

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Vergleich verschiedener Methoden zur Identifizierung
Paratuberkulose-positiver Rinderherden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Julia Kube

aus Apolda

Leipzig, 2014

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer, Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Uwe Rösler, Institut für Tier- und Umwelthygiene, Fachbereich
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 11. März 2014

Angefertigt an der Thüringer Tierseuchenkasse (AdöR),

gefördert durch die Thüringer Tierseuchenkasse (AdöR) und die Landesvereinigung
Thüringer Milch e.V.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

2.5.1	Direkter Erregernachweis	18
2.5.2	Indirekter Erregernachweis	19
2.5.2.1	Johnin Hauttest, Interferon- γ -Test, Komplementbindungsreaktion, Agargelimmunodiffusionstest	19
2.5.2.2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	20
2.5.3	Untersuchung auf Herdenebene	21
2.5.3.1	Milchuntersuchungen	21
2.5.3.2	Umgebungskotproben	22
3	Material und Methoden	27
3.1	Ausgewählte Betriebe	27
3.2	Direkter Erregernachweis Kotproben: Probenentnahme	30
3.2.1	Einzeltierkotproben	30
3.2.2	Umgebungskotproben	30
3.3	Direkter Erregernachweis Kotproben: Probenaufbereitung	31
3.4	Klimatische Verhältnisse am Tag der Probenentnahme der Umgebungskotproben	32
3.5	Direkter Erregernachweis Kotproben: Ergebniserfassung	32
3.6	Direkter Erregernachweis: Kalkulation einer Stichprobe	34
3.7	Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe	36
3.8	Festlegung des Herdenstatus	36
3.9	Serologische Untersuchung Milchproben: Probenaufbereitung	36
3.10	Serologische Untersuchung Milchproben: Enzyme Linked Immunosorbent Assay	38

Inhaltsverzeichnis

3.11	Serologische Untersuchung Milchproben: Ergebniserfassung	40
3.12	Statistische Analyse	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Untersuchungen der Einzeltierkotproben	43
4.2	Untersuchungen der Umgebungskotproben	44
4.3	Klimatische Verhältnisse am Tag der Probenentnahme der Umgebungskotproben	50
4.4	Kalkulation einer Stichprobe	52
4.5	Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe	54
4.6	Untersuchungen der Milchproben	57
4.6.1	LDL Cattletype MAP Ab 25er Milchpools	57
4.6.2	LDL Cattletype MAP Ab 50er Milchpools	58
4.6.3	ID Screen Paratuberculosis Indirect 25er Milchpools	59
4.6.4	ID Screen Paratuberculosis Indirect 50er Milchpools	60
4.7	Zusammenhänge	61
4.7.1	Einzeltierprävalenz und Umgebungskotproben Frühjahr	61
4.7.2	Einzeltierprävalenz und Umgebungskotproben Sommer	64
4.7.3	Umgebungskotproben Frühjahr und Umgebungskotproben Sommer	66
4.7.4	Vergleich der Einzeltierprävalenz und der errechneten Stichprobenuntersuchung	66
4.7.5	Stichprobenuntersuchung und Umgebungskotproben Frühjahr	67
4.7.6	Einzeltierprävalenz und ELISAs	68

Inhaltsverzeichnis

4.8	Gegenüberstellung der Ergebnisse verschiedener Untersuchungsansätze zur Feststellung des Herdenstatus	69
5	Diskussion	71
5.1.	Umgebungskotproben	73
5.2	Kalkulation einer Stichprobe	77
5.3	Milchserologie nach Anreicherung	79
5.4	Schlussfolgerung	81
6	Zusammenfassung	83
7	Summary	85
8	Literaturverzeichnis	87
	Anhang	106
	Tabellenverzeichnis	108
	Formelverzeichnis	109
	Abbildungsverzeichnis	110
	Danksagung	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

n. d.	keine Untersuchung durchgeführt
–	keine Kolonie sichtbar
+	1 bis 10 Kolonien vorhanden
++	11 bis 50 Kolonien vorhanden
+++	51 bis 100 Kolonien vorhanden
++++	mehr als 100 Kolonien vorhanden
°	Grad (Winkel)
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
25er	zu 25 Tieren gepoolte Milchprobe(n)
50er	zu 50 Tieren gepoolte Milchprobe(n)
AdöR	Anstalt des öffentlichen Rechts
AHC	Animal Health Committee
ANV	Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin
BD-Röhrchen = HEYM	BBL Herrold's Egg Yolk Agar mit Mycobactin sowie Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin
BHV1	Bovines Herpes Virus 1
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EP	Einzeltierkotproben

Abkürzungsverzeichnis

Fa.	Firma
FLI	Friedrich–Loeffler–Institut
g	Gramm
gE	Glykoprotein E (Feldvirusinfektion bei BHV–geimpften Rindern)
HF	historisch frei
HIT–Datenbank	Datenbank des Herkunftssicherungs– und Informationssystem Tier
HP	hochprävalent
HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid Monohydrat (antiseptische Laborchemikalie)
IDVet	Innovative Diagnostics Vétérinaire
Ig	Immunglobulin
IS900	Insertionssequenz 900
K0	ohne Kontamination
K1	geringe Kontamination (Fremdflora von 1 bis 2 mm)
K2	mäßige Kontamination
K3	starke Kontamination (Fremdflora < Hälfte des Nährbodens)
K4	sehr starke Kontamination (Fremdflora > Hälfte des Nährbodens = Befundung als „nicht auswertbar“)
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
LDL	Labor Diagnostik Leipzig
m ³	Kubikmeter
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>

Abkürzungsverzeichnis

MAP –	kein Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
MAP +	positiver Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
MAP n. a.	Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> nicht möglich, da sehr starke Kontamination
ml	Milliliter
n	Anzahl
n. a.	nicht auswertbar
neg	negativ
nm	Nanometer
NP	niedrigprävalent
OD	Optische Dichte
OIE	World Organisation for Animal Health
PCR	Polymerase–Kettenreaktion
pos	positiv
PS	Polystyrol
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
S / P	korrigierte optische Dichte
ssp.	subspecies
t	Temperatur
TSK	Thüringer Tierseuchenkasse (Anstalt des öffentlichen Rechts)
t _f	Taupunkttemperatur
UP	Umgebungskotproben
US\$	United States Dollar

Abkürzungsverzeichnis

USA	United States of America
USDA	United States Department of Agriculture
verd	verdächtig
z.B.	zum Beispiel
$x\ g$	Gravitationsbeschleunigung auf der Erdoberfläche
x	Wassergehalt
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
ρ	nicht-parametrischer Korrelationskoeffizient
ρ	Dichte
φ	relative Luftfeuchtigkeit
χ^2	Chi-Quadrat

1 EINLEITUNG

Die Paratuberkulose (auch John'sche Krankheit) ist eine weltweit verbreitete chronisch–progressive, infektiöse, nicht heilbare Darmerkrankung der Haus– und Wildwiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Neben dem Tierverlust bedeutet eine Infektion mit dem Erreger hohe wirtschaftliche Einbußen infolge eines Milchleistungsrückganges und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber anderen Erkrankungen durch Schwächung des Immunsystems der Tiere. Zudem kann ein zoonotisches Potenzial des Erregers nicht sicher ausgeschlossen werden, eine Beteiligung am Morbus Crohn des Menschen wird diskutiert. Aus diesen Gründen werden in verschiedenen Ländern Maßnahmen zur Bekämpfung dieser Krankheit auf freiwilliger oder verpflichtender Basis ergriffen.

In Deutschland ist die Paratuberkulose seit 1970 meldepflichtig ohne jedoch staatlich bekämpft zu werden. In einigen Bundesländern gibt es freiwillige Sanierungsprogramme. So können seit dem Jahr 2003 in Thüringen die Betriebe am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens“ teilnehmen. Diagnostische Untersuchungen zur Erkennung der mit MAP infizierten Tiere werden durch Beihilfen der Thüringer Tierseuchenkasse unterstützt. Im Mittelpunkt der Bekämpfungsmaßnahmen stehen Hygiene– und Managementmaßnahmen zur Verhinderung der Infektion hochempfindlicher Jungtiere sowie eine regelmäßige Diagnostik mit schnellstmöglicher Elimination von Ausscheidern. Eine Paratuberkulose–Sanierung erweist sich als langwierig. Erst nachdem über mehrere Jahre in regelmäßigen Untersuchungen der Erreger nicht mehr nachgewiesen wurde, kann eine Herde als Paratuberkulose–unverdächtig bezeichnet werden.

Da klinische Symptome erst nach einer langen, über mehrere Jahre andauernden subklinischen Krankheitsphase sichtbar werden und in der modernen Milchproduktion zahlreiche Tiere das dafür erforderliche Alter nicht erreichen, wird die Paratuberkulose im betroffenen Bestand häufig lange Zeit nicht offenkundig. Da infizierte Tiere jedoch im Verlauf der Krankheit einer allgemeinen Schwächung mit Leistungsminderungen unterliegen, gilt es eine verstärkte Sensibilisierung der Landwirte gegenüber der verlustreichen Krankheit zu erreichen. Um eine breitere Beteiligung an dem gegenwärtig noch freiwilligen Bekämpfungsprogramm zu erreichen, könnte eine einfach durchzuführende Einstiegsuntersuchung motivierend

wirken. Die bis zum Jahr 2007 dazu im Thüringer Bekämpfungsprogramm vorgesehene serologische Einzeltieruntersuchung hat sich auf Grund ihrer unzureichenden Sensitivität und Spezifität nicht bewährt. Daher erfolgte im Jahr 2008 eine Umstellung der Paratuberkulose–Diagnostik auf die kulturelle Untersuchung von Einzeltierkotproben des gesamten Bestandes, die eine höhere diagnostische Sensitivität aufweist. Diese bedarf jedoch eines höheren Zeit– und Kostenaufwandes zur Aufbereitung und Inkubation der Proben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Screening–Methoden zu prüfen, um auf einfachere und kostensparendere Weise mit ausreichender statistischer Sicherheit festzustellen, ob der Erreger der Paratuberkulose in einer Herde vorhanden ist oder nicht. Dazu wurden zwei auf dem kulturellen Erregernachweis beruhende Verfahren, die Untersuchung individueller Kotproben auf der Basis von Stichproben und die Untersuchung von Umgebungskotproben, einem serologischen Untersuchungsansatz, dem Nachweis von MAP–Antikörpern nach Aufkonzentrierung in gepoolten Einzelmilchproben gegenübergestellt. Diese dienten dabei auch als Modell für eine Tankmilchuntersuchung in Milchviehherden mit einer Größe von bis zu 50 laktierenden Kühen.

Ausgehend von der Annahme, dass die Detektion betroffener Herden von der Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde abhängt, galt es insbesondere festzustellen, ab welcher Einzeltierprävalenz die geprüften Methoden zur Erkennung der Herde als MAP–positiv führen. Dieses Detektionslimit ist maßgeblich für die Entscheidung, ob der jeweilige Untersuchungsansatz in Studien zur Ermittlung des Anteils MAP–positiver Herden in einem bestimmten Territorium zu einem bestimmten Zeitpunkt Verwendung finden kann.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Bedeutung

2.1.1 Wirtschaftliche Aspekte der Erkrankung

Die Paratuberkulose ist eine der bedeutendsten Erkrankungen in der Rinderhaltung. Haupteinbußen entstehen durch eine verringerte Milchmenge (HUTCHINSON 1996, NIELSEN et al. 2009a), sowie einer verschlechterten Milchqualität im Vergleich zu nicht erkrankten Tieren (HENDRICK et al. 2005b). Weitere Einbußen werden durch verminderte Schlachtausbeuten (KUDAHL und NIELSEN 2009), ein erhöhtes Mastitisrisiko (MCKENNA et al. 2006a) und eine geschmälerte Fertilität (MARCÉ et al. 2009) verursacht. Nach OTT et al. (1999) beträgt der wirtschaftliche Verlust einer Kuh in einem Paratuberkulose-Bestand 97 US\$ pro Jahr im Vergleich zu einem Paratuberkulose-freien Bestand. Bei Betrieben mit deutlicher klinischer Manifestation der Erkrankung ermittelten die Autoren einen jährlichen wirtschaftlichen Verlust von 245 US\$ pro Kuh. Diese hochprävalenten Herden produzierten 748 kg weniger Milch pro Kuh und Jahr und hatten eine erhöhte Merzungsrate. Die Autoren ermittelten für die amerikanische Milchwirtschaft Ertragseinbußen infolge verminderter Produktivität in Höhe von 200 bis 250 Millionen US\$ pro Jahr beziehungsweise von 22 bis 27 US\$ pro Kuh und Jahr. RAIZMAN et al. (2009) gaben an, dass eine Kuh mit kulturell nachgewiesenem Paratuberkulosebefund 1,3 kg weniger Milch pro Tag produzierte und ein dreifach erhöhtes Abgangsrisiko hat; nicht gemerzte MAP-positive Tiere kosteten den Betrieb 155 US\$ pro Laktation.

