mammals in Wisconsin. *J. Wildl. Dis.* 43, 302-308.
6. Angus, K.W., 1990. Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Pathol.* 103, 101-105.
7. Bannantine, J.P., Paustian, M.L., 2006. Identification of diagnostic proteins in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by a whole genome analysis approach. *Methods Mol. Biol.* 345, 185-196.
8. Bannantine, J.P., Zhang, Q., Li, L.L., Kapur, V., 2003. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis belies their divergent growth rates. *BMC Microbiol.* 3, 10.
9. 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.
10. Barlow, R.E., Gascoyne-Binzi, D.M., Gillespie, S.H., Dickens, A., Qamer, S., Hawkey, P.M., 2001. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2453-2457.
11. 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.
12. Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
13. Bercovier, H., Kafri, O., Sela, S., 1986. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 1136-1141.
14. 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.
15. Buergelt, C.D., Layton, A.W., Ginn, P.E., Taylor, M., King, J.M., Habecker, P.L., Mauldin, E., Whitlock, R., Rossiter, C., Collins, M.T., 2000. The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol.* 37, 428-438.
  16. Buergelt, C.D., Hall, C., McEntee, K., Duncan, J.R., 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207.
  17. Bull, T.J., Hermon-Taylor, J., Pavlik, I., El-Zaatari, F., Tizard, M., 2000. Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and development of multiplex PCR typing. *Microbiology.* 146, 2185-2197.
  18. Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M., 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology (N.Y.)*. 9, 553-557.
  19. Carrington, M., Hoelzel, A.R., (eds.), 2001. *Molecular Epidemiology; A Practical Approach*. Oxford University Press. 2001: pp. 57.
  20. Chandler, R.L., 1961. Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. IV. Comparative susceptibility to infection of C.57, C.B.A. and Swiss white mice. *J. Comp. Pathol.* 71, 233–242.
  21. Chandler, R.L., 1962. Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. V. Further studies on the comparative susceptibility of C57 black mice. *J. Comp. Pathol.* 72, 198–213.
  22. Charlton, B.R., Bickford, A.A., Chin, R.P., Walker, R.L., 1999. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys from the central valley of California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 408-415.
  23. Chiodini, R.J., 1990. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* and organisms of the *Mycobacterium avium* complex by restriction polymorphism of the rRNA gene region. *J. Clin. Microbiol.* 28, 489-494.
  24. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262.
  25. Clarke, C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
  26. Clarke, C.J., Little, D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114, 419-437.
  27. Cole, S.T., Barrell, B.G., 1998. *Novartis Found. Symp.* 217, 160–172; discussion. 172–177.
  28. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393, 537–544.

29. Collins, D.M., Cavnignac, S., de Lisle, G.W., 1997. Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes.* 11, 373–380.
30. Collins, D.M., Hilbink, F., West, D.M., Hosie, B.D., Cooke, M.M., de Lisle, G.W., 1993. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* 133, 599–600.
31. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990a. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
32. Collins, M.T., Kenefick, K.B., Sockett, D.C., Lambrecht, R.S., McDonald, J., Jorgensen, J.B., 1990b. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2514-2519.
33. Collins, D.M., Gabric, D.M., de Lisle, G.W., 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 175–178.
34. Cook, W.E., Cornish, T.E., Shideler, S., Lasley, B., Collins, M.T., 1997. Radiometric culture of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from the feces of tule elk. *J. Wildl. Dis.* 33, 635-637.
35. 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.
36. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
37. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184-190.
38. Cowan, L.S., Mosher, L., Diem, L., Massey, J.P., Crawford, J.T., 2002. Variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1592-1602.
39. Damato, J.J., Collins, M.T., 1990. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet. Microbiol.* 22:31–42.
40. Daniels, M.J., Ball, N., Hutchings, M.R., Greig, A., 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161, 306-313.
41. Daniels, M.J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J.M., Hutchings, M.R., 2003. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol. Infect.* 130, 553-559.
42. de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L., 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927-5932.
43. delisle, G.W., Yates, G.R., Collins, D.M., 1993. Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 567–571.

44. Deutz, A., Spergser, J., Wagner, P., Rosengarten, R., Kofer, J., 2005. [Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in wild animal species and cattle in Styria/Austria] Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 118, 314-320. German.
45. Dimarelli, Z., Xenos, G., Argyroudou, S., Papadopoulos, O., 1991. A survey of ovine and caprine paratuberculosis in the Thessaloniki area, Greece. Paratuberculosis Newsletter. 3, 8-9.
46. Dombek, P.E., Johnson, L.K., Zimmerley, S.T., Sadowsky, M.J., 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate Escherichia coli isolates from human and animal sources. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2572-2577.
47. Dvorska, L., Matlova, L., Bartos, M., Parmova, I., Bartl, J., Svastova, P., Bull, T.J., Pavlik, I., 2004. Study of Mycobacterium avium complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. Vet. Microbiol. 99, 239-250.
48. Eamens, G.J., Whittington, R.J., Marsh, I.B., Turner, M.J., Saunders, V., Kemsley, P.D., Rayward, D., 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. Vet. Microbiol. 77, 357-367.
49. Fawcett, A.R., Goddard, P.J., McKelvey, W.A., Buxton, D., Reid, H.W., Greig, A., Macdonald, A.J., 1995. Johne's disease in a herd of farmed red deer. Vet. Rec. 136, 165-169.
50. Feizabadi, M.M., Robertson, I.D., Hope, A., Cousins, D.V., Hampson, D.J., 1997. Differentiation of Australian isolates of Mycobacterium paratuberculosis using pulsed-field gel electrophoresis. Aust. Vet. J. 75, 887-889
51. Ferroglio, E., Nebbia, P., Robino, P., Rossi, L., Rosati, S., 2000. Mycobacterium paratuberculosis infection in two free-ranging Alpine ibex. Rev. Sci. Tech. 19, 859-862.
52. Francis, J., 1943. Infection of laboratory animals with Mycobacterium johnei. J. Comp. Pathol. 53, 140-150.
53. Francois, B., Krishnamoorthy, R., Elion, J., 1997. Comparative study of Mycobacterium paratuberculosis strains isolated from Crohn's disease and Johne's disease using restriction fragment length polymorphism and arbitrarily primed polymerase chain reaction. Epidemiol. Infect. 118, 227-233.
54. Gascoyne-Binzi, D.M., Barlow, R.E., Frothingham, R., Robinson, G., Collins, T.A., Gelletlie, R., Hawkey, P.M., 2001. Rapid identification of laboratory contamination with Mycobacterium tuberculosis using variable number tandem repeat analysis. J. Clin. Microbiol. 39, 69-74.
55. Ghadiali, A.H., Strother, M., Naser, S.A., Manning, E.J., Sreevatsan, S., 2004. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. J. Clin. Microbiol. 42, 5345-5348.
56. Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., Oliver, S.P., 1997. Identification of Streptococcus species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. J. Dairy Sci. 80, 471-476.
57. Gilmour, N.J., Nisbet, D.I., Brotherston, J.G., 1965. Experimental oral infection of calves with Mycobacterium johnei. J Comp Pathol. 75, 281-286.
58. Glawischnig, W., Khaschabi, D., 2001. Paratuberkulose bei einem freilebend Rothirsch (Cervus elaphus hippelaphus) aus dem Bundesland Vorarlberg: ein Fallbericht. Wien. Tierärztl. Mschr. 88, 66-69.

59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E. 2nd, McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
63. Hallman, E.T., Witter, J.F., 1933. Some observations on the pathology of Johne's disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 83, 159-187.
64. Harding, H.P., 1959. The histopathology of *Mycobacterium johnei* infection in small lab animals. *J. Pathol. Bacteriol.* 78, 157-169.
65. Harding, H.P., 1957. The detection of *M. johnei* in sections by fluorescent examination. *J. Comp. Pathol.* 67, 180-185.
66. Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 489-512.
67. Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468-1473. Review.
68. Henderson, S.T., Petes, T.D., 1992. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 12, 2749-2757.
69. Hirsch, A., 1956. Infection of hamsters and rabbits with *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Pathol.* 66, 260-269.
70. Homuth, M., Valentin-Weigand, P., Rohde, M., Gerlach, G.F., 1998. Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 66, 710-716.
71. Jessup, D.A., Abbas, B., Behymer, D., Gogan, P., 1981. Para-tuberculosis in tule elk in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 1252-1254.
72. Johne, H.A., Frothingham, L., 1895. Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Pathologie.* 21, 438-454.
73. Jorgensen, J.B., 1982. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Vet. Scand.* 23, 325-335.
74. 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.
75. Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Allcroft, D.J., Hutchings, M.R., 2005. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6033-6038.
76. Juste, R.A., Marco, J.C., Saez de Ocariz, C., Aduriz, J.J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385-390.
77. Kaltenboeck, B., Kousoulas, K.G., Storz, J., 1993. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J. Bacteriol.* 175, 487-502.



78. Kanduma, E., McHugh, T.D., Gillespie, S.H. 2003. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J. Appl. Microbiol.* 94, 781-791.
79. Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E., 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182, 2928-2936.
80. Kennedy, D.J., Benedictus, G., 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.* 20, 151-179.
81. Kim, W., Hong, Y.P., Yoo, J.H., Lee, W.B., Choi, C.S., Chung, S.I., 2002. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 21-27.
82. Kim, Y.G., Bech-Nielsen, S., Gordon, J.C., Slemons, R.D., Spangler, E., 1989. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1110-1113.
83. Klevytska, A.M., Price, L.B., Schupp, J.M., Worsham, P.L., Wong, J., Keim, P., 2001. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3179-3185.
84. Kopečna, M., Ondrus, S., Literak, I., Klimes, J., Horvathova, A., Moravkova, M., Bartos, M., Trcka, I., Pavlik, I., 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians. *J. Wildl. Dis.* 42, 691-695.
85. Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Florou, M., 2006. Application of a semi-dependent latent model in the Bayesian estimation of the sensitivity and specificity of two faecal culture methods for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76, 121-134.
86. Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakus, M.A., Musser, J.M., van Embden, J.D., 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2607-2618.
87. Larsen, A.B., Moon, H.W., 1972. Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.* 33, 1231-1235.
88. Lee, T.Y., Lee, T.J., Kim, S.K., 1994. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Yonsei. Med. J.* 35, 286-294.
89. Leontides, S., Tomopoulos, D., Christopoulos, C., Tsangaris, T., Exarchopoulos, G., 1975. Paratuberculosis (Johne's disease) in goats in Greece. *Proc. XXth World Veterinary Congress (W.V.C.), Thessaloniki – Greece, Vol 2, pp 1426-1428.*
90. Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, 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. U.S.A.* 102, 12344-12349.
91. Libke, K.G., Walton, A.M., 1975. Presumptive paratuberculosis in a Virginia white-tailed deer. *J. Wildl. Dis.* 11, 552-553.

92. Lindstedt, B.A., Heir, E., Gjernes, E., Kapperud, G., 2003. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1469-1479.
93. Linton, C.J., Jalal, H., Leeming, J.P., Millar, M.R., 1994. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2169-2174.
94. Lloyd, A.T., Sharp, P.M., 1993. Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J. Mol. Evol.*, 37, 399.
95. Lominski, L., Cameron, J., Roberts, G.B.S., 1956. Experimental Johne's disease in mice. *J. Pathol. Bacteriol.* 71, 211-222.
96. 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.
97. Manning, E.J., Collins, M.T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech.* 20, 133-150. Review.
98. Manning, E.J., Steinberg, H., Rossow, K., Ruth, G.R., Collins, M.T., 1998. Epizootic of *paratuberculosis* in farmed elk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1320-1322, 1280-1281.
99. Marco, I., Ruiz, M., Juste, R., Garrido, J.M., Lavin, S., 2002. *Paratuberculosis* in free-ranging fallow deer in Spain. *J. Wildl. Dis.* 38, 629-632.
100. Marsh, I.B., Whittington, R.J., 2007. Genomic diversity in *Mycobacterium avium*: single nucleotide polymorphisms between the S and C strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and with *M. a. avium*. *Mol. Cell. Probes.* 21, 66-75.
101. Marsh, I., Whittington, R., Cousins, D., 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311, *Mol. Cell. Probes.* 13, 115-126.
102. Mathews, P.R.J., Sargent, A., 1977. The isolation of mycobacteria from the brown hare (*Lepus europaeus*). *Br. Vet. J.* 133, 399-404
103. Mathews, F.P., 1930. Liver lesions in Johne's disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 29, 248-250.
104. Matsiota-Bernard, P., Waser, S., Tassios, P.T., Kyriakopoulos, A., Legakis, N.J., 1997. Rapid discrimination of *Mycobacterium avium* strains from AIDS patients by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1585-1588.
105. Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A.L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C., Supply, P., 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1901-1906.
106. 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.
107. Mereb, G.C., Bedotti, D.O., Suarez, V.H., Busetti, M.R., Moreira, A.R., Lorenzo, R.M., 1994. *Paratuberculosis* en ciervo colorado. *Vet. Arg.* 11, 107-112.

108. Merkal, R.S., 1970. Diagnostic methods for the detection of paratuberculosis (Johne's disease). In: Proceedings of the 74th Annual Meeting of the US Animal Health Association, 620-623.
109. Mokresh, A.H., Czuprynski, C.J., Butler, D.G., 1989. A rabbit model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infections. *Infect. Immun.* 57, 3798–3807.
110. Mokresh, A.H., Butler, D.G., 1990. Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can. J. Vet. Res.* 54, 313–319.
111. Motiwala, A.S., Janagama, H.K., Paustian, M.L., Zhu, X., Bannantine, J.P., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2006a. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis with diverse genotypes. *Infect. Immun.* 74, 6046-6056.
112. Motiwala, A.S., Li, L., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2006b. Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Microbes Infect.* 8, 1406-1418.
113. Motiwala, A.S., Strother, M., Theus, N.E., Stich, R.W., Byrum, B., Shulaw, W.P., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2005. Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from broth cultures. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2111-2117.
114. Motiwala, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1703-1712.
115. Motiwala, A.S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S.A., Stabel, J.R., Shulaw, W.P., Bannantine, J.P., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2003. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2015-2026.
116. Nebbia, P., Robino, P., Ferroglio, E., Rossi, L., Meneguz, G., Rosati, S., 2000. Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the western Alps. *Vet. Res. Commun.* 24, 435-443.
117. Nguyen, H.T., Buergelt, C.D., 1983. Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 44, 2173-2174.
118. Nielsen, S.S., Kolmos, B., Christoffersen, A.B., 2004. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on two different media. *J. Appl. Microbiol.* 96, 149-153.
119. Ochman, H., Wilson, A.C., 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* 26, 74-86.
120. O'Shea, B., Khare, S., Bliss, K., Klein, P., Ficht, T.A., Adams, L.G., Rice-Ficht, A.C., 2004. Amplified fragment length polymorphism reveals genomic variability among *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3600-3606.
121. Overduin P, Schouls L, Roholl P, van der Zanden A, Mahmmud N, Herrewegh A, van Soolingen D., 2004. Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5022-5028.
122. Pacetti, A., Belletti, G., Fabbi, M., Mutinelli, F., Genchi, C., 1994. Paratuberculosis del cervo. *Doc. Vet.* 15, 67–70.

123. Palmer, M.V., Stoffregen, W.C., Carpenter, J.G., Stabel, J.R., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J. Wildl. Dis.* 41, 629-635.
124. 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.
125. Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R., Machackova, M., Yayo Ayele, W., Horvathova, A., 2000. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet. Microbiol.* 77, 231-251.
126. Payne, J.M., Rankin, J.D., 1961a. A comparison of the pathogenesis of Johne's disease in calves and cattle. *Res. Vet. Sci.* 2, 175-179.
127. Payne, J.M., Rankin, J.D., 1961b. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res. Vet. Sci.* 2, 167-174.
128. Perez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
129. 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.
130. Pillai, S.R., Jayarao, B.M., Gummo, J.D., Hue, E.C., Tiwari, D., Stabel, J.R., Whitlock, R.H., 2001. Identification and sub-typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* by randomly amplified polymorphic DNA. *Vet. Microbiol.* 79, 275-284.
131. Raizman, E.A., Wells, S.J., Jordan, P.A., DelGiudice, G.D., Bey, R.R., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can. J. Vet. Res.* 69, 32-38.
132. Rajya, B.S., Singh, C.M., 1961. Studies on the pathology of Johne's disease in sheep. III. Pathologic changes in sheep with naturally occurring infections. *Am. J. Vet. Res.* 22, 189-203.
133. Rankin, J.D., 1958. The experimental production of Johne's disease in laboratory rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.* 75, 363-366.
134. Ridge, S.E., Harkin, J.T., Badman, R.T., Mellor, A.M., Larsen, J.W., 1995. Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Aust. Vet. J.* 72, 150-153.
135. Rienmann, H., Zaman, M.R., Ruppner, R., Aalund, O., Jorgensen, J.B., Worsaae, H., Behymer, D., 1979. Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 841-843.
136. Rohonczy, E.B., Balachandran, A.V., Dukes, T.W., Payeur, J.B., Rhyan, J.C., Saari, D.A., Whiting, T.L., Wilson, S.H., Jarnagin, J.L., 1996. A comparison of gross pathology, histopathology, and mycobacterial culture for the diagnosis of tuberculosis in elk (*Cervus elaphus*). *Can. J. Vet. Res.* 60, 108-114.
137. Roiz, M.P., Palenque, E., Guerrero, C., Garcia, M.J., 1995. Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1389-1391.

138. Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S., Skuce, R., 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2126-2133.
139. Saxegaard, F., 1985. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. *J. Clin. Microbiol.* 22, 312-313.
140. Scheibl, P., Gerlach, G.F., 1997. Differentiation of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates by rDNA-spacer analysis and random amplified polymorphic DNA patterns. *Vet. Microbiol.* 57, 151-158.
141. Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., Juste, R.A., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol.* 12, 7-18.
142. Sharp, J.M., Stevenson, K., Challans, J.A., Ramage, C., Hitchcock, D., Reid, H.W., 1995. Mycobacterial infections of free living deer in Scotland, In R. J. Chiodini, M. E. Hines, and M. T. Collins (ed.), *Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wis. p. 180-182.
143. 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.
144. Sockett, D.C., Carr, D.J., Collins, M.T., 1992. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 148-153.
145. Soltys, M.A., Wise, D.R., 1967. Atypical mycobacterium in tuberculosis-like lesions in wood pigeons. *J. Pathol. Bacteriol.* 93, 351-352.
146. Stabel, J.R., 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 375-380.
147. Stamp, J.T., Watt, J.A., 1954. Johne's disease in sheep. *J Comp Pathol.* 64, 26-40.
148. Stehman, S.M., 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 12, 441-455. Review.
149. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
150. Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., Petes, T.D., 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365, 274-276.
151. Stuart, P., 1965a. A pigmented *M. Johnei* strain of bovine origin. *Br. Vet. J.* 121, 332-334.
152. Stuart, P., 1965b. Vaccination against Johne's disease in cattle exposed to experimental infection. *Br. Vet. J.* 121, 289-318.
153. Sung, N., Collins, M.T., 1998. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 999-1005.

154. Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., Loch, C., 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol. Microbiol.* 26, 991-1003.
155. Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Loch, C., 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36, 762-771.
156. Suzuki, Y., Nagata, A., Ono, Y., Yamada, T., 1988. Complete nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 170, 2886-2889.
157. Tafti, A.K., Rashidi, K., 2000. The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 47, 487-495.
158. Taylor, A.W., 1953. The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Comp. Pathol.* 63, 368-373.
159. Taylor, A.W., 1951. Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 63, 333-336.
160. Temple, R.M., Muscoplat, C.C., Thoen, C.O., Himes, E.M., Johnson, D.W., 1979. Observations on diagnostic tests for paratuberculosis in a deer herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 914-915.
161. Thoresen, O.F., Olsaker, I., 1994. Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 293-303.
162. Thrusfield M.V., 1986. *Veterinary Epidemiology*. 1<sup>st</sup> edition, Butterworths, London, 280.
163. Twort, F.W. and Ingram, G.L.Y., 1912. A method for isolating and cultivating *Mycobacterium euteridis chronicae pseudotuberculosis bovis*, *Johne*, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.* 84, 517-542.
164. Valente, C., Cuteri, V., Quondam Giandomenico, R., Gialletti, L., Franciosini, M.P., 1997. Use of an experimental chicks model for paratuberculosis enteritis (*Johne's disease*). *Vet. Res.* 28, 239-246.
165. van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., Verbrugh, H., 1998. Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 275-293.
166. van Belkum, A., 1999. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 306-311.
167. van der Giessen, J.W., Haring, R.M., van der Zeijst, B.A., 1994. Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* and the fast-growing *Mycobacterium phlei*. *Microbiology.* 140, 1103-1108.
168. van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M., et al., 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31, 406-409.
169. Verna, A.E., Garcia-Pariente, C., Munoz, M., Moreno, O., Garcia-Marin, J.F., Romano, M.I., Paolicchi, F., Perez, V., 2007. Variation in the immunopathological responses of lambs after experimental infection with

- different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health*. 54, 243-252.
170. VonMayer, H., Weiss, E.H., 1986. Paratuberkulose bei einem Mufflon in Nordbaden. *Tierärztl. Umsch.* 41, 112–117.
  171. VonWeber, A., Gurke, R., 1992. Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Mycobacterium paratuberculosis* in Kotproben von Damwild (*Dama dama* L.). *Z. Jagdwiss.* 38, 55–59.
  172. Watt, J.A.A., 1954. Johne's disease in a bovine associated with a pigmented strain of *Mycobacterium johnei*. *Vet. Rec.* 66, 387.
  173. Weber, A., Gurke, R., Bauer, K., Schreyer, K., 1992. [Bacterial studies on the occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* in fecal samples of zoo ruminants] *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 105, 161-164. German.
  174. Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
  175. Whipple, D.L., Callihan, D.R., Jarnagin, J.L., 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 368-373. Review.
  176. Whipple, D.L., Kapke, P., Vary, C., 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561–2564.
  177. Whitlock, R.H., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12, 345-356.
  178. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387-398.
  179. Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cel. Prob.* 12, 349-358.
  180. Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Micr.* 38, 3240-3248.
  181. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077–1083.
  182. Whittington, R.J., Marsh, I.B., Whitlock, R.H., 2001a. Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol. Cell. Probes.* 15, 139-145.
  183. Whittington, R.J., Sergeant, E.S., 2001b. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aus. Vet.* 79, 267-278.
  184. Wiid, I.J., Werely, C., Beyers, N., Donald, P., van Helden, P.D., 1994. Oligonucleotide (GTG)<sub>5</sub> as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1318-1321.

185. Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535
186. Williams, E.S., Spraker, T.R., Schoonveld, G.G., 1979. Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado. *J. Wild. Dis.* 15, 221–227.
187. Λεοντίδης Σ., 1978. Παραφυματίωση των προβάτων και των αιγών. Υπουργείο Γεωργίας, Κτηνιατρικό Ινστιτούτο Θεσσαλονίκης.



## *Κεφάλαιο 2*

**Απομόνωση του *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, που ζουν στους χώρους σταβλισμού και στους βοσκότοπους ελληνικών κοπαδιών προβάτων και αιγών**

*Έγινε δεκτό για δημοσίευση στο περιοδικό *Epidemiology and Infection**

## 2.1 Περίληψη

Σκοποί της μελέτης αυτής ήταν: (1) η ανίχνευση *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) σε μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, που έρχονταν σε επαφή με πρόβατα και αίγες γαλακτοπαραγωγών φυλών, τεσσάρων ελληνικών, ενδημικά μολυσμένων με παραφυματίωση, κοπαδιών και (2) η γενετική σύγκριση μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από τα άγρια ζώα με εκείνα που απομονώθηκαν από τα μηρυκαστικά των κοπαδιών αυτών. Καλλιεργήσαμε και εξετάσαμε με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR), για την ανίχνευση της ειδικής για το MAP ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900, ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από 327 άγρια ζώα, που προέρχονταν από 11 διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας. Επίσης, καλλιεργήσαμε δείγματα κοπράνων από 100 πρόβατα και αίγες από κάθε κοπάδι. Το MAP απομονώθηκε από τα δείγματα 11 προβάτων, 12 αιγών, 2 μυών, 2 επίμυων, ενός λαγού και μίας αλεπούς. Μόνο ένας επίμυς είχε ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Η γενετική τυποποίηση κατηγοριοποίησε 21 στελέχη ως βοείου τύπου και 2, από ένα μυ και μία αίγα, ως πρόβειου τύπου στελέχη. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά απομόνωσης στελέχους MAP S τύπου από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας. Τα στελέχη των τρωκτικών και των κατοικίδιων μηρυκαστικών που απομονώθηκαν από το ίδιο κοπάδι, άνηκαν στον ίδιο τύπο MAP. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το λαγό και την αλεπού άνηκαν στον ίδιο τύπο MAP με αυτόν που απομονώθηκε από την πλειοψηφία των κατοικίδιων μηρυκαστικών.

Λέξεις-κλειδιά: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, τρωκτικά, λαγοί, αλεπούδες, δεξαμενή

## 2.2 Εισαγωγή

Η διασπορά μολυσματικών παραγόντων από τα οικόσιτα ζώα στην άγρια πανίδα αποτελεί θέμα μείζονος σημασίας για τους εκτροφείς τόσο αγρίων όσο και κατοικίδιων ζώων, καθώς επηρεάζεται η υγεία της άγριας πανίδας, αλλά και γιατί τα άγρια ζώα πιθανόν λειτουργούν ως δεξαμενές μετάδοσης της μόλυνσης στο ζωικό κεφάλαιο. Η άγρια πανίδα μπορεί να εκτεθεί στο *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) μέσω της πρόσληψης επιμολυσμένης τροφής ή της κατανάλωσης μολυσμένων θηραμάτων. Οι πιθανοί οδοί μετάδοσης του MAP από την άγρια πανίδα στο ζωικό κεφάλαιο περιλαμβάνουν την επιμόλυνση της ζωοτροφής με κόπρανα, τόσο μέσα στους χώρους στέγασης των κατοικίδιων ζώων, όσο και μέσα στους λειμώνες (Daniels et al., 2003).

Για πολλά χρόνια, η παραφυματίωση θεωρούνταν ως νόσος μόνο των μηρυκαστικών. Εκτός από τα κατοικίδια μηρυκαστικά η νόσος έχει τεκμηριωμένα εντοπισθεί και σε διάφορα είδη αγρίων μηρυκαστικών (Williams et al., 1979; Jessup et al., 1981; Chiodini and Vankruiningen, 1983; Delisle et al., 1993; Buergelt et al., 2000). Τελευταία έχουν αυξηθεί οι αναφορές απομόνωσης του MAP από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, με ή χωρίς παθολογοανατομικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης. Το MAP έχει απομονωθεί από λαγόμορφα (Mathews and Sargent, 1977; Beard et al., 2001b; Raizman et al., 2005; Corn et al., 2005), τρωκτικά, ασβούς, ρακούν, αρμαδίλλους, μαρσιπόμυες, μυγαλές, κουνάβια (Beard et al., 2001a; Corn et al., 2005; Deutz et al., 2005), αγριόχοιρους (Machackova et al., 2003; Alvarez et al., 2005), ρινόκερους (Cousins et al., 2000) και διάφορα είδη πτηνών (Beard et al., 2001a; Corn et al., 2005; Deutz et al., 2005). Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης έχουν βρεθεί σε αγριοκούνελα, μύες του δάσους, αλεπούδες, ερμίνες, νυφίτσες και κοράκια (Angus, 1990; Greig et al., 1997, 1999; Beard et al., 1999; Beard et al., 2001b; Beard et al., 2001a).

Για τη διευκρίνιση της γενετικής ποικιλομορφίας των στελεχών MAP και τη διαφοροποίηση των στελεχών που μολύνουν διαφορετικούς πληθυσμούς (Collins et al., 1990; Whittington et al., 1998; Pavlik et al., 1999; Stevenson et al., 2002), έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές τυποποίησης του γενετικού υλικού (DNA), όπως ο IS900 πολυμορφισμός περιορισμού μήκους θραυσμάτων [IS900-restriction fragment length polymorphism (IS900-RFLP)], η IS1311 αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR) ακολουθούμενη από ανάλυση περιορισμού ενδονουκλεασών (restriction endonuclease analysis - REA) και η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος παλμικού πεδίου [Pulse field gel electrophoresis (PFGE)]. Με βάση τα αποτελέσματα των τεχνικών αυτών και τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης του MAP στην καλλιέργεια, έχουν αναγνωριστεί δύο κύριες ομάδες στελεχών MAP: τα πρόβειου (sheep-S) τύπου ή τύπου I στελέχη, τα οποία εμφανίζουν πολύ αργή ανάπτυξη στην καλλιέργεια και έχουν απομονωθεί κυρίως από πρόβατα, και τα βοείου (cattle-C) τύπου ή τύπου II στελέχη, τα οποία αναπτύσσονται πιο γρήγορα στην καλλιέργεια και συνήθως απομονώνονται από βοοειδή καθώς και από ευρύ φάσμα ξενιστών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.

Η μεγάλη πλειοψηφία των ελληνικών κοπαδιών προβάτων και αιγών γαλακτοπαραγωγών φυλών ακολουθεί ημιεντατικό σύστημα εκτροφής. Συνήθως, τα ζώα βόσκουν στους βοσκότοπους το μεγαλύτερο μέρος του έτους και τους παρέχεται, επιπλέον, συμπυκνωμένη τροφή. Το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας βρίσκονται έξω, ενώ μετακινούνται στους στάβλους για τη νύχτα. Η μεγάλη πλειοψηφία των κοπαδιών αυτών είναι ενδημικά μολυσμένα με MAP (Dimarelli et al., 1991). Αυτό το σύστημα εκτροφής προσφέρει πολλές ευκαιρίες για τη μετάδοση του MAP μεταξύ

προβάτων, αιγών και άγριας πανίδας, που μοιράζονται τους ίδιους βοσκότοπους ή χώρους στέγασης. Πριν τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής, οι Greig et al. (1997, 1999) είχαν δείξει ότι αγριοκούνελα που ζούσαν στα βοσκοτόπια βοοειδών κρεοπαραγωγών φυλών στη Σκοτία, απέκκριναν το MAP και πιθανώς λειτουργούσαν ως δεξαμενή μόλυνσης των βοοειδών. Ένα παρόμοιο σενάριο είναι πιθανό να ισχύει και στις ελληνικές εκτροφές γαλακτοπαραγωγών προβάτων και αιγών, όπου διάφορα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, όπως τρωκτικά, λαγοί και αλεπούδες, συνήθως ζουν στους στάβλους (τρωκτικά) ή στους βοσκότοπους (τρωκτικά, λαγοί, αλεπούδες). Ωστόσο, η πιθανότητα αυτή δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε, για μόλυνση με MAP, δείγματα ιστών από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, που ζούσαν στους χώρους στέγασης ή στους βοσκότοπους κοπαδιών προβάτων και αιγών γαλακτοπαραγωγών φυλών, ενδημικά μολυσμένων με MAP, καθώς και δείγματα κοπράνων που συλλέχθηκαν από πρόβατα και αίγες των κοπαδιών αυτών. Τα στελέχη MAP, που απομονώθηκαν από τα μικρά μηρυκαστικά και την άγρια πανίδα, χαρακτηρίστηκαν γενετικά με τη μέθοδο της IS1311 PCR-REA.