2.1.2 Zoonotisches Potential

Die Paratuberkulose entwickelt auch eine steigende Aufmerksamkeit im humanen Verbraucherschutz. Eine Beteiligung an Human-Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn kann nicht sicher ausgeschlossen werden (BÜLTE et al. 2005, GILL et al. 2011). Ein Zusammenhang zwischen der bovinen Paratuberkulose und dem Morbus Crohn des Menschen wird durch Parallelen in der Krankheitssymptomatik, ähnlichen histopathologischen Befunden und dem Nachweis von MAP bei Morbus Crohn-Patienten begründet (UZOIGWE et al. 2007). In einer Metaanalyse von 18 Fall-Kontroll-Studien konnten FELLER et al. (2007) in 16 Studien eine erhöhte Prävalenz von MAP bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Kontrollen feststellen.

Tierpfleger indischer Ziegenherden mit vorliegenden Paratuberkulose-befunden wurden beim Auftreten gastrointestinalen Störungen auf das Vorliegen von MAP untersucht. Bei 50 % der Tierpfleger wurde ein positiver kultureller Nachweis von MAP geführt (SINGH et al. 2011).

Eine neuseeländische Studie wies MAP in Skelettmuskulatur und Blut exponierter Mutterschafe nach und verwies auf die Gefahr einer potentiellen oralen Infektion beim menschlichen Verzehr des Fleisches (SMITH et al. 2011b). BOULAIS et al. (2011) gelang der Nachweis des Erregers in Rohmilchproben. Auch durch Hitzebehandlung (Pasteurisieren) lässt sich der Erreger nicht zuverlässig abtöten (CERF et al. 2007, PATEL und SHAH 2011). Die initiale Menge des Erregers hat Einfluss auf dessen erfolgreiche Abtötung während des Pasteurisationsvorganges (ELTHOLTH et al. 2009).

Auch ein Zusammenhang mit der humanen Multiplen Sklerose wird diskutiert. Eine auf Sardinien durchgeführte Studie ermittelte in 42 % der an Multipler Sklerose erkrankten Patienten ein Vorkommen von MAP-DNA und eine signifikante humorale Immunantwort der Multiple Sklerose Patienten gegen das MAP-Protein MAP 2694 (COSSU et al. 2011).

2.2 Verbreitung

Seit der Erstbeschreibung beim Rind um 1895 wurde eine weltweite Verbreitung der Erkrankung Paratuberkulose, der klinischen Erscheinungsform des Erregers MAP, belegt (LOMBARD 2011). Auch kleine Wiederkäuer (STEHMAN 1996) und Wildwiederkäuer erkrankten. Der Erreger wurde beispielsweise aus Elchen (CRAWFORD et al. 2006), Lamas (SALGADO et al. 2009), Rehen (PIETERSE et al. 2010) und Damwildhirschen (BALSEIRO et al. 2008) isoliert. Auch in Nicht-Wiederkäuern wie Hunden, Katzen, Waschbären, Gürteltieren und Opposums wurde das Vorhandensein von MAP nachgewiesen (CORN et al. 2005, GLANEMANN et al. 2008). Laut Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) existieren Berichte zum Vorkommen von Paratuberkulose in Nord- und Südamerika, Europa, Afrika, Asien und Australien (Abbildung 1).

Es liegen Prävalenzstudien aus zahlreichen Ländern vor. Unterschiedliche Diagnoseverfahren verhindern jedoch einen direkten Vergleich. Die Studien unterscheiden sich in der betrachteten Prävalenz. So kann eine Einzeltierprävalenz (Anzahl der zum Untersuchungszeitpunkt erkrankten Einzeltiere der untersuchten Stichprobe) von einer Herdenprävalenz (Anzahl MAP–positiver Herden im Verhältnis zu den untersuchten Herden der Studie) unterschieden werden.

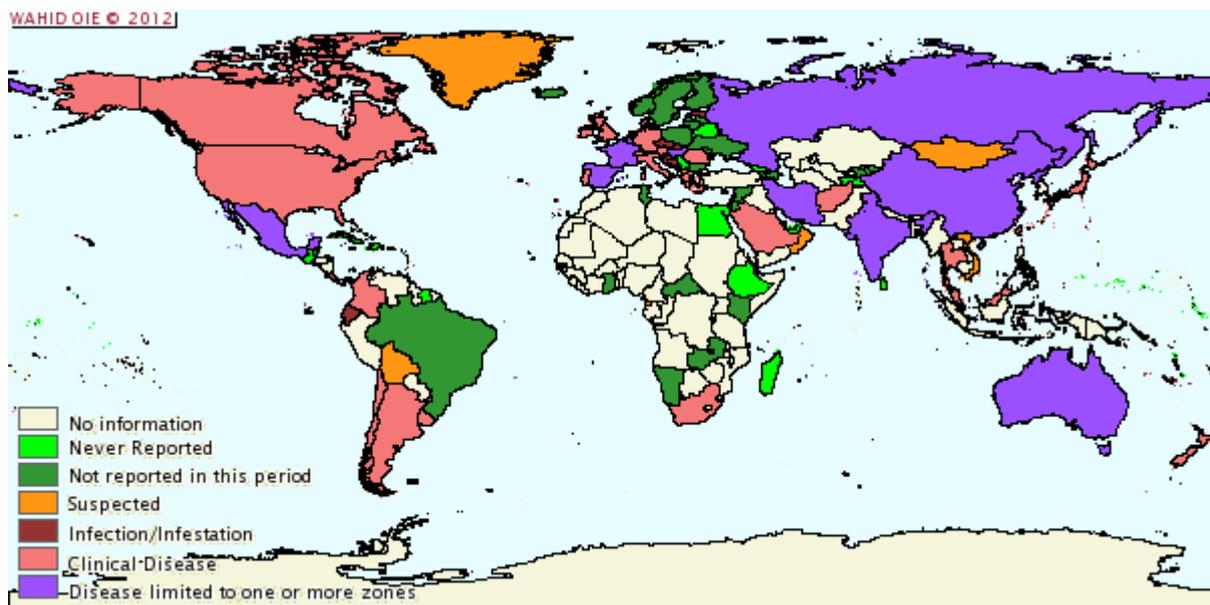


Abbildung 1: Verbreitung der Paratuberkulose im Zeitraum Juli bis Dezember 2011

Quelle: World Organisation for Animal Health 10.6.2012

2.2.1 Verbreitung außerhalb Europas

Im Rahmen freiwilliger Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen in einigen Bundesstaaten der Vereinigten Staaten und in Kanada wurden Daten zur Verbreitung der Paratuberkulose erhoben. Bei 35 % der 226 teilnehmenden Betriebe einer kanadischen Studie wurden MAP–Antikörper unter Verwendung von Einzel–Milch–ELISAs detektiert (SORGE et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse wurden durch HENDRICK et al. (2005a) erzielt: 30 % der an der Studie teilnehmenden 50 Herden aus Ontario waren serologisch MAP–positiv, hier betrug die Einzeltierprävalenz 2,6 %. Bei Schlachttieren aus Milchviehbeständen in Ostkanada und Maine wurden 16,1 % der 984 Tiere durch histologische und bakterielle Kultivierung als MAP–positiv identifiziert (MCKENNA et al. 2004). RAIZMAN et al. (2011a) betrachteten 66 Milchviehherden in Minnesota mit einer Herdengröße von durchschnittlich

222 Tieren (Minimum: 44 Tiere; Maximum 1500 Tiere). Die kulturelle Untersuchung von gepoolten Kotproben aus 100 Tieren je Bestand ergab eine Einzeltierprävalenz von 10 %. 39 % der bei einer Studie in Utah genommenen Tankmilchproben waren MAP-positiv (WILSON et al. 2010). Von 4990 Rindern aus 158 Milchviehbetrieben im Bundesstaat Wisconsin waren 4,79 % der Rinder und 50 % der Betriebe serologisch positiv (COLLINS et al. 1994). In Missouri konnte unter Verwendung einer blutserologischen ELISA-Untersuchung eine Einzeltierprävalenz von 8 % (+/- 3 %) bei Milchrindern und 5 % (+/- 2 %) bei Fleischrindern festgestellt werden. 74 % der Milchrinderherden beziehungsweise 40 % der Fleischrinderherden waren betroffen (THORNE und HARDIN 1997). Eine staatenübergreifende Studie in den USA wies im Jahr 2000 3,4 % der Rinder und 21,6 % der Milchviehherden mittels blutserologischer ELISA-Diagnostik eine Infektion mit MAP nach (WELLS und WAGNER 2000).

Mexiko hat eine unbekannte Paratuberkulose-Prävalenz und bisher auch noch kein entsprechendes Kontrollprogramm. Das Vorhandensein von MAP wurde in einer Studie in 100 % der aus 14 Rinder- und 3 Ziegenherden entnommenen Tankmilchproben aufgezeigt (FAVILA-HUMARA et al. 2010). In Brasilien wurde der Erreger in 3,6 % der 222 entnommenen Milchproben nachgewiesen, wenngleich der Erreger nur als selten vorkommend eingestuft wird (RISTOW et al. 2007, CARVALHO et al. 2009). PAOLICCHII et al. (2003) berichten bei Milch- und Fleischrindern in Argentinien von einer „hohen“ Prävalenz. HOLZMANN et al. (2004) werteten Berichte einer argentinischen Herdengesundheitsdatenbank aus und stellten einen Anstieg der jährlichen Neuerkrankungsrate von 0,7 % im Jahr 1993 auf 10,3 % im Jahr 2001 fest.

In Marokko und Südafrika ist das Vorkommen von MAP bei Schafen beschrieben (BENAZZI et al. 1996, MICHEL und BASTIANELLO 2000). In Kenia wurde der Antikörper gegen den Erregern bei Kamelen und Ziegen nachgewiesen (PALING et al. 1988). Im Ägypten konnten bei einer Studie 75 von 160 untersuchten Rindern als MAP-positiv identifiziert werden (SALEM et al. 2005).

In Japan wurde nach dem Jahr 1997 in 1105 Betrieben das Auftreten von Paratuberkulose registriert (KOBAYASHI et al. 2007). Bei in Nordindien untersuchten

86 Rinder-, 34 Büffel-, 25 Ziegen- und 26 Schafproben wurden 55 % der Tiere mittels PCR (IS900) als MAP-positiv beschrieben (KAUR et al. 2011).

2.2.2 Verbreitung in Europa

NIELSEN und TOFT (2009b) führten eine kritische Auswertung veröffentlichter Prävalenzen aus europäischen Mitgliedsstaaten zwischen den Jahren 1990 und 2007 durch. Dabei ermittelten die Autoren eine korrigierte Einzeltierprävalenz (aufgetretene Prävalenzen korrigiert mit den Eigenschaften der verwendeten Testmethoden) von schätzungsweise 20 % und mindestens 3 bis 5 % in einzelnen Ländern. Kein europäisches Land veröffentlichte eine Paratuberkulosefreiheit. Mindestens 50 % der europäischen Herden sind nach NIELSEN und TOFT (2009b) mit MAP infiziert. POZZATO et al. (2011) ermittelten mittels verschiedener ELISA-Testsysteme eine Herdenprävalenz von 48 % bis 65 % in den zwei norditalienischen Regionen Lombardei und Venetien. Nach BIHRMANN et al. (2012) schwankt in Dänemark das Auftreten der MAP-Antikörpern territorial. Nach STERNBERG LEWERIN et al. (2007) hat Schweden eine geringe Erkrankungsrate mit nur 53 infizierten Herden im Zeitraum zwischen 1993 bis 2005. In Slowenien untersuchten OCEPEK et al. (2009) 38 374 Rinder in 6 780 Herden im Alter von über zwei Jahren serologisch auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP. 228 Tiere (0,59 %) beziehungsweise 188 Herden (2,77 %) hatten im IDVet ELISA positive Antikörperreaktionen gegen den Erreger. DIÉGUEZ et al. (2007) untersuchten 61 069 Rinder im Alter von mindestens einem Jahr aus 2 735 Herden in Nordwest Spanien (Galizien). Die Autoren wiesen bei 10,7 % der Milchviehbetriebe, bei keinem der Fleischviehbetriebe und bei 2,7 % der gemischten Betriebe (sowohl Milchrinder, als auch Fleischvieh) mindestens bei einem untersuchten Tier der Herde eine positive Antikörperreaktion gegen den Erreger nach. In Irland untersuchten O'REILLY et al. (2004) 389 Tankmilchproben und 357 kommerziell erhältliche pasteurisierte Milchproben und wiesen bei 50 Tankmilchproben (12,9 %) und bei 35 der pasteurisierten Milchproben (9,8 %) MAP-DNA durch das Verfahren der ImmunoMagneticSeparations-PCR nach. MUSKENS et al. (2000) untersuchten 378 niederländische Herden im ELISA. Bei 207 Herden (55 %) ermittelten die Autoren bei mindestens einem Tier einen positiven Antikörpernachweis gegen den Erreger der Paratuberkulose. Die Autoren kalkulierten die Einzeltierprävalenz auf 2,7 % bis 6,9 % und die Herdenprävalenz auf 31 % bis 71 %. CETINKAYA et al. (1998) ermittelten

durch eine Befragung von 3772 Milchviehbetrieben in England und entlang der Grenzen zu Wales in den Jahren 1984 bis 1993 eine vergleichsweise niedrige Herdenprävalenz von 1,3 % bis 4,9 %.

2.2.3 Verbreitung in Deutschland

In Baden–Württemberg, Bayern, Brandenburg, Niedersachsen, Nordrhein–Westfalen, Saarland, Sachsen und Thüringen existieren freiwillige Bekämpfungsprogramme. Allerdings gelten national uneinheitliche Richtlinien bezüglich diagnostischer Methoden, so dass ein Vergleich der Daten nicht verlässlich ist. Es ist davon auszugehen, dass nur ein kleiner Teil der Infektionen erkannt und über das amtliche Tierseuchen–Nachrichten–System gemeldet wird. Das entspricht möglicherweise nicht der realen Verbreitung (KÖHLER et al. 2003), so dass die wahre Prävalenz der Paratuberkulose auf Einzeltier– und Herdenebene in Deutschland nicht bekannt ist (KÖHLER und MÖBIUS 2011). Gleichwohl wurden in Deutschland verschiedene epidemiologische Studien auf regionaler Ebene durchgeführt.

HACKER et al. (2004) untersuchten 2997 Serumproben aus 59 Rinderherden in Mecklenburg–Vorpommern auf das Vorhandensein von MAP–Antikörpern, dabei zeigten 84,7 % der Betriebe mindestens einen positiven Reagenten, durchschnittlich ergab sich eine Einzeltierprävalenz der Stichproben von 12,2 %. In Niedersachsen wurden bei Untersuchungen des *Iliocaecal*–Lymphknotens mit Hilfe einer semi–nested IS900 PCR 17,2 % der getesteten 99 Schlachttiere als MAP–infiziert erkannt (MÜNSTER et al. 2011). Die mittlere Einzeltierprävalenz im Rahmen einer sächsischen Erhebung an 55 394 Blutproben ergab einen Anteil positiver und fraglicher Antikörpernachweise von 9,6 % (DONAT et al. 2005). DENZIN et al. (2011) ermittelten für Sachsen–Anhalt eine Prävalenz von 4,2 %. Dabei untersuchten sie 896 Blutproben im ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP. Tierdichte und regionale Herkunft der Tiere fanden dabei besondere Beachtung um ein repräsentatives Ergebnis darzustellen. FAILING et al. (2012) untersuchten Einzelmilchproben hessischer Tiere mittels ELISA auf Antikörper gegen MAP und geben eine geschätzte Einzeltierprävalenz von < 1 % aller hessischen Milchkühe und eine Herdenprävalenz von nicht über circa 10 % an. Nach epidemiologischen Schätzungen sind in Deutschland 5 % bis 15 % der Herden infiziert (STRATMANN et

al. 2005). Auf Grund der unterschiedlichen Methodik sind die Ergebnisse dieser Studien kaum vergleichbar (KÖHLER et al. 2008b).

In Thüringen können Betriebe seit dem Jahr 2003 am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ teilnehmen. Diagnostische Untersuchungen zur Erkennung der mit MAP infizierten Tiere werden mittels Beihilfen durch die Thüringer Tierseuchenkasse unterstützt. Im Jahr 2008 wurden durch das Labor des Thüringer Gesundheitsdienstes 23 114 Kotproben aus 88 Betrieben bakteriologisch auf das Vorhandensein von MAP untersucht und dabei eine Einzeltierprävalenz von 5 % festgestellt (DONAT 2009). Im Jahr 2010 wurden 29 318 Kotproben aus 135 Betrieben am Labor des Thüringer Gesundheitsdienstes untersucht. Dabei wurde in 3,6 % der Kotproben MAP kulturell nachgewiesen (TSK 2011).

Die vorliegende Studie soll Wege für eine frühzeitige Erkennung von Herden mit infizierten Tieren aufzeigen. Nur eine Screening–Methode, die den Nachweis von MAP in einer Herde auf einfache und kostensparende Weise mit ausreichender statistischer Sicherheit erlaubt, ermöglicht den betroffenen Landwirten einen rechtzeitigen Einstieg in ein Bekämpfungsprogramm.

2.3 Pathogenese und Klinik

2.3.1 Erreger

Der Erreger MAP ist ein schwach grampositives, aerobes, unbewegliches, nicht sporenbildendes, säure– und alkoholfestes Stäbchenbakterium mit einer Länge von 0,3 bis 2,0 μm und einer Dicke von 0,2 bis 0,5 μm (MANNING und COLLINS 2001).

Nach STEVENSON et al. (2002), DOHMANN et al. (2003) und GIERKE (2009) können drei sogenannte Biotypen nach Wirtsassoziation und Wachstumsform unterschieden werden. Der „ovine“ Biotyp tritt bei Schafen auf, wächst langsam in häufig pigmentierten, flachen und gleichförmigen Kolonien. Bei Rindern kann zumeist der „bovine“ Biotyp gefunden werden, welcher zumeist cremefarben bis transparent, klein, glatt und glänzend in nicht–pigmentierten Kolonien wächst. Ein „intermediäres“ Isolat kann von Schafen und Ziegen angezüchtet werden.

Eine widerstandsfähige Zellwand ermöglicht dem Mycobakterium eine auffallend hohe Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Noxen (TESSEMA et al. 2001). Die Bakterien können länger als ein Jahr im Boden, auf Weideflächen und im Wasser bei erhaltener Infektiosität überdauern (LARSEN et al. 1956, WHITTINGTON et al. 2004). Nach RAIZMAN et al. (2011b) übersteht der Erreger mehrere Tiefgefrier- und Auftauvorgänge. Aufgrund der hohen Tenazität ist eine Anreicherung des Erregers in der Umgebung möglich (KÖHLER et al. 2003). Diese Eigenschaft kann bei der Untersuchung von Umgebungsproben genutzt werden (PILLARS et al. 2009a, PILLARS et al. 2009b, DONAT et al. 2011). Nach SALGADO et al. (2011) und RAIZMAN et al. (2011c) kann sich der Erreger durch unterschiedliche Witterungsbedingungen im Boden verteilen. Eine kulturelle Anzucht des langsam wachsenden Erregers gelingt ausschließlich auf Mycobactin-haltigen Nährböden (FLI 2010).

2.3.2 Infektion und Verbreitung im Bestand

Als Hauptinfektionsweg gilt die orale Aufnahme des Erregers. Jungtiere sind als besonders empfänglich gegenüber einer Infektion einzustufen (WINDSOR und WHITTINGTON 2010). Der Erreger wird von infizierten Tieren mit dem Kot ausgeschieden. Mit einem Gramm Kot infizierter Rinder werden 10^9 bis 10^{11} Mycobakterien ausgeschieden (HOFFMANN et al. 2009). Auch die Sekretion von MAP über Kolostrum und Milch bildet eine potentielle Infektionsquelle. (SWEENEY 1996). MAP hat einen obligaten Darmtropismus. Über Interaktion mit im *Ileum* ansässigen M-Zellen kann das Agens die Darmschranke passieren (SECOTT et al. 2004). M-Zellen sind Epithelzellen, die die Peyerschen Plaques besiedeln. Durch Transzytose gelangen die aufgenommenen MAPs in das Stroma und werden durch Makrophagen aufgenommen. Effektive Schutzmechanismen erlauben einem Großteil der MAPs das Überleben und die Vermehrung im Makrophagen (TESSEMA et al. 2001). Der intrazelluläre Aufenthalt ermöglicht es dem Erreger langfristig im Körper des Wirtes zu persistieren (VALENTIN-WEIGAND 2004, SIGURDARDÓTTIR et al. 2005, BERMUDEZ et al. 2010).

Neben der fäkal-oralen Kuh-Kalb-Übertragung wird eine Übertragung der Erkrankung *in utero* diskutiert. Nach ALY und THURMOND (2005) haben Kälber aus Muttertieren mit seropositivem Paratuberkulose-Nachweis ein 6,6fach höheres

Risiko auch seropositiv auf den Erreger zu reagieren, als Tiere von Paratuberkulose-seronegativen Muttertieren. In einer Literaturrecherche von WHITTINGTON und WINDSOR (2009) waren 9 % der Kälber aus subklinisch infizierten Rindern und 39 % aus Muttertieren mit klinischen Paratuberkuloseerscheinungen mit MAP infiziert. HINGER (2009) und KÜPPER et al. (2012) untersuchten eine mögliche Vererbbarkeit der MAP-Infektion. HINGER (2009) verglich dazu die genetischen Abstammungslinien von 4524 Deutsch Holstein Kühen aus zwölf Thüringer Betrieben mit der serologisch ermittelten Antikörperantwort gegenüber der MAP-Infektion. Die geschätzten Heritabilitäten lagen zwischen 0,05 und 0,14. KÜPPER et al. (2012) ermittelten eine höhere Heritabilität von 0,157 bis 0,228 bei der Untersuchung von 11285 Herdbuchtieren aus 15 Thüringer Betrieben unter Verwendung von Kotkulturen. Bestände mit einer Einzeltierprävalenz von über 10 % zeigten dabei eine erhöhte Erblichkeit als Bestände mit einer Einzeltierprävalenz von unter 10 %. Der Nachweis des Erregers gelang in Uterusspülproben klinisch erkrankter Muttertiere (ROHDE und SHULAW 1990). SWEENEY et al. (1992b) wiesen ein Vorkommen des Erregers in Feten infizierter Muttertiere mit starker fäkaler Ausscheidung (über 70 Kolonien je Diagnosekultur) nach.

Eine Modellstudie zur Durchseuchung in einer Herde wurde durch MARCÉ et al. (2011) durchgeführt: Wird ein infiziertes Tier in eine naive Herde verbracht, so kommt es in 66 % der Fälle zu einer Durchseuchung der Herde. Ist der Erreger persistent, so steigt die Einzeltierprävalenz binnen 25 Jahren auf 88 %.