## 2.3 Υλικά και μέθοδοι

### 2.3.1 Πληθυσμός της μελέτης - Δειγματοληψία

Επιλέχθηκαν τέσσερις εκτροφές προβάτων και αιγών της κεντρικής Ελλάδας (γεωγραφικό μήκος: +39° 22', γεωγραφικό πλάτος: +22° 00'), οι οποίες απείχαν μεταξύ τους τουλάχιστον 10 χιλιόμετρα και κυμαίνονταν σε μέγεθος από 250 έως 350 ζώα. Το ένα από τα κοπάδια αποτελείτο από πρόβατα, το άλλο από αίγες και τα υπόλοιπα δύο ήταν μεικτά, με αναλογία προβάτων-αιγών, το ένα 60-40% και το άλλο 40-60%. Όλα τα κοπάδια είχαν ιστορικό κλινικής παραφυματίωσης και δεν είχαν εμβολιαστεί ποτέ στο παρελθόν για το MAP. Τα ζώα εκτρέφονταν ημιεντατικά. Κύριος στόχος ήταν η παραγωγή γάλακτος. Οι αντικαταστάσεις πραγματοποιούνταν από απογόνους ζώων υψηλής γαλακτοπαραγωγής, ενώ τα αρσενικά προέρχονταν από ζώα υψηλής απόδοσης άλλων κοπαδιών. Ο ετήσιος ρυθμός αντικατάστασης στα κοπάδια ήταν περίπου 20% και ήταν παρόμοιος με το ρυθμό απομάκρυνσης, καθώς οι παραγωγοί έπαιρναν επιδοτήσεις με βάση το μέγεθος του κοπαδιού. Για την πραγματοποίηση της μελέτης τα κοπάδια ήταν υπό εντατική παρακολούθηση για χρονικό διάστημα 2 ετών. Οι ιδιοκτήτες των κοπαδιών είχαν ενημερωθεί για τους σκοπούς της έρευνας και αποδέχτηκαν ότι δύο από τους συγγραφείς (ΠΚ και ΜΦ) θα επισκέπτονταν τους στάβλους για την συλλογή αγρίων ζώων, κάθε δεύτερη μέρα, από το Σεπτέμβριο του 2001 έως τον Ιούνιο του 2003. Η παρακολούθηση των κοπαδιών και η συλλογή δειγμάτων δεν παρεμπόδιζαν την καθημερινή διαχείριση των κοπαδιών. Πριν από τη δειγματοληψία των αγρίων ζώων, η ενδημική μόλυνση των κοπαδιών επιβεβαιώθηκε τόσο ορολογικά, με ορούς που είχαν ληφθεί από 100 τυχαία επιλεγμένα ζώα ανά κοπάδι (IDEXX ELISA test; IDEXX Laboratories, Portland, ME, USA), όσο και βακτηριολογικά, από δείγματα εντέρων ζώων >1 ενός έτους με μακροσκοπικές αλλοιώσεις ενδεικτικές της νόσου, που είχαν συλλεχθεί στα σφαγεία. Κατά τη διάρκεια της περιόδου της μελέτης, συνολικά 327 άγρια ζώα από 11 διαφορετικά είδη (Πίνακας 1) αιχμαλωτίστηκαν και ευθανατώθηκαν, με τη χρήση νόμιμων και ειδικών του είδους μεθόδων (παγίδες ζωντανών ζώων και κυνήγι) ή βρέθηκαν νεκρά, είτε μέσα στους στάβλους (μύες, επίμυες, σπουργίτια), είτε στους λειμώνες βόσκησης των κοπαδιών (αλεπούδες, λαγοί, ασβοί, καρακάξες, ένας λύκος,

μία νυφίτσα, ένα γεράκι και μία κουκουβάγια). Σε όλα τα ζώα πραγματοποιήθηκε πλήρης νεκροψία, κατά τη διάρκεια της οποίας σημειώθηκαν όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις των εντέρων και των υπολοίπων οργάνων. Για κάθε ζώο ξεχωριστά, συλλέχθηκαν και ομογενοποιήθηκαν τα τελευταία τμήματα του δωδεκαδακτύλου και του ειλεού, τα πρώτα τμήματα του τυφλού και του κόλου, οι ειλεοτυφλικοί και οι κολικοί λεμφαδένες και το ήπαρ. Τα ομογενοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε στείρους περιέκτες και διατηρήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για καλλιέργεια και IS900-PCR. Επίσης λήφθηκαν τεμάχια από τους παραπάνω ιστούς, εκτός από τις περιπτώσεις που εμφάνιζαν αυτόλυση υψηλού βαθμού, και τοποθετήθηκαν σε 10% ουδέτερο διάλυμα φορμόλης για ιστοπαθολογική εξέταση. Επιπλέον των δειγμάτων των αγρίων ζώων, από το Σεπτέμβριο του 2002 έως το Φεβρουάριο του 2003, συλλέχθηκαν 100, ανά κοπάδι, δείγματα κοπράνων από κλινικά υγιή πρόβατα και αίγες, ηλικίας  $>1$  έτους. Από κάθε ζώο συλλέχθηκαν από το απευθυσμένο περίπου 10 γραμμάρια κοπράνων, τοποθετήθηκαν σε στείρους περιέκτες και διατηρήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για καλλιέργεια.

**Πίνακας 1.** Τα είδη της άγριας πανίδας που αιχμαλωτίστηκαν (τρωκτικά), συλλέχθηκαν από κυνηγούς (λαγοί) ή βρέθηκαν νεκρά, από το Σεπτέμβριο του 2001 έως τον Ιούνιο του 2003, στους χώρους σταβλισμού ή στους βοσκότοπους τεσσάρων ελληνικών κοπαδιών προβάτων και αιγών, ενδημικά μολυσμένων με *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP).

Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Αριθμός ζώων
Οικιακός μυσ	<i>Mus musculus</i>	149
Επίμυς	<i>Rattus rattus</i>	55
Καρακάξα	<i>Pica pica</i>	30
Σπουργίτι	<i>Passer domesticus</i>	32
Ευρωπαϊκός καφέ λαγός	<i>Lepus europaeus</i>	44
Αλεπού	<i>Vulpes vulpes</i>	10
Ασβός	<i>Meles meles</i>	3
Λύκος	<i>Canis lupus</i>	1
Νυφίτσα	<i>Mustela nivalis</i>	1
Γεράκι	<i>Accipiter nissus</i>	1
Κουκουβάγια	<i>Asio otus</i>	1
Σύνολο		327

### 2.3.2 Καλλιέργεια

Τα κόπρανα και τα ομογενοποιημένα δείγματα ιστών καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα Lowenstein-Jensen (LJ), όπως περιγράφηκε σε πρόσφατες μελέτες (Whitlock and Rosenberger, 1990) και σε Herrold's Egg-Yolk (HEYM) μετά από μικρή τροποποίηση ενός πρωτοκόλλου που περιγράφηκε από τους Greig et al. (1999).

Πιο συγκεκριμένα, για την καλλιέργεια στο υπόστρωμα LJ, 2 με 5 γραμ. κοπράνων προβάτων και αιγών τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 15ml στείρου φυσιολογικού ορού, αναδεύτηκαν και αφέθηκαν σε όρθια θέση για 30min. Ταυτόχρονα, 0,5cm<sup>3</sup> επαρκώς τεμαχισμένων ιστών από τα άγρια ζώα ομογενοποιήθηκαν για 30-60 δευτερόλεπτα με 10 ml αποστειρωμένου νερού, με τη χρήση τεχνητού στομάχου (Colworth Stomacher 80, Seward Medical, London, UK).

Για την απομάκρυνση των επιμολύνσεων, το ομογενοποιημένο μείγμα μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε 25ml hexadecylpyridinium chloride (HPC) (Sigma-Aldrich, Athens, Greece), πυκνότητας 0,9%, σε θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Basingstoke, UK), και αφέθηκε σε όρθια θέση, στους 37 °C, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε στις 1.000 στροφές ανά λεπτό, για 30 λεπτά. Το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε εκ νέου σε 1 ml BHI, που περιείχε βανκομυκίνη (100 mg/ml), ναλιδιξικό οξύ (100 mg/ml) και αμφοτερικίνη B (50 mg/ml) (όλα αντιβιοτικά της Sigma). Το μείγμα αυτό επώαστηκε για 48 ώρες στους 37°C. Ακολούθως, διαιρέθηκε σε τρία τμήματα των 300 μl (6 σταγόνες) περίπου και ενοφθαλμίστηκε σε τρεις σωλήνες που περιείχαν υπόστρωμα LJ, στους δύο εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και πυρουβικό και στον ένα χωρίς.

Για την καλλιέργεια στο υπόστρωμα HEYM, 1 με 2 γραμ. κοπράνων προβάτων και αιγών ή 0,5cm<sup>3</sup> επαρκώς τεμαχισμένων ιστών από τα άγρια ζώα ομογενοποιήθηκαν για 30-60 δευτερόλεπτα με 10 ml αποστειρωμένου νερού, μέσω της χρήσης τεχνητού στομάχου (Colworth Stomacher 80, Seward Medical). Για την απομάκρυνση των επιμολύνσεων από το ομογενοποιημένο μείγμα προστέθηκαν 10ml HPC (Sigma-Aldrich), πυκνότητας 1,5%. Στη συνέχεια, το μείγμα αφέθηκε σε όρθια θέση για όλο το βράδυ, σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη μέρα, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 στροφές ανά λεπτό, για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε εκ νέου σε 10 ml αποστειρωμένου ύδατος. Η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε και το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε σε 1 ml αποστειρωμένου ύδατος. Το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάκια μικροφυγόκεντρου και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές ανά λεπτό, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το σχηματισθέν ίζημα ομογενοποιήθηκε με 0,5 ml αποστειρωμένου ύδατος. Από κάθε εναιώρημα 0,1 ml ενοφθαλμίστηκαν σε δύο σωλήνες με υπόστρωμα HEYM, εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και αντιβιοτικά (Becton Dickinson product code: 222233).

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 30 εβδομάδες, στους 37<sup>0</sup>C και ελέγχθηκαν για ανάπτυξη αποικιών, τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 8<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 16<sup>η</sup>, 20<sup>η</sup>, 24<sup>η</sup> και την 30<sup>η</sup> εβδομάδα. Από την επιφάνεια ενοφθαλμισμού των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκαν επιχρίσματα τα οποία βάφθηκαν με χρώση Ziehl-Nielsen.

### 2.3.3 Εκχύλιση του DNA του MAP από καλλιέργειες και παθολογικά υλικά

Οι διαδικασίες εκχύλισης του DNA του MAP ήταν πανομοιότυπες για τις μεθόδους PCR για την ανίχνευση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών IS900, IS1311 και IS1245. Η εκχύλιση του DNA από τους ομογενοποιημένους ιστούς και από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο LJ, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Genomic DNA Purification Kit (Puregene, Minneapolis, MN, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η εκχύλιση του DNA από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο HEYM, 1-2 αποικίες μεταφέρθηκαν, λαμβάνοντας μέριμνα ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά τεμαχίων του υποστρώματος, σε στείρους περιέκτες χωρητικότητας 1,5ml, οι οποίοι περιείχαν 100μl αποστειρωμένου νερού. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα ανακινήθηκε για 1 λεπτό σε αναμίκτη vortex (IKA-Works Inc. Wilmington, NC, USA), τοποθετήθηκε στους 100<sup>0</sup>C για 30 λεπτά, με σκοπό τη λύση των βακτηρίων, και φυγοκεντρήθηκε στις 14000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο στείρο περιέκτη χωρητικότητας 1,5ml και το

σχηματισθέν ίζημα απορρίφθηκε. Τα δείγματα DNA τοποθετούνταν στους 4°C, εφόσον εξετάζονταν άμεσα, ή αποθηκεύονταν στους -20°C.

#### 2.3.4 Μέθοδοι PCR και ανάλυσης περιορισμού ενδονουκλεασών (REA)

Το DNA που προέκυψε μετά τη διαδικασία εκχύλισης από τις καλλιέργειες και τα δείγματα ιστών εξετάστηκε με PCR για την ανίχνευση της, ειδικής για το MAP, ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900. Τα IS900-θετικά δείγματα υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε IS1311 PCR, ακολουθούμενη από REA με το ένζυμο HinfI, και σε IS1245 PCR. Η IS1311 PCR-REA έγινε για τη διάκριση των στελεχών του MAP σε C και S τύπο. Η IS1245-PCR εφαρμόστηκε για την ανίχνευση του *Mycobacterium avium* subspecies *avium* (*M. avium*). Τα εκκινητικά μόρια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε PCR, δίνονται στον Πίνακα 2. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα (Millar et al., 1995; Marsh et al., 1999), έπειτα από μικρή τροποποίηση των πρωτοκόλλων. Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιούνταν τα παρακάτω αντιδραστήρια: 10μl DNA, 10μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος PCR (Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200μM dNTPs (Deoxyribonucleotides triphosphates, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια) (Invitrogen), 7.5 μονάδες (για την IS900-PCR) ή 11.25 μονάδες (για την IS1311- και για την IS1245-PCR) Taq DNA πολυμεράσης (Invitrogen), 30 pmoles από τους εκκινητές και νερό DEPC (Diethyl pyrocarbonate) μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου. Στη συνέχεια τα προς εξέταση δείγματα, ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας, τοποθετούνταν για πολλαπλασιασμό σε θερμοκυκλοποιητή. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: Αρχική επώαση στους 94°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 40 κύκλους, ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 30 δευτερόλεπτα στους 94°C, 30 (για την IS900-PCR) ή 15 (για την IS1311- και την IS1245-PCR) δευτερόλεπτα στους 62°C και 2,5 (για την IS900-PCR) ή 1 (για την IS1311- και την IS1245-PCR) λεπτά στους 72 °C. Για την τελική επέκταση τα δείγματα παρέμεναν στους 72°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια δέκα μl από κάθε προϊόν PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 2%, στην οποία είχε προστεθεί αιθίδιο βρωμίδιο (0.5μg/ml). Στο πρώτο φρεάτιο τοποθετούνταν 10 μl DNA μάρτυρα μοριακού βάρους (100bp DNA ladder, Invitrogen). Ένα δείγμα θεωρούνταν θετικό όταν το μέγεθος του προϊόντος της PCR ήταν ίδιο με εκείνο του DNA μάρτυρα μοριακού βάρους, δηλαδή 414bp για την IS900-PCR, 268bp για την IS1311-PCR και 198bp για την IS1245-PCR.

Όλα τα προϊόντα της IS900-PCR καθαρίστηκαν από την αгарόζη (Qiaquick Gel Extraction kit ; Qiagen, West Sussex, UK) και στάλθηκαν στην MWG Biotech (Ebersberg, Germany) για την εξακρίβωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων.

Οι αντιδράσεις για τη REA πραγματοποιήθηκαν όπως είχε περιγραφεί νωρίτερα από τους Marsh et al. (1999). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνταν τα παρακάτω αντιδραστήρια: 10μl από κάθε προϊόν IS1311-PCR, 2 μονάδες από το ένζυμο Hinf I, 1.6 μl από διάλυμα ενδονουκλεάσης περιορισμού και αποστειρωμένο νερό μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου 16μl. Στη συνέχεια τα προς εξέταση δείγματα επώαστηκαν στους 22°C για 2 ώρες και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 4%, στην οποία είχε προστεθεί αιθίδιο βρωμίδιο (0.5μg/ml). Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της REA ήταν 268, 218 και 50bp για το πρότυπο περιορισμού του C τύπου και 268bp για το πρότυπο περιορισμού του S τύπου.



**Πίνακας 2.** Στόχος, ειδικότητα και αλληλουχίες των μορίων εκκινητών για την IS900-, την IS1311- και την IS1245-PCR; Οι σχετικές αναφορές βρίσκονται στις παρενθέσεις. Η IS900-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της ένθετης αλληλουχίας που είναι ειδική για το MAP, η IS1311-PCR, ακολουθούμενη από REA, για τη διάκριση των στελεχών σε S και C τύπο, ενώ η IS1245-PCR για την ανίχνευση της ένθετης αλληλουχίας που απαντάται μόνο στο *M. avium*.

Στόχος PCR	Ειδικότητα	Μόρια εκκινητών	Αλληλουχία (5'-3')	Αναφορά
IS900	MAP	P90	GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG	(Millar et al., 1995)
		P91	GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC	(Millar et al., 1995)
IS1311	MAP	M56	GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA	(Marsh et al., 1999)
	<i>M. avium</i>	M94	CAG CGA TCG TCG ACA GTG TG	(Marsh et al., 1999)
IS1245	<i>M. avium</i>	M114	CTC GAC GCA CTG CGC ACC	(Collins et al., 1997)
		M115	CCG CAG TTC CAG GTC CCC T	(Collins et al., 1997)

### 2.3.5 Ιστοπαθολογική εξέταση

Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10%, αφυδατώθηκαν σε σειρά αλκοολών και ακολούθησε έγκλεισή τους σε παραφίνη. Στη συνέχεια λήφθηκαν τομές πάχους 5µm, οι οποίες βάφθηκαν με τις χρώσεις αιματοξυλίνη-εωσίνη, για τη συνήθη ιστοπαθολογική εξέταση και Ziehl-Nielsen για την ανίχνευση οξεάντοχων βακτηρίων (OB).

## 2.4 Αποτελέσματα

Τα δείγματα 5 αγρίων ζώων και 23 μικρών μηρυκαστικών ήταν θετικά στην καλλιέργεια (Πίνακας 3). Τα στελέχη που απομονώθηκαν από 3 πρόβατα, 3 αίγες και 2 μύες καλλιεργήθηκαν μόνο στο LJ, ενώ τα υπόλοιπα μόνο στο HEYM. Ένα μόνο δείγμα κοπράνων από μία αίγα ήταν θετικό και με τις δύο μεθόδους. Όλα τα στελέχη ενοφθαλμίστηκαν ξανά σε HEYM, αλλά μόνο αυτά που είχαν αρχικά αναπτυχθεί σε HEYM επανακαλλιεργήθηκαν.

Όλα τα στελέχη ήταν θετικά για την ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS900. Η IS900 ανιχνεύθηκε επίσης στους ομογενοποιημένους ιστούς ενός επίμυος, ο οποίος ήταν αρνητικός στην καλλιέργεια (Πίνακας 3). Η εξακρίβωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 επιβεβαίωσε την απομόνωση στελεχών MAP. Η IS1311 PCR-REA κατηγοριοποίησε 21 στελέχη σε C και 2 στελέχη σε S τύπο (Πίνακας 4). Τα τελευταία προέρχονταν από μία αίγα και έναν μυ (Εικόνα 1). Επτά στελέχη δεν τυποποιήθηκαν, πιθανώς λόγω ανεπαρκούς ποσότητας DNA. Τα θετικά δείγματα που είχαν συλλεχθεί από το ένα εκ των δύο μικτών κοπαδιών, προέρχονταν από δύο πρόβατα, μία αίγα, έναν επίμυ και έναν μυ και τα στελέχη που απομονώθηκαν άνηκαν στο C τύπο. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το άλλο μικτό κοπάδι,

προέρχονταν από τέσσερις αίγες, ένα πρόβατο και έναν μν. Το τελευταίο ήταν S τύπου, ενώ τα υπόλοιπα κατηγοριοποιήθηκαν ως C στελέχη. Στο κοπάδι που αποτελείτο μόνο από αίγες, 3 αίγες βρέθηκαν μολυσμένες με C τύπου στελέχη, ενώ από μία, η οποία ήταν θετική και στα δύο καλλιεργητικά υποστρώματα, απομονώθηκαν και οι δύο τύποι MAP. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το κοπάδι που αποτελείτο μόνο από πρόβατα, προέρχονταν από 4 πρόβατα και έναν επίμν και άνηκαν στο C τύπο (Πίνακας 4). Τα στελέχη από την αλεπού και το λαγό, που είχαν βρεθεί νεκρά ή είχαν συλληχθεί από κυνηγούς αντίστοιχα, στους λειμώνες βόσκησης των κοπαδιών, τυποποιήθηκαν ως C τύπου στελέχη (Εικόνα 1). Κανένα από τα στελέχη δεν ήταν θετικό για την, ειδική για το *M. avium*, ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS1245.

Κατά τη νεκροψία δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης στα άγρια ζώα που εξετάστηκαν. Στα IS900 θετικά ζώα πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική εξέταση. Σε κανένα από τα ζώα που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν OB ή κοκκιωματώδους τύπου αλλοιώσεις, συμβατές με λοίμωξη από MAP, πλην ενός επίμνους. Στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων του εντερικού του επιθηλίου υπήρχε μικρός αριθμός OB, ο οποίος, μόνο σπάνια υπερέβαινε τα 5.

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα της καλλιέργειας δειγμάτων κοπράνων από κλινικά υγιή πρόβατα και αίγες τεσσάρων κοπαδιών και δειγμάτων ομογενοποιημένων ιστών από την άγρια πανίδα.

Είδος (τύπος δείγματος)	Αριθμός ζώων θετικών στην καλλιέργεια (συνολικός αριθμός ζώων που εξετάστηκαν)	Αριθμός ζώων με ιστούς θετικούς στην IS900-PCR
Πρόβατα (κόπρανα)	11(180)	ΔΕ <sup>a</sup>
Αίγες (κόπρανα)	12(220)	ΔΕ
Μνες (ιστοί)	2(149)	0
Επίμνες (ιστοί)	1(55)	1
Αλεπούδες (ιστοί)	1(10)	0
Ευρωπαϊκοί καφέ λαγοί (ιστοί)	1(44)	0
Καρακάξες (ιστοί)	0(30)	0
Σπουργίτια (ιστοί)	0(32)	0
Ασβοί (ιστοί)	0(3)	0
Λύκος (ιστοί)	0(1)	0
Νυφίτσα (ιστοί)	0(1)	0
Γεράκι (ιστοί)	0(1)	0
Κουκουβάγια (ιστοί)	0(1)	0
Σύνολο	28(727)	1

<sup>a</sup> ΔΕ Δεν έγιναν

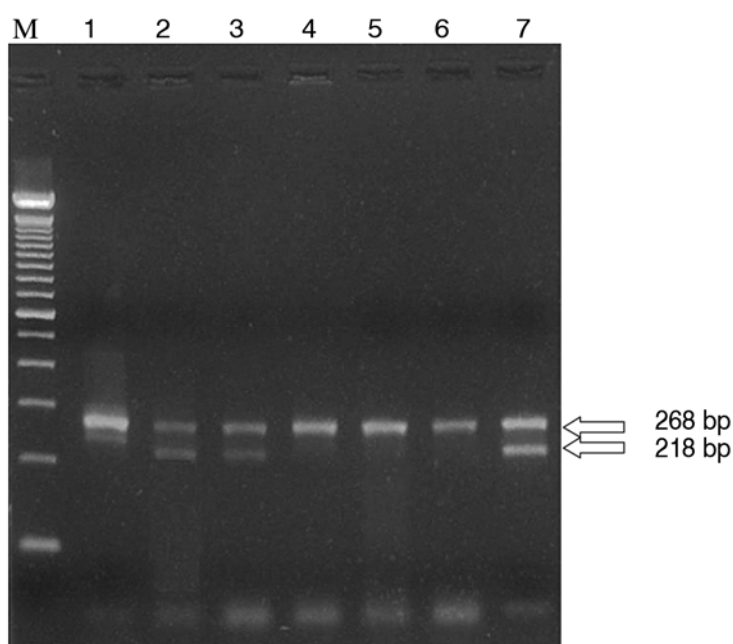
Κάθε δείγμα ομογενοποιημένων ιστών κάθε ζώου αποτελείτο από το τελευταίο τμήμα του δωδεκαδακτύλου, το πρώτο τμήμα του τυφλού και του κόλου, τους ειλεοτυφλικούς και τους κολικούς λεμφαδένες και το ήπαρ. Τα δείγματα ιστών εξετάστηκαν όχι μόνο με καλλιέργεια αλλά και με απευθείας PCR για την ανίχνευση της ειδικής για το MAP αλληλουχίας IS900. Οι καλλιέργειες έγιναν σε δύο υποστρώματα, Lowenstein-Jensen και Herrold's Egg-Yolk, και τα στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως MAP με IS900-PCR. Το στέλεχος που απομονώθηκε από τα κόπρανα μιας αίγας καλλιεργήθηκε και στα δύο υποστρώματα. Το ομογενοποιημένο δείγμα ιστών από έναν επίμν, ο οποίος ήταν αρνητικός στην καλλιέργεια, ήταν θετικό στην απευθείας IS900-PCR.

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα του γενετικού χαρακτηρισμού με IS1311 PCR-REA με HinfI, 23 στελεχών, κατηγοριοποιημένων ανάλογα με την τοποθεσία της δειγματοληψίας και το είδος του ζώου από το οποίο απομονώθηκαν. Από το δείγμα κοπράνων της αίγας (από το κοπάδι 2), που ήταν θετικό και στα δύο καλλιεργητικά υποστρώματα, απομονώθηκαν και οι δύο τύποι MAP.

Τοποθεσία δειγματοληψίας (τύπος κοπαδιού)	Είδος ζώου από το οποίο απομονώθηκαν τα στελέχη	IS1311 PCR-REA	
		C τύπος	S τύπος
Κοπάδι 1 (μικτό)	Πρόβατα	2	ME <sup>a</sup>
	Αίγες	1	ME
	Επίμνες	1	ME
	Μύες	1	ME
Κοπάδι 2 (αίγες)	Αίγες	4	1
Κοπάδι 3 (πρόβατα)	Πρόβατα	4	ME
	Επίμνες	1	ME
Κοπάδι 4 (μικτό)	Πρόβατα	4	ME
	Αίγες	1	ME
	Μύες	0	1
Λειμώνες των 4 κοπαδιών	Ευρωπαϊκοί καφέ λαγοί	1	ME
	Αλεπούδες	1	ME
Σύνολο		21	2

<sup>a</sup>ME: μη εφαρμοστέο

**Εικόνα 1.** Τυπικά πρότυπα της IS1311 PCR-REA με HinfI σε συνεχόμενες στήλες. Φαίνονται τα C τύπου στελέχη MAP (στήλες 2, 3), που απομονώθηκαν από μία αλεπού και ένα λαγό αντίστοιχα, καθώς και τα S τύπου στελέχη MAP (στήλες 4 και 5), που απομονώθηκαν από ένα μυ και μία αίγα. Οι στήλες 1 και 6 αντιπροσωπεύουν τους θετικούς μάρτυρες για τα S τύπου στελέχη (στελέχη MAP που είχαν απομονωθεί νωρίτερα με IS900-PCR από τον ειλέο προβάτου με παραφυματίωση και χαρακτηρίστηκαν ως S τύπου στελέχη με IS1311 PCR-REA), ενώ η στήλη 7 αντιπροσωπεύει το θετικό μάρτυρα για τα C τύπου στελέχη MAP (Στέλεχος MAP ATCC19698). Στήλη M: DNA μάρτυρα μοριακού βάρους 100bp



## 2.5 Συζήτηση

Ανιχνεύσαμε ή απομονώσαμε το MAP από τέσσερα διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας, τα οποία ζούσαν στους χώρους στέγασης ή στους βοσκοτόπους κοπαδιών μολυσμένων με παραφυματίωση. Πιο συγκεκριμένα, το MAP απομονώθηκε από δύο επίμυες και δύο μύες, που είχαν αιχμαλωτιστεί μέσα στους χώρους στέγασης, καθώς και από μία αλεπού και έναν λαγό, που είχαν βρεθεί νεκρά ή είχαν συλληφθεί από κυνηγούς στους βοσκοτόπους των κοπαδιών. Δεν απομονώθηκε από σπουργίτια, ασβούς, καρακάξες, ένα λύκο, μία νυφίτσα, ένα γεράκι και μία κουκουβάγια, αλλά ο διαθέσιμος αριθμός ζώων από τα είδη αυτά ήταν περιορισμένος (Πίνακας 1). Δεν ανιχνεύσαμε μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης στα άγρια ζώα που εξετάσαμε. Παρόλα αυτά, υπήρχαν OB στα μακροφάγα του εντερικού επιθηλίου ενός, αρνητικού στην καλλιέργεια, επίμυος, ο οποίος είχε θετικούς ιστούς στην IS900-PCR. Το εύρημα αυτό, πολύ πιθανόν, υποδεικνύει λοίμωξη και όχι απλό «πέραςμα» του MAP από τον εντερικό σωλήνα, λόγω πρόσφατης κατανάλωσης μολυσμένων υλικών. Οι Beard et al. (2001a), επίσης,

είχαν διαπιστώσει την παρουσία OB μέσα σε πολυάριθμα μακροφάγα σε έναν, θετικό στην καλλιέργεια, μυ του δάσους. Η διαφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ της καλλιέργειας και της ιστοπαθολογικής εξέτασης έχει επισημανθεί και από άλλους συγγραφείς (Beard et al., 2001a; Corn et al., 2005). Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί και σε πειραματικά μολυσμένους μύες και επίμυες, που δεν εμφάνιζαν σταθερά κλινικά συμπτώματα και ιστοπαθολογικά ευρήματα (Harris and Barletta, 2001).

Οι Stevenson et al. (2002) που τυποποίησαν με IS1311 PCR-REA μια μεγάλη ποικιλία στελεχών από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, βρήκαν ότι όλα ήταν C ή τύπου II στελέχη. Στην παρούσα μελέτη όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από άγρια ζώα, πλην ενός, άνηκαν στο C τύπο. Το στέλεχος που κατατάχθηκε στον S τύπο προερχόταν από έναν μυ. Μέχρι σήμερα, αυτή είναι η πρώτη αναφορά απομόνωσης στελέχους MAP S τύπου από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι τα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας είναι πιθανό να μολύνονται και με τους δύο τύπους MAP. Ο συγκεκριμένος μυς αιχμαλωτίστηκε μέσα στο χώρο στέγασης ενός κοπαδιού, από το οποίο απομονώθηκαν μόνο C τύπου στελέχη από τα πρόβατα και τις αίγες. Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδηλώνει, είτε ότι τα πρωτόκολλα δειγματοληψίας και καλλιέργειας απέτυχαν να απομονώσουν S τύπου στελέχη, είτε ότι ο μυς μολύνθηκε με το συγκεκριμένο στέλεχος κάπου αλλού. Προφανώς, το τελευταίο έχει μεγαλύτερη επιδημιολογική σημασία. Οι Whittington et al. (2003) ανέφεραν ότι η απομόνωση του MAP από περιβαλλοντικά δείγματα σε εκτροφές προβάτων και αιγών στη Νέα Ζηλανδία ήταν πολύ χαμηλή 5 μήνες μετά την απομάκρυνση του μολυσμένου ζωικού κεφαλαίου, αλλά είδη της μολυσμένης άγριας πανίδας με μεγαλύτερους χρόνους ζωής, όπως είναι οι μύες, οι επίμυες, οι λαγοί και οι αλεπούδες, είναι πιθανό να συνεχίζουν την απέκκριση του μικροοργανισμού και για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 5 μηνών.