2.3.3 Krankheitsverlauf

Es werden drei Stadien der Erkrankung beschrieben (TIWARI et al. 2006):

1. Latenzphase

Die Erkrankung beinhaltet eine zum Teil mehrere Jahre (2 bis zu 10 Jahre) andauernde Latenzphase. Der Erreger befindet sich im Wirt, es sind jedoch weder klinische Symptome feststellbar, noch lässt sich der Erreger diagnostisch nachweisen. Generell wird mit einer systematischen Diagnostik ab einem Lebensalter von 24 Monaten begonnen. PITHUA et al. (2010) belegte eine diagnostische Lücke im kulturellen Nachweis des Erregers bei Jungtieren unter einem Alter von 2 Jahren, auch wenn ein Nachweis des

Erregers im Färsenalter nicht ausgeschlossen ist (BOLTON et al. 2011). Nach WEBER et al. (2010) kann ein Nachweis des Erregers früher als im Alter von 24 Monaten gelingen, insbesondere wenn der Betrieb einen starken Infektionsdruck des Paratuberkuloseerregers bietet. Auch HINGER et al. (2008) beschreiben einen Anstieg der MAP-Prävalenz bei Tieren im Alter von zwei bis drei Jahren. Dafür untersuchten die Autoren 4 524 Rinder aus 12 Thüringer Beständen mit Prävalenzen zwischen 5 % und 36,9 %. Eine Diagnose kann auch am toten Tier durch Erregernachweis in der Darmschleimhaut oder im tributären Lymphknoten gelingen (BREES et al. 2000).

2. Subklinische Phase

In der subklinischen Phase sind keine klinischen Symptome auffällig. Der Erreger überlebt in den Makrophagen des Wirtes (SWEENEY 2011). Nach TIWARI et al. (2006) ist ein Nachweis der Paratuberkulose-Erkrankung bei einem kleinen Teil der subklinisch infizierten Rinder möglich. Wahrscheinlich scheiden die Tiere auch Erregermaterial in Mengen unterhalb der diagnostischen Nachweisgrenze aus, so dass diese unerkannt bleiben. Die Ausscheidung geringer Erregermengen durch Rinder im subklinischen Krankheitsstadium spielt nach TIWARI et al. (2006) eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Tier zu Tier. Teilweise findet auch eine Antikörperbildung gegen den Erreger statt, so dass die Tiere einer serologischen Diagnostik zugänglich sind.

3. Klinische Phase

Der Erreger hat sich nach Latenzphase und subklinischem Stadium soweit manifestiert, dass die Tiere klinische Symptome zeigen. Die Tiere verlieren markant an Gewicht bei erhaltenem oder vermindertem Appetit. Innerhalb von drei bis sechs Monaten kommt es zu profusen Durchfällen infolge pathognomonisch hirnwindenartig verdickter Dünndarmschleimhaut. Der Durst ist zumeist gesteigert und die Milchproduktion sinkt (LOMBARD 2011). Neben der Kultivierung von MAP aus Kotproben, ist auch ein Antikörpernachweis

möglich. Die Erregerstreuung durch den Kot erkrankter Tiere bildet eine erneute Infektionsquelle für empfängliche Jungtiere des Bestandes. Wird das Tier nicht gemerzt, verschlechtert sich das Allgemeinbefinden bis hin zu Ödembildungen infolge Proteinmangel (SWEENEY 2011) und dem Versterben des Tieres. Tiere in der klinischen Ausscheidungsphase sind die „Spitze des Eisberges“. Viele Tiere verlassen den Bestand auf Grund anderer Ursachen bevor sie klinische Symptome zeigen (WHITLOCK und BUERGELT 1996).

SWEENEY et al. (1992a) konnten experimentell ein „Passagieren“ des Erregers erzeugen. Oral verabreichte Dosen des Erregers waren nach wenigen Tagen aus dem Kot des Tieres zu isolieren, ohne dass eine Infektion des Tieres hervorgerufen wurde. Die dabei ausgeschiedene Erregermenge zeigte eine Abhängigkeit von der aufgenommenen Erregerdosis.

2.4 Therapie und Bekämpfung

In Deutschland besteht eine Meldepflicht für Paratuberkulose-Erkrankungen. Die Paratuberkulose-Sanierung ist zeitaufwendig (COLLINS et al. 2010, KUDAHL et al. 2011). Die Inkubationszeit kann mehrere Jahre betragen. In dieser Zeit können sich erneut Tiere infiziert haben. Die Diagnostik ist zeitaufwendig. Goldstandard ist die kulturelle Untersuchung, das Ergebnis ist den Landwirten nach 12 Wochen zugänglich.

2.4.1 Merzung infizierter Tiere

Eine kausale Therapie ist nicht bekannt (MANNING und COLLINS 2001), eine symptomatische Therapie ist wenig erfolgversprechend. Aus diesem Grund sollen infizierte Tiere im Sinne einer Paratuberkulosesanierung der unmittelbaren Schlachtung zugeführt werden (LU et al. 2008, KUDAHL et al. 2011). Nach GROENENDAAL et al. (2003) ist die alleinige *test-and-cull*-Strategie jedoch nicht geeignet innerhalb von 20 Jahren Paratuberkulose aus dem Bestand auszurotten.

2.4.2 Management- und Hygienemaßnahmen

In Deutschland wurden 2005 die Leitlinien für den Umgang mit der „Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen“ durch das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft erlassen, um eine einheitliche Vorgehensweise in Deutschland bei der Paratuberkulosebekämpfung zu erzielen. Drei Säulen bilden das Grundgerüst der Leitlinien (BMELV 2005):

1. Hygienemaßnahmen zur Senkung des Infektionsdruckes
2. Bestandsüberwachung klinisch, serologisch und bakteriologisch
3. Bundesweite Registrierung der Paratuberkuloseverbreitung

Neben der Merzung diagnostizierter Rinder sind strikte Management- und Hygienemaßnahmen einzuhalten. Speziell im Abkalbebereich ist auf konsequente Hygiene zu achten. Die Trennung der Abkalbebuchten in MAP-positiv und MAP-negativ ist sinnvoll. Kälber sind unmittelbar nach der Geburt vom Muttertier zu trennen um Kontakt mit potentiell erregerehaltigem Kot zu vermeiden. Zuchtkälber erhalten kein Kolostrum aus MAP-positiven Muttertieren. Kälber von MAP-ausscheidenden Rindern haben ein höheres MAP-Infektionsrisiko (BENEDICTUS et al. 2008). Personenverkehr und Arbeitsgeräte sind als Erregerträger nicht zu vernachlässigen. Auch landwirtschaftliche Nutzflächen sind so zu bewirtschaften, dass eine Erregerverschleppung minimiert wird (BMELV 2005). Kälber und Jungtiere sind räumlich getrennt von adulten Rindern aufzustellen. Bei Handel und Tierzukauf sollte neben anderen vermeintlich „wichtigeren“ Infektionskrankheiten auch der Paratuberkulose-Status bedacht werden. Nachkommen infizierter Tiere sind von der Zucht auszuschließen. Nach Möglichkeit ist eine Eigenremontierung aus Paratuberkulose-unverdächtigen Muttertieren anzustreben (BMELV 2005).

NIELSEN UND TOFT (2007) identifizierten vier Risikofaktoren, die für die Paratuberkulose-Erkrankung eine entscheidende Bedeutung einnehmen:

1. Rinder in Laufstallhaltungen sind anfälliger als Tiere in Anbindehaltungen
2. Geringe Hygienemaßnahmen im Futterbereich der Kälber
3. Abkalbebereiche mit geringer Strohmenge
4. Große Tierdichte der Jungtiere im Alter von über 12 Monaten

Gute Erfolge, das heißt eine nachhaltige Senkung der Einzeltierprävalenzen, kann durch Einhalten der Sanierungsempfehlungen erzielt werden (BENEDICTUS et al. 2008, FEROUILLET et al. 2009, COLLINS et al. 2010). COLLINS et al. (2010) führten eine Studie an neun Milchviehherden durch. Durch folgende Hygieneauflagen wurde die Anzahl ELISA-positiver Kühe von 11,6 % zu Beginn der Studie auf 5,6 % nach sechs Jahren gesenkt:

1. Getrennte Abkalbebuchten für ELISA-positiv und ELISA-negativ Rinder
2. Trennung des Kalbes binnen zwei Stunden nach Geburt vom Muttertier
3. Verfütterung von ungepoolten Kolostrum aus ELISA-negativen Muttertieren
4. hygienische Kolostrumgewinnung
5. Fütterung von pasteurisierten Milchaustauscher nach dem Absetzen
6. Reduktion des Kontakts des Kalbes mit dem Kot adulter Rinder.

NIELSEN und TOFT (2011) untersuchten durch retrospektive Befragungen aus dänischen Rinderbetrieben im Jahr 2006 Einflussfaktoren des Managements auf einen Prävalenzanstieg MAP-spezifischer Antikörper. Einen Einfluss auf den Anstieg der Paratuberkuloseprävalenz zeigen folgende Kriterien:

1. Zukauf von Tieren
2. Merzung wiederholt seropositiver Tiere
3. Verwendung überschüssiger Milch aus Muttertieren mit geringem MAP-Risiko an Färsenkälber

Ohne Einfluss nach den Autoren hingegen bleibt die Trennung hochrisikobehafteter Rinder von niedrigrisikanten Rindern in den Abkalbebereichen, die Reinigung der Abkalbeställe nachdem ein MAP-positives Rind gekalbt hat, die Entfernung der Kälber binnen zwei Stunden von MAP-positiven Muttertieren, die Verwendung von Kolostrum aus geringrisikanten Rindern zur Fütterung von Färsenkälbern sowie die Herdengröße.

2.4.3 Impfung

Ein Impfstoff gegen Paratuberkulose ist in der Europäischen Union nicht zugelassen (SANTEMA et al. 2011). Eine geeignete Impfung könnte als wichtiges Instrument zur Senkung der Erregerlast bei der Sanierung dienen. Es sind sowohl Totimpfstoffe als auch attenuierte Lebendimpfstoffe in der Testung (KALIS et al. 2001, CHARTIER et

al. 2012). Die Vakzination senkt die Erregerausscheidung, die wirtschaftlichen Verluste und die Häufigkeit klinischer Symptome, sie schützt jedoch nicht vor einer Infektion (BASTIDA und JUSTE 2011). JUSTE et al. (2009) wiesen eine Steigerung der Milchproduktion von 3,9 % nach Impfung mit einem Milliliter *Silirum*® MAP vaccine (CZ Veterinaria, S.A., Porriño, Spain) nach. Der Impfstoff *Mycopar* ist in den USA als einziger Impfstoff für die Anwendung bei Rindern zugelassen (PATTON 2011). In Deutschland ist eine Impfung derzeit verboten. Die fehlende Differenzierung zwischen geimpften und infizierten Tieren in der Diagnostik (MUSKENS et al. 2002) ist der größte Nachteil der Impfung. Des Weiteren existieren Berichte über positive Tuberkulinisierungsreaktionen (CHARTIER et al. 2012) und Unterhautgranulome nach erfolgter Impfung (LEI et al. 2008, KLAWONN 2009).

2.4.4 Kontroll- und Präventionsprogramme

Dem zunehmenden Interesse an der Erkrankung Paratuberkulose folgen weltweit Kontroll- und Präventionsprogramme (KENNEDY 2011). Die Bekämpfungsprogramme beziehen sich zumeist auf die Unterbrechung der Kuh-Kalb-Übertragung durch Hygienemaßnahmen. In den meisten Ländern ist die Teilnahme am jeweiligen Bekämpfungsprogramm freiwillig. Eine Ausnahme bilden Japan und Schweden (BAUMGARTNER und KHOL 2008). In Japan muss jedes Rind mindestens einmal in fünf Jahren durch ELISA, Kotkultur oder mikroskopischen Kotnachweis getestet werden. In Schweden wird ein strenges Programm verfolgt: Alle Wiederkäuer sind auf MAP zu untersuchen. Im Nachweisfall ist die infizierte Herde auszumerzen (BAUMGARTNER und KHOL 2008).

In den USA wird ein freiwilliges Programm zur Kontrolle der bovinen Paratuberkulose angeboten. Es sieht eine Untersuchung im jährlichen Rhythmus vor und kategorisiert Herden entsprechend der angewandten Diagnosemethode und der nachgewiesenen Prävalenz (USDA 2010). In den einzelnen Bundesstaaten wird die Ausführung in separaten Paratuberkuloseprogrammen konkretisiert (RAIZMAN et al. 2004, HOE und RUEGG 2006). In Australien sind Kontroll- und Bekämpfungsmethoden durch das *Australian National Johne's Disease Control Program* genau geregelt (AHC 2011). Das kanadische Paratuberkuloseprogramm besteht aus zwei Stufen (MCKENNA 2006b): In Stufe 1 wird den Landwirten risikobasiertes Verhalten vermittelt und in Stufe 2 wird der Erkrankungsstatus ermittelt und kontrolliert. In

vielen Ländern Europas bestehen freiwillige Paratuberkuloseprogramme, beispielsweise in den Niederlanden (BENEDICTUS et al. 2000), Norwegen (THARALDSEN et al. 2003) und Österreich (KHOL et al. 2007). In Dänemark werden teilnehmende Herden viermal jährlich mittels Milch–ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP getestet (KUDAHL et al. 2008). In Deutschland sind im Jahr 2005 „Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen“ durch das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft erlassen worden (BMELV 2005). Einzelne Bundesländer verfolgen freiwillige Paratuberkuloseprogramme. In Thüringen ist durch das „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ ein Durchführungsplan mit dem Ziel der Senkung des Paratuberkulose–Infektionsdruckes gegeben. Das Programm beinhaltet folgende Schwerpunkte:

1. Grundsätzliche Bekämpfungsansätze
 - Senkung des Erregerdruckes durch Eliminierung der Ausscheider
 - Verhindern von Neuinfektionen der Kälber durch Hygienemaßnahmen
2. Statusdefinitionen
 - Infektion eines Rindes mit MAP (kultureller, molekularbiologischer oder pathologischer Nachweis)
 - Sanierungsbestand (Teilnahme des Betriebes am Programm mit Durchführung eines betrieblichen Bekämpfungsplans)
 - Paratuberkulose–unverdächtiger Bestand (jährliche kulturelle Einzeltieruntersuchung aller über 24 Monate alten Rinder des Bestandes über 3 Jahre mit ausschließlich MAP–negativen Ergebnissen)
3. Untersuchungen
 - Serologische Basisuntersuchung aller über 24 Monate alten Rinder
 - Kot– oder Blutproben entsprechend des Bekämpfungsplanes
4. Regelungen zum Tierverkehr (Zukauf nur aus Herden mit gleichem oder besserem Paratuberkulosestatus)
5. Wesentliche Hygienemaßnahmen
 - Trennung der Kälber sofort nach der Geburt vom Muttertier
 - Verwendung von hygienisch gewonnenem Erstkolostrum aus Paratuberkulose–negativen Muttertieren

- Benutzung der Arbeitsmaterialien entweder im Milchviehstall oder im Kälber- und Jungviehstall
- keine Gülle- oder Festmistdüngung auf Futterflächen, Jungtierhaltung nicht auf Weideflächen, die durch MAP-infizierte Tiere beweidet wurden
- kein Zuchteinsatz von Nachkommen MAP-infizierter Rinder

2.5 Diagnostik

Die Diagnose der Paratuberkulose erfolgt direkt im Kot mit Hilfe mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden oder indirekt durch serologische Bestimmung von Antikörpern gegen den Erreger. Nur ein positives Testergebnis bietet eine zuverlässige Aussage zum Infektionsstatus des jeweiligen Tieres. Ein negatives Ergebnis bedeutet nicht die Freiheit des Tieres von MAP, sondern kann nach VALENTIN-WEIGAND (2002) auch einem periodischen Ausscheiden des Erregers oder einer unterschiedlich stark ausgeprägten Immunantwort geschuldet sein.

In Thüringen wird seit 2008 der direkte kulturelle Nachweis von MAP als Standardmethode angewandt. Zuvor kamen indirekte blutserologische Untersuchungen mit Nachweis von MAP-Antikörpern zum Einsatz (DONAT 2009).

2.5.1 Direkter Erregernachweis

Um den Erreger direkt nachzuweisen, eignen sich Kotproben von lebenden Tieren oder Darminhalt, veränderte Darmschleimhaut (vorwiegend *Jejunum* oder *Ileum*), *Ileozäkalklappe* und die zugehörigen Mesenterial-Lymphknoten von Schlachttieren, getöteten oder verendeten Tieren (FLI 2010).

Auch wenn es in der Paratuberkulosedagnostik bisher keine perfekte Methode gibt, so ist die kulturelle Anzucht von MAP aus Rinderkot die derzeit sensitivste Methode am lebenden Tier (LEPPER et al. 1989, WHITTINGTON und SERGEANT 2001, KÖHLER et al. 2008b). Um den Paratuberkulosestatus einer Herde zu bestimmen, ist die wiederholte kulturelle Untersuchung aller Einzeltiere über 24 Monate des Gesamtbestandes geeignet (WELLS et al. 2002, GIERKE 2009). Eine Probengewinnung im frühen Laktationsstadium der Tiere ermöglicht eine verbesserte Auffindungsrate, da eine erhöhte Ausscheidung während Stresssituationen erwartet

wird (NORTON et al. 2010). Unterstützend zur kulturellen Anzucht wird die nachfolgende Identifizierung mittels Ziehl–Neelsen–Färbung und Polymerase–Ketten–Reaktion (PCR) als Bestätigung eingesetzt (ENGLUND et al. 1999, MÖBIUS et al. 2008).

Die Anfärbung von Abklatschpräparaten ist eine weitere, wenn auch unzuverlässige, direkte Nachweismethode des Erregers (RIS 1988). Dabei wird eine Kotprobe nach Ziehl–Neelsen oder ein veränderter Darmabschnitt mit zugehörigen Lymphknoten auch mit Akridin–Orange gefärbt und mit dem Mikroskop durchmustert (FLI 2010).

2.5.2 Indirekter Erregernachweis

Antikörper gegen MAP können im Blutserum, Plasma, Milch oder Milchserum nachgewiesen werden (FLI 2010). Der Nachweis von Antikörpern kann jedoch erst zeitlich versetzt zum direkten Erregernachweis geschehen (LEPPER et al. 1989, GEISBAUER et al. 2007). Der serologische Nachweis von Antikörpern hat zudem eine geringere Sensitivität als der direkte Nachweis in einer kulturellen Untersuchung (SOHAL et al. 2007, GEISBAUER et al. 2007).

2.5.2.1 Johnin Hauttest, Interferon– γ –Test, Komplementbindungsreaktion, Agargelimmunodiffusionstest

Viele indirekte Erregernachweise wie der Johnin Hauttest, der Interferon– γ –Test und die Komplementbindungsreaktion finden auf Grund mangelhafter Sensitivität beziehungsweise ungenügender Spezifität keine Anwendung (GIERKE 2009). Der Agargelimmunodiffusionstest ist in einigen Ländern, z.B. in Australien, zur schnellen und kostengünstigen Diagnosestellung bei klinischen Verdachtstieren im Einsatz. FERREIRA et al. (2002) ermittelten eine Sensitivität des Agargelimmunodiffusionstests von 57 % und eine Spezifität von 92,5 % bei der Untersuchung von 48 Rinderseren in Brasilien. Als Referenzmethode nutzten die Autoren die Untersuchung von Blutserumproben mit Hilfe von drei verschiedenen ELISA–Testsystemen.

2.5.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

In Deutschland sind derzeit fünf ELISA–Kits zur Diagnostik von MAP zugelassen (FLI 2011):

1. ID Screen *Paratuberculosis* Indirect/ IDVet/ FLI–B 443
2. ID Screen *Paratuberculosis* indirect–Bestätigung, Kurzform: PARAB/ IDVet, FLI–B 533
3. Test zum Nachweis von Antikörpern gegen die Paratuberkulose (Serum), Handelsformen:
 - a) IDEXX *Paratuberculosis* Verification
 - b) IDEXX *Paratuberculosis* Screening/ IDEXX Montpellier SAS, BGVV–B 263
4. CATTLETYPE MAP Ab ELISA–Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Kurzform: CATTLETYPE MAP Ab, Labor Diagnostik Leipzig (LDL), FLI–B 471
5. PARACHEK 2, ELISA für den in vitro Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subspezies *paratuberculosis* in Serum von Rindern, Schafen und Ziegen und Milch von Rindern, Kurzform: PARACHECK 2/ Prionics Deutschland, FLI–B 477

In einer neuseeländischen Studie von NORTON et al. (2010) wurden 779 Kühe mit zwei ELISA–Testsystemen, sowie kulturell untersucht. Es wurde eine ELISA–Sensitivität von 38,3 % (bei Verwendung von wiederholten Messdaten) beziehungsweise 41,4 % (bei Verwendung von Querschnittsdaten) und eine ELISA–Spezifität von 99,5 % (wiederholte Messdaten) beziehungsweise 97,7 % (Querschnittsdaten) ermittelt. Nach KÖHLER et al. (2008a) zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Sensitivitäten vom Erkrankungsstadium der Tiere. In der Studie wurden Seren aus 286 Paratuberkulose–negativen und 110 Paratuberkulose–positiven Beständen evaluiert. Tiere mit klinischen Symptomen erzielten Sensitivitäten von 51,6 bis 77,4 %, hingegen zeigten subklinisch infizierte Tiere Sensitivitäten von 22,6 bis 54,8 %. In einer Studie von MCKENNA et al. (2005) wurden ein absorbierender und ein nicht–absorbierender ELISA bei der Untersuchung von 383 Tieren aus acht Herden miteinander verglichen. Die Autoren ermittelten Spezifitäten von 98,4 % (absorbierender ELISA) und 87,9 % (nicht–absorbierender ELISA). Die Sensitivitäten waren mit 72,5 % (absorbierender ELISA)

und 65,5 % (nicht-absorbierender ELISA) ähnlich zu den Untersuchungen von KÖHLER et al. (2008a).

2.5.3 Untersuchung auf Herdenebene

2.5.3.1 Milchuntersuchungen

Die Detektion von MAP aus Rindermilchproben findet in der Paratuberkulosedagnostik bereits Anwendung (SORGE et al. 2011, PATEL und SHAH 2011). Es werden Tankmilchproben (WILSON et al. 2010) oder individuelle, beziehungsweise gepoolte Einzelmilchproben (SHANKAR et al. 2010, SORGE et al. 2011) untersucht. Es kommen zumeist IS900 PCR-Verfahren, real-time PCR-Verfahren oder die Nutzung von ELISA-Testkits zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP zum Einsatz (METZGER-BODDIEN et al. 2006, SHANKAR et al. 2010). Des Weiteren werden Milchproben kulturell auf das Vorhandensein von MAP untersucht (BOTSARIS et al. 2010, OKURA et al. 2012). Zur Überprüfung der Verfahren werden künstlich infizierte Milchproben eingesetzt (KHARE et al. 2004).

1. Serologische Methoden

WILSON et al. (2010) untersuchten Tankmilchproben aus 170 Milchviehbetrieben in Utah. Dabei wiesen 39 % (61 von 170) der untersuchten Tankmilchproben Antikörper gegen MAP auf. Es wurde eine Sensitivität der Tankmilchuntersuchung von 57 % errechnet. SORGE et al. (2011) stellten bei der zweimaligen Untersuchung von Einzelmilchproben im ELISA aus 226 Betrieben in Ontario und Westkanada fest, dass eine einzelne Herdenuntersuchung nicht ausreicht um den MAP-Antikörper-Status einer Herde zu bestimmen. Die Herden zeigten unterschiedliche Ergebnisse zu beiden Testzeitpunkten.

GEUE et al. (2007) untersuchten Tankmilchproben in Rheinland-Pfalz auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP mittels zwei verschiedener ELISA-Testkits. Bei Verwendung dieser Methode wurden 82,9 % (Svanovir-ELISA) beziehungsweise 80 % (IDEXX-ELISA) der Paratuberkulose-positiven Betriebe nicht identifiziert. Auch veränderte cut-off Wert erzielten lediglich eine erhöhte Sensitivität zu Lasten einer verminderten Spezifität. Die Autoren zweifeln an der diagnostischen Brauchbarkeit der verfügbaren Testsysteme zur Untersuchung von Tankmilchproben.