Οι Haydon et al. (2002) ανέφεραν ότι ο γενετικός χαρακτηρισμός παθογόνων παραγόντων που απομονώθηκαν από διαφορετικούς πληθυσμούς, αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση μιας πιθανής δεξαμενής ενός μικροοργανισμού. Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν ότι ως δεξαμενή θα πρέπει να οριστεί ένας ή περισσότεροι επιδημιολογικά συνδεδεμένοι πληθυσμοί ή περιβάλλοντα, στα οποία ο παθογόνος παράγοντας μπορεί να διατηρηθεί μόνιμα και να μεταφέρει τη μόλυνση στον καθορισμένο πληθυσμό στόχο. Ο ζωικός πληθυσμός μέσα σε μια δεξαμενή μπορεί να περιλαμβάνει διαφορετικά είδη τα οποία να συνδέονται άμεσα ή έμμεσα μεταξύ τους. Στη Σκωτία, τα αγριοκούνελα θεωρήθηκαν αρχικά ύποπτα ως δεξαμενή συντήρησης και μετάδοσης της παραφυματίωσης στα βοοειδή (Judge et al., 2005, 2006), επειδή δεν υπήρχε διαφορά στα στελέχη που απομονώθηκαν από αγριοκούνελα και βοοειδή από την ίδια ή διαφορετικές εκτροφές, όταν τυποποιήθηκαν γενετικά με RFLP και PFGE (Greig et al., 1999). Η υποψία αυτή αργότερα επιβεβαιώθηκε με το γενετικό χαρακτηρισμό των στελεχών. Τα περισσότερα από τα στελέχη που απομονώσαμε από την άγρια πανίδα και τα κοπάδια προβάτων και αιγών άνηκαν στον C τύπο. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η πλειοψηφία των στελεχών της άγριας πανίδας άνηκαν στον ίδιο γενετικό τύπο με τα στελέχη των προβάτων και των αιγών από το ίδιο κοπάδι. Τα στελέχη από την αλεπού και το λαγό, επίσης, άνηκαν στον κυρίαρχο, μεταξύ των στελεχών των προβάτων και των αιγών, C τύπο. Τα τρωκτικά πιθανόν μολύνθηκαν με το MAP τρώγοντας πεσμένα στο έδαφος των χώρων σταβλισμού τροφή που είχε ανακατευτεί με μολυσμένα κόπρανα των μικρών μηρυκαστικών. Η αλεπού πιθανόν μολύνθηκε τρώγοντας μολυσμένα θηράματα, όπως τρωκτικά και λαγούς. Τα ευρήματα αυτά

υποδεικνύουν ότι είναι πιθανό να έχει συμβεί μετάδοση του MAP μεταξύ των διαφορετικών ειδών και ότι τα τρωκτικά, οι αλεπούδες, οι λαγοί και το περιβάλλον διαβίωσής τους πιθανόν συμμετέχουν σε ένα περίπλοκο σύστημα διατήρησης της μόλυνσης από MAP των μικρών μηρυκαστικών. Οι Daniels et al. (2001, 2003) ανέφεραν ότι στη Σκοτία μολυσμένα με MAP αγριοκούνελα απέκριναν έως και 4 εκατομμύρια CFU/γραμμάριο κοπράνων, μία ποσότητα η οποία ήταν ικανή να αποτελέσει μολύνουσα δόση για τα βοοειδή. Επίσης διαπίστωσαν ότι τα βοοειδή δεν απέφευγαν, κατά τη βόσκηση, την κατανάλωση κοπράνων αγριοκούνελων. Επειδή η συμπεριφορά βόσκησης των προβάτων και των αιγών είναι διαφορετική από εκείνη των βοοειδών, απαιτούνται περισσότερες μελέτες που να συσχετίζουν τη συμπεριφορά τους και την παθογένεια του MAP στην άγρια πανίδα, έτσι ώστε να διευκρινιστεί αν τα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας συνιστούν σοβαρή απειλή για τη μόλυνση των μικρών μηρυκαστικών. Πιθανώς, η άγρια πανίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία της μόλυνσης από MAP σε εκτροφές που έχουν εκριζώσει την παραφυματίωση ή σε απαλλαγμένες από το MAP εκτροφές εντός γεωγραφικών περιοχών με άλλες προσβεβλημένες εκτροφές.

Απομονώσαμε και τους δύο τύπους MAP από τα κόπρανα μίας αίγας. Σύμμεικτες λοιμώξεις με στελέχη MAP, που άνηκαν σε διαφορετικούς RFLP τύπους έχουν αναφερθεί σε μία αγελάδα (Pavlik et al., 1995). Επίσης, οι Corn et al. (2005) απομόνωσαν στελέχη, που άνηκαν σε τρεις διαφορετικούς γενότυπους βραχέων ακολουθιών, από έναν αρμαδίλλο, καθώς και στελέχη, που άνηκαν σε δύο διαφορετικούς γενότυπους, από μία γάτα. Στην παρούσα μελέτη, η αίγα άνηκε σε ένα κοπάδι που ήταν μολυσμένο μόνο με στελέχη C τύπου. Η αίγα αυτή μπορεί να είχε μολυνθεί από το συγκεκριμένο στέλεχος κάπου αλλού, καθώς η συγκεκριμένη εκτροφή δεν ακολουθούσε κλειστό σύστημα διαχείρισης, ή να μολύνθηκε κατά τη βόσκηση σε κοινούς λειμώνες με άλλα κοπάδια, οπότε υπήρχε η δυνατότητα ανταλλαγής στελεχών μεταξύ διαφορετικών κοπαδιών. Φυσικά, είναι επίσης πιθανό ότι στο συγκεκριμένο κοπάδι, καθώς επίσης και στα υπόλοιπα τρία, υπήρχαν και οι δύο τύποι MAP, αλλά υποεκτιμήσαμε το ποσοστό προσβολής από στελέχη S τύπου επειδή: (1) καλλιεργούνται πολύ δύσκολα και υπάρχουν πολλές διαφωνίες όσον αφορά το κατάλληλο για την απομόνωσή τους καλλιεργητικό υπόστρωμα (Whittington et al., 1999; de Juan et al., 2006) και (2) τα καθιερωμένα πρωτόκολλα για την αποφυγή επιμολύνσεων των καλλιεργειών μειώνουν τον αριθμό των στελεχών S τύπου που απομονώνονται (Reddacliff et al., 2003).

Συμπερασματικά, προσπαθήσαμε να απομονώσουμε MAP από ένα μεγάλο εύρος αγρίων ειδών που ζούσαν σε εκτροφές προβάτων και αιγών. Τέσσερα διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας (μύες, επίμυες, αλεπούδες και λαγοί), καθώς και τα κατοικίδια μικρά μηρυκαστικά που έρχονταν σε επαφή με αυτά βρέθηκαν μολυσμένα με τον μικροοργανισμό. Οι μύες ήταν μολυσμένοι και με τους δύο τύπους MAP, ενώ τα υπόλοιπα άγρια είδη μόνο με το C τύπο. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά απομόνωσης στελεχούς MAP S τύπου από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας. Οι τύποι MAP που απομονώθηκαν από τα πρόβατα και τις αίγες των εκτροφών απομονώθηκαν και από τα τρωκτικά που συμβιούσαν στα ίδια κοπάδια. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι, πιθανώς, έχει συμβεί μετάδοση του MAP μεταξύ διαφορετικών ειδών και ενισχύουν την πιθανότητα η άγρια πανίδα να παίζει κάποιο ρόλο στην επιδημιολογία της παραφυματίωσης των προβάτων και των αιγών. Είναι γεγονός ότι απαιτούνται περισσότερες μελέτες που να αφορούν τη συμπεριφορά βόσκησης των προβάτων και των αιγών, καθώς και την παθογένεια του MAP στην άγρια πανίδα, προκειμένου να διευκρινιστεί αν τα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας αποτελούν πραγματική απειλή για τη μόλυνση των μικρών μηρυκαστικών.

Ωστόσο τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η άγρια πανίδα μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία της μόλυνσης από MAP, σε εκτροφές που έχουν εκριζώσει την παραφυματίωση ή σε απαλλαγμένες από το MAP εκτροφές εντός γεωγραφικών περιοχών με άλλες προσβεβλημένες εκτροφές.

## 2.6 Βιβλιογραφία

1. Alvarez, J., de Juan, L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Mateos, A., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet. Rec.* 156, 212-213.
2. Angus, K.W., 1990. Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Pathol.* 103, 101-105.
3. 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.
4. Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
5. Beard, P.M., Rhind, S.M., Buxton, D., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Greig, A., Hutchings, M.R., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001b. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J. Comp. Pathol.* 124, 290–299.
6. Buergelt, C.D., Layton, A.W., Ginn, P.E., Taylor, M., King, J.M., Habecker, P.L., Mauldin, E., Whitlock, R., Rossiter, C., Collins, M.T., 2000. The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol.* 37, 428-438.
7. Chiodini, R.J., Vankruiningen, H.J., 1983. Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 168–169.
8. Collins, D.M., Cavaignac, S., de Lisle, G.W., 1997. Use of four DNA insertion Sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes.* 11, 373-380.
9. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
10. 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.
11. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184-19016.
12. Daniels, M.J., Ball, N., Hutchings, M.R., Greig, A., 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161, 306-313.
13. Daniels, M.J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J.M., Hutchings, M.R., 2003. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol. Infect.* 130, 553-559.
14. de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L., 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927-5932.



15. Delisle, G.W., Yates, G.R., Collins, D.M., 1993. Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 567–571.
16. Deutz, A., Spergser, J., Wagner, P., Rosengarten, R., Kofer, J., 2005. (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild animal species and cattle in Styria/Austria) *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 118, 314-320.
17. Dimarelli, Z., Xenos, G., Argyroudis, S., Papadopoulos, O., 1991. A survey of ovine and caprine paratuberculosis in the Thessaloniki area, Greece. *Paratuberculosis Newsletter.* 3, 8-9.
18. 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.
19. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E. 2nd, McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
20. Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol Rev.* 14, 489-512.
21. Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468-1473. Review.
22. Jessup, D.A., Abbas, B., Behymer, D., Gogan, P., 1981. Para-tuberculosis in tule elk in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 1252–1254.
23. Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Allcroft, D.J., Hutchings, M.R., 2005. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6033-6038.
24. 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.
25. Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzliková, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagy, G., Lipiec, M., Ocepek, M., Pavlik I., 2003. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Vet. Med.* 48, 51-65.
26. Marsh, I., Whittington, R., Cousins, D., 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell. Probes.* 13, 115-126.
27. Mathews, P.R.J., Sargent, A., 1977. The isolation of mycobacteria from the brown hare (*Lepus europaeus*). *Br. Vet. J.* 133, 399-404
28. 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.
29. 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.
30. Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., Rychlik, I., 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism

- analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods. 38, 155–167.
31. Raizman, E.A., Wells, S.J., Jordan, P.A., DelGiudice, G.D., Bey, R.R., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. Can. J. Vet. Res. 69, 32-38.
  32. 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.
  33. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 40, 1798-1804.
  34. Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. Proceedings of the 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the USAHA, pp. 280-285.
  35. Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. Mol. Cel. Prob. 12, 349-358.
  36. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. J. Clin. Microbiol. 37, 1077–1083.
  37. Whittington, R.J., Marsh, I.B., Taylor, P.J., Marshall, D.J., Taragel, C., Reddacliff, L.A., 2003. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. Aust Vet J. 81, 559-63
  38. Williams, E.S., Spraker, T.R., Schoonveld, G.G., 1979. Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado. J. Wildl. Dis. 15, 221–227

## *Κεφάλαιο 3*

**Γενετική σύγκριση στελεχών *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* που απομονώθηκαν από ελληνικά πρόβατα και αίγες, από την τροφή και τη στρωμή τους, καθώς και από συσχετιζόμενα με αυτά μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας.**

*Έχει υποβληθεί για δημοσίευση στο περιοδικό *Epidemiology and Infection**

### 3.1 Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η γενετική σύγκριση στελεχών *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) που απομονώθηκαν από ελληνικά πρόβατα και αίγες, από την τροφή και τη στρωμή τους, καθώς και από συσχετιζόμενα με αυτά μονογοναστρικά είδη της άγριας πανίδας. Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν και συγκρίθηκαν γενετικά με τη μέθοδο της IS1311 αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR) ακολουθούμενη από ανάλυση περιορισμού ενδονουκλεασών (restriction endonuclease analysis - REA) και με προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900. Καλλιεργήσαμε και εξετάσαμε με PCR, για την ανίχνευση της ειδικής για το MAP ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900, ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από 327 άγρια ζώα, που προέρχονταν από 11 διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας, τα οποία είχαν αιχμαλωτιστεί ή βρεθεί νεκρά στους στάβλους ή στους βοσκότοπους τεσσάρων ελληνικών κοπαδιών προβάτων και αιγών, ενδημικά μολυσμένων με MAP. Επίσης, από κάθε κοπάδι, καλλιεργήθηκαν 60 δείγματα στρωμνής, 15 δείγματα τροφής καθώς και δείγματα κοπράνων από 100 πρόβατα και αίγες. Επιπλέον, καλλιεργήθηκαν και εξετάστηκαν με IS900-PCR ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από τον εντερικό σωλήνα και τους επιχώριους λεμφαδένες 142 προβάτων και 72 αιγών, που είχαν συλλεχθεί σε τρία σφαγεία, τα οποία έσφαζαν πρόβατα και αίγες από την ευρύτερη περιοχή των υπό διερεύνηση εκτροφών. Το MAP ανιχνεύτηκε σε 1 δείγμα στρωμνής, σε 1 δείγμα τροφής, καθώς και στα δείγματα 6 αγρίων ζώων και 33 μικρών μηρυκαστικών. Η IS1311 PCR-REA κατηγοριοποίησε 25 στελέχη MAP σε βόειο και 10 σε πρόβειο τύπο. Γενικά, τα στελέχη των τρωκτικών, της στρωμνής και της τροφής άνηκαν στον ίδιο τύπο MAP με εκείνα των κατοικίδιων μηρυκαστικών, που απομονώθηκαν από το ίδιο κοπάδι. Ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA και η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 ομαδοποίησε 19 στελέχη MAP ανάλογα με την περιοχή της δειγματοληψίας και έδειξε ότι, πιθανώς, είχε συμβεί μετάδοση των στελεχών μεταξύ της άγριας πανίδας, των προβάτων και των αιγών.

## 3.2 Εισαγωγή

Παρά το γεγονός ότι πολλά σημαντικά νοσήματα των ανθρώπων, των κατοικίδιων ζώων και των πληθυσμών της άγριας πανίδας πιστεύεται ότι συντηρούνται σε ξενιστές-δεξαμενές (Daszak et al., 2000), αυτές οι δεξαμενές σπάνια ορίζονται και αναγνωρίζονται. Οι Haydon et al. (2002) όρισαν τη δεξαμενή ως έναν ή περισσότερους επιδημιολογικά συσχετιζόμενους πληθυσμούς ή περιβάλλοντα, στα οποία ο παθογόνος οργανισμός μπορεί να διατηρηθεί και από τον οποίο η μόλυνση μπορεί να μεταδοθεί στον καθορισμένο πληθυσμό στόχο. Τόνισαν ότι οι δεξαμενές μπορούν να αναγνωριστούν μόνο όταν αναφέρονται σε καθορισμένους πληθυσμούς στόχους και ότι ο γενετικός χαρακτηρισμός παθογόνων παραγόντων που απομονώθηκαν από διαφορετικούς πληθυσμούς και το περιβάλλον τους, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση των δεξαμενών.

Παρόλο που το *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) έχει απομονωθεί από πολλά είδη άγριων μονογαστρικών (Beard et al., 2001; Corn et al., 2005; Anderson et al., 2007), ο πιθανός ρόλος των ειδών αυτών ως δεξαμενής του μικροοργανισμού παραμένει αδιευκρίνιστος. Γενικά, υπάρχει έλλειψη μελετών που να αφορούν τη γενετική σύγκριση στελεχών MAP που απομονώθηκαν από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας με εκείνα, καλά καθορισμένων και επιδημιολογικά σχετιζόμενων με την άγρια πανίδα, ζωικών πληθυσμών. Οι Greig et al. (1997, 1999) χρησιμοποίησαν για την τυποποίηση στελεχών MAP IS900-πολυμορφισμό περιορισμού μήκους θραυσμάτων [IS900-restriction fragment length polymorphism (IS900-RFLP)] και ηλεκτροφόρηση πηκτώματος παλμικού πεδίου [Pulse field gel electrophoresis (PFGE)] και δεν βρήκαν διαφορές μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από αγριοκούνελα και από βοοειδή, με τα οποία έρχονταν σε επαφή. Οι Palmer et al. (2005) έδειξαν ότι τα στελέχη MAP που απομονώθηκαν από αγριόγατες και βοοειδή σε γαλακτοπαραγωγικές εκτροφές στις ΗΠΑ άνηκαν στον ίδιο RFLP τύπο.

Δεν υπάρχουν παρόμοιες μελέτες που να αφορούν τα πρόβατα ή/και τις αίγες και τα μονογαστρικά άγρια ζώα. Καθώς η παθογένεια της παραφυματίωσης των προβάτων και των αιγών είναι διαφορετική από εκείνη των βοοειδών (Clarke and Little, 1996; Clarke, 1997; Corpa et al., 2000; Tafti and Rashidi, 2000) και καθώς τα μικρά μηρυκαστικά πιθανώς μολύνονται από διαφορετικά στελέχη MAP σε σχέση με τα βοοειδή (Collins et al., 1990; Stevenson et al., 2002), τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν βοοειδή δεν θα πρέπει να επεκτείνονται στα πρόβατα και τις αίγες. Για το λόγο αυτό, σχεδιάσαμε μια μελέτη για να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο, για την παραφυματίωση των προβάτων και των αιγών, κάποιων μονογαστρικών αγρίων ειδών, που ζουν στους στάβλους και στους λειμώνες ενός πληθυσμού ελληνικών προβάτων και αιγών, ενδημικά μολυσμένων με παραφυματίωση (Florou et al., 2007). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να συγκρίνουμε γενετικά στελέχη MAP που απομονώθηκαν από πρόβατα και αίγες, την τροφή και τη στρωμή τους και από μονογαστρικά άγρια ζώα με τα οποία έρχονταν σε επαφή. Ο γενετικός χαρακτηρισμός των στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της IS1311 αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR) ακολουθούμενη από ανάλυση περιορισμού ενδονουκλεασών (restriction endonuclease analysis - REA) και με προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900. Ενώ η IS1311 PCR-REA έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη διάκριση των στελεχών στους δύο κύριους τύπους MAP (Marsh et al., 1999), ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA και η φυλογενετική ανάλυση

των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τη σύγκριση στελεχών MAP.

### 3.3 Υλικά και μέθοδοι

#### 3.3.1 Πληθυσμός της μελέτης - Δειγματοληψία

Επιλέχθηκαν τέσσερις εκτροφές προβάτων και αιγών της κεντρικής Ελλάδας (γεωγραφικό μήκος: +39° 22', γεωγραφικό πλάτος: +22° 00'), οι οποίες απείχαν μεταξύ τους τουλάχιστον 10 χιλιόμετρα και κυμαίνονταν σε μέγεθος από 250 έως 350 ζώα. Το ένα από τα κοπάδια αποτελείτο από πρόβατα, το άλλο από αίγες και τα υπόλοιπα δύο ήταν μεικτά, με αναλογία προβάτων-αιγών, το ένα 60-40% και το άλλο 40-60%. Για την πραγματοποίηση της μελέτης τα κοπάδια ήταν υπό εντατική παρακολούθηση για χρονικό διάστημα 2 ετών. Δύο από τους συγγραφείς (ΠΚ και ΜΦ) επισκέπτονταν τους στάβλους για την ανίχνευση και συλλογή αγρίων ζώων, τα οποία αιχμαλωτίστηκαν ή βρέθηκαν νεκρά, είτε μέσα στους στάβλους, είτε στους λειμώνες βόσκησης των κοπαδιών (Πίνακας 1). Οι λεπτομέρειες για τη γενική διαχείριση, καθώς και οι τεχνικές δειγματοληψίας και επεξεργασίας των δειγμάτων έχουν ήδη περιγραφεί (Kostoulas et al., 2006; Florou et al., 2007). Εκτός από τα δείγματα των ζώων, συλλέχθηκαν από κάθε κοπάδι, με τη χρήση τετραγωνικής δειγματοληψίας, 60 δείγματα στρωμνής. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν από κάθε κοπάδι 15 δείγματα συμπυκνωμένης ζωοτροφής, περίπου 10gr το κάθε ένα. Πολλά από τα δείγματα ζωοτροφής ήταν επιμολυσμένα με κόπρανα τρωκτικών.

Τα άγρια ζώα που είχαν αιχμαλωτιστεί ευθανατώθηκαν με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων. Σε όλα τα ζώα πραγματοποιήθηκε πλήρης νεκροψία, κατά τη διάρκεια της οποίας συλλέχθηκαν, για κάθε ζώο ξεχωριστά, τα τελευταία τμήματα του δωδεκαδακτύλου και του ειλεού, τα πρώτα τμήματα του τυφλού και του κόλου, οι ειλεοτυφλικοί και οι κολικοί λεμφαδένες και το ήπαρ, που, ακολούθως, ομογενοποιήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε στείρους περιέκτες και διατηρήθηκαν στους -20°C για καλλιέργεια και IS900-PCR.

Καθώς πολλά από τα άγρια είδη που εξετάστηκαν είχαν βρεθεί νεκρά ή είχαν πυροβοληθεί από κυνηγούς (αλεπούδες, λαγοί, ασβοί, καρακάξες, ένας λύκος, μία νυφίτσα, ένα γεράκι και μία κουκουβάγια) στους λειμώνες όπου τα πρόβατα και οι αίγες της μελέτης έβοσκαν μαζί με γειτονικά κοπάδια, συλλέχθηκαν, επίσης, δείγματα από πρόβατα και αίγες που είχαν οδηγηθεί προς σφαγή σε τρία τοπικά σφαγεία, τα οποία δέχονταν ζώα από την περιοχή των τεσσάρων κοπαδιών. Για χρονικό διάστημα έξι μηνών δύο από τους συγγραφείς (ΜΦ και ΠΚ) επισκέπτονταν τα σφαγεία κάθε δύο εβδομάδες και, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, επιθεωρούσαν οπτικά τον εντερικό σωλήνα και τους επιχώριους λεμφαδένες όλων των σφαγίων για αλλοιώσεις ενδεικτικές της παραφυματίωσης. Συλλέχθηκαν όσα θεωρήθηκαν ύποπτα για τη νόσο, δηλαδή συνολικά οι εντερικοί σωλήνες και οι λεμφαδένες 142 προβάτων και 72 αιγών. Η περαιτέρω συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων από τους εντερικούς σωλήνες των προβάτων και των αιγών ήταν παρόμοια με εκείνη των αγρίων ζώων.

**Πίνακας 1.** Τα είδη της άγριας πανίδας που αιχμαλωτίστηκαν (τροκτικά), συλλέχθηκαν από κυνηγούς (λαγοί) ή βρέθηκαν νεκρά, από το Σεπτέμβριο του 2001 έως τον Ιούνιο του 2003, στους χώρους σταβλισμού ή στους βοσκότοπους τεσσάρων ελληνικών κοπαδιών προβάτων και αιγών, ενδημικά μολυσμένων με *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP).

Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Αριθμός ζώων
Οικιακός μυσ	<i>Mus musculus</i>	149
Επίμυς	<i>Rattus rattus</i>	55
Καρακάξα	<i>Pica pica</i>	30
Σπουργίτι	<i>Passer domesticus</i>	32
Ευρωπαϊκός καφέ λαγός	<i>Lepus europaeus</i>	44
Αλεπού	<i>Vulpes vulpes</i>	10
Ασβός	<i>Meles meles</i>	3
Λύκος	<i>Canis lupus</i>	1
Νυφίτσα	<i>Mustela nivalis</i>	1
Γεράκι	<i>Accipiter nissus</i>	1
Κουκουβάγια	<i>Asio otus</i>	1
Σύνολο		327

### 3.3.2 Καλλιέργεια, μέθοδοι PCR και ανάλυσης περιορισμού ενδονουκλεασών (REA)

Όλα τα δείγματα καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα Lowenstein-Jensen (LJ) και Herrold's Egg-Yolk (HEYM) όπως περιγράφηκε σε πρόσφατες μελέτες (Whitlock and Rosenberger, 1990; Greig et al., 1999; Florou et al., 2007). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν τουλάχιστον για 7 μήνες, στους 37°C και ελέγχθηκαν για ανάπτυξη αποικιών, τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 8<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 16<sup>η</sup>, 20<sup>η</sup>, 24<sup>η</sup> και την 30<sup>η</sup> εβδομάδα.

Οι διαδικασίες εκχύλισης του DNA του MAP ήταν πανομοιότυπες για τις μεθόδους PCR για την ανίχνευση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών IS900, IS1311 και IS1245. Η εκχύλιση του DNA από τους ομογενοποιημένους ιστούς και από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο LJ, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Genomic DNA Purification Kit (Puregene, Minneapolis, MN, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την εκχύλιση του DNA από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο HEYM, 1-2 αποικίες μεταφέρθηκαν, λαμβάνοντας μέριμνα ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά τεμαχίων του υποστρώματος, σε στείρους περιέκτες χωρητικότητας 1,5ml, οι οποίοι περιείχαν 100μl αποστειρωμένου νερού. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα ανακινήθηκε για 1 λεπτό σε αναμίκτη vortex (IKA-Works Inc. Wilmington, NC, USA), τοποθετήθηκε στους 100°C για 30 λεπτά, με σκοπό τη λύση των βακτηρίων, και φυγοκεντρήθηκε στις 14000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο στείρο περιέκτη χωρητικότητας 1,5ml και το σχηματισθέν ίζημα απορρίφθηκε. Τα δείγματα DNA τοποθετούνταν στους 4°C, εφόσον εξετάζονταν άμεσα, ή αποθηκεύονταν στους -20°C.

Το DNA που προέκυψε μετά τη διαδικασία εκχύλισης από τις καλλιέργειες και τα δείγματα ιστών εξετάστηκε με PCR για την ανίχνευση της, ειδικής για το MAP, ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900. Τα IS900-θετικά δείγματα υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε IS1311 PCR, ακολουθούμενη από REA με το ένζυμο *Hinf*I, και σε IS1245 PCR. Η IS1311 PCR-REA έγινε για τη διάκριση των στελεχών του MAP σε βόειο (cattle-C) και σε πρόβειο (sheep-S) τύπο. Η IS1245-PCR εφαρμόστηκε για την ανίχνευση του *Mycobacterium avium* subspecies *avium* (*M.*



*avium*). Τα εκκινητικά μόρια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε PCR, δίνονται στον Πίνακα 2. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα (Millar et al., 1995; Marsh et al., 1999; Florou et al., 2007). Ένα δείγμα θεωρούνταν θετικό όταν το μέγεθος του προϊόντος της PCR ήταν ίδιο με εκείνο του DNA μάρτυρα μοριακού βάρους, δηλαδή 414bp για την IS900-PCR, 268bp για την IS1311-PCR και 198bp για την IS1245-PCR.

Οι αντιδράσεις για τη REA πραγματοποιήθηκαν όπως είχε περιγραφεί νωρίτερα από τους Marsh et al. (1999). Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της REA ήταν 268, 218 και 50bp για το πρότυπο περιορισμού του C τύπου και 268bp για το πρότυπο περιορισμού του S τύπου.

**Πίνακας 2.** Στόχος, ειδικότητα και αλληλουχίες των μορίων εκκινητών για την IS900-, την IS1311- και την IS1245-PCR; Οι σχετικές αναφορές βρίσκονται στις παρενθέσεις. Η IS900-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της ένθετης αλληλουχίας που είναι ειδική για το MAP, η IS1311-PCR, ακολουθούμενη από REA, για τη διάκριση των στελεχών σε S και C τύπο, ενώ η IS1245-PCR για την ανίχνευση της ένθετης αλληλουχίας που απαντάται μόνο στο *M. avium*.

Στόχος PCR	Ειδικότητα	Μόρια εκκινητών	Αλληλουχία (5'-3')	Αναφορά
IS900	MAP	P90	GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG	(Millar et al., 1995)
		P91	GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC	(Millar et al., 1995)
IS1311	MAP	M56	GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA	(Marsh et al., 1999)
	<i>M. avium</i>	M94	CAG CGA TCG TCG ACA GTG TG	(Marsh et al., 1999)
IS1245	<i>M. avium</i>	M114	CTC GAC GCA CTG CGC ACC	(Collins et al., 1997)
		M115	CCG CAG TTC CAG GTC CCC T	(Collins et al., 1997)

### 3.3.3 Προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900

Για να διευκρινιστεί η γενετική ετερογένεια των στελεχών MAP όλα τα προϊόντα της IS900-PCR (414bp) καθαρίστηκαν από την αγαρόζη (Qiaquick Gel Extraction kit ; Qiagen, West Sussex, UK) και στάλθηκαν στην MWG Biotech (Ebersberg, Germany) για τον προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA και προς τις δυο κατευθύνσεις, χρησιμοποιώντας τους πρόσθιους και τους αντίστροφους εκκινητές. Σε 23 στελέχη, ο προσδιορισμός της σημειακής ακολουθίας του DNA πραγματοποιήθηκε σε 178 nt από ένα προϊόν PCR μεγέθους 414bp της περιοχής που κωδικοποιεί την ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS900. Η ανάλυση κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε δύο φορές και χρησιμοποιήθηκαν μόνο υψηλής ποιότητας αλληλουχίες. Η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν σε 178 nt της περιοχής που κωδικοποιεί την IS900 με τη χρήση του λογισμικού MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Για την

αποσαφήνιση της εξελικτικής ιστορίας 19 ελληνικών στελεχών MAP χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Neighbor-Joining, ενώ οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της μεγίστης σύνθετης πιθανοφάνειας. Τα ποσοστά των επαναληπτικών φυλογενετικών δέντρων στα οποία οι σχετιζόμενες ομάδες ταξινόμησης κατατάχθηκαν μαζί στις αυτοδύναμες δοκιμές (1000 επαναλήψεων) εμφανίζονται δίπλα από τους κλάδους (Εικόνα 1).

### 3.4 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας και της IS900-PCR φαίνονται στον Πίνακα 3. Ένα δείγμα στρωμνής, ένα δείγμα ζωοτροφής, καθώς και τα δείγματα 5 αγρίων ζώων και 33 μικρών μηρυκαστικών ήταν θετικά στην καλλιέργεια. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από 4 πρόβατα, 6 αίγες και 2 μύες καλλιεργήθηκαν μόνο στο LJ, ενώ τα υπόλοιπα μόνο στο HEYM. Ένα μόνο δείγμα κοπράνων από μία αίγα ήταν θετικό και με τις δύο μεθόδους. Όλα τα στελέχη ενοφθαλμίστηκαν ξανά σε HEYM, αλλά μόνο αυτά που είχαν αρχικά αναπτυχθεί σε HEYM επανακαλλιεργήθηκαν. Όλα τα στελέχη ήταν θετικά για την ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS900. Η IS900 ανιχνεύθηκε επίσης στους ομογενοποιημένους ιστούς 3 προβάτων και 7 αιγών, θετικών στην καλλιέργεια και ενός, αρνητικού στην καλλιέργεια, επίμυος (Πίνακας 3).