2. PCR – basierte Detektion

GIACOMETTI et al. (2012) untersuchten Rohmilchproben in Norditalien und wiesen mittels PCR bei 3 % der Proben MAP nach und folgerten, dass Rohmilch als Quelle einer Mycobakterien–Gefährdung für Verbraucher in Betracht gezogen werden kann.

BOTSARIS et al. (2010) untersuchten 220 Tankmilchproben mit unterschiedlichen diagnostischen Methoden. Durch eine quantitative real–time PCR wurde in 63 Proben (28,6 %) MAP nachgewiesen. Eine ähnliche Nachweisrate wurde mit einer IS900 PCR erzielt: In 50 Proben (22,2 %) wurde der Erreger nachgewiesen. Nur zwei der untersuchten Tankmilchproben wurden durch das Anlegen einer Kultur erkannt, so dass die Autoren angeben, dass die Schnelluntersuchungsmethoden eine höhere Sensitivität bei der Untersuchung von Rohmilch aufweisen als die kulturelle Milchuntersuchung.

OKURA et al. (2012) werteten Studien zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP in Tankmilchproben und Einzelgemelken aus. Die auftretenden Prävalenzen wurden im Verhältnis zur verwendeten Testmethode und dem Infektionsstatus der Herde beziehungsweise der Tiere betrachtet. In den Studien kamen hauptsächlich PCR–Methoden und die kulturelle Untersuchung der Proben zur Anwendung. Die Autoren konnten keine Aussage zur MAP–Häufigkeit in Milchproben treffen, da die unterschiedlichen Studien keine quantitative Auswertung lieferten.

SLANA et al. (2012) untersuchten die Nutzung von Milchfiltern als Screening–Methode zur Feststellung des Paratuberkulose–Herdenstatus. Milchfilter aus 79 Betrieben mit bekanntem MAP–Status wurden mit einer quantitativen real–time PCR analysiert. Die Autoren gaben eine Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen MAP–Detektion durch die Untersuchung von Milchfiltern in Herden mit MAP–infizierten Rindern von mindestens 94,3 % an. Die absoluten Zahlen von detektierten MAPs auf den Milchfiltern dienten den Autoren als grobe Schätzung der Paratuberkulose–Einzeltierprävalenz von über 10 %.

2.5.3.2 Umgebungskotproben

Infizierte Tiere kontaminieren maßgeblich die Stallumgebung durch die Ausscheidung von Mycobakterien–haltigem Kot. Mit einem Gramm Kot werden 10^9 bis 10^{11} Mycobakterien an die Stallumgebung abgegeben (HOFFMANN et al. 2009).

MAP besitzt eine hohe Widerstandsfähigkeit (BÜLTE et al. 2005) gegenüber physikalischen und chemischen Noxen. Der Erreger kann in der Umgebung der Tiere persistieren. Aufgrund einer hohen Tenazität ist eine Anreicherung und Verbreitung des Erregers in der Umgebung möglich (Köhler et al. 2003).

EISENBERG et al. (2010) wiesen den Erreger in Staubproben des Milchviehstalls, sowie im Jungtierstall niederländischer Milchviehbetriebe nach. Ein Nachweis des Erregers in Umgebungskotproben lässt Rückschlüsse auf die Einzeltierprävalenz zu (BERGHAUS 2006).

Umgebungskotproben eignen sich vor allem in Laufstallhaltungen als Methode zur Einschätzung der in der Herde vorliegenden Paratuberkulose-Prävalenz (PILLARS et al. 2009a). Hochprävalente Herden können sicher detektiert werden, wenn kulturelle Untersuchungen aus der Stallumgebung mit hohem Tierkontakt durchgeführt werden (RAIZMAN et al. 2004, LOMBARD et al. 2006, PILLARS et al. 2009a).

Studien zur Eignung von Umgebungskotproben unterscheiden sich in den verwendeten Referenzmethoden. Einzeltierkotproben (LOMBARD et al. 2006), gepoolte Einzeltierkotproben (BERGHAUS et al. 2006), Serum-ELISA (RAIZMAN et al. 2004) oder Milch-ELISA (LOMBARD et al. 2006) kommen zum Einsatz (Tabelle 1). Ist ein Bestand Paratuberkulose-infiziert, so lassen sich häufig auch Nachweise von MAP in verschiedenen Bereichen des Stalles mit Tierkontakt führen. Dung-Lagerplätze, Kuhtriebwege und Vorwartehefe/Melkbereiche sind als besonders geeignete Lokalisationen zur Auffindung von MAP-infizierten Betrieben anzusehen (RAIZMAN et al. 2004, PILLARS et al. 2009a, SMITH et al. 2011a). Betriebe mit einer Einzeltierprävalenz von > 2 % sind nach einer Studie von PILLARS et al. (2009a) mit Hilfe von Umgebungskotproben mit hoher Sicherheit zu detektieren. Ähnliche Ergebnisse erzielten DONAT et al. (2011). Die Autoren untersuchten Umgebungskotproben aus 46 Milchviehherden mit bekannter Einzeltierprävalenz. In 22 aus 31 MAP-infizierten Betrieben (71 %) wurde das Vorhandensein des Erregers auch mittels kultureller Untersuchung von Umgebungskotproben identifiziert. Positive Umgebungskotproben waren von der Einzeltierprävalenz des Betriebes abhängig. Betriebe mit einer Einzeltierprävalenz über 2 % konnten zu 87 % sicher auffindig gemacht werden.

Tabelle 1: Ausgewählte Studien zur Herdendetektion durch Umgebungskotproben im Vergleich zu kulturellen Einzeltieruntersuchungen

	Anzahl untersuchter Herden	Ergebnis	Untersuchungsmethode
RAIZMAN et al. 2004	80 infizierte & 28 nicht-infizierte (Minnesota)	<ul style="list-style-type: none"> • 78 % der UP aus „infizierten“ Herden mit MAP-Nachweis 	EP _{< 100Tiere der Herde, gepoolt zu 5 Kühen} 2 UP je Betrieb
BERGHAUS et al. 2006	23 (Kalifornien)	Anteil MAP-positiver Herden: <ul style="list-style-type: none"> • UP: 74 % • EP: 70 % • ELISA: 65 % 	EP oder EP _{gepoolt} von 60 Tieren ELISA _{Blut} UP
LOMBARD et al. 2006	98 (21 Staaten der USA)	<ul style="list-style-type: none"> • 45,1 % (218 von 483) der UP mit MAP-Nachweis • 38 der 50 EP-„infizierten“ Betriebe: UP positiv 	Fragebogen EP ELISA _{Serum} ELISA _{Milch} UP
HOFFMANN et al. 2009	191 (Bayern)	<ul style="list-style-type: none"> • 6 von 961 UP mit positiven MAP-Nachweis 	ELISA _{Blut} EP UP
PILLARS et al. 2009a	7 (Michigan)	<ul style="list-style-type: none"> • 11 % (81 von 731) der UP mit MAP-Nachweis • EP > 2 %: Melkbereich und/oder Dung-Lagerplatz in 75 % mit MAP-Nachweis • EP < 2 %: kein MAP-Nachweis in UP 	2xjährlich UP
DONAT et al. 2011	46 (Thüringen)	<ul style="list-style-type: none"> • Erkennung MAP-infizierter Betriebe ab EP > 2 % • 71 % (22 aus 31 infizierten Betrieben) mit MAP-Nachweis in UP 	EP UP
SMITH et al. 2011a	3 (Nordost-USA)	<ul style="list-style-type: none"> • 11,8 % der UP-Proben MAP-positiv • je höher EP, desto eher UP-Nachweis 	2xjährlich EP über 6 Jahre 4xjährlich UP

EP = Einzeltierkotproben bzw. Einzeltierkotprobenprävalenz, UP = Umgebungskotproben

RAIZMAN et al. (2004) untersuchten im Rahmen des *Minnesota Johne's Disease Control Program* 108 Herden, davon 80 infizierte und 28 nicht infizierte. Es wurden jeweils bis zu 100 Einzelkotproben je Betrieb entnommen und diese zu je fünf Kühen gepoolt und anschließend kulturell untersucht. Zusätzlich wurden zwei Proben aus unterschiedlichen Lokalisationen im Stall entnommen. Alle Proben wurden kulturell auf das Vorhandensein von MAP untersucht. 80 % der „infizierten“ Herden hatten mindestens einen positiven Einzeltierkotprobenpool. In 78 % der untersuchten Herden wurde der Erreger mittels Umgebungskotproben nachgewiesen. Positive Umgebungskotproben konnten im Kuhtriebweg (bei 77 % der Herden), auf dem Dung-Lagerplatz (bei 68 % der Herden), im Abkalbebereich (bei 21 % der Herden), im Krankenstall (bei 18 % der Herden) diagnostiziert werden. Die Anzahl der Kolonien pro untersuchter Kultur aus dem Kuhtriebweg und der Dung-Lagerplatz korrelierte mit der Prävalenz der gepoolten Kotproben. Konnte in keiner der beiden Umgebungskotproben MAP nachgewiesen werden, so hatte die Herde eine Prävalenz von 0,3 bis 4 %. Wurde in beiden Umgebungskotproben MAP nachgewiesen, entsprach dies einer Pool-Prävalenz von 53 % bis 73 % (RAIZMAN et al. 2004). Die Voreinstufung durch die Autoren ist als fraglich zu bewerten: Bei 7 % der als „nicht-infiziert“ klassifizierten Herden stellten die Autoren einen positiven Pool der Einzeltierkotproben fest und eine Herde zeigte eine positive Umgebungskotprobe. Die Autoren stellten eine positive Korrelation zwischen Maximalanzahl der Kolonien auf den Kulturen von Laufweg und Dung-Lagerplatz mit der Prävalenz gepoolter Einzeltierkotproben fest.

BERGHAUS et al. (2006) untersuchten 23 kalifornische Herden mit individuellen oder gepoolten Einzeltierkotproben von 60 Tieren des Bestandes, serologischen ELISA-Verfahren von ebenfalls 60 Tieren des Bestandes und durch Umgebungskotproben. 74 % der Herden wurden durch Umgebungskotproben, 70 % durch Einzeltierkotproben und 65 % durch einen Antikörpernachweis mittels ELISA als Paratuberkulose-positiv eingestuft.

LOMBARD et al. (2006) führten eine Studie zum Vergleich diagnostischer Paratuberkulose-Nachweis-Methoden durch. Es wurden 483 Umgebungskotproben aus 98 Betrieben in 21 Bundesstaaten der USA gesammelt, davon konnte in 218 Kulturen (45,1 %) ein Wachstum von MAP nachgewiesen werden. Die Resultate wurden mit Ergebnissen von Einzeltierkotproben und ELISA-Ergebnissen aus Milch

und Serum verglichen. Die durch die Autoren getroffenen Aussagen bezüglich Wiedererkennungsraten einzelner Methode sind fraglich und werden an dieser Stelle nicht erwähnt.

HOFFMANN et al. (2009) untersuchen 961 Umgebungskotproben aus 191 Beständen. Die kulturelle Einzeltierkotprobenuntersuchung ergab einen Anteil von 0,97 %. In sechs der 961 Umgebungskotproben konnte der Erreger kulturell nachgewiesen werden. Diese sechs Proben stammten aus drei Betrieben der 191 untersuchten Bestände.

PILLARS et al. (2009a) untersuchten sieben Milchviehherden im Bundesstaat Michigan über fünf Jahre. Der häufigste Nachweis von MAP in Umgebungskotproben konnte im Melkbereich und auf dem Dung-Lagerplatz geführt werden (30 % beziehungsweise 33 % der positiven Umgebungskotprobenbefunde). Es konnte gezeigt werden, dass eine Kontamination der Herde mit MAP viele Jahre andauert und nur durch konsequente Hygienemaßnahmen eine Reduktion der MAP-Kontamination im Stallbereich bewirkt werden kann. Es wurden 731 Umgebungskotproben entnommen, bei 81 Proben (11 %) führten die Autoren einen positiven MAP-Nachweis. Betriebe mit einer Einzeltierprävalenz über 2 % konnten zu 75 % mit Proben im Melkbereich und/oder Dung-Lagerplatz identifiziert werden. Betriebe mit einer Einzeltierprävalenz unter 2 % zeigten kein Wachstum des Erregers bei Kultivierung der entnommenen Umgebungskotproben.