Τα αποτελέσματα της IS1311 PCR-REA εμφανίζονται στον Πίνακα 4. Η IS1311 PCR-REA κατηγοριοποίησε 25 στελέχη σε C και 10 στελέχη σε S τύπο. Επτά στελέχη δεν τυποποιήθηκαν, πιθανώς λόγω ανεπαρκούς ποσότητας DNA. Στο κοπάδι 1 τα στελέχη που απομονώθηκαν προέρχονταν από δύο πρόβατα, μία αίγα, έναν επίμυ, έναν μυ και ένα δείγμα ζωοτροφής και άνηκαν στο C τύπο. Στο κοπάδι 2 που αποτελείτο μόνο από αίγες, 3 αίγες και ένα δείγμα στρωμνής βρέθηκαν ότι είχαν μολυνθεί με C τύπου στελέχη, ενώ από μία αίγα, η οποία ήταν θετική και στα δύο καλλιεργητικά υποστρώματα, απομονώθηκαν και οι δύο τύποι MAP. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το κοπάδι 3 που αποτελείτο μόνο από πρόβατα, προέρχονταν από 4 πρόβατα και έναν επίμυ και άνηκαν στο C τύπο. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το κοπάδι 4, προέρχονταν από τέσσερις αίγες, ένα πρόβατο και έναν μυ. Το τελευταίο ήταν S τύπου, ενώ τα υπόλοιπα κατηγοριοποιήθηκαν ως C στελέχη. Τα στελέχη από την αλεπού και το λαγό τυποποιήθηκαν ως C τύπου στελέχη. Τέλος τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα σφαγεία κατηγοριοποιήθηκαν ως S τύπου στελέχη, εκτός από τα στελέχη από ένα πρόβατο και μία αίγα, που άνηκαν στο C τύπο. Κανένα από τα στελέχη δεν ήταν θετικό για την, ειδική για το *M. avium*, ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS1245.

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα της καλλιέργειας δειγμάτων κοπράνων από κλινικά υγιή πρόβατα και αίγες τεσσάρων κοπαδιών, δειγμάτων της στρωμνής και της συμπυκνωμένης ζωοτροφής των και της καλλιέργειας και της IS900-PCR δειγμάτων ομογενοποιημένων ιστών από την άγρια πανίδα και από πρόβατα και αίγες από τρία σφαγεία, που δέχονταν προς σφαγή ζώα από την περιοχή των τεσσάρων κοπαδιών.

Προέλευση δείγματος (τύπος δείγματος)	Αριθμός ζώων ή δειγμάτων <sup>α</sup> θετικών στην καλλιέργεια (συνολικός αριθμός ζώων ή δειγμάτων που εξετάστηκαν)	Αριθμός ζώων με ιστούς θετικούς στην IS900-PCR
Πρόβατα (κόπρανα)	11(180)	ΔΕ <sup>β</sup>
Αίγες (κόπρανα)	12(220)	ΔΕ
Πρόβατα (ιστοί)	3(142)	3
Αίγες (ιστοί)	7(72)	7
Μυες (ιστοί)	2(149)	0
Επίμυες (ιστοί)	1(55)	1
Αλεπούδες (ιστοί)	1(10)	0
Ευρωπαϊκοί καφέ λαγοί (ιστοί)	1(44)	0
Καρακάξες (ιστοί)	0(30)	0
Σπουργίτια (ιστοί)	0(32)	0
Ασβοί (ιστοί)	0(3)	0
Λύκος (ιστοί)	0(1)	0
Νυφίτσα (ιστοί)	0(1)	0
Γεράκι (ιστοί)	0(1)	0
Κουκουβάγια (ιστοί)	0(1)	0
Δείγματα στρωμνής	1(238)	ΔΕ
Δείγματα ζωοτροφής	1(60)	ΔΕ

<sup>α</sup> μόνο για τα δείγματα στρωμνής και ζωοτροφής

<sup>β</sup> ΔΕ Δεν έγιναν

Κάθε δείγμα ομογενοποιημένων ιστών από τα πρόβατα και τις αίγες αποτελείτο από το τελευταίο τμήμα του δωδεκαδακτύλου, το πρώτο τμήμα του τυφλού και του κόλου, τους ειλεοτυφλικούς και τους κολικούς λεμφαδένες. Κάθε δείγμα ομογενοποιημένων ιστών από τα άγρια ζώα περιελάμβανε όλα τα παραπάνω τμήματα και επιπλέον το ήπαρ κάθε ζώου. Οι καλλιέργειες έγιναν σε δύο υποστρώματα, Lowenstein-Jensen και Herrold's Egg-Yolk, και τα στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως MAP με IS900-PCR. Το στέλεχος που απομονώθηκε από τα κόπρανα μιας αίγας καλλιεργήθηκε και στα δύο υποστρώματα. Όλα τα θετικά στην καλλιέργεια ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από τα πρόβατα και τις αίγες ήταν θετικά και στην απευθείας IS900-PCR, όπως επίσης και το ομογενοποιημένο δείγμα ιστών από έναν επίμυ, ο οποίος ήταν αρνητικός στην καλλιέργεια.

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα του γενετικού χαρακτηρισμού με IS1311 PCR-REA με *HinfI*, 35 στελεχών, κατηγοριοποιημένων ανάλογα με την τοποθεσία της δειγματοληψίας τους και την προέλευσή τους. Από το δείγμα κοπράνων της αίγας (από το κοπάδι 2), που ήταν θετικό και στα δύο καλλιεργητικά υποστρώματα, απομονώθηκαν και οι δύο τύποι MAP.

Τοποθεσία δειγματοληψίας (τύπος κοπαδιού)	Προέλευση των στελεχών	IS1311 PCR-REA	
		C τύπος	S τύπος
Κοπάδι 1 (μικτό)	Πρόβατα	2	ME <sup>a</sup>
	Αίγες	1	ME
	Επίμυες	1	ME
	Μύες	1	ME
	Ζωοτροφή	1	ME
Κοπάδι 2 (αίγες)	Αίγες	4	1
	Στρωμνή	1	ME
Κοπάδι 3 (πρόβατα)	Πρόβατα	4	ME
	Επίμυες	1	ME
Κοπάδι 4 (μικτό)	Πρόβατα	4	ME
	Αίγες	1	ME
	Μύες	0	1
Λειμώνες των 4 κοπαδιών	Ευρωπαϊκοί καφέ λαγοί	1	ME
	Αλεπούδες	1	ME
Σφαγεία	Πρόβατα	1	2
	Αίγες	1	6
Σύνολο		25	10

<sup>a</sup> ME: μη εφαρμοστέο

*Προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών*

Ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA σε 178nt της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 επιβεβαίωσε ότι τα 23 ελληνικά στελέχη ήταν στελέχη MAP. Οι αριθμοί εγγραφής των στελεχών στη GenBank, οι τοποθεσίες δειγματοληψίας τους, το είδος του ζώου ή του δείγματος από το οποίο απομονώθηκαν και ο τύπος MAP στον οποίο άνηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 5. Οι σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ των 10 στελεχών που απομονώθηκαν από πρόβατα και αίγες από τα σφαγεία έδειξε ότι τα 7 από αυτά ήταν πανομοιότυπα (κωδικοποιούνται ως GRE-12, GRE-15, GRE-16, GRE-20, GRE-21, GRE-22, GRE-23) με 100% μεταξύ τους νουκλεοτιδική ομολογία. Συνεπώς επιλέχθηκαν 3 από αυτά για τη φυλογενετική ανάλυση με βάση τον τύπο MAP στον οποίο άνηκαν (Πίνακας 5). Το φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 1) έδειξε ότι τα στελέχη σχημάτισαν δύο κύριες ομάδες. Η πρώτη αποτελείται από τα στελέχη των τριών πρώτων κοπαδιών, τα στελέχη των σφαγίων και αυτά της αλεπούς και του λαγού. Γενικά, μέσα στην ομάδα αυτή τα στελέχη από τα ίδια κοπάδια κατατάχθηκαν μαζί, με εξαίρεση εκείνα που απομονώθηκαν από το κοπάδι 1. Τα στελέχη του λαγού και της αλεπούς κατατάχθηκαν μαζί με στελέχη προβάτων και αιγών από τα σφαγεία. Η συνολική

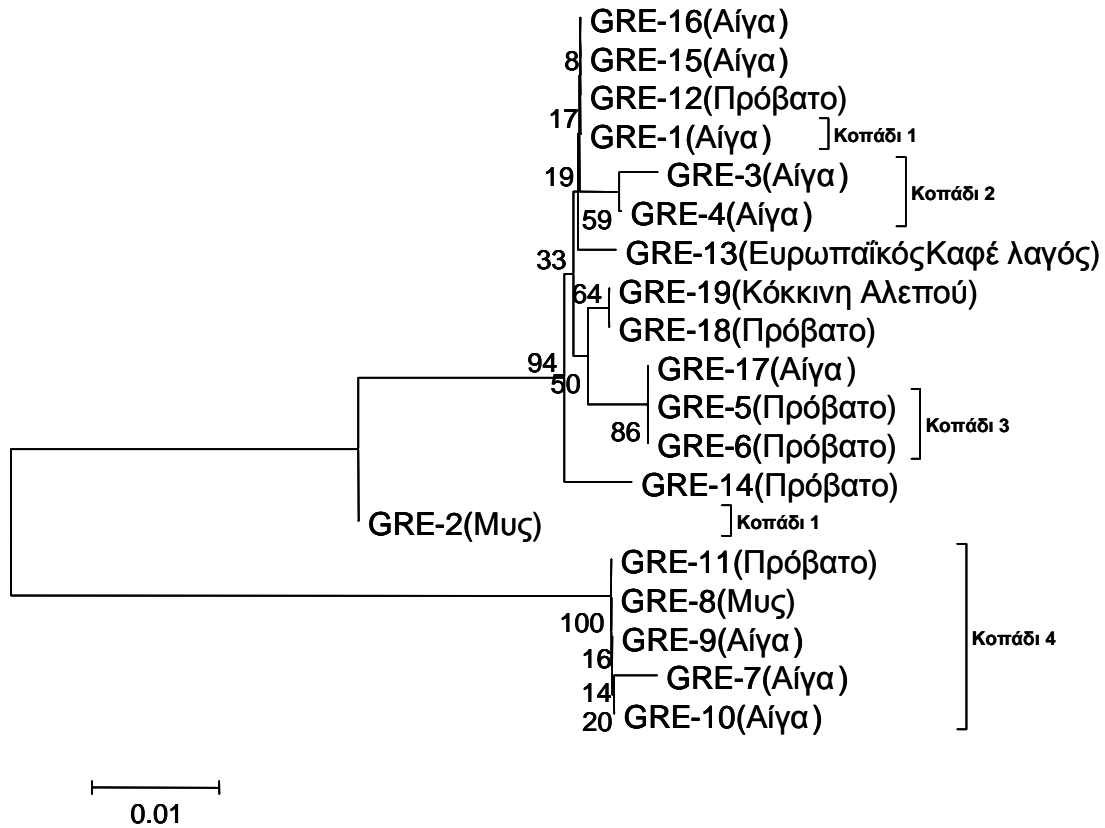
νουκλεοτιδική ομολογία των στελεχών μέσα στην ομάδα κυμαινόταν από 98 έως 100%. Η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε τα στελέχη από το κοπάδι 4 τα οποία εμφάνιζαν μεταξύ τους 100% νουκλεοτιδική ομολογία. Τα στελέχη των μονογαστρικών αγρίων ζώων δεν ομαδοποιήθηκαν ξεχωριστά και με εξαίρεση το στέλεχος του μύς από το κοπάδι 1, είχαν υψηλή ομοιότητα με τα στελέχη των προβάτων και των αιγών.

**Πίνακας 5.** Η κωδικοποίηση, οι αριθμοί εγγραφής στη GenBank, οι τοποθεσίες δειγματοληψίας, το είδος του ζώου από το οποίο απομονώθηκαν και ο τύπος MAP στον οποίο άνηκαν σύμφωνα με την IS1311 PCR-REA (C ή S) 23 στελεχών MAP, στα οποία εφαρμόστηκε προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA σε ένα τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής ακολουθίας IS900.

Κωδικός στελέχους	Αριθμός εγγραφής	Τοποθεσία δειγματοληψίας	Είδος ζώου	IS1311 PCR-REA
GRE-1	EU057153	Κοπάδι 1	Αίγα	C
GRE-2	EU057154	Κοπάδι 1	Μυς	C
GRE-3	EU057155	Κοπάδι 2	Αίγα	C
GRE-4	EU057156	Κοπάδι 2	Αίγα	C
GRE-5	EU057157	Κοπάδι 3	Πρόβατο	C
GRE-6	EU057158	Κοπάδι 3	Πρόβατο	C
GRE-7	EU057159	Κοπάδι 4	Αίγα	C
GRE-8	EU057160	Κοπάδι 4	Μυς	S
GRE-9	EU057161	Κοπάδι 4	Αίγα	C
GRE-10	EU057162	Κοπάδι 4	Αίγα	C
GRE-11	EU057163	Κοπάδι 4	Πρόβατο	C
GRE-12	EU057164	Σφαγεία	Πρόβατο	S
GRE-13	EU057165	Λειμώνες	Ευρωπαϊκός καφέ λαγός	C
GRE-14	EU057166	Σφαγεία	Πρόβατο	C
GRE-15	EU057167	Σφαγεία	Αίγα	C
GRE-16	EU057168	Σφαγεία	Αίγα	S
GRE-17	EU057169	Σφαγεία	Αίγα	S
GRE-18	EU057170	Σφαγεία	Πρόβατο	C
GRE-19	EU057171	Λειμώνες	Κόκκινη αλεπού	C
GRE-20	EU057172	Σφαγεία	Αίγα	S
GRE-21	EU057173	Σφαγεία	Αίγα	S
GRE-22	EU057174	Σφαγεία	Αίγα	S
GRE-23	EU057175	Σφαγεία	Πρόβατο	S

Επτά στελέχη από τα σφαγεία εμφάνισαν μεταξύ τους 100% νουκλεοτιδική ομολογία (GRE-12, GRE-15, GRE-16, GRE-20, GRE-21, GRE-22, GRE-23) και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα τρία πρώτα στη φυλογενετική ανάλυση, τα οποία αντιπροσώπευαν διαφορετικά ζωικά είδη και τύπους MAP.

**Εικόνα 1.** Η φυλογενετική ανάλυση 19 ελληνικών στελεχών MAP, η οποία πραγματοποιήθηκε σε 178 bp της περιοχής που κωδικοποιεί την ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS900. Οι παρενθέσεις και οι αγκύλες περιλαμβάνουν τα ζωικά είδη και τα κοπάδια, αντίστοιχα, από τα οποία απομονώθηκαν τα στελέχη. Τα υπόλοιπα στελέχη προβάτων και αιγών προέρχονται από τα σφαγεία.



### 3.5 Συζήτηση

Σε προηγούμενη μελέτη, αναφέραμε την απομόνωση του MAP από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας που ζούσαν μαζί με ενδημικά μολυσμένα πρόβατα και αίγες (Florou et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μοριακές τεχνικές με σκοπό το χαρακτηρισμό και τη σύγκριση των στελεχών που απομονώθηκαν από πρόβατα και αίγες, την τροφή και τη στρωμνή τους, καθώς και από μονογαστρικά άγρια ζώα με τα οποία έρχονται σε επαφή. Θεωρήσαμε ότι η ομοιότητα μεταξύ των στελεχών από την άγρια πανίδα, την ζωοτροφή και τη στρωμνή από τη μία και των στελεχών από τα κατοικίδια μηρυκαστικά από την άλλη, θα υποστήριζε τη θεωρία ότι, σε καθορισμένους πληθυσμούς στόχους, τα μονογαστρικά άγρια ζώα και το περιβάλλον τους μπορεί να παίζουν ρόλο ως στοιχεία μιας δεξαμενής διατήρησης του MAP (Haydon et al., 2002). Απομονώσαμε το MAP από τον πληθυσμό στόχο, ο οποίος αποτελείτο από τέσσερις ενδημικά προσβεβλημένες εκτροφές προβάτων και αιγών, καθώς και από πρόβατα και αίγες με μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης, που συλλέχθηκαν σε τρία σφαγεία τα οποία δέχονταν προς σφαγή ζώα από τις ευρύτερες περιοχές των εκτροφών. Επίσης

απομονώσαμε το MAP από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, την ζωοτροφή και τη στρωμή που είχαν συλλεχθεί από τους στάβλους των κοπαδιών.

Γενικά τα στελέχη MAP που απομονώθηκαν από την ίδια εκτροφή κατηγοριοποιήθηκαν στον ίδιο τύπο. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι σε ένα από τα κοπάδια ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από τρωκτικά, πρόβατα και αίγες και από δείγματα τροφής και τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν στον C τύπο (Πίνακας 3). Η τροφή ήταν οπτικά μολυσμένη με κόπρανα τρωκτικών και δεν είχε εκτεθεί στα πρόβατα και τις αίγες, καθώς η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε μέσα στους χώρους αποθήκευσης των τροφών. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι τα τρωκτικά απεκκρίνουν το MAP με τα κόπρανα και επιμολύνουν την τροφή των μηρυκαστικών. Οι Beard et al. (2001) επίσης απομόνωσαν το MAP από κόπρανα ποντικών του δάσους. Η απομόνωση του MAP από κόπρανα άλλων μονογαστρικών αγρίων ειδών όπως οπόσουμ, αρμαδύλους, αγριόγατες, ρακούν, νυφίτσες και σαρκοφάγα πτηνά έχει αναφερθεί (Corn et al., 2005; Beard et al., 2001). Στη Σκοτία έχει διαπιστωθεί ότι τα αγριοκούνελα αποτελούν πραγματική απειλή για τη μόλυνση των βοοειδών, καθώς βρέθηκε ότι απέκριναν έως και 4 εκατομμύρια CFU/γραμμάριο κοπράνων, μία ποσότητα η οποία ήταν ικανή να αποτελέσει μολύνουσα δόση για τα βοοειδή (Daniels et al., 2001, 2003). Σε ένα άλλο κοπάδι της παρούσας μελέτης στελέχη MAP C τύπου απομονώθηκαν από αίγες και από τη στρωμή. Οι Whittington *et al.* (2003) ανέφεραν ότι η απομόνωση του MAP από περιβαλλοντικά δείγματα σε εκτροφές προβάτων και αιγών στη Νέα Ζηλανδία ήταν πολύ χαμηλή, 5 μήνες μετά την απομάκρυνση του μολυσμένου ζωικού κεφαλαίου, αλλά είδη της μολυσμένης άγριας πανίδας με μεγαλύτερους χρόνους ζωής, όπως είναι οι μύες και οι επίμυες είναι πιθανό να συνεχίζουν την απέκκριση του μικροοργανισμού και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να επαναμολύνουν το περιβάλλον και την τροφή.

Επίσης, εφαρμόσαμε προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση του MAP, καθώς είναι αποκλειστική του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Green et al., 1989). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία IS900 υπάρχει σε 15-18 αντίγραφα στο γονιδίωμα του MAP και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την εφαρμογή μοριακών μεθόδων τυποποίησης στελεχών του μικροοργανισμού (Motiwala et al., 2006). Στην προσπάθεια αποσαφήνισης της επιδημιολογίας του έχουν εφαρμοστεί ποικίλες μέθοδοι τυποποίησης στελεχών του MAP, τα οποία απομονώθηκαν από διάφορα ζωικά είδη (συνοψίζονται από τους Motiwala et al., 2006b). Η πιο ακριβής μέθοδος για τη διάκριση των βακτηριακών στελεχών παραμένει ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA (Carrington and Hoelzel, 2001), ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου τα στελέχη εμφανίζουν τους ίδιους φαινοτύπους και δεν διακρίνονται γενετικά με τις τεχνικές τυποποίησης, όπως συμβαίνει σε πολλές περιπτώσεις στελεχών MAP (Motiwala et al., 2006). Η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών έδειξε ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα άγρια ζώα κατατάχθηκαν μαζί με στελέχη από πρόβατα και αίγες (Εικόνα 1). Για παράδειγμα, το στέλεχος από τον μν από το κοπάδι 4, το οποίο είχε τυποποιηθεί ως S τύπου, κατατάχθηκε μαζί με τα στελέχη από τα πρόβατα και τις αίγες του κοπαδιού αυτού, τα οποία ήταν C τύπου. Επίσης, τα στελέχη από την αλεπού και το λαγό, που είχαν χαρακτηριστεί ως C τύπου στελέχη, κατατάχθηκαν μαζί με στελέχη προβάτων και αιγών από τα σφαγεία, η πλειοψηφία των οποίων ήταν S τύπου. Τα ευρήματα αυτά διαφωνούν με την υπόθεση της ύπαρξης ειδικότητας ξενιστού των στελεχών MAP, που απομονώνονται από διαφορετικά είδη μηρυκαστικών (Collins et al., 1990; Stevenson et al., 2002). Επιπλέον ενισχύουν την υπόθεση της μετάδοσης στελεχών MAP μεταξύ των μικρών

μηρυκαστικών και της άγριας πανίδας. Η απουσία ειδικότητας ξενιστού των στελεχών του MAP που απομονώνονται από την άγρια πανίδα έχει αναφερθεί στη Σκοτία και στις ΗΠΑ (Greig et al., 1997, 1999; Palmer et al., 2005). Η μόνη εξαίρεση στη μελέτη μας ήταν το στέλεχος MAP που απομονώθηκε από έναν μυ στο κοπάδι 1, το οποίο, παρόλο που είχε χαρακτηριστεί ως στέλεχος C τύπου, δεν κατατάχθηκε μαζί με το στέλεχος από αίγα του ίδιου κοπαδιού το οποίο ήταν επίσης C τύπου (Εικόνα 1). Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδηλώνει, είτε ότι τα πρωτόκολλα δειγματοληψίας και καλλιέργειας απέτυχαν να ανιχνεύσουν μόλυνση του κοπαδιού με αυτό το στέλεχος, είτε ότι ο μυς μολύνθηκε με το συγκεκριμένο στέλεχος κάπου αλλού. Γενετική ποικιλομορφία των στελεχών MAP μέσα στο ίδιο κοπάδι έχει αναφερθεί στην Ισπανία, όπου 18 στελέχη από αίγες της ίδιας εκτροφής στο Τολέδο διαχωρίστηκαν με PFGE σε πέντε διαφορετικά πολλαπλά πρότυπα (de Juan et al., 2005). Επίσης οι de Juan et al. (2006) περιέγραψαν σύμμεκτη μόλυνση μίας εκτροφή βοοειδών με C και S τύπου στελέχη.

Ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA και η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 στην παρούσα μελέτη αποκάλυψε αρκετή γενετική ποικιλομορφία ώστε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω διαχωρισμός των στελεχών τα οποία ήταν πανομοιότυπα σύμφωνα με την IS1311 PCR-REA. Τα στελέχη των προβάτων και των αιγών από τα κοπάδια 1, 2 και 3, τα οποία είχαν χαρακτηριστεί ως C τύπου, διαχωρίστηκαν περαιτέρω σύμφωνα με την περιοχή της δειγματοληψίας τους. Ιδιαίτερα τα στελέχη από το κοπάδι 4 σχημάτισαν μια ξεχωριστή ομάδα, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα ζώα ήταν μολυσμένα με ένα διαφορετικό στέλεχος MAP. Το εύρημα αυτό πιθανώς αντανάκλα περιορισμένη δυνατότητα ανταλλαγής στελεχών μεταξύ των κοπαδιών στην περιοχή της μελέτης, παρά το γεγονός ότι το ημιεκτατικό σύστημα διαχείρισης των κοπαδιών ήταν γενικά παρόμοιο μεταξύ των εκτροφών (Kostoulas et al., 2006; Florou et al., 2007).

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας παρέχουν ενδείξεις ότι στον υπό μελέτη πληθυσμό των μικρών μηρυκαστικών, τα τρωκτικά, οι αλεπούδες και οι λαγοί πιθανώς παίζουν κάποιο ρόλο, όχι εντελώς ασήμαντο, στη μετάδοση του MAP εντός και μεταξύ των κοπαδιών. Το ημιεκτατικό σύστημα διαχείρισης των εκτροφών των προβάτων και των αιγών είναι τυπικό αυτού που ακολουθείται από τη μεγάλη πλειοψηφία των εκτροφών προβάτων και αιγών σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, αλλά και στις χώρες της Νότιας Ευρώπης και της Μέσης Ανατολής. Για το λόγο αυτό πιστεύουμε ότι τα αποτελέσματά μας αφορούν σημαντικό ποσοστό κοπαδιών σε αυτές τις γεωγραφικές περιοχές. Αυτό σημαίνει ότι επιχειρούμενη εκρίζωση της παραφυματίωσης, τόσο σε τοπικό όσο και σε εθνικό επίπεδο, θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την πιθανότητα ύπαρξης μιας διαφορετικής, από τα πρόβατα και τις αίγες, δεξαμενής του MAP.



### 3.6 Βιβλιογραφία

1. Anderson, J.L., Meece, J.K., Koziczowski, J.J., Clark, D.L.Jr., Radcliff, R.P., Nolden, C.A., Samuel, M.D., Ellingson, J.L., 2007. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Scavenging Mammals in Wisconsin. *J. Wildl. Dis.* 43, 302-308.
2. Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
3. Carrington, M., Hoelzel, A.R., (eds), 2001. *Molecular Epidemiology; A Practical Approach*. Oxford University Press. 2001: pp. 57.
4. Clarke, C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
5. Clarke, C.J., Little, D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114, 419-437.
6. Collins, D.M., Cavaignac, S., de Lisle, G.W., 1997. Use of four DNA insertion Sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes.* 11, 373-380.
7. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591-1596.
8. 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.
9. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
10. Daniels, M.J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J.M., Hutchings, M.R., 2003. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol. Infect.* 130, 553-559.
11. Daniels, M.J., Ball, N., Hutchings, M.R., Greig, A., 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161, 306-313.
12. Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Wildlife ecology—emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science.* 287, 443-449.
13. de Juan, L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106, 249-257.
14. de Juan, L., Alvarez, J., Aranaz, A., Rodriguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Dominguez, L., 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115, 102-110.
15. Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., Lykotrafitis, F., 2007. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 1-9. Published online: 20 Jun 2007; doi:10.1017/S095026880700893X.

16. 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.
17. 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.
18. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E. 2nd, McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
19. Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468-1473. Review.
20. Kostoulas, P., Leontides, L., Enoe, C., Billinis, C., Florou, M., Sofia, M., 2006. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76, 56-73.
21. Marsh, I., Whittington, R., Cousins, D., 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell. Probes.* 13, 115-126.
22. 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.
23. Motiwala, A.S., Li, L., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2006. Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect.* 8, 1406-1418.
24. Palmer, M.V., Stoffregen, W.C., Carpenter, J.G., Stabel, J.R., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J. Wildl. Dis.* 41, 629-635.
25. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
26. Tafti, A.K., Rashidi, K., 2000. The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 47, 487-495.
27. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24, 1596-1599.
28. Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. Proceedings of the 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the USAHA, pp. 280-285.
29. Whittington, R.J., Marsh, I.B., Taylor, P.J., Marshall, D.J., Taragel, C., Reddacliff, L.A., 2003. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust Vet J.* 81, 559-63

## *Κεφάλαιο 4*

**Εκτίμηση της ευαισθησίας της καλλιέργειας του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ανάλογα με τον τύπο του στελέχους σε ελληνικά πρόβατα και αίγες.**

*Έγινε δεκτό για δημοσίευση στο περιοδικό *Zoonoses and Public Health**

## 4.1 Περίληψη

Οι απαιτήσεις για την απομόνωση του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) είναι πιθανό να σχετίζονται με τον τύπο του στελέχους [πρόβειο (sheep-S) ή βόειο (cattle-C)] και όχι με τον ξενιστή. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση και η σύγκριση της ευαισθησίας (Eu) δύο στερεών καλλιεργητικών υποστρωμάτων, του Herrold's egg - yolk medium (HEYM) και του Lowenstein-Jensen (LJ), για την απομόνωση του MAP, ανάλογα με τον τύπο του στελέχους και το είδος του δείγματος (κόπρανα ή ιστοί) από ελληνικά γαλακτοπαραγωγά πρόβατα και αίγες. Από 400 δείγματα κοπράνων, που συλλέχθηκαν από υποκλινικά μολυσμένα πρόβατα και αίγες 4 κοπαδιών και από 214 δείγματα ομογενοποιημένων ιστών (142 από πρόβατα και 72 από αίγες), που συλλέχθηκαν στα σφαγεία από ζώα μεγαλύτερα του 1 έτους με μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης, απομονώθηκαν 34 στελέχη MAP. Από τα παραπάνω, 18 κατατάχθηκαν στον C και 9 στον S τύπο, με τη μέθοδο της IS1311 PCR-REA. Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes για την εκτίμηση της Eu των καλλιεργητικών υποστρωμάτων ανάλογα με τον τύπο του στελέχους. Η  $Eu_{HEYM-C-κόπρανα} = 17\%$  (95% Διάστημα αξιοπιστίας: 7, 40) ήταν μεγαλύτερη από την  $Eu_{HEYM-S-κόπρανα} = 2\%$  (0.3, 11). Επίσης, η  $Eu_{HEYM-C-κόπρανα}$  ήταν μεγαλύτερη από την  $Eu_{LJ-C-κόπρανα} = 4\%$  (1, 12). Στα ομογενοποιημένα δείγματα ιστών δεν διέφεραν οι Eu για την απομόνωση διαφορετικών τύπων MAP.

*Λέξεις-κλειδιά:* παραφυματίωση προβάτων και αιγών, καλλιέργεια, μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes, ευαισθησία ανάλογα με τον τύπο του στελέχους

## 4.2 Εισαγωγή

Η καλλιέργεια του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) αποτελεί απαραίτητο στάδιο στην διαδικασία διάγνωσης της παραφυματίωσης και τη μετέπειτα εφαρμογή μοριακών τεχνικών τυποποίησης των στελεχών. Οι διαγνωστικές διαδικασίες και τα ποσοστά απομόνωσης ποικίλουν ανάλογα με τον ξενιστή, τον τύπο του δείγματος (κόπρανα ή ιστοί) και τον τύπο του στελέχους [στελέχη βοείου (cattle-C) ή πρόβειου (sheep-S) τύπου] (Whitlock et al., 2000; Manning and Collins; 2001; Stevenson et al., 2002). Παρά το γεγονός ότι τα S στελέχη απομονώνονται κυρίως από πρόβατα (Stevenson et al., 2002), ενώ τα C στελέχη κυρίως από βοοειδή και αίγες (Pavlik et al., 1995), πρόσφατες μελέτες (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007) δείχνουν ότι πιθανά δεν υπάρχει ειδικότητα ξενιστή των στελεχών. Γι αυτό πρέπει να διερευνηθεί η πιθανότητα επιλογής του πρωτοκόλλου καλλιέργειας με βάση τον τύπο του στελέχους και όχι με βάση το ζωικό είδος από το οποίο συλλέγονται τα δείγματα (de Juan et al., 2006). Η καλλιέργεια του MAP, παρά την σχεδόν τέλεια ειδικότητά (Ei) της υστερεί σε ευαισθησία (Eu). Οι υπάρχουσες αναφορές για τα ενδεικνυόμενα ανάλογα με τον τύπο του στελέχους καλλιεργητικά πρωτοκόλλα, βασίστηκαν είτε σε ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από θετικά στην ELISA ζώα (de Juan et al., 2006) είτε σε στελέχη που απομονώθηκαν από ομογενοποιημένα δείγματα ιστών ή/και κοπράνων (Sevilla et al., 2007). Δεν λάμβαναν υπόψη τους τη γενετική και παθογενετική ετερογένεια των στελεχών MAP στον πληθυσμό των ζώων από τον οποίο προέρχονταν τα δείγματα (Verna et al., 2007) και δεν υπολόγισαν τις ανάλογες με τον τύπο του στελέχους Eu των καλλιεργητικών πρωτοκόλλων.

Πρόσφατα δημοσιεύσαμε εκτιμήσεις της Eu της καλλιέργειας κοπράνων από υποκλινικά μολυσμένα πρόβατα και αίγες (Kostoulas et al., 2006α,β), που προέκυψαν από μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης (Gardner et al., 2002, Branscum et al., 2004). Αφού χαρακτηρίσαμε γενετικά τα στελέχη που απομονώσαμε (Florou et al., 2007), χρησιμοποιήσαμε μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes για να υπολογίσουμε την ανάλογη με τον τύπο του στελέχους Eu των υποστρωμάτων. Επιπλέον, εφαρμόσαμε την ίδια διαγνωστική και αναλυτική προσέγγιση και σε ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από πρόβατα και αίγες. Σκοπός μας ήταν να εκτιμήσουμε και να συγκρίνουμε την ανάλογη με τον τύπο του στελέχους και το είδος του δείγματος Eu μεταξύ δύο στερεών καλλιεργητικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην απομόνωση του MAP, του Herrold's egg - yolk medium (HEYM) και του Lowenstein-Jensen (LJ), σε δείγματα που συλλέχθηκαν από ελληνικά γαλακτοπαραγωγά πρόβατα και αίγες.

## 4.3 Υλικά και μέθοδοι

### 4.3.1 Δειγματοληψία

Συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν 400 δείγματα κοπράνων από θηλυκά, κλινικά υγιή ζώα, μεγαλύτερα του ενός έτους, από 4 εκτροφές, ενδημικά προσβεβλημένες με παραφυματίωση. Επιπλέον, συλλέχθηκαν δείγματα ιστών από τρία σφαγεία, τα οποία έσφαζαν 400-500, κατά μέσο όρο, πρόβατα και αίγες κάθε εβδομάδα από την ευρύτερη περιοχή των υπό διερεύνηση εκτροφών. Με σκοπό την αύξηση της πιθανότητας απομόνωσης του MAP, δύο από τους συγγραφείς (ΠΚ και ΜΦ) επισκέπτονταν τα σφαγεία δύο φορές την εβδομάδα, για χρονικό διάστημα έξι

μηνών (από το Σεπτέμβριο του 2002 έως τον Φεβρουάριο του 2003) και, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, επιθεωρούσαν οπτικά τον εντερικό σωλήνα όλων των μεγαλύτερων του έτους σφαγίων για αλλοιώσεις ενδεικτικές της παραφυματίωσης. Συλλέχθηκαν όσα θεωρήθηκαν ύποπτα για τη νόσο, δηλαδή συνολικά οι εντερικοί σωλήνες και λεμφαδένες 142 προβάτων και 72 αιγών. Κατόπιν, από κάθε δείγμα ύποπτου ζώου αφαιρέθηκαν και ομογενοποιήθηκαν τα τελευταία τμήματα του δωδεκαδακτύλου και του ειλεού, τα πρώτα τμήματα του τυφλού και του κόλου, οι ειλεοτυφλικοί και οι κολικοί λεμφαδένες. Λεπτομέρειες για την διαχείριση των 4 εκτροφών, καθώς και για τη συλλογή και την καλλιέργεια των δειγμάτων, την επιβεβαίωση της ανάπτυξης MAP με IS900-PCR και IS1245-PCR και το μοριακό διαχωρισμό των στελεχών με IS1311 PCR-REA με το ένζυμο Hinf I και με προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων σε τμήμα της IS900 έχουν ήδη δημοσιευθεί (Kostoulas et al., 2006α,β; Florou et al., 2007).

Η IS1311 PCR-REA πραγματοποιήθηκε για το διαχωρισμό των στελεχών MAP σε C και S τύπο, ενώ η IS1245-PCR για τον αποκλεισμό της ανάπτυξης *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (M. avium).

Για τον υπολογισμό των Ευ των υποστρωμάτων για την απομόνωση διαφορετικών τύπων στελεχών από τους δύο τύπους δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τα πρόβατα και τις αίγες χρησιμοποιήσαμε μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes (Branscum et al., 2004). Η προσέγγισή μας συνοψίζεται στα ακόλουθα: Υποθέτουμε ότι  $y_i$  είναι ο αριθμός των θετικών δειγμάτων από τα  $n_i$  ζώα που εξετάστηκαν, όπου ο δείκτης  $i$  δηλώνει 8 διαφορετικές υποκατηγορίες, ανάλογα με τον τύπο του στελέχους (C ή S), το καλλιεργητικό υπόστρωμα (HEYM ή LJ) και τον τύπο του δείγματος (κόπρανα ή ομογενοποιημένοι ιστοί). Θεωρούμε ότι τα δεδομένα  $\{y_i\}$  είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους και ακολουθούν τη διωνυμική κατανομή (Bin):

$$y_i | \Pi_i, E_i \sim \text{Bin}(n_i, \Pi_i * E_i + (1 - \Pi_i) * (1 - E_i)) \quad (1)$$

όπου  $\Pi_i$ ,  $E_i$  και  $E_i$  είναι το πραγματικό ποσοστό προσβολής από τη λοίμωξη με MAP – με τον όρο λοίμωξη εννοούμε ότι τα ζώα φέρουν το MAP ενδοκυτταρικά, όπου έχει ή δεν έχει πολλαπλασιαστεί, καθώς η λοίμωξη μπορεί να είναι λανθάνουσα -, η ευαισθησία και η ειδικότητα της καλλιέργειας, αντίστοιχα, σε κάθε υποκατηγορία  $i$ . Αν θεωρήσουμε ότι η  $E_i$  της καλλιέργειας ισούται με 1 (Whitlock et al., 2000), η εξίσωση (1) παίρνει τη μορφή

$$y_i | \Pi_i, E_i \sim \text{Bin}(n_i, \Pi_i * E_i) \quad (2)$$

Παραβλέψαμε την ανάμικτη κατανομή που επιτρέπει την πιθανότητα της κάθε υποκατηγορίας  $i$  να μην είναι μολυσμένη επειδή α) τα κοπάδια ήταν γνωστό ότι ήταν ενδημικά μολυσμένα, β) τα δείγματα ομογενοποιημένων ιστών προέρχονταν από ζώα με αλλοιώσεις και γ) η σχετική βιβλιογραφία (de Juan et al., 2006, Sevilla et al., 2007) υποδεικνύει σαφώς ότι σε μολυσμένους πληθυσμούς προβάτων και αιγών συνήθως υπάρχουν και οι δύο τύποι MAP.

Χρησιμοποιήθηκαν κατανομές βήτα ( $B(\alpha - \beta)$ ) για την ενσωμάτωση εκ των προτέρων πληροφοριών στο μοντέλο για τις προς εκτίμηση παραμέτρους ( $E_i$  και  $\Pi_i$ ). Χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό Beta Buster, το οποίο είναι διαθέσιμο στον ιστότοπο: <http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/> για την εκτίμηση των παραμέτρων  $a$  και  $b$  των βήτα εκ των προτέρων κατανομών. Η πιο πιθανή τιμή της  $E_i$  για όλες τις υποκατηγορίες καθορίστηκε στο 10%, ενώ ήμασταν 95% βέβαιοι ότι δεν υπερέβαινε το 50%. Αυτά τα στοιχεία αντιστοιχούν σε μία  $B(1.48, 5.38)$ . Οι

εκ των προτέρων πληροφορίες για το ΠΠΠ βασίστηκαν στην άποψη εξειδικευμένων κτηνιάτρων που επέβλεπαν τα κοπάδια και τα σφαγεία. Για τα δείγματα κοπράνων, η πιο πιθανή τιμή για το ΠΠΠ ήταν 30% και ήμαστε 95% βέβαιοι ότι ήταν τουλάχιστο 15%. Αυτά τα στοιχεία αντιστοιχούν σε μία Βη (5.09, 10.56). Η πιο πιθανή τιμή για το ΠΠΠ των ιστών ήταν 50% και ήμαστε 95% βέβαιοι ότι δεν ήταν λιγότερο από 33%. Η αντίστοιχη κατανομή ήταν Βη (11.25, 11.25). Χρησιμοποιήσαμε ως εκ των προτέρων πληροφορία για τα ΠΠΠ σχετικά ευρείες Βη κατανομές. Με τον τρόπο αυτό εκφράστηκε τόσο η εκτίμησή μας όσο και η αβεβαιότητά μας όσον αφορά το ΠΠΠ των κοπράνων και των ιστών. Για να διερευνήσουμε το κατά πόσο οι επιλεγθείσες εκ των προτέρων πληροφορίες επέδρασαν στις εκτιμήσεις της Ευ χρησιμοποιήσαμε, επιπλέον, ως εκ των προτέρων πληροφορίες για την Ευ, ομοιογενείς κατανομές που αποδίδουν ίση πιθανότητα από 0-100% [Βη(1, 1)]. Η εκτίμηση των διαφορών στις τιμές της Ευ που υπολογίστηκαν βασίστηκε στην % αλληλοκάλυψη μεταξύ των συγκριθέντων εκ των υστέρων κατανομών (Kostoulas et al., 2006α). Οι καθιερωμένες διαγνωστικές διαδικασίες (Heidelberger and Welch, 1983; Raftery and Lewis, 1992; Gelman and Rubin, 1992) της Monte Carlo μαρκοβιανής αλυσίδας και του ελέγχου των αυτοσυσχετίσεων έδειξαν ότι δεν υπήρχε πρόβλημα σύγκλισης τιμών. Οι κατά Bayes εκτιμήσεις και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (ΔΑ) προέκυψαν από 45.000 επαναλήψεις της Monte Carlo μαρκοβιανής αλυσίδας, μετά από μια φάση προσαρμογής 5000 επαναλήψεων. Όλα τα μοντέλα αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν στο λογισμικό WinBUGS (Spiegelhalter et al., 1996).

#### 4.4 Αποτελέσματα

Συνολικά απομονώθηκαν 34 στελέχη MAP. Όλα τα στελέχη ήταν θετικά για την ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS900. Κανένα από τα στελέχη δεν ήταν θετικό για την, ειδική για το *M. avium*, ένθετη νουκλεοτιδική αλληλουχία IS1245. Η IS1311 PCR-REA κατηγοριοποίησε 18 στελέχη σε C και 9 στελέχη σε S τύπο. Επτά στελέχη δεν τυποποιήθηκαν λόγω ανεπαρκούς ποσότητας DNA (Πίνακας 1). Οι κατά Bayes εκτιμήσεις των διάμεσων τιμών (και των ΔΑ) της Ευ παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.

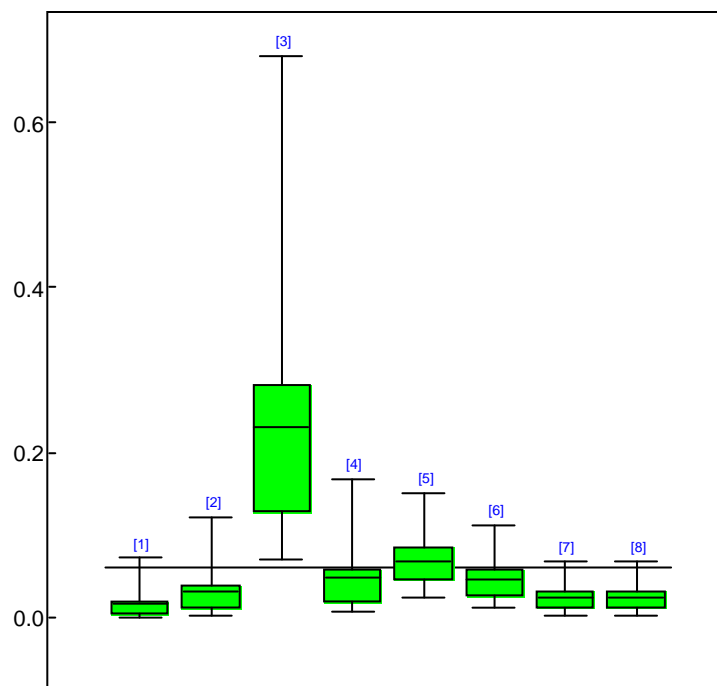
Στα δείγματα κοπράνων η Ευ του HEYM για την απομόνωση C στελεχών [ $E_{\text{HEYM-C-κόπρανα}}=17\%$  (ΔΑ: 7, 40)] ήταν υψηλότερη από την Ευ του για την απομόνωση S στελεχών [ $E_{\text{HEYM-S-κόπρανα}}=2\%$  (0.3, 11)] (Εικ. 1, αριθμοί υπόμνησης (AY) 3-1); το ποσοστό αλληλοκάλυψης των ΔΑ ήταν 1%. Επίσης, η  $E_{\text{HEYM-C-κόπρανα}}$  ήταν υψηλότερη από την  $E_{\text{LJ-C-κόπρανα}}=4\%$  (1, 12) (AY 3-4); το αντίστοιχο ποσοστό αλληλοκάλυψης των ΔΑ ήταν λιγότερο από 1%. Αντίθετα, η  $E_{\text{HEYM-S-κόπρανα}}$  και η  $E_{\text{LJ-S-κόπρανα}}$  δεν διέφεραν (AY 1-2). Στα ομογενοποιημένα δείγματα ιστών, η  $E_{\text{HEYM-C-ιστοί}}$ , η  $E_{\text{HEYM-S-ιστοί}}$ , η  $E_{\text{LJ-C-ιστοί}}$  και η  $E_{\text{LJ-S-ιστοί}}$  δεν διέφεραν (AY 5,6,7,8). Η  $E_{\text{HEYM-C}}$  ήταν υψηλότερη στα δείγματα κοπράνων από τα ομογενοποιημένα δείγματα ιστών ( $E_{\text{HEYM-C-ιστοί}}=2\%$  (0.4, 8), AY 3-7); τα ποσοστά αλληλοκάλυψης των ΔΑ ήταν λιγότερο από 1%.



**Πίνακας 1.** Αποτελέσματα της εξέτασης δειγμάτων κοπράνων και ιστών και οι αντίστοιχες κατά Bayes εκτιμήσεις της Ευαισθησίας (Ευ) [διάμεσες τιμές και διαστήματα αξιοπιστίας (ΔΑ)]. Τα δείγματα κοπράνων συλλέχθηκαν από υποκλινικά μολυσμένα πρόβατα και αίγες και τα ομογενοποιημένα δείγματα ιστών από σφάγια ενηλίκων προβάτων και αιγών με μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης. Τα στελέχη απομονώθηκαν είτε σε Lowenstein-Jensen (LJ) είτε σε Herrold's Egg-Yolk medium (HEYM) και κατηγοριοποιήθηκαν σε S και C τύπο με IS1311-PCR REA.

Τύπος δείγματος	Τύπος στελέχους	HEYM		LJ	
		<u>Θετικά</u> <u>(Εξετασθέντα)</u>	<u>Ευ (ΔΑ)</u>	<u>Θετικά</u> <u>(Εξετασθέντα)</u>	<u>Ευ (ΔΑ)</u>
Κόπρανα	S	0 (368)	2 (0.3, 11)	1 (368)	3 (0.4, 15)
	C	14 (368)	17 (7, 40)	2 (368)	4 (1, 12)
Ομογενοποιημ ένοι ιστοί	S	5 (204)	7 (2, 15)	3 (204)	4 (1, 12)
	C	1 (204)	2 (0.4, 8)	1 (204)	2 (0.4, 8)

**Εικόνα 1.** Οι διάμεσες τιμές και τα 95% ΔΑ της Ευ. Οι υποκατηγορίες ορίζονται με βάση το είδος του δείγματος (κόπρανα ή ομογενοποιημένοι ιστοί), τον τύπο του στελέχους (S ή C) και το καλλιεργητικό υπόστρωμα (HEYM ή LJ). Ο κάθε αριθμός υπόμνησης (από 1 έως 16) αντιστοιχεί σε διαφορετική υποκατηγορία\*. Τα ορθογώνια παραλληλόγραμμα αντιστοιχούν στο 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> τεταρτημόριο της εκ των υστέρων κατανομής με τη γραμμή στο μέσο κάθε ορθογωνίου να αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή. Τα άκρα των ορθογωνίων εκτείνονται έως το 2,5<sup>ο</sup> και 97,5<sup>ο</sup> εκατοστημόριο της εκ των υστέρων κατανομής ώστε το γράφημα να απεικονίζει το 95% ΔΑ για κάθε υποκατηγορία.



\*[1]: κόπρανα, S, HEYM; [2]: κόπρανα, S, LJ; [3]: κόπρανα, C, HEYM; [4]: κόπρανα, C, LJ; [5]: ιστοί, S, HEYM; [6]: ιστοί, S, LJ; [7]: ιστοί, C, HEYM; [8]: ιστοί, C, LJ.

#### 4.5 Συζήτηση

Χρησιμοποιήσαμε την μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes για να εκτιμήσουμε την Ευ της καλλιέργειας ανάλογα με τον τύπο του στελέχους, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα ζώα στα οποία η λοίμωξη ήταν σε λανθάνουσα κατάσταση, με την ενσωμάτωση εκ των προτέρων πληροφοριών για το ΠΠΠ. Τα πρακτικά πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας επίλυσης κατά Bayes που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ότι: (i) μπορεί πάντα να εφαρμοστεί σε μικρά δείγματα- στην περίπτωση μας στο μικρό ή και μηδενικό, σε ορισμένες περιπτώσεις (βλ. πίνακα 1), αριθμό απομονώσεων-, (ii) επιτρέπει το συνδυασμό των δεδομένων με υπάρχουσες επιστημονικές πληροφορίες με σκοπό τη βελτιστοποίηση των εκτιμήσεων και (iii) αποδίδει άμεσα προς αξιολόγηση την ακριβή κατανομή των πιθανοτήτων εμφάνισης

κάθε αποτελέσματος (Gardner et al., 2002). Καθώς δεν υπήρχαν προηγούμενες εκτιμήσεις για την Ευ της καλλιέργειας ανάλογα με τον τύπο του στελέχους, αρχικά χρησιμοποιήσαμε σχετικά ευρείες Βη κατανομές ως εκ των προτέρων πληροφορίες για τη σύγκριση όλων των υποκατηγοριών. Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε την ανάλυση ευαισθησίας με τη χρήση ομοιογενών κατανομών ως εκ των προτέρων πληροφορίες, αντανακλώντας την άγνοιά μας για την κατανομή των σταδίων της λοίμωξης που πιστεύεται ότι επηρεάζει την Ευ (Sergeant et al., 2003). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι όταν χρησιμοποιήθηκαν ομοιογενείς κατανομές παρατηρήθηκαν οι ίδιες με την αρχική ανάλυση διαφορές μεταξύ των συγκρινόμενων υποκατηγοριών.

Στα δείγματα κοπράνων από υποκλινικά μολυσμένα πρόβατα και αίγες, η  $E_{U_{HEYM-C}}$  ήταν υψηλότερη από την  $E_{U_{HEYM-S}}$  και από την  $E_{U_{LJ-C}}$ . Παρά το γεγονός ότι ο σχεδιασμός και η αναλυτική προσέγγιση στην παρούσα μελέτη διαφέρουν από τις ήδη δημοσιευμένες, τα αποτελέσματα δείχνουν και εδώ ότι το HEYM υποστηρίζει καλύτερα την απομόνωση C παρά S στελεχών MAP και ότι είναι καλύτερο για την απομόνωση C στελεχών από μικρά μηρυκαστικά σε σχέση με το LJ (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007). Παρόλα αυτά είναι δύσκολο να συγκρίνουμε τις εκτιμήσεις μας για την Ευ της καλλιέργειας ανάλογα με τον τύπο του στελέχους με άλλες δημοσιευμένες, καθώς δεν υπάρχουν μελέτες που να χρησιμοποιούν το HEYM ως κύριο υπόστρωμα για την απομόνωση του MAP από κόπρανα προβάτων, επειδή θεωρείτο ότι τα πρόβατα μολύνονται με S στελέχη και ότι το HEYM δεν υποστηρίζει την ανάπτυξη των στελεχών αυτών (Whittington et al., 1999; de Juan et al., 2006).

Το HEYM και το LJ ήταν εξίσου ευαίσθητα για την απομόνωση S στελεχών MAP από δείγματα κοπράνων. Η χαμηλή Ευ και των δύο υποστρωμάτων (Πίνακας 1), πιθανόν αντανακλά το γεγονός ότι ποικίλοι παράγοντες όπως το περιορισμένο βακτηριακό φορτίο στα δείγματα (τα δείγματα κοπράνων προέρχονταν από υποκλινικά μολυσμένα ζώα), η αυξημένη ευπάθεια του MAP στα πρωτόκολλα απολύμανσης των δειγμάτων, οι ιδιαίτερες θρεπτικές απαιτήσεις του μικροοργανισμού, καθώς και η αυξημένη ευπάθειά του στην ανασταλτική επίδραση των αντιβιοτικών στα υποστρώματα έχουν πιθανόν περιορίσει την ανάπτυξη των στελεχών αυτών (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007).

Η  $E_{U_{HEYM-C}}$  ήταν υψηλότερη στα δείγματα κοπράνων σε σχέση με τα δείγματα ομογενοποιημένων ιστών. Στα δείγματα ομογενοποιημένων ιστών δεν διέφεραν οι Ευ των δύο υποστρωμάτων για την απομόνωση διαφορετικών τύπων στελεχών. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με άλλα που έχουν δημοσιευτεί πρόσφατα (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007) και είναι μάλλον αποτελέσματα προκατάληψης λόγω κακής επιλογής; τα δείγματα ιστών συλλέχθηκαν από ενήλικα ζώα με ορατές αλλοιώσεις παραφυματίωσης. Οι αίγες σε σχέση με τα πρόβατα πιθανόν έχουν περιορισμένη ικανότητα να ελέγξουν τη λοίμωξη (Corpa et al., 2000; Kostoulas et al., 2006a). Επίσης, τα S στελέχη MAP είναι πιθανό να εμφανίζουν διαφορετική παθογένεια από τα C στελέχη στις αίγες και στα πρόβατα (Verna et al., 2007). Πιθανώς, μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τα σφαγεία υπήρχαν σε μεγαλύτερο αριθμό αίγες μολυσμένες με S στελέχη.

Συμπερασματικά, η Ευ των υποστρωμάτων εξαρτάται από τον τύπο στελέχους MAP. Το HEYM ήταν πιο ευαίσθητο για την απομόνωση C παρά S στελεχών MAP. Επίσης ήταν πιο ευαίσθητο από το LJ για την απομόνωση C στελεχών από τα δείγματα κοπράνων μικρών μηρυκαστικών.

## 4.6 Βιβλιογραφία

1. Branscum A.J. , Gardner I.A., Johnson W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test Sensitivity and Specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
2. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
3. de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L., 2006b. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927-5932.
4. Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., Lykotrafitis, F., 2007. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from nonruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* In press.
5. Gardner, I.A., 2002. The utility of Bayes' theorem and Bayesian inference in veterinary clinical practice and research. *Aust. Vet J.* 80, 758-761.
6. Heidelberger, P., Welch, P., 1983. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Operations Research.* 31, 1109-1144.
7. Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple Sequences. *Stat. Sci.* 7, 457– 511.
8. Kostoulas, P., Leontides, L., Enoe, C., Billinis, C., Florou, M., Sofia, M., 2006α. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76, 56-73.
9. Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Florou, M., 2006β. Application of a semi-dependent latent model in the Bayesian estimation of the sensitivity and specificity of two faecal culture methods for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76, 121-134.
10. Manning, E.J., Collins, M.T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech.* 20, 133-150. Review.
11. 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.
12. Raftery, A.L., Lewis, S., 1992. Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov chain Monte Carlo. *Stat. Sci.* 7, 493–497.
13. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
14. Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., Juste, R.A., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol.* 12, 7-18.
15. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks W., 1996. BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, Version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge. <http://www.mrcbsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>

16. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
17. Verna, A.E., Garcia-Pariente, C., Munoz, M., Moreno, O., Garcia-Marin, J.F., Romano, M.I., Paolicchi, F., Perez, V., 2007. Variation in the immunopathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health.* 54, 243-252.
18. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387-398.
19. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077-1083.

## *Κεφάλαιο 5*

## 5.1 Γενική Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή διερευνήσαμε το ρόλο των μονογαστρικών αγρίων ζώων και του περιβάλλοντός τους ως πιθανής δεξαμενής συντήρησης και μετάδοσης του MAP σε πρόβατα και αίγες ελληνικών εκτροφών. Για την επιβεβαίωση της εμπλοκής του ή των ζωικών ειδών και του περιβάλλοντός τους στη δεξαμενή, οι Haydon et al. (2002) πρόσφατα πρότειναν μια διαδικασία τεσσάρων σταδίων: 1) Στο πρώτο στάδιο πρέπει να υπάρχουν επιδημιολογικοί συσχετισμοί μεταξύ του/των συγκεκριμένων ζωικών ειδών και του περιβάλλοντός τους με τον πληθυσμό-στόχο, 2) Στο δεύτερο στάδιο πρέπει να υπάρχουν ενδείξεις φυσικής λοίμωξης από τον μικροοργανισμό του/των, εκτός του πληθυσμού-στόχου, ζωικών ειδών και μόλυνσης του περιβάλλοντός τους, 3) Στο τρίτο στάδιο ακολουθεί η γενετική σύγκριση των στελεχών που απομονώθηκαν από τον πληθυσμό-στόχο και από τον/τους ζωικούς πληθυσμούς και το περιβάλλον που διερευνώνται ως πιθανή δεξαμενή του μικροοργανισμού και 4) Στο τελευταίο στάδιο εκτιμώνται τα αποτελέσματα παρεμβάσεων που στοχεύουν στην απομόνωση του πληθυσμού-στόχου από την πιθανή δεξαμενή του μικροοργανισμού.

Στην έρευνά μας αρχικά επιλέχθηκαν ως πληθυσμός-στόχος 4 ενδημικά προσβεβλημένες από MAP εκτροφές προβάτων και αιγών. Ακολούθως συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν για την απομόνωση MAP δείγματα μονογαστρικών αγρίων ζώων που συμβιούσαν με τα πρόβατα και τις αίγες των εκτροφών αυτών είτε στους χώρους σταβλισμού είτε στους βοσκότοπους των. Επιπλέον, συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν δείγματα από τις συμπυκνωμένες τροφές και τη στρωμή των κοπαδιών. Τα τελευταία αποτελούσαν συστατικά του περιβάλλοντος διαβίωσης των ύποπτων μονογαστρικών. Η παρουσία φυσικής λοίμωξης στα ύποπτα άγρια μονογαστρικά διερευνήθηκε και παθολογο-ανατομικά. Το MAP απομονώθηκε από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, την τροφή και τη στρωμή των προβάτων και των αιγών των τεσσάρων εκτροφών. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκε από δύο επίμυες και δύο μύες, που είχαν αιχμαλωτιστεί μέσα στους χώρους σταβλισμού, καθώς και από μία αλεπού και έναν λαγό, που είχαν βρεθεί νεκρά ή είχαν συλληχθεί από κυνηγούς, αντίστοιχα, στους βοσκότοπους των κοπαδιών. Δεν απομονώθηκε από σπουργίτια, ασβούς, καρακάξες, ένα λύκο, μία νυφίτσα, ένα γεράκι και μία κουκουβάγια, αλλά ο διαθέσιμος αριθμός ζώων από τα είδη αυτά ήταν περιορισμένος. Μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης δεν ανιχνεύθηκαν στα άγρια ζώα. Βρέθηκαν όμως οξεάντοχα βακτήρια στα μακροφάγα του εντερικού επιθηλίου ενός επίμυος.

Ταυτόχρονα, απομονώσαμε MAP από τον πληθυσμό-στόχο καθώς και από επιπλέον δείγματα προβάτων και αιγών, με μακροσκοπικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης, που συλλέχθηκαν από τρία σφαγεία στα οποία προσκομίζονταν ζώα από την ευρύτερη περιοχή γύρω από τον πληθυσμό-στόχο. Συγκρίναμε τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα μονογαστρικά άγρια ζώα και το περιβάλλον διαβίωσής τους με τα στελέχη που απομονώθηκαν από τον πληθυσμό-στόχο και τα πρόβατα και αίγες της ευρύτερης περιοχής γύρω από αυτόν, με την IS1311 PCR-REA. Γενικά, τα στελέχη που απομονώθηκαν από την ίδια εκτροφή κατηγοριοποιήθηκαν στον ίδιο τύπο, είτε προέρχονταν από μηρυκαστικά, είτε από μονογαστρικά, είτε από το περιβάλλον τους. Αριθμητικά κυρίαρχος ήταν ο C τύπος στελεχών. Στον ίδιο τύπο ανήκαν και τα στελέχη από την αλεπού και το λαγό. Τα τρωκτικά πιθανόν μολύνθηκαν με το MAP τρώγοντας πεσμένη στο έδαφος των χώρων σταβλισμού τροφή που είχε ανακατευτεί με μολυσμένα κόπρανα των μικρών μηρυκαστικών. Η αλεπού πιθανόν μολύνθηκε τρώγοντας μολυσμένα θηράματα, όπως τρωκτικά και λαγούς. Από το ένα μικτό κοπάδι του πληθυσμού-στόχου

απομονώθηκαν C στελέχη από τρωκτικά, πρόβατα και αίγες και από δείγματα τροφής. Η τελευταία ήταν οπτικά μολυσμένη με κόπρανα τρωκτικών και δεν είχε εκτεθεί στα πρόβατα και στις αίγες, καθώς η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε μέσα στους χώρους αποθήκευσης των τροφών. Συνδυάζοντας τα ευρήματα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα τρωκτικά απεκκρίνουν το MAP με τα κόπρανα και επιμολύνουν την τροφή.

Έως πρόσφατα, διεθνώς κυριαρχούσε η άποψη ότι οι αίγες μολύνονται κυρίως με C στελέχη, ενώ τα S στελέχη εμφανίζουν ισχυρό τροπισμό για τα πρόβατα. Επιπλέον, μέχρι σήμερα όλα τα στελέχη που είχαν παγκοσμίως απομονωθεί από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας και εξετάστηκαν με IS1311 PCR-REA, τυποποιήθηκαν ως C στελέχη. Στη μελέτη μας 7/17 (42%) από τα στελέχη που απομονώθηκαν από αίγες ήταν S τύπου, 8/10 (80%) των στελεχών που απομονώθηκαν από πρόβατα ήταν C στελέχη, ενώ όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από άγρια ζώα, πλην ενός, άνηκαν στο C τύπο. Προφανώς, τα αποτελέσματά μας αμφισβητούν την ειδικότητα ξενιστή των C και S στελεχών. Το στέλεχος άγριου ζώου που κατατάχθηκε στον S τύπο προερχόταν από έναν μυ. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά απομόνωσης S στελέχους MAP από μονογαστρικό είδος της άγριας πανίδας. Συνεπώς, τα μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας είναι πιθανό να μολύνονται και με τους δύο τύπους MAP, ενώ δεν υπάρχει τροπισμός των S στελεχών στα πρόβατα και των C στις αίγες.