SMITH et al. (2011a) beprobten drei Betriebe im Nordosten der USA über sechs Jahre mit jeweils zweimaligen Einzeltierkotproben und viermaligen Umgebungskotproben pro Jahr. Dabei zeigten 11,8 % der Kulturen der Umgebungskotproben ein Wachstum von MAP. Aus Proben der Dung-Lagerplätze und Kreuzwege konnten am häufigsten Nachweise des Erregers gelingen. Die Autoren beobachteten eine Korrelation zwischen steigender Einzeltierprävalenz und Wahrscheinlichkeit eines positiven MAP-Nachweises in den Umgebungskotproben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Ausgewählte Betriebe

In die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 20 Thüringer Milchviehbetriebe einbezogen, die am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ teilnehmen. Diese Betriebe haben in den vergangenen Jahren regelmäßig Proben von Tieren ihres Bestandes zur Paratuberkulosedagnostik eingesandt und waren bereit an den Untersuchungen teilzunehmen. Betriebe, die aus mehreren Standorten bestehen, wurden in der Studie als ein Rinderbetrieb zusammengefasst.

Auf der Basis der eingesandten, kulturell untersuchten Einzeltierkotproben der Jahre 2008 bis 2010 (Tabelle 2) wurden die an der Studie beteiligten Rinderbestände entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den folgenden drei Prävalenzkategorien ausgewählt:

1. Drei Betriebe mit einer „historischen Freiheit“ von Paratuberkulose („negative Kontrolle“)
2. 14 Betriebe mit einer niedrigen Prävalenz von > 0 % bis 10 %
3. Drei Betriebe mit einer Prävalenz von > 10 % („positive Kontrolle“)

Der Schwerpunkt der vorliegenden Studie lag auf Herden aus der zweiten Prävalenzkategorie. Es wurden in Ergänzung der Untersuchung von DONAT et. al (2011) gezielt niedrigprävalente Bestände (Prävalenz von > 0 % bis 10 %) in die Untersuchung involviert.

Unter „historisch freien“ Beständen werden solche Herden verstanden, die bereits mehrere Jahre (über 3 Jahre) am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ teilnehmen, alle Kühe beproben und nie einen Nachweis von MAP zu verzeichnen hatten.

Tabelle 2: Bekannte Prävalenzen und Probenumfang der 20 teilnehmenden Betriebe

Betrieb	MAP-positiver Anteil bezogen auf eingesandte Proben				Kotprobenanzahl			Anzahl laktierender Rinder
	2008 [%]	2009 [%]	2010 [%]	Ø [%]	Einsen- dungen 2011	Alt- reagenten 2010	Tier- anzahl gesamt	
A	1,1	0,6	0,5	0,7	224		224	207
B	1,7	1,5	1	1,4	297	4	301	204
C	n. d.	7,1	7,4	7,3	236		236	158
D	3,9	n. d.	4,2	4,1	255	4	259	218
E	n. d.	n. d.	3,6	3,6	182		182	144
F	11,1	4,7	2,9	6,2	168		168	125
G	6,5	6,6	5	6,0	150		150	119
H	3	0,5	0	1,2	198		198	156
I	6,3	2,4	3,2	4,0	318	4	322	260
J	3,7	2,7	3,8	3,4	465		465	384
K	0	0	1,2	0,4	211		211	431
L	4,8	5,5	3,1	4,5	529	9	538	454
M	8,9	4,3	4,4	5,9	40		40	26
N	1,8	4	4,7	3,5	378	2	380	370
O	0	n. d.	0	0,0	204		204	169
P	0	0	0	0,0	253		253	207
Q	0	0	0	0,0	417		417	298
R	76,5	n. d.	27,8	52,2	195		195	158
S	26,5	18,2	23,6	22,8	110	25	135	86
T	12,1	9,1	9,5	10,2	185		185	163
SUMME					5015	48	5063	4337

n. d. = keine Untersuchung durchgeführt, Altreagenten 2010 = MAP-positiv im Jahr 2010 und zum Zeitpunkt der Einzeltierkotprobenuntersuchung 2011 noch im Bestand vorhanden, Ø = Mittelwert der Jahre 2008, 2009 und 2010

Von den teilnehmenden Betrieben wurde im Studienzeitraum der Paratuberkulose-Status durch die Untersuchung aller Einzeltiere des Bestandes erhoben. Die Entnahme der Einzeltierkotproben erfolgte im ersten Halbjahr 2011. Es wurde jeweils der gesamte Kuhbestand eines Betriebes mit einem Alter von über 24 Monaten in einem Untersuchungsgang beprobt und in diese Studie einbezogen. Dazu erfolgte ein Abgleich der eingeschickten Kotproben mit der Anzahl der über 24 Monate alten Tiere im *Herkunftssicherungs- und Informationssystem Tier* (HIT-Datenbank) zum Probenentnahmedatum.

Tiere, die innerhalb der nächsten 14 Tage zur Schlachtung vorgesehen waren, wurden nicht beprobt. Bekannte Ausscheidertiere aus Untersuchungen der Vorjahre, die sich noch im Bestand aufhielten, flossen als MAP-positive Altreagenten in die Auswertung ein.

Insgesamt wurden 5015 Kotproben untersucht. Zusätzliche 48 Tiere mit positivem MAP-Befund aus dem Vorjahr, welche sich noch im jeweiligen Betrieb befanden, wurden in die Studie einbezogen, so dass insgesamt 5063 Tiere in die Auswertung gingen (Tabelle 2). Die mittlere Anzahl betrachteter Kotproben der Rinder über 24 Monate pro Bestand betrug 253 Tiere (Minimum: 40 Tiere, Maximum: 538 Tiere).

Aus den an der Studie teilnehmenden Betrieben wurden zweimalig im Abstand von durchschnittlich 134 Tagen (Minimum: 118 Tage, Maximum 160 Tage) Umgebungs-kotproben entnommen und auf das Vorhandensein von MAP untersucht.

Weiterhin wurden die im Rahmen der Milchleistungsprüfung im jeweiligen Rinderbestand entnommenen Milchproben der laktierenden Rinder über den Thüringer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht, Jena-Göschwitz bezogen, gepoolt und mit Hilfe serologischer Testverfahren untersucht. Im August 2011 waren in den untersuchten Betrieben insgesamt 4337 Tiere laktierend (Tabelle 2).

Alle Proben wurden im Labor des Tiergesundheitsdienstes der Thüringer Tierseuchenkasse in Jena untersucht.

3.2 Direkter Erregernachweis Kotproben: Probenentnahme

3.2.1 Einzeltierkotproben

Jedes Tier, das zum Zeitpunkt der Probenentnahme älter als 24 Monate war, wurde rektal unter Verwendung eines jeweils neuen Untersuchungshandschuhs beprobt. Das Untersuchungsmaterial wurde in ein steriles Plastikgefäß überführt (Kabe Labortechnik 125 ml) und mittels Kurierfahrzeugen in das Labor der Thüringer Tierseuchenkasse transportiert. Die Proben wurden nach Probeneingang im Labor bei -20°C gelagert und vor der Bearbeitung aufgetaut.

3.2.2 Umgebungskotproben

Die Entnahme der Umgebungskotproben erfolgte zweimalig, im März und April (Frühjahr) 2011, sowie im Juli und August (Sommer) 2011, aus der direkten Stallumgebung der Tiere an fünf definierten Lokalisationen mit hohem Tierverkehr:

- 1 Abkalbebereich
- 2 Melkbereich einschließlich Vorwartehof
- 3 Laufbereich
- 4 Haupttriebweg
- 5 Übergang zum Kälberbereich

Es handelt sich dabei um diejenigen Stallbereiche, die nach DONAT et. al (2011), die höchsten Nachweisraten aufwiesen.

Ein desinfizierter Spachtel beziehungsweise je ein Einweghandschuh wurde verwendet, um die Proben zu entnehmen und in sterile Plastikgefäße (Kabe Labortechnik 125 ml) zu überführen. Dabei wurde darauf geachtet multiple Proben von mehreren Stellen in der entsprechenden Lokalität ($n \geq 10$) zu gewinnen, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen. Die Proben wurden nach dem unmittelbaren Transport ins Labor bei -20°C gelagert und vor der Bearbeitung aufgetaut.

3.3 Direkter Erregennachweis Kotproben: Probenaufbereitung

Nach dem Auftauen erfolgte eine Aufbereitung des Untersuchungsmaterials entsprechend der amtlichen Methodensammlung des Friedrich– Loeffler– Institutes, Stand Juli 2010 (FLI 2010).

Zunächst wurden 30 ml 0,75 %ige *Hexadecylpyridiniumchlorid Monohydrat* (HPC)–Lösung (Firma (Fa.) Acros Organics, bezogen über Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland) in ein PS–Stuhlgefäß (52 ml, Fa. Greiner bio–one) vorgelegt. Das Untersuchungsgut wurde gründlich mit Hilfe eines im PS–Gefäß befindlichen Löffels durchmischt, bevor circa 3 g Kot in das PS–Stuhlgefäß überführt wurden. Das Gefäß wurde verschlossen und manuell durchgeschüttelt. Nach einer Sedimentationszeit von zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden circa 20 ml des Überstands aus dem PS–Stuhlgefäß in ein Probenröhrchen (Probenröhren Neutral, Aufnahmemenge 30 ml der Fa. KABE Labortechnik GmbH) überführt. Die Gefäße wurden verschlossen und bei Raumtemperatur bei 200 rpm mit Hilfe eines Laborschüttlers (Gerhardt Laboshake) für 30 Minuten durchmischt. Anschließend wurden die Proben bei Zimmertemperatur, unter Lichtausschluss 48 Stunden inkubiert.

Zur Bebrütung wurden je Probe drei Kulturröhrchen (BD–Röhrchen/ HEYM–Röhrchen) mit *BBL Herrold's Egg Yolk Agar* mit Mycobactin sowie Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) benutzt. Zusätzlich wurde der Nähragar mit 40 µl Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin (ANV) benetzt um das Kontaminationsrisiko nochmals zu senken. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgegossen und die Kulturröhrchen mit jeweils 200 µl des dekontaminierten Sedimentes beimpft. Nach dem Beimpfen wurden die Kulturröhrchen schräg gestellt (circa 20°– Winkel) und in einem Brutschrank (37°C) verbracht. Sie waren nur mit locker aufliegendem Schraubverschluss bedeckt. Nach sieben Tagen wurden die Kulturröhrchen mit einem Schraubdeckel luftdicht verschlossen, die BD–Röhrchen senkrecht gestellt und weitere elf Wochen bebrütet.

War das Nährmedium der Umgebungskotproben bei der ersten Kontrolle auf Bakterienwachstum (= „Ableseung“) nach fünf Wochen kontaminiert, wurde die Probe einer erneuten Aufbereitung (= „Wiederholung“) mit dreifacher Röhrchen–Beimpfung

unterzogen. Die Wiederholungskulturen aus dem Sommer wurden zur verstärkten Unterdrückung der Begleitflora 72 Stunden mit HPC dekontaminiert und die BD-Röhrchen wurden mit 80 µl anstelle von 40 µl ANV benetzt. Bei den kontaminierten Einzeltierkotproben wurde auf den Ansatz einer Wiederholungskultur verzichtet.

3.4 Klimatische Verhältnisse am Tag der Probenentnahme der Umgebungs-kotproben

Am Tag der Probenentnahmen der Umgebungskotproben wurde die mittlere Temperatur und die mittlere relative Luftfeuchte erfasst. Dazu dienten Tageswerte des Deutschen Wetterdienstes, die entsprechend der Lage des Betriebes zur nächstgelegenen Wetterstation ausgewählt wurden. Zur Darstellung der unterschiedlichen Luftzustände im Frühjahr und im Sommer diente ein Molier h-x-Diagramm.