Εκτός από την IS1311 PCR-REA, εφαρμόσαμε προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση του MAP. Αν και έχουν εφαρμοστεί ποικίλες μέθοδοι τυποποίησης στελεχών του MAP, στην προσπάθεια για την αποσαφήνιση της επιδημιολογίας του, ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA παραμένει η πιο ακριβής μέθοδος διάκρισης των βακτηριακών στελεχών. Η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών έδειξε ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα άγρια ζώα κατατάχθηκαν μαζί με στελέχη από πρόβατα και αίγες. Για παράδειγμα, το στέλεχος από τον μυ από το ένα μικτό κοπάδι κατατάχθηκε μαζί με τα στελέχη από τα πρόβατα και τις αίγες του κοπαδιού αυτού. Επίσης, τα στελέχη από την αλεπού και το λαγό κατατάχθηκαν μαζί με στελέχη προβάτων και αιγών από τα σφαγεία. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση της μετάδοσης στελεχών MAP μεταξύ των μικρών μηρυκαστικών και της άγριας πανίδας. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA και η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 αποκάλυψε αρκετή γενετική ποικιλομορφία ώστε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω διαχωρισμός των στελεχών τα οποία ήταν πανομοιότυπα σύμφωνα με την IS1311 PCR-REA. Τα στελέχη των προβάτων και των αιγών από το ένα μικτό κοπάδι, καθώς και από το κοπάδι που αποτελείτο μόνο από πρόβατα και εκείνο που περιείχε μόνο αίγες, τα οποία είχαν χαρακτηριστεί ως C τύπου, διαχωρίστηκαν περαιτέρω σύμφωνα με την περιοχή της δειγματοληψίας τους. Ιδιαίτερα τα στελέχη από το άλλο μικτό κοπάδι σχημάτισαν μια ξεχωριστή ομάδα, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα ζώα ήταν μολυσμένα με ένα διαφορετικό στέλεχος MAP. Το εύρημα αυτό πιθανώς αντανάκλα περιορισμένη δυνατότητα ανταλλαγής στελεχών μεταξύ των κοπαδιών στην περιοχή της μελέτης, παρά το γεγονός ότι το ημιεκτατικό σύστημα διαχείρισης των κοπαδιών ήταν γενικά παρόμοιο μεταξύ των εκτροφών.

Για να διερευνήσουμε αν η έλλειψη ειδικότητας ξενιστή των στελεχών του MAP οφείλεται στη διαφορετική ικανότητα των καλλιεργητικών μεθόδων να ανιχνεύσουν τα S ή C στελέχη, εκτιμήσαμε την Ευ της καλλιέργειας ανάλογα με τον



τύπο του στελεχούς και το είδος του δείγματος. Η καλλιέργεια αποτελεί προαπαιτήτηση για τη μετέπειτα εφαρμογή των περισσότερων μοριακών τεχνικών τυποποίησης των στελεχών του MAP και, επομένως, η γνώση της Ευ των υποστρωμάτων ανάλογα με το είδος του ξενιστή και του δείγματος βοηθά στην επιλογή του καταλληλότερου υποστρώματος για την απομόνωση και ταυτοποίηση των διαφορετικών στελεχών. Χρησιμοποιήσαμε μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes που επέτρεψε την ενσωμάτωση εκ των προτέρων πληροφοριών για το ΠΠΠ από MAP των υποκλινικά προσβεβλημένων αιγών και προβάτων. Τα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας επίλυσης κατά Bayes που αξιοποιήθηκαν είναι ότι (α) μπορεί πάντα να εφαρμοστεί σε μικρά δείγματα (εδώ στο μικρό ή και μηδενικό σε ορισμένες περιπτώσεις αριθμό απομονώσεων – Πίνακας 1), (ii) επιτρέπει το συνδυασμό των δεδομένων με υπάρχουσες επιστημονικές πληροφορίες με σκοπό τη βελτιστοποίηση των εκτιμήσεων και (iii) αποδίδει άμεσα προς αξιολόγηση την ακριβή κατανομή των πιθανοτήτων εμφάνισης κάθε αποτελέσματος. Στα δείγματα κοπράνων από υποκλινικά προσβεβλημένα πρόβατα και αίγες, η Ευ<sub>HEYM-C</sub> ήταν υψηλότερη από την Ευ<sub>HEYM-S</sub> και από την Ευ<sub>LJ-C</sub>. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το HEYM υποστηρίζει καλύτερα την απομόνωση C παρά S στελεχών MAP και ότι είναι καλύτερο για την απομόνωση C στελεχών από μικρά μηρυκαστικά σε σχέση με το LJ. Επίσης το HEYM και το LJ είχαν εξίσου χαμηλή Ευ για την απομόνωση S στελεχών MAP από δείγματα κοπράνων, που πιθανόν αντανάκλα το γεγονός ότι παράγοντες όπως το περιορισμένο βακτηριακό φορτίο στα δείγματα, η αυξημένη ευπάθεια του MAP στα πρωτόκολλα απολύμανσης των δειγμάτων, οι ιδιαίτερες θρεπτικές απαιτήσεις του μικροοργανισμού, καθώς και η αυξημένη ευπάθειά του στην ανασταλτική επίδραση των αντιβιοτικών στα υποστρώματα περιορίζουν την ανάπτυξη των στελεχών αυτών. Επιπλέον, η Ευ<sub>HEYM-C</sub> ήταν υψηλότερη στα δείγματα κοπράνων σε σχέση με τα δείγματα ομογενοποιημένων ιστών. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην Ευ των δύο υποστρωμάτων για την απομόνωση διαφορετικών τύπων στελεχών από δείγματα ομογενοποιημένων ιστών.

Συμπερασματικά, λοιπόν, απομονώσαμε το MAP από τέσσερα διαφορετικά είδη της άγριας πανίδας (μύες, επίμνες, αλεπούδες και λαγοί), το περιβάλλον διαβίωσής τους και από τον πληθυσμό-στόχο των προβάτων και των αιγών. Ο γενετικός χαρακτηρισμός των στελεχών με IS1311 PCR-REA και προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της ένθετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900 έδειξε ότι, πιθανώς, έχει συμβεί μετάδοση του MAP μεταξύ διαφορετικών ζωικών ειδών και ότι δεν υπάρχει ειδικότητα ξενιστού των στελεχών. Διαπιστώσαμε ότι τρωκτικά απεκκρίνουν το MAP και μολύνουν την τροφή και το περιβάλλον διαβίωσης των προβάτων και των αιγών. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα τρωκτικά, οι αλεπούδες, οι λαγοί και το περιβάλλον διαβίωσής τους μπορούν να συμμετέχουν σε ένα περίπλοκο σύστημα διατήρησης της μόλυνσης από MAP των μικρών μηρυκαστικών. Πιθανώς, η άγρια πανίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία της μόλυνσης από MAP σε εκτροφές που έχουν εκριζώσει την παραφουματίωση ή σε απαλλαγμένες από το MAP εκτροφές εντός γεωγραφικών περιοχών με άλλες προσβεβλημένες εκτροφές. Καθώς το ημικτατικό σύστημα διαχείρισης των 4 εκτροφών προβάτων και αιγών, που αποτελούσαν τον πληθυσμό της μελέτης μας, είναι τυπικό αυτού που ακολουθείται από τη μεγάλη πλειοψηφία των ελληνικών εκτροφών, πιστεύουμε ότι τα αποτελέσματά μας αφορούν σημαντικό ποσοστό του εθνικού ζωικού κεφαλαίου. Αυτό σημαίνει ότι η εκρίζωση της παραφουματίωσης, όπου επιχειρείται, θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την πιθανότητα ύπαρξης μιας, διαφορετικής από τα πρόβατα και τις αίγες, δεξαμενής διατήρησης και μετάδοσης του MAP. Επιπλέον, εκτιμήσαμε την Ευ

της καλλιέργειας ανάλογα με τον τύπο του στελέχους και διαπιστώσαμε ότι το HEYM ήταν πιο ευαίσθητο για την απομόνωση C παρά S στελεχών MAP. Επίσης ήταν πιο ευαίσθητο από το LJ για την απομόνωση C στελεχών από τα δείγματα κοπράνων μικρών μηρυκαστικών. Επομένως η Ευ των υποστρωμάτων εξαρτάται από τον τύπο στελέχους MAP, γεγονός που υποδεικνύει ότι η επιλογή του πρωτοκόλλου καλλιέργειας θα πρέπει λαμβάνει υπόψη τον τύπο του στελέχους MAP και όχι το ζωικό είδος από το οποίο προέρχονται τα δείγματα καθώς φαίνεται ότι πιθανώς δεν υπάρχει ειδικότητα ξενιστή των στελεχών. Υπό το πρίσμα αυτό πρέπει να ιδωθεί και η πρώτη απομόνωση S στελέχους από μονογαστρικό άγριο ζώο. Δεν είναι, μάλλον, ένα μεμονωμένο διεθνώς περιστατικό. Πιθανότατα τα ίδια στελέχη μολύνουν και αλλού άγρια μονογαστρικά αλλά, είναι ελάχιστη η πιθανότητα απομόνωσής τους καθώς η επιλογή του πρωτοκόλλου καλλιέργειας γίνεται με δεδομένο ότι μολύνονται αποκλειστικά με C στελέχη MAP.

## 5.2 Προοπτικές μελλοντικής έρευνας

Μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας που ζουν στους χώρους σταβλισμού και βόσκησης ελληνικών προβάτων και αιγών μολύνονται από MAP και το απεκκρίνουν. Η συχνότητα προσβολής τους όμως φαίνεται να είναι σχετικά μικρή. Αξίζει όμως να διερευνηθεί το εάν υπάρχει δυνατότητα κάθετης ή οριζόντιας μετάδοσης του MAP εντός των πληθυσμών των τρωκτικών.

Πιθανότατα υπάρχει διαφορά στην παθογένεια των δύο τύπων του MAP στις αίγες, αλλά και των S στελεχών μεταξύ των προβάτων και των αιγών. Καθώς ήταν εδραιωμένη η πεποίθηση ότι οι αίγες μολύνονται κυρίως με C στελέχη, δεν συγκρίθηκε η παθογένεια των δύο τύπων του MAP στις αίγες και στα πρόβατα. Η μελέτη μας, κατέληξε ότι δεν υπάρχει ειδικότητα ξενιστού των στελεχών στα πρόβατα και τις αίγες. Γι αυτό και πρέπει να μελετηθεί η ισχυρή πιθανότητα διαφορετικής παθογένειας ανάλογα με το στέλεχος και το ζωικό είδος.

Ο προσδιορισμός της σημειακής αλληλουχίας του DNA και η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών σε τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS900, που πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά, με σκοπό τη σύγκριση των στελεχών MAP, οδήγησε στην εξαγωγή ορισμένων συμπερασμάτων που αφορούν το ρόλο των μονογαστρικών αγρίων ειδών ως πιθανής δεξαμενής μετάδοσης του MAP στα ελληνικά πρόβατα και στις αίγες. Η διεξαγωγή ερευνών σε καθορισμένες γεωγραφικές περιοχές που θα περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της σημειακής αλληλουχίας του DNA στην νουκλεοτιδική αλληλουχία IS900 ή σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος και την φυλογενετική ανάλυση στελεχών MAP από άγρια ζώα, το περιβάλλον τους και από κατοικίδια μηρυκαστικά θα συμβάλει σημαντικά στην διευκρίνιση των αγρίων ειδών που μολύνονται περισσότερο από MAP, καθώς και του ρόλου τους ως δεξαμενές μετάδοσης του μικροοργανισμού στο ζωικό κεφάλαιο.

# *Παράρτημα*

**1. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση κατά Bayes του πραγματικού ποσοστού προσβολής (ΠΠΠ) των κοπράνων και των ιστών από τους διαφορετικούς τύπους στελεχών MAP, λαμβάνοντας υπόψη τη διαγνωστική ευαισθησία της καλλιέργειας.**

```
model
{for (i in 1:n)
{
pos[i]~dbin(ap[i],test[i])
ap[i]<-tp[i]*Se[i]

Se[i]~dbeta(1.48, 5.38) #Mode=10% 95% certainty of at most 50%

}

for (i in 1:7)
{
pap1[i]<-step(ap[i]-ap[i+1])
ppp1[i]<-step(tp[i]-tp[i+1])
pse1[i]<-step(Se[i]-Se[i+1])
}

for (i in 1:6)
{
pap2[i]<-step(ap[i]-ap[i+2])
ppp2[i]<-step(tp[i]-tp[i+2])
pse2[i]<-step(Se[i]-Se[i+2])
}

for (i in 1:4)
{
pap4[i]<-step(ap[i]-ap[i+4])
ppp4[i]<-step(tp[i]-tp[i+4])
pse4[i]<-step(Se[i]-Se[i+4])
}

tp[1]~dbeta(5.09,10.56) #mode =30% 95% certainty of at least 15%
tp[3]~dbeta(5.09,10.56)
tp[5]~dbeta(11.25,11.25) #mode=50% 95% certainty of at least 33%
tp[7]~dbeta(11.25,11.25)

tp[2]<-tp[1]
tp[4]<-tp[3]
tp[6]<-tp[5]
tp[8]<-tp[7]
}

list(n=8,pos=c(0,1,14,2,5,3,1,1), test=c(368,368,368,368,204,204,204,204))
```

## 2. Η κατανομή β

Στη θεωρία των πιθανοτήτων και τη στατιστική, η βήτα κατανομή είναι μια συνεχής κατανομή πιθανότητας που ορίζεται από την εξίσωση:

$$f(x; \alpha, \beta) = \frac{1}{\mathbf{B}(\alpha, \beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1}$$

όπου α και β είναι παράμετροι που πρέπει να είναι μεγαλύτερες από μηδέν και Β είναι η Βήτα συνάρτηση. Η Βήτα συνάρτηση είναι μια σταθερά κανονικοποίησης για να εξασφαλίσει ότι το ολοκλήρωμα της πυκνότητας πιθανότητας της κατανομής θα είναι ίσο με 1:

$$\begin{aligned} f(x; \alpha, \beta) &= \frac{x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1}}{\int_0^1 u^{\alpha-1} (1-u)^{\beta-1} du} \\ &= \frac{\Gamma(\alpha + \beta)}{\Gamma(\alpha)\Gamma(\beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1} \\ &= \frac{1}{\mathbf{B}(\alpha, \beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1} \end{aligned}$$

όπου Γ είναι η συνάρτηση Γάμμα..

Μια ειδική περίπτωση της βήτα κατανομής όταν α=1 και β=1 είναι η ομοιόμορφη κατανομή. Η μέση τιμή E(X) και η διακύμανση var(X) μιας τυχαίας μεταβλητής X που ακολουθεί β κατανομή με παραμέτρους α και β δίνεται από τους τύπους:

$$\mathbf{E}(X) = \frac{\alpha}{\alpha + \beta},$$

$$\mathbf{var}(X) = \frac{\alpha\beta}{(\alpha + \beta)^2(\alpha + \beta + 1)}.$$

και η κύρτωση ή υπερβολή είναι:

$$6 \frac{\alpha^3 - \alpha^2(2\beta - 1) + \beta^2(\beta + 1) - 2\alpha\beta(\beta + 2)}{\alpha\beta(\alpha + \beta + 2)(\alpha + \beta + 3)}$$

Αντιστρόφως, με E(X) και var(X) γνωστές οι παράμετροι α και β υπολογίζονται από τους τύπους:

$$\alpha = \mathbf{E}(X) \left( \frac{\mathbf{E}(X)}{\mathbf{var}(X)} [1 - \mathbf{E}(X)] - 1 \right),$$

$$\beta = \alpha \frac{1 - \mathbf{E}(X)}{\mathbf{E}(X)}$$

με  $0 < \mathbf{E}(X) < 1$  και  $0 < \mathbf{var}(X) < \mathbf{E}(X)(1 - \mathbf{E}(X))$ .

### Μορφές

Η β κατανομή μπορεί να πάρει τις διαφορετικές μορφές ανάλογα με τις τιμές των δύο παραμέτρων α και β.:

α=β=1 είναι η ομοιόμορφη κατανομή

$\alpha = \beta$  είναι συμμετρική περίπου στο 0.5  
 $\alpha < 1, \beta < 1$  είναι σε σχήμα υ  
 $\alpha > 1, \beta = 1$  αυξάνεται αυστηρά  
 $\alpha = 1, \beta > 1$  μειώνεται αυστηρά  
 $\alpha > 1, \beta > 1$  είναι δίκορφη

## *Άρθρα στην αγγλική γλώσσα*

# **1. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from nonruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats**

M. Florou<sup>1</sup>, L. Leontides<sup>1\*</sup>, P. Kostoulas<sup>1</sup>, C. Billinis<sup>2</sup>, M. Sofia<sup>2</sup>, I. Kyriazakis<sup>3</sup>, F. Lykotrafitis<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece

<sup>2</sup> Laboratory of Microbiology and Parasitology, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece

<sup>3</sup> Laboratory of Animal Husbandry, Nutrition and Welfare, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece

<sup>4</sup> Laboratory of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece

\*Corresponding author: L. Leontides, Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa, Greece, Tel +30 24410 66002, Fax +30 24410 66047, Email: leoleont@vet.uth.gr

**Short running head:** Paratuberculosis in wildlife in Greece



## Summary

We aimed to: (1) investigate whether non-ruminant wildlife interfacing with dairy sheep and goats of four Greek flocks endemically infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) harboured MAP and (2) genetically compare the strains isolated from the wildlife to those isolated from the small ruminants of these flocks. We cultured and screened, by polymerase chain reaction (PCR), pooled-tissue samples from 327 wild animals of 11 species for the MAP-specific IS900 insertion sequence. We also cultured faecal samples from 100 sheep or goats from each of the four flocks. MAP was detected in samples from 11 sheep, 12 goats, two mice, two rats, a hare and a fox. Only one rat had histopathological findings. Genetic typing categorized 21 isolates as cattle-type strains and two, from a house mouse and a goat respectively, as sheep-type strains; this is the first report of a rodent harbouring a sheep-type strain. The MAP-types that were most frequently isolated amongst the sheep and goats of each flock were also the ones isolated from sympatric rodents; those isolated from the fox and hare also belonged to the predominant ruminants strains.

## 1. Introduction

Spillover of infectious organisms from domestic herds to wildlife is of concern to wildlife managers and livestock keepers, both because it affects wildlife health and because wild animals may serve as potential reservoirs or disseminators of infection to livestock. Wildlife may become exposed to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) via feeding on contaminated grain, forage in pastures, faeces, or on infected prey. Potential routes of transmission of MAP from wildlife back to livestock include faecal contamination of feed and forage, both in farm buildings and on pastures (Daniels et al., 2003).

Paratuberculosis has long been considered a disease of ruminants only. Apart from domestic ruminants, the disease is also well documented in several wild ruminants (Williams et al., 1979; Jessup et al., 1981; Chiodini and Vankruiningen, 1983; Delisle et al., 1993; Buergelt et al., 2000). Only lately, isolations of MAP from non-ruminant wildlife species, with or without typical pathology suggesting natural paratuberculosis, are increasingly being reported. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* has been isolated from lagomorphs (Mathews and Sargent, 1977; Beard et al., 2001b; Raizman et al., 2005; Corn et al., 2005), rodents, badgers, racoons, nine-banded armadillos, opossums, northern short-tailed shrew, striped skunks (Beard et al., 2001a; Corn et al., 2005; Deutz et al., 2005), wild boars (Machackova et al., 2003; Alvarez et al., 2005), a rhinoceros (Cousins et al., 2000) and several bird species (Beard et al., 2001a; Corn et al., 2005; Deutz et al., 2005). The typical pathology of paratuberculosis has been noted in wild rabbits, wood mice, foxes, stoats, weasels and crows (Angus, 1990; Greig et al., 1997, 1999; Beard et al., 1999; Beard et al., 2001b; Beard et al., 2001a).

DNA-based subtyping techniques, such as IS900-restriction fragment length polymorphism (IS900-RFLP), IS1311 polymerase chain reaction - restriction endonuclease analysis (IS1311 PCR-REA) and pulse field gel electrophoresis (PFGE) have been applied to reveal the genetic variation of MAP-isolates and differentiate among strains infecting different populations (Collins et al., 1990; Whittington et al., 1998; Pavlik et al., 1999; Stevenson et al., 2002). Based on these and the cultural characteristics, two major groups of MAP strains have been identified, the sheep or Type-I strains, including slow-growing strains that appeared to have a strong host-preference for sheep, and the cattle or Type-II strains, including faster growing strains commonly isolated from cattle and a broad host-range including humans.

The great majority of Greek dairy sheep- and goat-flocks are kept under semi-intensive management systems. Typically, animals graze on pastures throughout most of the year and are offered a concentrate supplement. They spent most of the day outside and are moved into their sheds during the night. The great majority of these flocks are endemically infected with paratuberculosis (Dimarelli et al., 1991). Their management provides several opportunities for interspecies transmission of MAP between sheep, goats and wildlife which co-habit the same pastures or sheds. Before this study commenced, Greig et al. (1997, 1999) showed that wild rabbits living on the grazing grounds of beef cattle in Scotland harboured and excreted MAP, and, therefore, potentially acted as a maintenance reservoir for the infection in these farms. A similar scenario is possible in Greek dairy sheep- and goat-flocks, where other non-ruminant wildlife, such as rodents, hares and foxes, that frequently co-habit the sheds (rodents) and the grazing grounds (rodents, hares, foxes), may be involved. However, this possibility had never been investigated before. In this study we screened for MAP non-ruminant wildlife that lived in the sheds and on the grazing grounds of

endemically infected dairy sheep- and goat-flocks. At the same time, we screened for MAP samples collected from the sheep and goats of these flocks. The strains isolated from the small ruminants and the wildlife were genetically characterized by IS1311 PCR-REA.

## **2. Methods**

### *2.1 Study site and collection of samples*

Four dairy sheep- and goat-flocks, each with 250 to 350 animals, located in Central Greece (longitude: +39° 22', latitude: +22° 00'), situated at a distance of more than ten kilometres away from each other, were selected as study-sites. One of the flocks was a sheep-only flock, another was a goat-only flock and the remaining two were mixed, one with 60:40 and the other with 40:60 sheep-to-goat ratios. All flocks had a history of clinical paratuberculosis, but vaccination against MAP had never been applied. The sheep and goats were kept under semi-intensive management, for the purposes of milk production. The farmers selected breeding replacements amongst the daughters of the high-yielding ewes and goats. The males bought into the flocks originated from high-yielding animals from other flocks. The annual replacement rate in these flocks was around 20%, which was similar to the annual culling rate; this was because farmers received subsidies on the basis of flock size. The flocks were intensively monitored for 2 years. Prior to launching the study, the flock-owners were informed about the study's tasks and accepted that two of the authors (PK and MF) would visit their flock sheds to trap wildlife every second day from September 2001 to June 2003. The monitoring did not interfere with routine management or affect management decision in any way. Prior to sampling wildlife, the endemic level of infection in the flocks was confirmed both serologically, on sera obtained from 100 animals per flock randomly selected among >1 year-old animals (IDEXX ELISA test; IDEXX Laboratories, Portland, ME, USA), and bacteriologically, on gut samples collected at slaughter from animals >1 year-old with macroscopic lesions suggestive of paratuberculosis. During the study period, a total of 327 wild animals, from 11 species (Table 1), either were captured and euthanized, by using authorized, species-appropriate methods (live-captured traps and shooting), or were found dead in the sheds (mice, rats, house sparrows) or on the grazing grounds of the flocks (badgers, foxes, hares, magpies, a wolf, a weasel, a hawk and an owl). All animals were subjected to full necropsy, during which all gross-lesions of the intestine and other tissues were noted. The last parts of the duodenum and the ileum, the first parts of the cecum and the colon, the ileocecal and the colic lymph nodes and the liver were collected, and pooled for each animal, put into sterile bags and preserved at -20°C for culture and direct IS900-PCR. Parts of all samples, except those originating from animals found dead in advanced autolysis, were fixed in 10% neutral buffered formalin for histopathology. In addition to wildlife sampling, from September 2002 to February 2003, 100 clinically healthy animals, >one year-old from each flock, were faecally sampled. Approximately 10 gr of faeces were collected from the rectum of each animal. Samples were separated and put into sterile bags and preserved at -20°C for culture.

### *2.2 Culture*

Faecal and pooled tissue samples were cultured on Lowenstein-Jensen medium (LJ), using a slight modification of the procedure described by Whitlock and

Rosenberger (1990), and on Herrold's Egg-Yolk medium (HEYM), using the procedure described by Greig et al. (1999). More specifically, for culture on LJ, 2-5 gr of faeces, from sheep or goats, were placed in a tube with 15 ml sterile normal saline, mixed and allowed to stand for 30 min. From wildlife, 0.5 cm<sup>3</sup> of finely chopped tissues were homogenized for 30 sec in 10 ml of sterile distilled water with a Colworth Stomacher 80 (Seward Medical, London, UK). Subsequently, 5 ml of the faecal supernatants and the tissue homogenates were transferred to a fresh tube containing 25 ml of 0.9% hexadecylpyridinium chloride (HPC) (Sigma-Aldrich, Athens, Greece) in half strength Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid, Basingstoke, UK) and allowed to stand at 37<sup>0</sup>C for 24h. Subsequently, the supernatants were centrifuged at 1000rpm for 30 min and the formed pellet was collected and re-suspended in 1 ml half-strength BHI broth, containing vancomycin (100 mg/ml), nalidixic acid (100 mg/ml) and amphotericin B (50 mg/ml) (all Sigma antibiotics). The tube containing the pellet with the mixture of antibiotics was incubated for 48 h at 37<sup>0</sup>C. The prepared sediment was divided in three equal portions and approximately 300 µl (6 drops) were inoculated onto each of three slopes of LJ medium (two with mycobactin and pyruvate, and one plain).

For culture on HEYM, 1-2 gr of faeces or 0.5 cm<sup>3</sup> of finely chopped tissues were homogenized for 30 sec in 10 ml of sterile distilled water with a Colworth Stomacher 80 (Seward Medical). The homogenates were decontaminated by adding 10 ml of 1.5% HPC (Sigma-Aldrich) and left to stand overnight at room temperature. The resulting supernatants were centrifuged at 3080rpm for 20 min at 4<sup>0</sup>C, and each pellet was re-suspended in 10 ml of sterile distilled water. The centrifugation step was repeated, and each formed pellet was re-suspended in 1 ml of sterile distilled water. Suspensions were then transferred to a microfuge tube and centrifuged at 13,000rpm for 5 min at room temperature. The pellets were re-suspended in 0.5 ml of sterile distilled water. Following decontamination procedures, two slants of HEYM supplemented with mycobactin J and antibiotics (Becton Dickinson product code: 222233), were inoculated with 0.1 ml of the prepared suspension.

The inoculated slants were incubated for at least 7 months at 37<sup>0</sup>C. Growth was determined, both visually and microscopically, at weeks 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 and 30. Smears were prepared, using sterile procedures, from the inoculation surface of the medium and stained by Ziehl-Nielsen.

### 2.3 DNA Extraction

MAP DNA extraction procedures were identical for IS900-, IS1311- and IS1245- PCR assays. DNA extraction from pooled tissue samples and from colonies grown on LJ was performed using the Genomic DNA Purification Kit (Puregene, Minneapolis, MN, USA), according to the instructions provided by the manufacturer. To prepare DNA for analysis from HEYM cultures, one or two colonies were lifted off the media, taking care not to remove any media, added to 100µl of sterile water in a sterile 1.5ml tube. The contents of the tube were mixed vigorously for 1 min on a vortex mixer (IKA-Works Inc. Wilmington, NC, USA), heated at 100<sup>0</sup>C for 30 min to lyse the bacteria and centrifuged at 14000rpm for 10 min. The supernatant was transferred to another sterile 1.5 ml tube and the pellet was discarded. DNA samples were placed at 4<sup>0</sup>C, when analyzed immediately, or were stored at -20<sup>0</sup>C.

#### 2.4 PCR and restriction endonuclease analysis (REA) reactions

All culture isolates and pooled-tissue samples were subjected to PCR for the MAP-specific IS900 insertion sequence. Subsequently, IS1311-PCR followed by REA with *Hinf*I and IS1245-PCR were performed on all IS900-positive isolates. The IS1311 PCR-REA was performed to discriminate cattle- and sheep-type strains. The IS1245-PCR was used to identify *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (*M. avium*). The sequences of the primers used for each PCR are given in Table 2. All PCR reactions were performed as previously described (Millar et al., 1995; Marsh et al., 1999), using a slightly modified protocol. Each PCR reaction mixture contained 10 µl of genomic DNA, 10 µl 10x PCR buffer (Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200µM of a dNTP mix (Invitrogen), 7.5 U (for IS900-PCR) or 11.25 U (for IS1311- and IS1245-PCR) of Taq polymerase (Invitrogen), and 30 pmoles of the primers. The reaction volume was adjusted to 100 µl with DEPC treated H<sub>2</sub>O. The thermal cycler parameters included an initial denaturation step at 94°C for 3min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30sec, annealing at 62°C for 30sec (for IS900-PCR) or 15sec (for IS1311- and IS1245-PCR), extension at 72 °C for 2.5min (for IS900-PCR) or 1 min (for IS1311- and IS1245-PCR) and a final extension of 5 min at 72°C. Ten µl of each PCR product were analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (0.5µg/ml). A 100 bp DNA ladder (Invitrogen) was analysed on the same gel to serve as a size marker. The expected sizes of the products were 414bp for IS900-PCR, 268bp for IS1311-PCR and 198bp for IS1245-PCR.

All IS900-PCR products were gel-purified (Qiaquick Gel Extraction kit; Qiagen, West Sussex, UK) and sequenced in both directions by MWG Biotech (Ebersberg, Germany), using the forward and reverse PCR primers.

Restriction endonuclease analysis reactions were prepared, as described by Marsh et al. (1999), by adding 10 µl of IS1311-PCR product, 2U of *Hinf* I, 1.6 µl of buffer (supplied with restriction endonuclease) and made up to 16 µl with sterile purified water. Restriction digests were incubated at 22°C for 2 h and were assessed by electrophoresis in 4% agarose gel prestained with ethidium bromide (0.5µg/ml). The expected sizes of the REA products were 268, 218 and 50bp for the cattle strain digestion pattern and 268bp for the sheep strain digestion pattern.

#### 2.5 Histopathology

The formalin-fixed samples were dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin wax. Then, sections were cut and stained with hematoxylin and eosin (HE), for routine histopathological examination and by the Ziehl-Nielsen (ZN) method for detection of acid-fast bacteria (AFB).

### 3. Results

MAP was isolated from the samples of five wild animals and 23 small ruminants (Table 3). The isolates from three sheep, three goats and two house mice grew only on LJ and the remaining isolates only on HEYM. One faecal sample from a goat was positive on both culture-media. All isolates were re-cultured on HEYM slants, but eventually only those initially grown on HEYM grew again.

All isolates were positive for IS900. The IS900 insertion sequence was also detected in the pooled-tissue sample from one culture-negative black rat (Table 3). Sequence analysis of the IS900 insertion sequence confirmed that the isolates were

indeed MAP isolates. IS1311 PCR-REA categorized 21 isolates into cattle- and two into sheep-type strains (Table 4). The latter originated from a goat and a house mouse (Figure 1). Seven isolates were not typed, possibly due to inadequate quantity of DNA. The positive samples from one of the mixed flocks originated from two sheep, a goat, a black rat and a house mouse, and were all classified as cattle-type strains. Those from the other mixed flock came from four goats, a sheep and a house mouse. The latter was classified into sheep-type and the former into cattle-type strains. In the goat only flock, three goats were infected with cattle-type strains and one, which was positive in both culture media, by both strain-types. The isolates from the sheep only flock, were from four sheep and a black rat and belonged to the cattle-type strains (Table 4). The isolates from the fox and the hare, found dead and shot respectively, on the grazing grounds of the flocks, were typed as cattle strains (Figure 1). None of the isolated strains had the *M. avium* specific IS1245 insertion sequence.

No gross lesions of paratuberculosis were noted at necropsy in any of the wildlife animals examined. The formalin-fixed samples from the IS900-positive wild animals were examined histologically. No acid-fast bacteria (AFB) or granulomatous infiltrates consistent with MAP-infection were seen in the tissues of all but one animal, a black rat. In this rat intestine there were small numbers of AFB-positive macrophages scattered throughout the intestinal lamina propria. Only rarely >5 AFB were seen in the cytoplasm of these cells.

#### 4. Discussion

We detected or isolated MAP from four different wildlife species co-habiting the sheds and the grazing grounds of paratuberculosis-affected flocks. Specifically, MAP was recovered from two black rats and two house mice trapped in the sheds and from a fox and a hare found dead or shot on the grazing grounds of the flocks. We failed to recover MAP from magpies, badgers, a wolf, a weasel, a hawk and an owl but the available number of animals from these species was very small (Table 1). We found no gross lesions of paratuberculosis in any of the wild animals examined. However, there were AFB in the intestinal macrophages of one culture negative black rat, which was found IS900-positive by direct tissue-PCR. This finding indicates, very likely infection and not “passing-through” of recently ingested contaminated material. Beard et al. (2001a) also found numerous AFB-containing macrophages in a culture-positive wood mouse. Other authors have also noted the disagreement between histological and culture results (Beard et al., 2001a; Corn et al., 2005). This has also been evident in experimentally infected mice and rats, which did not consistently develop clinical disease and histological lesions (Harris and Barletta, 2001).

Stevenson et al. (2002) when characterized a large battery of isolates from nonruminant wildlife, by IS1311 PCR-REA, classified all of them into cattle- or type-II strains. All but one of our isolates were also classified into the cattle-group. However the isolate from a house mouse belonged to the sheep-group. To our knowledge this is the first report of a sheep-type strain isolated from nonruminant wildlife. Therefore, it is likely that nonruminant wildlife may be susceptible to infection with either type of MAP. The mouse was trapped in the shed of a flock where only cattle-type strains had been isolated from MAP-shedding sheep and goats. This may indicate either that our sampling and isolation protocols failed to detect infection of the flock with sheep-type strains or that the mouse picked-up MAP elsewhere. Evidently, the latter is epidemiologically more important. Whittington et

al. (2003) reported that recovery of MAP from environmental samples in sheep and goat farms in New Zealand was very low 5 months after the infected stock were removed, but infected wildlife with longer life spans, such as mice, rats, hares and foxes, may continue shedding at some level beyond this period of time.

Haydon et al. (2002) suggested that genetic characterization of pathogens isolated from different populations provides a powerful tool for identifying key components of likely reservoirs. They proposed that a reservoir should be defined as one or more epidemiologically connected populations or environments in which the pathogen can be permanently maintained and from which infection may be transmitted to the defined target population. The animal populations in a reservoir may include different species which are directly or indirectly connected to each other. In Scotland, wild rabbits were initially suspected as a possible maintenance reservoir for paratuberculosis in beef cattle (Judge et al., 2005, 2006), because molecular genetic typing by RFLP and PFGE could not discriminate between rabbit and cattle isolates from the same or different farms (Greig et al., 1999). This was later proved to be the case through genetic characterisation.. Most of our isolates from the four flocks and the non-ruminant wildlife were classified into the cattle-type strains. Interestingly, the majority of the wildlife isolates from each flock belonged to the same MAP-type with the sheep and/or goat isolates from the same flock. The isolates from the fox and the hare also belonged to the predominant, among sheep and goats, cattle-type strains. The rodents probably picked-up MAP through scavenging livestock feed on floors contaminated with livestock faeces. The fox probably picked-up MAP when consuming contaminated prey, like rodents and hares. These findings indicate that interspecies transmission may have occurred and that rodents, foxes and hares and their environment may have a potential role in a complex maintenance reservoir for MAP infection of small ruminant populations. Daniels et al. (2001, 2003) reported that infected wild rabbits in Scotland excreted up to 4 millions CFU/gr of faeces, an amount which was sufficient to constitute an infective dose, and that cattle did not avoid grazing on pasture contaminated by rabbit faecal pellets. Clearly, since the grazing behaviour of sheep and goats is different from cattle, further studies considering this and the pathogenesis of MAP in non-ruminant wildlife are needed to determine whether non-ruminant wildlife species represent true threats for infection of small ruminants. It is suggested that infected wildlife may have the greatest effect on the epidemiology of MAP infection on farms that have eliminated all infected livestock from the premises or on MAP-free farms located in the same geographic area as infected farms.

We isolated both MAP types from the faecal samples of a goat. Mixed infections with MAP strains, belonging to different RFLP types, have already been reported in a cow (Pavlik et al., 1995). Also, Corn et al. (2005) recovered three distinct short sequence repeat genotypes from an armadillo and two from a feral cat. The goat in our study belonged to a flock from which only cattle-type strains were recovered. This goat may have picked up this strain elsewhere, because the flock was not operating as a completely closed flock, or whilst grazing on communal pastures where different flocks have the potential to interchange different MAP strains. Of course, it is also possible that both MAP-types existed in this and the other three study flocks, but we underestimated the prevalence of sheep-type strains because: (1) they are very difficult to culture, as there is still disagreement on the most appropriate culture media for MAP (Whittington et al., 1999; de Juan et al., 2006) and (2) routine decontamination protocols decreased the number of sheep-type strains isolated (Reddacliff et al., 2003).

In conclusion, we examined a wide range of wildlife species co-habiting four infected sheep- and goat-flocks for the presence of MAP. We found that wildlife belonging to four different species (mice, rats, foxes and hares) and the domestic livestock exposed to this wildlife shed and/or harboured the organism. The mice harboured both MAP-types, whereas, only cattle-type strains were detected in the other wildlife species. This is the first report of sheep-type strain being isolated from non-ruminant wildlife. The MAP-types most frequently isolated from the sheep or goats of each flock were also the ones isolated from sympatric rodents. These facts strongly suggest that interspecies transmission of MAP may have occurred and substantiate a potential role of wildlife in the epidemiology of sheep and goat paratuberculosis. Although further studies considering the grazing behaviour of sheep and goats and the pathogenesis of MAP in non-ruminant wildlife are needed to determine whether the non-ruminant wildlife species represent true threats for the infection of small ruminants, our results strongly indicate that the wildlife may have the greatest effect on farms that have eliminated all infected livestock from the premises or on MAP-free farms located in the same geographic area as infected farms.

### **Acknowledgements**

This research was part of a project entitled “The role of wildlife in the epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in domestic ruminants in Europe” funded by the European Commission (contract number: QLK2-CT-2001-00879). The first author also acknowledges financial support from the Greek Ministry of Education (Project “Herakleitos”).



## References

1. Alvarez, J., de Juan, L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Mateos, A., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet. Rec.* 156, 212-213.
2. Angus, K.W., 1990. Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Pathol.* 103, 101-105.
3. 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.
4. Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
5. Beard, P.M., Rhind, S.M., Buxton, D., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Greig, A., Hutchings, M.R., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001b. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J. Comp. Pathol.* 124, 290–299.
6. Buergelt, C.D., Layton, A.W., Ginn, P.E., Taylor, M., King, J.M., Habecker, P.L., Mauldin, E., Whitlock, R., Rossiter, C., Collins, M.T., 2000. The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol.* 37, 428-438.
7. Chiodini, R.J., Vankruiningen, H.J., 1983. Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 168–169.
8. Collins, D.M., Cavaignac, S., de Lisle, G.W., 1997. Use of four DNA insertion Sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes.* 11, 373-380.
9. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
10. 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.
11. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184-19016.
12. Daniels, M.J., Ball, N., Hutchings, M.R., Greig, A., 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161, 306-313.
13. Daniels, M.J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J.M., Hutchings, M.R., 2003. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol. Infect.* 130, 553-559.
14. de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L., 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927-5932.

15. Delisle, G.W., Yates, G.R., Collins, D.M., 1993. Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 567–571.
16. Deutz, A., Spergser, J., Wagner, P., Rosengarten, R., Kofer, J., 2005. (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild animal species and cattle in Styria/Austria) *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 118, 314-320.
17. Dimarelli, Z., Xenos, G., Argyroudis, S., Papadopoulos, O., 1991. A survey of ovine and caprine paratuberculosis in the Thessaloniki area, Greece. *Paratuberculosis Newsletter.* 3, 8-9.
18. 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.
19. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E. 2nd, McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
20. Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol Rev.* 14, 489-512.
21. Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468-1473. Review.
22. Jessup, D.A., Abbas, B., Behymer, D., Gogan, P., 1981. Para-tuberculosis in tule elk in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 1252–1254.
23. Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Allcroft, D.J., Hutchings, M.R., 2005. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6033-6038.
24. 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.
25. Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzliková, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagy, G., Lipiec, M., Ocepek, M., Pavlik I., 2003. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Vet. Med.* 48, 51-65.
26. Marsh, I., Whittington, R., Cousins, D., 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell. Probes.* 13, 115-126.
27. Mathews, P.R.J., Sargent, A., 1977. The isolation of mycobacteria from the brown hare (*Lepus europaeus*). *Br. Vet. J.* 133, 399-404
28. 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.
29. 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.
30. Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., Rychlik, I., 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism

- analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods. 38, 155–167.
31. Raizman, E.A., Wells, S.J., Jordan, P.A., DelGiudice, G.D., Bey, R.R., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. Can. J. Vet. Res. 69, 32-38.
  32. 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.
  33. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 40, 1798-1804.
  34. Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. Proceedings of the 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the USAHA, pp. 280-285.
  35. Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. Mol. Cel. Prob. 12, 349-358.
  36. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. J. Clin. Microbiol. 37, 1077–1083.
  37. Whittington, R.J., Marsh, I.B., Taylor, P.J., Marshall, D.J., Taragel, C., Reddacliff, L.A., 2003. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. Aust Vet J. 81, 559-63
  38. Williams, E.S., Spraker, T.R., Schoonveld, G.G., 1979. Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado. J. Wildl. Dis. 15, 221–227

**Table 1.** Wildlife trapped (rodents), shot (hares) or found dead in the sheds and on the grazing grounds of four endemically infected with MAP Greek sheep and goat flocks, from September 2001 to June 2003.

Common name	Scientific name	No sampled
House mouse	<i>Mus musculus</i>	149
Black rat	<i>Rattus rattus</i>	55
Magpie	<i>Pica pica</i>	30
House sparrow	<i>Passer domesticus</i>	32
European Brown Hare	<i>Lepus europaeus</i>	44
Fox	<i>Vulpes vulpes</i>	10
Badger	<i>Meles meles</i>	3
Wolf	<i>Canis lupus</i>	1
Weasel	<i>Mustela nivalis</i>	1
Hawk	<i>Accipiter nissus</i>	1
Owl	<i>Asio otus</i>	1
Total		327

**Table 2.** Summary of the target, the specificity and the sequences of the primer pairs, for IS900-, IS1311- and IS1245-PCR; the relevant references are in square brackets. The IS900-PCR was used to identify the insertion sequence which is specific to MAP, the IS1311-PCR, followed by REA, was used to discriminate cattle from sheep-type strains, while the IS1245-PCR was used to identify the insertion sequence which is found only in *M. avium*.

PCR target	Species specificity	Primer pairs	Sequence (5'-3')	Reference
IS900	MAP	P90	GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG	Millar et al. (1995)
		P91	GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC	Millar et al. (1995)
IS1311	MAP	M56	GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA	Marsh et al. (1999)
	<i>M. avium</i>	M94	CAG CGA TCG TCG ACA GTG TG	Marsh et al. (1999)
IS1245	<i>M. avium</i>	M114	CTC GAC GCA CTG CGC ACC	Collins et al. (1997)
		M115	CCG CAG TTC CAG GTC CCC T	Collins et al. (1997)

**Table 3.** Summary of results from the culture of faecal samples from clinically healthy sheep and goats of four flocks and of pooled tissue samples from wildlife.

Species (sample type)	No of culture positive animals (total number of animals examined)	No of animals with IS900-positive tissues
Sheep (faeces)	11(180)	ND <sup>a</sup>
Goats (faeces)	12(220)	ND
House mouse (tissues)	2(149)	0
Black rat (tissues)	1(55)	1
Red fox (tissues)	1(10)	0
European Brown Hare (tissues)	1(44)	0
Magpie (tissues)	0(30)	0
House sparrow (tissues)	0(32)	0
Badger (tissues)	0(3)	0
Wolf (tissues)	0(1)	0
Weasel (tissues)	0(1)	0
Hawk (tissues)	0(1)	0
Owl (tissues)	0(1)	0
Total	28(727)	1

<sup>a</sup>ND not done

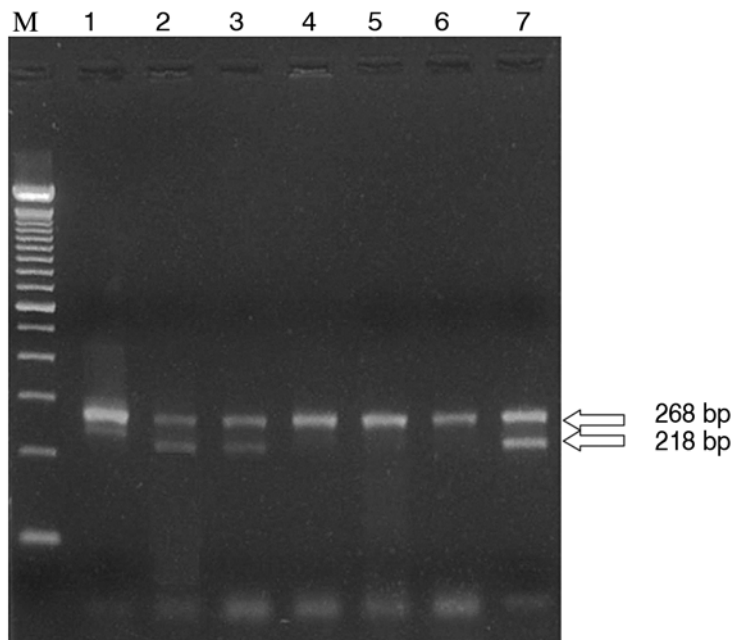
Each pooled tissue sample consisted of the last part of the duodenum and ileum, the first part of the cecum and colon, the ileocecal and colic lymph nodes and the liver of each animal. The pooled tissue samples were also screened by PCR for the MAP-specific IS900 insertion sequence. The isolates grew either on Lowenstein-Jensen or on Herrold's Egg-Yolk medium and were confirmed as MAP by IS900-PCR. The isolate from a goat faecal sample grew on both media. A pooled-tissue sample from a culture-negative black rat was positive to IS900-PCR.

**Table 4.** Results of genetic characterisation with IS1311-PCR and REA with HinfI, of 23 of the isolates arranged by sampling location and origin of the isolate. The goat sample (from flock 2), which was positive on both culture media harboured both MAP-types.

Sampling location (flock type)	Origin of the isolates	IS1311 PCR-REA	
		Cattle type	Sheep type
Flock 1 (mixed)	Sheep	2	NA <sup>a</sup>
	Goat	1	NA
	Black rat	1	NA
	House mouse	1	NA
Flock 2 (goats)	Goat	4	1
Flock 3 (sheep)	Sheep	4	NA
	Black rat	1	NA
Flock 4 (mixed)	Sheep	4	NA
	Goat	1	NA
	House mouse	0	1
Grazing grounds of the 4 flocks	European Brown Hare	1	NA
	Red fox	1	NA
<b>Total</b>		<b>21</b>	<b>2</b>

<sup>a</sup>NA: non-applicable

**Figure 1.** Typical IS1311 PCR-REA patterns with *Hinf*I-digested amplicons in adjacent lanes. MAP cattle-type strains (lanes 2, 3) recovered from a fox and a hare respectively and MAP sheep-type strains (lanes 4 and 5) recovered from a house mouse and a goat are shown. Lanes 1 and 6 represent positive controls for sheep-type strains (ileum from sheep previously positive by IS900-PCR and IS1311 PCR-REA) and lane 7 a positive control for cattle-type strains (MAP strain ATCC19698). Lane M: 100 bp ladder



## **2. Genetic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Greek sheep and goats, their feed and litter and associated non-ruminant wildlife**

M. Florou<sup>1</sup>, L. Leontides<sup>1\*</sup>, P. Kostoulas<sup>1</sup>, C. Billinis<sup>2</sup>, G. C. Fthenakis<sup>3</sup>, M. Sofia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Animal Health Economics, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology and Parasitology, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

<sup>3</sup>Clinic of Obstetrics and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece

\*Corresponding author: Assoc. Prof. L. Leontides, Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa, Greece, Tel +30 24410 66002, Fax +30 24410 66047, Email: leoleont@vet.uth.gr

**Short running head:** Genetic comparison of MAP strains



## Summary

The aim of this paper was to genetically compare *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolates from Greek sheep and goats, their compound feed and litter and the associated non-ruminant wildlife. We genetically characterized the strains by using both the IS1311 polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction endonuclease analysis (REA) and the sequence and phylogenetic analysis of a part of the IS900 insertion sequence. We cultured and screened by PCR for the IS900 insertion sequence, pooled-tissue samples from 327 wild animals of 11 species, trapped or found dead in the sheds or on the grazing grounds of four endemically infected with paratuberculosis sheep and goat flocks. We also cultured 60 litter and 15 concentrate feed samples and faecal samples from 100 sheep or goats from each of the four flocks. In addition, we cultured and screened by PCR pooled-tissue samples from the gastrointestinal tracts of 142 sheep and 72 goats, collected at three abattoirs receiving animals from the region around the flocks. MAP was detected in samples from six wild animals, 33 small ruminants, one litter and one feed sample. IS1311 PCR-REA classified 25 isolates into cattle- and ten into sheep-type strains. Generally, the same MAP type was recovered from feed and litter samples, wildlife and sympatric sheep and goats. The sequence and phylogenetic analysis on a part of the IS900 sequence discriminated 19 MAP strains according to sampling site and showed that interspecies transmission between wildlife and sheep and goats has occurred.

## 1. Introduction

Although many emerging diseases of human, domestic animal, and wildlife populations are considered to be maintained in reservoir hosts (Daszak et al., 2000), these reservoirs are rarely identified. Haydon et al. (2002) defined a reservoir as one or more epidemiologically connected populations or environments, in which the pathogen can be permanently maintained and from which infection is transmitted to the defined target population. They pointed out that reservoirs can only be understood with reference to defined target populations and that genetic characterization of pathogens isolated from different populations and their environment provide a powerful tool for identifying key components of reservoirs.

Despite the fact that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) has been recovered from many non-ruminant wildlife species (Beard et al., 2001; Corn et al., 2005; Anderson et al., 2007), the potential role of these animals as components of the pathogen's natural reservoirs is yet unclear. Generally, there is a paucity of studies comparing strains from non-ruminant wildlife to those from well defined and epidemiologically associated to the wildlife livestock populations. Greig et al. (1997, 1999) used restriction fragment length polymorphism (RFLP) and pulse field gel electrophoresis (PFGE) for typing strains and found no difference between strains from wild rabbits and in-contact beef cattle. Palmer et al. (2005) showed that MAP strains from cats and cattle of US dairy herds belonged to the same RFLP type.

There are no similar studies about sheep and/or goats and in-contact non-ruminant wildlife. Because the pathogenesis of ovine/caprine paratuberculosis is different than that in cattle (Clarke and Little, 1996; Clarke, 1997; Corpa et al., 2000; Tafti and Rashidi, 2000) and because small ruminants may harbour different MAP strains than cattle (Collins et al., 1990; Stevenson et al., 2002), the results of studies on cattle should not be extrapolated to sheep and goats. Thus, we designed a study in order to investigate the potential role in the epidemiology of paratuberculosis of some non-ruminant wildlife living in the environment, in the sheds and on the grazing grounds, of a geographically defined population of Greek sheep and goats endemically infected with paratuberculosis (Florou et al., 2007). The aim of this paper was to genetically compare MAP isolates from the sheep and goats, their compound feed and litter and the associated non-ruminant wildlife. We genetically characterized the strains by using both the IS1311 polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction endonuclease analysis (REA) and the sequence and phylogenetic analysis of a part of the IS900 insertion sequence. Although the IS1311 PCR-REA has been successfully used to discriminate between the two major MAP genetic types (Marsh et al., 1999), the IS900 sequence and phylogenetic analysis has not been used previously for MAP strain comparison.

## 2. Methods

### 2.1 Study sites and collection of samples

Four dairy sheep- and goat-flocks, each with 250 to 350 animals, located in Central Greece, situated at a distance of more than 10 kilometres away from each other, with a history of clinical paratuberculosis, were selected as study-sites. One of the flocks was a sheep-only flock, another was a goat-only flock and the remaining two were mixed, one with 60 to 40% and one with 40 to 60%, sheep-to-goat ratios. During a two-year period, the flocks had been regularly visited by two of the authors (MF and PK) in order to identify and trap wildlife that lived in the flocks' sheds or

collect wildlife that were found dead or were shot by hunters on the grazing grounds of the flocks (Table 1). In addition to wildlife sampling, faecal samples were collected directly from the rectum of 100 clinically-healthy animals from each flock, aged over 1 year. Details on the flocks' general management, as well as techniques for sampling and processing of samples have been presented elsewhere (Kostoulas et al., 2006; Florou et al., 2007). In addition to the samples collected from animals, we collected approximately 60 samples of the litter, consisting of faecally contaminated hay and soil, of each flock, using quadrat sampling. Then, 15 feed samples of concentrate feed, approximately 10 g each, were also taken from the storage bins of each flock. Many of the feed samples appeared to be spoiled with rodents' faeces.

The trapped wildlife were euthanized with appropriate methods. All wildlife were subjected to a full necropsy during which the last part of the duodenum and ileum, the first part of the caecum and the colon, and the ileocaecal and colic lymph nodes of each animal were excised, pooled and grinded and preserved at -20°C for culture and direct IS900-PCR.

Because many of the examined wildlife species were either found dead or shot by hunters (badgers, foxes, hares, magpies, a wolf, a weasel, a hawk and an owl) on the grazing grounds where the sheep and goats of the study-flocks grazed together with neighboring flocks, samples were also collected from sheep and goats slaughtered in three local abattoirs, receiving animals from the region around the study-flocks. During fortnightly visits throughout a six-month period, two of the authors (MF and PK), independently, visually assessed the gastrointestinal tracts of slaughtered animals, older than one-year, for paratuberculosis lesions. Those found suspect, in total the gastrointestinal tracts of 142 sheep and 72 goats, were collected. The same parts of the gastrointestinal tract as above were collected and similarly processed.

## 2.2 Culture, PCR and REA reactions

All samples were cultured on Lowenstein-Jensen (LJ) and on Herrold's Egg-Yolk medium (HEYM), following previously described procedures (Whitlock and Rosenberger, 1990; Greig et al., 1999; Florou et al., 2007). The inoculated slants were incubated for at least 7 months at 37°C. Growth was determined, both visually and microscopically 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 and 30 weeks after beginning of the incubation.

MAP DNA extraction procedures were identical for IS900-, IS1311- and IS1245- PCR assays. DNA extraction from pooled tissue samples and from colonies grown on LJ was performed using the Genomic DNA Purification Kit (Puregene, Minneapolis, MN, USA), according to the instructions provided by the manufacturer. To prepare DNA for analysis from HEYM cultures, one or two colonies were lifted off the media, taking care not to remove any media, added into 100µl of sterile water, vigorously mixed for 1 min on a vortex mixer (IKA-Works Inc. Wilmington, NC, USA), heated at 100°C for 30 min to lyse the bacteria and centrifuged at 15339 g for 10 min. The supernatant was transferred to another sterile 1.5 ml tube and the pellet was discarded. DNA samples were placed at 4 °C, when analyzed immediately or alternatively were stored at -20 °C.

All culture isolates and pooled-tissue samples were subjected to PCR for the MAP-specific IS900 insertion sequence. Subsequently, IS1311-PCR followed by REA with *Hinf*I and IS1245-PCR were performed on all IS900-positive isolates. The IS1311 PCR-REA was performed to discriminate cattle- (C) and sheep-type strains (S). The IS1245-PCR was used to identify *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (M).

*avium*). The sequences of the primers used for each PCR are given in Table 2. All PCR reactions were performed as previously described (Millar et al., 1995; Marsh et al., 1999; Florou et al., 2007). The expected sizes of the products were 414bp for IS900-PCR, 268bp for IS1311-PCR and 198bp for IS1245-PCR.

Restriction endonuclease analysis reactions were prepared, as described by Marsh et al. (1999). The expected sizes of the REA products were 268, 218 and 50bp for the C strain digestion pattern and 268bp for the S strain digestion pattern.

### 2.3 IS900 sequence analysis

To determine the extent of genetic heterogeneity of the MAP isolates, PCR products (414 bp) were gel-purified (Qiaquick Gel Extraction kit; Qiagen, West Sussex, UK) and sequenced in both directions commercially (MWG Biotech, Ebersberg, Germany), using the forward and reverse primers. In 23 strains, sequence analysis was performed on 178 nt of a 414 bp PCR fragment of the IS900 coding region. All the samples were analysed twice and only high-quality sequences were used. Nucleotide sequence alignments and phylogenetic analysis were performed on 178 bp of the IS900 coding region using the program MEGA 4 (Tamura et al., 2007). The evolutionary history of 19 Greek strains was inferred using the Neighbor-Joining method and the evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Figure 1).

## 3. Results

Culture and IS900-PCR results for MAP isolation are shown in Table 3. MAP were isolated from five wild animals, 33 small ruminants, from one litter and one compound feed sample. The isolates from four sheep, six goats and two house mice grew only on LJ and the remaining isolates only on HEYM. One faecal sample from a goat was positive on both culture-media. All isolates were re-cultured on HEYM slants, but eventually only those initially grown on HEYM grew again. All isolates were positive for IS900. The IS900 insertion sequence was also detected in the pooled-tissue samples of three culture-positive sheep, seven culture-positive goats and one culture-negative black rat (Table 3).

The results of the IS1311 PCR-REA are in Table 4. Twenty five isolates were categorized into C- and ten into S-type strains. Seven isolates were not typed, possibly due to inadequate quantity of DNA. In flock 1, the isolates originated from two sheep, one goat, one black rat, one house mouse and one feed sample. They were categorized as C type strains. In flock 2, the litter sample and samples from three goats yielded C type strains, while the sample from one goat yielded both MAP types. The isolates from flock 3 were from four sheep and one black rat and belonged to the C type. Finally, those from flock 4 came from four goats, one sheep and one house mouse. The isolate from the latter was classified into S type and the other ones into C type. The isolates from the fox and the hare were typed as C strains. The isolates from the abattoirs were categorized as S type strains except for the isolates from one sheep and one goat, which were C type strains. None of the isolated strains had the *M. avium* specific IS1245 insertion sequence.

### IS900 sequence and phylogenetic analysis

Sequence analysis on 178 nt of the IS900 coding region confirmed that the 23 Greek isolates were indeed MAP isolates. The GenBank accession numbers, the sampling location, the species of origin and the MAP type of the strains are in Table 5. Nucleotide sequence alignments between ten of the strains isolated from sheep and goats sampled in the abattoirs showed that seven of the strains were identical (coded GRE-12, GRE-15, GRE-16, GRE-20, GRE-21, GRE-22, GRE-23) displaying 100% nucleotide identity. As a consequence, three of them were selected for phylogenetic analysis based on MAP type (Table 5). The phylogenetic tree (Figure 1) indicated that the strains formed two major clusters. The first one comprised of strains from flocks 1-3, from the slaughterhouse samples, and from the fox and the hare. Generally, in this cluster, the strains from the flocks were clustered together; the exception was the strains from flock 1. Those from the fox and the hare were clustered with strains from sheep and goat sampled in the abattoirs. The overall nucleotide identity in this cluster varied from 98 to 100%. The second cluster included strains from flock 4 displaying 100% nucleotide identity. Strains from non-ruminant wildlife did not form a separate group and, with the exception of the house mouse strain from flock 1, they were closely related to sheep and goats strains.

#### 4. Discussion

In a previous study, we reported the recovery of MAP from non-ruminant wildlife cohabiting with endemically infected with paratuberculosis sheep and goats (Florou et al., 2007). In this study, we used molecular techniques to characterize and compare isolates from the sheep and goats, their feed and litter and associated wildlife. We proposed that strain-similarity between the wildlife and litter and feed isolates from one side and those from the domestic ruminants from the other would support the theory that in defined target populations non-ruminant wildlife and their environment may play a role as components of a maintenance reservoir of MAP (Haydon et al., 2002). We isolated MAP from the target population which included adult sheep and goats of four endemically infected flocks, as well as adult sheep and goats slaughtered in three abattoirs, receiving animals from the region around the four flocks. We also recovered MAP from the wildlife, the concentrated feed and the litter collected from the flocks' sheds.

In general, MAP strains isolated from each flock were classified into the same MAP type. Interestingly, in one of the flocks, MAP was recovered from rodents, sheep, goats and the feed, all the isolates being C type strains (Table 3). Since, the feed samples were visually contaminated with rodents' faeces and had not been exposed to sheep and goats, given that sampling was carried out directly from inside the storage bins, this finding suggests that rodents may excrete MAP and contaminate the ruminant feed. Beard et al. (2001) have also isolated MAP from wood mice faeces. Other studies have reported the isolation of MAP from faeces collected from other non-ruminant wildlife, such as opossums, armadillos, feral cats, racoons, foxes, stoats and crows (Corn et al., 2005; Beard et al., 2001). In Scotland, wild rabbits have been found to consist a real risk for paratuberculosis infection of beef cattle, since they excrete MAP, up to  $4 \times 10^6$  c.f.u./g of faeces, an amount sufficient to constitute an infective dose (Daniels et al., 2001, 2003). In another flock, C type MAP strains were recovered from goats and the litter. Whittington et al. (2003) reported low recovery of MAP from environmental samples in sheep and goat farms 5 months after removal of the infected stock. They argued that infected wildlife with longer life spans, such

as mice and rats, may continue shedding at some level beyond this period of time and thus, re-contaminate the environment and the food.

We also conducted sequence and phylogenetic analysis on a part of the IS900 insertion sequence, which is widely used for MAP identification because it is unique for this species (Green et al., 1989). IS900 insertion sequence appears in 15-18 copies in MAP's genome and has been used as the base for the application of many fingerprinting techniques for strain discrimination (Motiwala et al., 2006). In an effort to obtain information relevant to the epidemiology of the organism, many DNA fingerprinting methods have been applied to isolates from different species (reviewed by Motiwala et al., 2006). Indisputably, nucleotide sequence is considered to be the most accurate and powerful method for bacterial strain discrimination (Carrington and Hoelzel, 2001), especially when strains are phenotypically and genetically homogeneous, as are MAP strains (Motiwala et al., 2006). The phylogenetic analysis indicated that MAP strains recovered from wildlife were clustered with sheep and goat isolates (Figure 1). For example, the house mouse strain from flock 4, which was classified as S type, was grouped together with isolates from sympatric sheep and goats which were classified as C type. Similarly, the strains from the fox and the hare which were classified as C type were closely related to sheep and goat isolates from the abattoirs, the majority of which was classified as S type. These findings are not in accord with suggestions regarding a possible host specificity of MAP strains isolated from different ruminant species (Collins et al., 1990; Stevenson et al., 2002). Furthermore, they lend strong support for the hypothesis of interspecies MAP transmission, between small ruminants and wildlife. Previous reports have shown the lack of existence of wildlife specific strains in Scotland and the USA (Greig et al., 1997, 1999; Palmer et al., 2005). The only exception, in our study was the house mouse isolate from flock 1, which, although it was categorized as C type, was not grouped together with the sympatric goat isolate, also C type (Figure 1). This may indicate that either our sampling and isolation protocol failed to detect infection of the flock with this strain or that the mouse picked up MAP elsewhere. Within-flock genetic variation of MAP strains was observed in Spain, where 18 goat isolates from a single farm in Toledo were divided by PFGE analysis into five different 'multiplex' profiles (de Juan et al., 2005). Also, de Juan et al. (2006) described a mixed infection with C and S strains in a cattle herd.

The sequence and phylogenetic analysis of MAP strains in our study revealed enough variation to make discriminations possible that appeared clonal by IS1311 PCR-REA. Sheep and goat isolates from flocks 2, 3 and 4, typed as C strains, were further discriminated according to their sampling site. Especially strains from flock 4 formed a totally separate cluster indicating that animals were infected with a different MAP strain. This finding may reflect restricted strain sharing among flocks in the studied area, although the semi-intensive management of the flocks is generally similar (Kostoulas et al., 2006; Florou et al., 2007).

Overall, our findings provide clear evidence that in the small ruminant population studied rodents, foxes and hares and their environment may play a role, not entirely insignificant, in the transmission of MAP within and among flocks. The semi-intensive management pattern of the sheep and goat flocks, in our study, is typical to the one followed by the great majority of sheep and goat flocks in many other parts of Greece, of other Southern European and Middle-eastern countries. Therefore, one can suggest the present results may apply to a significant proportion of flocks in that geographic area. Therefore, attempts to control paratuberculosis, in a

local or national level, should consider the possibility of a MAP reservoir outside the ruminant hosts.

### **Acknowledgements**

This research was part of a project entitled “The role of wildlife in the epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in domestic ruminants in Europe” funded by the European Commission (contract number: QLK2-CT-2001-00879). The first author also acknowledges financial support from the Project “Herakleitos” which is co-funded by the European Union – European Social Fund & National Resources – EPEAEK II .

## References

1. Anderson, J.L., Meece, J.K., Koziczowski, J.J., Clark, D.L.Jr., Radcliff, R.P., Nolden, C.A., Samuel, M.D., Ellingson, J.L., 2007. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Scavenging Mammals in Wisconsin. *J. Wildl. Dis.* 43, 302-308.
2. Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
3. Carrington, M., Hoelzel, A.R., (eds), 2001. *Molecular Epidemiology; A Practical Approach*. Oxford University Press. 2001: pp. 57.
4. Clarke, C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
5. Clarke, C.J., Little, D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114, 419-437.
6. Collins, D.M., Cavaignac, S., de Lisle, G.W., 1997. Use of four DNA insertion Sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes.* 11, 373-380.
7. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591-1596.
8. 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.
9. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
10. Daniels, M.J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J.M., Hutchings, M.R., 2003. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol. Infect.* 130, 553-559.
11. Daniels, M.J., Ball, N., Hutchings, M.R., Greig, A., 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161, 306-313.
12. Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Wildlife ecology—emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science.* 287, 443-449.
13. de Juan, L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106, 249-257.
14. de Juan, L., Alvarez, J., Aranaz, A., Rodriguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Dominguez, L., 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115, 102-110.
15. Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., Lykotrafitis, F., 2007. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 1-9. Published online: 20 Jun 2007; doi:10.1017/S095026880700893X.



16. 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.
17. 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.
18. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E. 2nd, McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
19. Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468-1473. Review.
20. Kostoulas, P., Leontides, L., Enoe, C., Billinis, C., Florou, M., Sofia, M., 2006. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76, 56-73.
21. Marsh, I., Whittington, R., Cousins, D., 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell. Probes.* 13, 115-126.
22. 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.
23. Motiwala, A.S., Li, L., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2006. Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect.* 8, 1406-1418.
24. Palmer, M.V., Stoffregen, W.C., Carpenter, J.G., Stabel, J.R., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J. Wildl. Dis.* 41, 629-635.
25. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
26. Tafti, A.K., Rashidi, K., 2000. The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 47, 487-495.
27. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24, 1596-1599.
28. Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. Proceedings of the 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the USAHA, pp. 280-285.
29. Whittington, R.J., Marsh, I.B., Taylor, P.J., Marshall, D.J., Taragel, C., Reddacliff, L.A., 2003. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust Vet J.* 81, 559-63

**Table 1.** Species of wildlife in sheep or goat environment, from which samples were collected for isolation of MAP during a two-year survey (September 2001 to June 2003).

Common name	Scientific name	No sampled
House mouse	<i>Mus musculus</i>	149
Black rat	<i>Rattus rattus</i>	55
Magpie	<i>Pica pica</i>	30
House sparrow	<i>Passer domesticus</i>	32
European Brown Hare	<i>Lepus europaeus</i>	44
Fox	<i>Vulpes vulpes</i>	10
Badger	<i>Meles meles</i>	3
Wolf	<i>Canis lupus</i>	1
Weasel	<i>Mustela nivalis</i> .	1
Hawk	<i>Accipiter nissus</i>	1
Owl	<i>Asio otus</i>	1
Total		327

**Table 2.** Summary of the target, the specificity and the sequences of the primer pairs, for IS900-, IS1311- and IS1245-PCR [relevant references in square brackets]. The IS900-PCR was used to identify the insertion sequence which is specific to MAP, the IS1311-PCR, followed by REA, was used to discriminate C from S-type strains, while the IS1245-PCR was used to identify the insertion sequence which is found only in *M. avium*.

PCR target	Species specificity	Primer pairs	Sequence (5'-3')	Reference
IS900	MAP	P90	GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG	Millar et al. (1995)
		P91	GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC	Millar et al. (1995)
IS1311	MAP	M56	GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA	Marsh et al. (1999)
	<i>M. avium</i>	M94	CAG CGA TCG TCG ACA GTG TG	Marsh et al. (1999)
IS1245	<i>M. avium</i>	M114	CTC GAC GCA CTG CGC ACC	Collins et al. (1997)
		M115	CCG CAG TTC CAG GTC CCC T	Collins et al. (1997)

**Table 3.** Summary of results from the culture of faecal samples from clinically healthy sheep and goats of four flocks, of litter and feed samples and from the culture and IS900-PCR of pooled-tissue samples from wildlife and sheep and goats from three abattoirs, receiving animals from the region around the four flocks.

Sample origin (sample type)	No of culture positive animals or samples <sup>a</sup> (total number of animals or samples examined)	No of animals with IS900-positive tissues
Sheep (faeces)	11(180)	ND <sup>b</sup>
Goats (faeces)	12(220)	ND
Sheep (tissues)	3(136)	3
Goats (tissues)	7(68)	7
House mouse (tissues)	2(149)	0
Black rat (tissues)	1(55)	1
Red fox (tissues)	1(10)	0
European Brown Hare (tissues)	1(44)	0
Magpie (tissues)	0(30)	0
House sparrow (tissues)	0(32)	0
Badger (tissues)	0(3)	0
Wolf (tissues)	0(1)	0
Weasel (tissues)	0(1)	0
Hawk (tissues)	0(1)	0
Owl (tissues)	0(1)	0
Environmental samples	1(238)	ND
Final feed samples	1(60)	ND

<sup>a</sup> Only for environmental and final feed samples

<sup>b</sup> ND not done

Each pooled-tissue sample from sheep and goats consisted of the last part of the duodenum and ileum, the first part of the cecum and colon, the ileocecal and colic lymph nodes. Each pooled-tissue sample from wildlife included all the above portions and also the liver of each animal. The isolates grew either on Lowenstein-Jensen or on Herrold's Egg-Yolk medium and were confirmed as MAP by IS900-PCR. The isolate from a goat faecal sample grew on both media. All culture-positive pooled-tissue samples from sheep and goats were also positive by tissue IS900-PCR, while a pooled-tissue sample from a culture-negative black rat was positive to tissue IS900-PCR.

**Table 4.** Results of genetic characterisation with IS1311-PCR and REA with HinfI, of 35 of the isolates arranged by sampling location and origin of the isolate. The goat sample (from flock 2), which was positive on both culture media harboured both MAP-types.

Sampling location (flock type)	Origin of the isolates	IS1311 PCR-REA	
		Cattle type	Sheep type
Flock 1 (mixed)	Sheep	2	NA <sup>a</sup>
	Goat	1	NA
	Black rat	1	NA
	House mouse	1	NA
	Final feed	1	NA
Flock 2 (goats)	Goat	4	1
	Environment	1	NA
Flock 3 (sheep)	Sheep	4	NA
	Black rat	1	NA
Flock 4 (mixed)	Sheep	1	NA
	Goat	4	NA
	House mouse	0	1
Grazing grounds of the 4 flocks	European Brown Hare	1	NA
	Red fox	1	NA
Abattoirs	Sheep	1	2
	Goat	1	6
Total		25	10

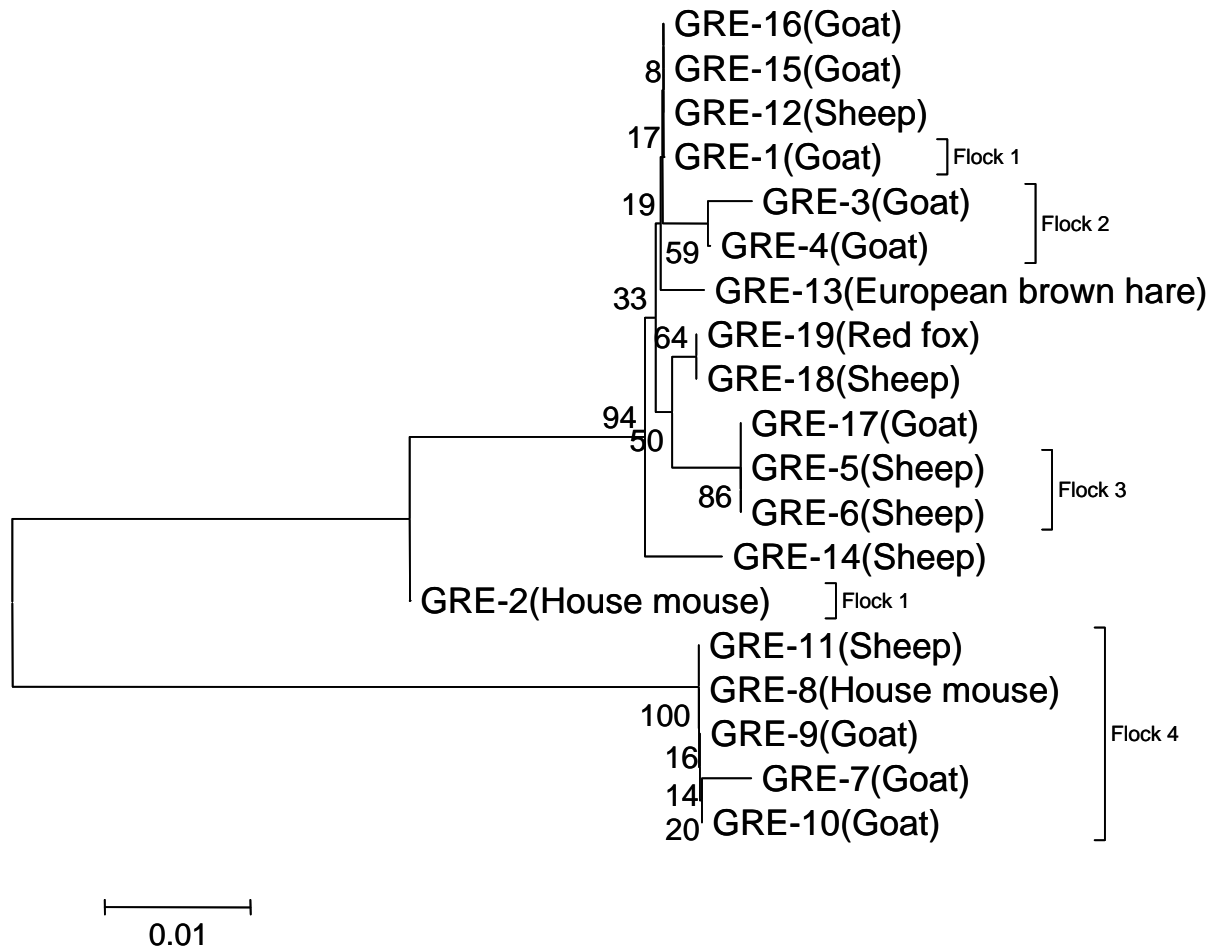
<sup>a</sup>NA: non-applicable

**Table 5.** Codes, accession numbers in GenBank, sampling site, species of origin and MAP type by IS1311 PCR-REA (C or S) of the 23 MAP isolates genetically characterized in part of IS900 insertion sequence.

Isolate code	Accession Number	Sampling site	Species	IS1311 PCR-REA
GRE-1	EU057153	Flock 1	Goat	C
GRE-2	EU057154	Flock 1	House mouse	C
GRE-3	EU057155	Flock 2	Goat	C
GRE-4	EU057156	Flock 2	Goat	C
GRE-5	EU057157	Flock 3	Sheep	C
GRE-6	EU057158	Flock 3	Sheep	C
GRE-7	EU057159	Flock 4	Goat	C
GRE-8	EU057160	Flock 4	House mouse	S
GRE-9	EU057161	Flock 4	Goat	C
GRE-10	EU057162	Flock 4	Goat	C
GRE-11	EU057163	Flock 4	Sheep	C
GRE-12	EU057164	Abattoirs	Sheep	S
GRE-13	EU057165	Grazing grounds	European Brown Hare	C
GRE-14	EU057166	Abattoirs	Sheep	C
GRE-15	EU057167	Abattoirs	Goat	C
GRE-16	EU057168	Abattoirs	Goat	S
GRE-17	EU057169	Abattoirs	Goat	S
GRE-18	EU057170	Abattoirs	Sheep	C
GRE-19	EU057171	Grazing grounds	Red fox	C
GRE-20	EU057172	Abattoirs	Goat	S
GRE-21	EU057173	Abattoirs	Goat	S
GRE-22	EU057174	Abattoirs	Goat	S
GRE-23	EU057175	Abattoirs	Sheep	S

Seven isolates from abattoirs displayed 100% nucleotide identity (GRE-12, GRE-15, GRE-16, GRE-20, GRE-21, GRE-22, GRE-23) and therefore we used only the first three, representing different animal species and MAP types, in the phylogenetic analysis.

**Figure 1.** Phylogenetic analysis performed on 178 bp of the IS900 coding region of 19 Greek MAP strains. Brackets and square brackets included the names of species and flocks, respectively, from which MAP strains were genetically characterized. The remaining strains from sheep and goats were collected from abattoirs.



### **3. Strain-specific sensitivity estimates of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis culture in Greek sheep and goats**

M. Florou<sup>1</sup>, L. Leontides<sup>1\*</sup>, P. Kostoulas<sup>1</sup>, C. Billinis<sup>2</sup>, M. Sofia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Animal Health Economics, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology and Parasitology, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

\*Corresponding author: Assoc. Prof. L. Leontides, Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa, Greece, Tel +30 24410 66002, Fax +30 24410 66047, Email: leoleont@vet.uth.gr

## Summary

The requirements for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) may be related to the strain-type [sheep (S)- or cattle (C)-type] and not to the host. The objective of this paper was to estimate and compare strain-, and biologic sample (faeces or pooled-tissue) - specific sensitivities (Ses) of two solid culture media, Herrold's egg yolk medium (HEYM) and Lowenstein-Jensen (LJ), for Map isolation from Greek dairy sheep and goats. From 400 faecal samples collected from subclinically infected sheep and goats of 4 flocks and from 214 pooled-tissue samples (142 from sheep and 72 from goats) collected, at the abattoir, from >1 year-old, routinely slaughtered animals, with gross pathology suggestive of paratuberculosis, we isolated 34 Map strains. Of those, by the IS1311 PCR, 18 were categorized into the C- and 9 into the S-type; 7 were not typed. We used a Bayesian approach to estimate the strain-specific Ses.  $Se_{HEYM-C-faecal} = 17\%$  (95% credible interval: 7, 40) was higher than  $Se_{HEYM-S-faecal} = 2\%$  (0.3, 11). Also,  $Se_{HEYM-C-faecal}$  was higher than  $Se_{LJ-C-faecal} = 4\%$  (1, 12). In pooled-tissue samples the strain-specific Ses did not differ between the two media.

*Keywords: ovine and caprine paratuberculosis, culture, Bayesian estimation, strain-specific sensitivity*



## 1. Introduction

Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is an essential step both for diagnosis of paratuberculosis and for later application of certain molecular typing techniques. The diagnostic processes and the isolation rates may vary depending on the host, the biologic sample (tissues or faeces) and the strain-type (sheep (S) or cattle (C)) (Whitlock et al., 2000; Manning and Collins, 2001; Stevenson et al., 2002). Although it is commonly accepted that S-type strains have a host preference for sheep (Stevenson et al., 2002) and C-type strains for cattle and goats (Pavlik et al., 1995), recent reports (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007) indicate that the host specificity of strains may not exist. Thus, the possibility of strain- rather than species-specific selection of Map culture protocols should also be considered (de Juan et al., 2006). Map culture although of high to absolute specificity (Sp) lacks in sensitivity (Se) (Whitlock et al., 2000). Reports on the most strain-sensitive culture protocols were based either on pooled-tissue samples from ELISA-positive animals (de Juan et al., 2006) or on culture isolates from pooled- tissue and/or faecal samples (Sevilla et al., 2007) as gold-standards. These papers did not account for the genetic and pathogenetic diversity of Map strains in the target population (Verna et al., 2007) and did not provide media-specific Se estimates.

We recently published Se estimates for culture of faecal samples from sub-clinically infected sheep and goats (Kostoulas et al., 2006a, b), which were obtained with non-gold standard methods (Gardner, 2002; Branscum et al., 2005). After genetically characterizing our isolates (Florou et al., 2007), we applied a Bayesian methodology to estimate strain-specific Ses. The same diagnostic and analytic approach was also implemented on pooled-tissue samples from sheep and goats. The objective of this paper was to estimate and compare, strain-, and sample-type-specific Ses of two solid culture media, Herrold's egg yolk medium (HEYM) and Lowenstein-Jensen (LJ), for Map isolation from Greek dairy sheep and goats.

## 2. Materials and methods

We collected and cultured 400 faecal samples from clinically healthy dairy sheep and goats of 4 endemically infected flocks. In addition, we obtained tissue samples from 3 slaughterhouses, slaughtering on average 400-500 sheep and goats per week from the region around the flocks. In order to increase our chances for MAP isolation, two of us (MF and PK) visited the slaughterhouses bi-weekly, during a 6-month period (from September 2002 to February 2003), and independently, visually inspected the gastrointestinal tracts of all slaughtered adult (>1 year-old) sheep and goats for lesions suggestive of paratuberculosis. Those suspect, in total the gastrointestinal tracts of 142 sheep and 72 goats, were collected. The distal duodenum and ileum, the proximal cecum and colon, and the ileocecal and colic lymph nodes from each gastrointestinal tract were excised, pooled and grinded. Details on the flocks, the animals, the collection and culture of samples, the IS900-PCR and sequencing, the IS1311-PCR followed by REA with HinfI, and the IS1245-PCR can be found elsewhere (Kostoulas et al., 2006a,b; Florou et al., 2007). The IS1311-PCR was done to discriminate between C- and S-type strains and the IS1245-PCR to rule out *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (*M. avium*).

We used a Bayesian approach to estimate strain-specific Ses of the two culture media for the two sample types from sheep and goats (Branscum et al., 2004). Briefly, let  $y_i$  be the number of positive samples out of  $n_i$  tested animals, where the

subscript  $i$  denotes 8 different subcategories according to strain type (C or S), culture medium (HEYM or LJ) and sample type (faeces or pooled-tissues). We assumed that the data  $\{y_i\}$  are independent and that the sampling distribution is approximately binomial:

$$y_i | TP_i, Se_i, Sp_i \sim Bin(n_i, TP_i * Se_i + (1 - TP_i) * (1 - Sp_i)) \quad (1)$$

where TP, Se and Sp are the true prevalence of MAP infected animals - by infection we mean that the animals carry MAP intracellularly, with or without substantial replication, because the infection can be latent -, the sensitivity and specificity of culture, respectively, in each subcategory  $i$ . Assuming that Sp=1 (Whitlock et al., 2000), equation (1) reduces to:

$$y_i | TP_i, Se_i \sim Bin(n_i, TP_i * Se_i) \quad (2)$$

We omitted the mixture distribution that allowed for the probability that each subcategory  $i$  may not be infected because i) the flocks were known to be endemically infected, ii) the tissue samples were from animals with lesions and iii) the relevant literature (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007) strongly suggest that infected sheep and goat populations usually harbour both MAP types.

We used Beta distributions, Be(a,b), to incorporate prior information about Se and TP. We used the Beta Buster software available at the website: <http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/> to compute the parameters  $a$  and  $b$  of the beta distributions. The most likely value of Se, for all subcategories, was thought to be 10%, while we were 95% certain that it was not more than 50%. This corresponded to a Be(1.48, 5.38). TP prior elicitation was based on expert opinion of the practicing veterinarians supervising the flocks and the abattoirs. For faecal samples, the most likely value for TP of faecal excretion was thought to be 30% and we were 95% sure that it was at least 15%, Be(5.09,10.56). The most likely value for TP of tissue colonisation was thought to be 50% and we were 95% sure that it was not less than 33%, Be(11.25,11.25). We selected relatively wide TP priors attempting to capture both our uncertainty and general idea about TP of faecal excretion and/or tissue colonisation. To assess the influence of the selected priors on the posterior Se estimates we also considered uniform distributions on the range from 0 to 100% as Se priors, Be(1,1). The assessment of differences in Ses was based on the % of overlap between the competing posterior distributions (Kostoulas et al., 2006a). Standard diagnostic procedures (Heidelberger and Welch, 1983; Raftery and Lewis, 1992; Gelman and Rubin, 1992) of Markov chain-Monte Carlo and visual inspection of autocorrelation plots revealed no convergence problems. Bayesian estimates and 95% credible intervals (CrIs) were based on analytical summaries of 45,000 iterations after a burn-in phase of 5000 iterations. Models were run in the freeware program WinBUGS (Spiegelhalter et al., 1996).

### 3. Results

In total, 34 isolates were recovered. No isolate had the *M. avium* specific IS1245 insertion sequence while all were confirmed as MAP by sequence of the IS900 region. With the IS1311 PCR-REA, 18 isolates were categorized into C- and 9 into S-type strains; 7 isolates were not typed due to inadequate quantity of DNA

(Table 1). Bayesian estimates of posterior medians and CrIs of Ses are depicted in Fig 1.

In faecal samples, the Se of HEYM for recovering C- [ $Se_{HEYM-C-faecal} = 17\%$  (CrIs: 7, 40%)] was higher than the Se for recovering S-type strains [ $Se_{HEYM-S-faecal} = 2\%$  (0.3, 11)] (Fig. 1, Identity Numbers (IN) 3–1); the CrIs exhibited 1% overlap. Also,  $Se_{HEYM-C-faecal}$  was higher than  $Se_{LJ-C-faecal} = 4\%$  (1, 12) (IN 3–4); the corresponding CrIs overlap was less than 1%. Contrarily,  $Se_{HEYM-S-faecal}$  and  $Se_{LJ-S-faecal}$  did not differ (IN 1–2). In pooled-tissues,  $Se_{HEYM-C-tissue}$ ,  $Se_{HEYM-S-tissue}$ ,  $Se_{LJ-C-tissue}$ , and  $Se_{LJ-S-tissue}$  did not differ (IN 5,6,7,8).  $Se_{HEYM-C}$  was higher for faecal than pooled-tissue samples ( $Se_{HEYM-C-tissue} = 2\%$  (0.4, 8), IN 3–7); the CrIs overlap was less than 1%.

#### 4. Discussion

We used a Bayesian approach to estimate strain-specific Ses accounting for all latently infected animals by the incorporation of TP priors. The primary practical advantages of the Bayesian framework are that (i) it can always be used for small samples – in our case the small or in some instances zero number (Table 1) of isolates –, (ii) it allows for the combination of our data and available scientific information in a coherent way and (iii) it allows direct probability interpretation of outcome results that can be readily evaluated (Gardner, 2002). Because there was paucity of strain-specific Se estimates, we initially selected a relatively wide Se prior for all subcategories compared. Further, we conducted sensitivity analysis using uniform Se priors to reflect our ignorance about the distribution of infection stages that is believed to affect the Ses (Sergeant et al., 2003). Importantly, under uniform Se priors the same significant differences between Ses were observed.

In faecal samples from sub-clinically infected sheep and goats,  $Se_{HEYM-C}$  was higher than  $Se_{HEYM-S}$  or  $Se_{LJ-C}$ . Although our study design and analytical approach differs from the ones recently published, we also found that HEYM supports better the isolation of C- than S-type strains and that it can recover more isolates than LJ from small ruminants infected with C-strains (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007). However, it is difficult to compare our strain-specific Se estimates with other published estimates because there is a general paucity of studies using HEYM as the primary medium for isolating MAP from sheep faeces, because it was believed that sheep were infected with S-type strains and that HEYM does not support growth of S-type strains (Whittington et al., 1999; de Juan et al., 2006).

The  $Se_{HEYM-S}$  in faecal samples from either sheep or goats did not differ from the  $Se_{LJ-S}$ . Both of them were very low (Table 1), possibly reflecting the fact that several factors including limited bacterial burden in the sample (faecal samples were from sub-clinically infected animals), increased sensitivity to the decontamination protocol, specific nutritional requirements, and increased sensitivity to the inhibitory effect of antibiotics in the media may have restricted growth of these strains (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007).

In goats,  $Se_{HEYM-C}$  was higher for faecal than pooled-tissue samples. In either sheep or goat pooled-tissue samples the strain-specific Ses did not differ between the two media. These findings disagree with those recently reported (de Juan et al., 2006; Sevilla et al., 2007) and were most likely the result of a selection bias; the tissue samples were collected from adult animals with visible lesions of paratuberculosis. Goats may have only limited ability to control infection when compared with sheep (Corpa et al., 2000; Kostoulas et al., 2006a). Also, S- may have different

pathogenicity than C-type strains in sheep or goats (Verna et al., 2007). Likely, in the samples selected from the slaughterhouse, goats infected with S-type strains were over-represented.

In conclusion, the Se of the media depended on the Map strain. HEYM was more sensitive for isolation of C- than S-type strains and could recover more C-type isolates than LJ from faecal samples of small ruminants.

## References

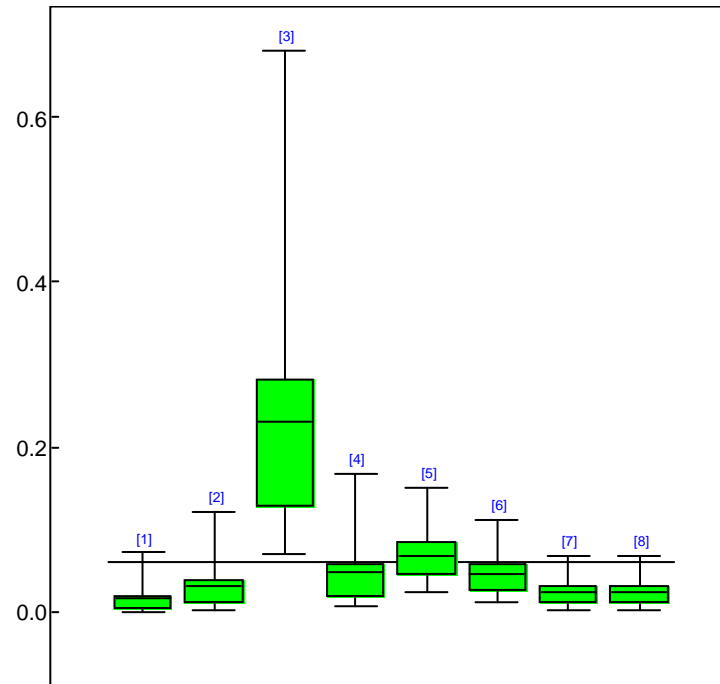
1. Branscum A.J. , Gardner I.A., Johnson W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test Sensitivity and Specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
2. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
3. de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L., 2006b. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927-5932.
4. Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., Lykotrafitis, F., 2007. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from nonruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* In press.
5. Gardner, I.A., 2002. The utility of Bayes' theorem and Bayesian inference in veterinary clinical practice and research. *Aust. Vet J.* 80, 758-761.
6. Heidelberger, P., Welch, P., 1983. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Operations Research.* 31, 1109-1144.
7. Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple Sequences. *Stat. Sci.* 7, 457– 511.
8. Kostoulas, P., Leontides, L., Enoe, C., Billinis, C., Florou, M., Sofia, M., 2006α. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76, 56-73.
9. Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Florou, M., 2006β. Application of a semi-dependent latent model in the Bayesian estimation of the sensitivity and specificity of two faecal culture methods for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76, 121-134.
10. Manning, E.J., Collins, M.T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech.* 20, 133-150. Review.
11. 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.
12. Raftery, A.L., Lewis, S., 1992. Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov chain Monte Carlo. *Stat. Sci.* 7, 493–497.
13. Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71–76.
14. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
15. Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., Juste, R.A., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol.* 12, 7-18.
16. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks W., 1996. BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, Version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge. <http://www.mrcbsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>

17. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
18. Verna, A.E., Garcia-Pariente, C., Munoz, M., Moreno, O., Garcia-Marin, J.F., Romano, M.I., Paolicchi, F., Perez, V., 2007. Variation in the immunopathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health.* 54, 243-252.
19. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387-398.
20. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077-1083.

**Table 1.** Summary of results from the examination of faecal and pooled tissue samples and respective Bayesian sensitivity (Se) estimates [posterior medians and 95% credible intervals (CrIs)]. Faecal samples were collected from sub-clinically infected sheep and goats and pooled-tissue samples from routinely slaughtered adult sheep and goats with gross pathology suggesting paratuberculosis. The isolates grew either on Lowenstein-Jensen (LJ) or on Herrold's Egg-Yolk medium (HEYM). Sheep (S) or cattle (C) strains were distinguished by IS1311-PCR REA.

Sample type	Strain type	HEYM		LJ	
		<u>Positive (Tested)</u>	<u>Se (CrIs)</u>	<u>Positive (Tested)</u>	<u>Se (CrIs)</u>
Faeces	S	0 (368)	2(0.3,11)	1 (368)	3(0.4,15)
	C	14 (368)	17(7, 40)	2 (368)	4 (1, 12)
Pooled tissues	S	5 (204)	7(2,15)	3 (204)	4(1,12)
	C	1 (204)	2(0.4,8)	1 (204)	2(0.4, 8)

**Figure 1.** Posterior median and 95% CrIs of Ses. Subcategories are defined by sample type (faeces or pooled-tissues), strain (S or C) and medium (HEYM or LJ). Identity numbers denote different subcategories\*. Boxes represent inter-quartile ranges and the solid black line at the approximate centre of each box is the median; the arms of each box extend to cover the central 95% of the marginal posterior distribution with their ends corresponding to 2.5<sup>th</sup> and 97.5<sup>th</sup> credible quartiles.



\*[1]: faeces, S, HEYM; [2]: faeces, S, LJ; [3]: faeces, C, HEYM; [4]: faeces, C, LJ; [5]: pooled tissues, S, HEYM; [6]: pooled tissues, S, LJ; [7]: pooled tissues, C, HEYM; [8]: pooled tissues, C, LJ.