3.5 Direkter Erregernachweis Kotproben: Ergebniserfassung

Ab der fünften Bebrütungswoche wurden die Kulturen im Zwei-Wochen-Rhythmus visuell und mittels Stereomikroskop auf Koloniewachstum überprüft. Es wurden drei Punkte bewertet: Die **Kontamination** der Kultur wurde überprüft und mittels eines Scores dokumentiert (siehe unten). Zeigten sich auf dem Nährboden grau-weiße, glatt, glänzende MAP-Kolonien, so wurden diese nach Quantität und Qualität beurteilt. Die Einteilung der **Quantität** erfolgte ebenfalls nach einer Skala. Die **Qualität** wurde nach Typ und Aussehen bewertet.

a) Kontamination der Kultur

- K0 = ohne Kontamination
- K1 = geringe Kontamination (Fremdflora von 1 bis 2 mm)
- K2 = mäßige Kontamination
- K3 = starke Kontamination (Fremdflora < Hälfte des Nährbodens)
- K4 = sehr starke Kontamination (Fremdflora > Hälfte des Nährbodens = Befundung als „nicht auswertbar“ (n. a.))

b) Quantität auftretender Kolonien

- – = keine Kolonie sichtbar
- + = 1 bis 10 Kolonien vorhanden
- ++ = 11 bis 50 Kolonien vorhanden
- +++ = 51 bis 100 Kolonien vorhanden
- ++++ = > 100 Kolonien vorhanden

c) Qualität auftretender Kolonien

- typisch
- weniger typisch
- unsicher
- wie atypisch
- untypisch

Im Falle eines positiven mikroskopischen Nachweises von Mycobakterien wurde die entsprechende Reinkultur einer weiterführenden Differenzierung unterzogen. Verdächtige Kolonien wurden mittels Ziehl–Neelsen–Färbung und einer IS900 Polymerase–Kettenreaktion (PCR) nach ENGLUND et al. (1999) identifiziert. Die Ziehl–Neelsen–Färbung erfolgte entsprechend der Amtlichen Methodensammlung (FLI 2010). Bei unklaren Ergebnissen wurde zudem eine Subkultur zur Klärung einer Mycobactin–Abhängigkeit der Kultur angelegt.

Als MAP–positiv wurden Kulturen kategorisiert, bei denen auf mindestens einer der beimpften Kulturen ein typisches Wachstum zu verzeichnen war und dies mittels Ziehl–Neelsen und PCR bestätigt wurde. Als MAP–negativ galten Kulturen auf denen kein Wachstum von Mycobakterien auf dem Nährmedium zu erkennen war. Als nicht auswertbar galten Röhrchen, die auf Grund einer bakteriellen oder fungalen Überwucherung eine Einstufung als MAP–positiv beziehungsweise MAP–negativ nicht zuließen.

Um eine lückenlose Probenzuordnung zu gewährleisten, waren alle Probengefäße mit Barcode versehen. Zur Datenverarbeitung wurde die Laborsoftware der Fa. Agro Data GmbH, Cottbus, Deutschland, verwendet.

3.6 Direkter Erregernachweis: Kalkulation einer Stichprobe

Aus der Gesamtheit der Einzeltierkotprobenuntersuchung wurde nachträglich eine Stichprobenuntersuchung simuliert. Die Untersuchung einer Teilmenge eines Bestandes würde bei ausreichender statistischer Sicherheit Untersuchungskosten einsparen.

Mit Hilfe des Kalkulationsprogrammes FreeCalc 2.0, welches durch CAMERON und BALDOCK (1998) entwickelt wurde, ist es möglich die notwendige Stichprobenmenge an Hand der vorhandenen Populationsgrößen, Sensitivitäten und Spezifitäten der Testsysteme für ein bestimmtes Konfidenzniveau zu schätzen, um so die Freiheit von einem Merkmal mit der festgelegten statistischen Sicherheit nachzuweisen.

Da Sensitivitäten und Spezifitäten der verwendeten Testverfahren von den Anforderungen eines idealen Tests (100%ige Sensitivität und 100%ige Spezifität) abweichen, muss die notwendige Stichprobengröße erhöht werden, um eine statistisch gesicherte Aussage zu erzielen. Unvollkommene diagnostische Testverfahren benötigen abhängig von der vorhandenen Einzeltierprävalenz und der Testgenauigkeit eine größere Stichprobenanzahl um die Freiheit des Bestandes von einem bestimmten Merkmal zu charakterisieren. Für die hier vorliegende Untersuchung wurde mit einer Mindestsicherheitswahrscheinlichkeit von 95 % für den α – und den β –Fehler gearbeitet.

Bei der kulturellen Untersuchung von Kotproben auf MAP werden nicht alle infizierten Tiere identifiziert. Die in dieser Untersuchung für die angewandte Methode der Kotkultur verwendeten Werte für die Sensitivität und Spezifität orientieren sich an der Veröffentlichung von KÖHLER et al. (2008a). Die Autoren untersuchten 87 Tiere mit für Paratuberkulose pathognomonischen Veränderungen. Dabei isolierten sie aus 71 Tieren MAP-positives Organmaterial und bei 64 Tieren wurde der Erreger im Kot nachgewiesen. Daraus errechnet sich eine Sensitivität der kulturellen Kotuntersuchung im Vergleich zur pathologischen Untersuchung von 73 %. RAIZMAN et al. (2011a) nahmen in ihrer Untersuchung ebenfalls eine 70%ige Sensitivität der Kotkultur an. Gleichzeitig gilt die kulturelle Untersuchung mit anschließender Identifizierung über PCR als Goldstandard der Diagnostik, weswegen eine Spezifität von 100% angegeben wird.

Die minimal zu detektierende Prävalenz wurde auf 5 % festgelegt. Dieser Wert ist der mittlere Wert der unter Punkt 3.1 festgelegten Spanne für Betriebe mit niedriger Prävalenz (> 0 % bis 10 %). Außerdem entspricht dieser Wert dem mittleren Anteil der MAP-positiven Rinder im gesamten Untersuchungsgut des Labors des Tiergesundheitsdienstes der Thüringer Tierseuchenkasse Jena, welcher im Mittel der Jahre 2007 bis 2010 4,7 % betrug (TSK 2011).

Aus der Gesamtheit der Einzeltierkotproben eines Betriebes wurde nun eine systematische Stichprobe ermittelt. Die Stichprobengröße wurde nach FreeCalc 2.0 kalkuliert. Um eine regelmäßige Verteilung der Stichproben zu gewährleisten, wurden die Stichprobengröße und die Tieranzahl pro Betrieb miteinander verrechnet. Die Stichprobenauswahl erfolgte durch Abzählen von der Einsendeliste, deren Reihung der Tiere sich an der nach Alter sortierten HIT-Datenliste orientiert. Die Reihung der HIT-Datenliste erfolgt an Hand der nach Alter sortierten Ohrmarken, damit ist sowohl die Berücksichtigung jeder Altersgruppe als auch die Zufälligkeit in ausreichendem Maße gewährleistet, denn die Auswahl des Stichprobentieres war unabhängig von anderen Merkmalen (klinische Erkrankung, Körperkondition, Befunde aus der Vergangenheit).

Die Stichprobenprävalenz errechnet sich aus der Anzahl MAP-positiver Stichprobenbefunde dividiert durch den von FreeCalc 2.0 bestimmten Stichprobenumfang.

3.7 Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe

Nach Empfehlung der Amtlichen Methodensammlung (FLI 2010) wurde in der vorliegenden Untersuchung jede Einzeltierkotprobe auf drei Nährmedien angelegt, bebrütet und beurteilt. War in einer der Kulturen MAP nachweisbar, war das Tier Paratuberkulose-positiv.

In einer weiteren Betrachtung dieser Arbeit wurde die Verwendung von nur einem Nährmedium simuliert. Die Bearbeitung und Zuordnung als erste, zweite oder dritte Probe erfolgte zufällig durch mehrere Mitarbeiter. Die Befunde aller drei Nährmedien aller Einzeltierkotproben aller Tiere der 20 Herden wurden untereinander gelistet und systematisch das erste, zweite oder dritte Nährmedium ausgewählt. Dieses ausgewählte Nährmedium wurde mit dem Ergebnis der Untersuchung von drei Nährmedien verglichen.

3.8 Festlegung des Herdenstatus

Als **Paratuberkulose-positiv** wurde eine Herde eingestuft, sofern in einer der eingesandten Proben MAP nachgewiesen wurde. Das gilt in gleicher Weise für die Stichprobenuntersuchung und die Umgebungskotprobenuntersuchung.

In **Paratuberkulose-negativen** Herden ist in der aktuellen Untersuchung kein Nachweis des Erregers erfolgt. Dazu zählen auch die als „historisch frei“ geltenden Herden, welche in den letzten drei Jahren regelmäßig Kotproben einsandten, dabei kein Erregernachweis auftrat, und sich dieses auch in dieser Untersuchung bestätigt.

3.9 Serologische Untersuchung Milchproben: Probenaufbereitung

Die Milchproben wurden jeweils bestandsweise zusammengefasst und in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland) gepoolt. Der Hersteller des Aufbereitungskits empfahl die Anwendung von zu 25 Tieren gepoolten Milchproben. Im Rahmen dieser Versuchsanstellung wurden die Proben in gleicher Weise zu 50 Tieren gepoolt und aufbereitet, um eine Zeit- und Kostenersparnis zu erzielen. War die Probenanzahl pro Betrieb nicht durch 25 beziehungsweise 50 teilbar, so

entstand ein Restpool, in den die überzähligen Milchproben auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilt wurden. Es kamen 262 Pools zur Untersuchung. In der statistischen Auswertung fanden Restpools keine Beachtung, so dass 244 Pools beurteilt wurden. Bei Anlieferung war die Milch auf 4°C bis 6°C gekühlt und in einer 5 %igen Natriumacid-Lösung konserviert. Die Milchproben wurden binnen zwei Tagen nach Anlieferung gepoolt und bei -20°C gelagert. Vor der Weiterbearbeitung wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut.

Die Poolproben wurden mittels des *Cattletype Milk Prep* der Fa. LDL, Leipzig, Deutschland aufbereitet. Das Testkit ermöglicht eine Anreicherung der in der Probe vorhandenen Antikörper, so dass beim nachfolgenden Einsatz im *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) eine erhöhte Sensitivität erzielt wird.

Die Anwendung des Testkits erfolgte nach Herstellerangaben. Die genannten Reagenzien sind Bestandteile des *Cattletype Milk Prep* der Fa. LDL. Zunächst wurde das Milchcasein gefällt (Fällungsreagenz) und durch 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 3800 x g entfernt (Heraeus Kühl-Biofuge primo R). Nachfolgend wurde mit dem Neutralisationspuffer der korrekte pH-Wert eingestellt. Nach Zugabe einer Matrix-Suspension wurden die Proben zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung (Schüttler GFL Typ 3006 bei 100 Umdrehungen/ min) inkubiert. In der Milchprobe eventuell enthaltene Antikörper (ImmunglobulinG) verbanden sich mit der eingesetzten Matrix. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, bei 4°C und 3000 x g) wurde der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgenommen und die als Pellet am Boden zurückbleibende Matrix mit den gebundenen Antikörpern in einen Spin Filter pipettiert. Ungebundene Bestandteile wurden durch eine nachfolgende Zentrifugation und mehrere Waschschrte entfernt. Nach Zugabe von Elutionspuffer wurden die gebundenen Antikörper aus der Matrix in konzentrierter Form ausgewaschen. Das dabei gewonnene Eluat wurde bei -20°C gelagert.

3.10 Serologische Untersuchung Milchproben: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Die aus den gepoolten Milchproben gewonnenen Eluate wurden mit Hilfe von zwei verschiedenen Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP untersucht.

1. *Cattletype MAP Ab* (LDL) (Zul. Nr. FLI-B 471)

Die Anwendung des *Cattletype MAP Ab* erfolgte nach Herstellerangaben, die verwendeten Reagenzien sind im Testkit enthalten. Die aufgetauten Eluate wurden 90 Minuten mit inaktivierten *Mycobacterium phlei*-Extrakt (Verdünnungspuffer) vorinkubiert um Kreuzreaktionen der Antigene auf der Festphase mit Antikörpern atypischer Mycobakterien zu vermeiden. Danach wurden die Testplatten mit jeweils 92 Eluaten und zwei Negativ-, sowie zwei Positivkontrollen befüllt. Die Testplatte ist mit MAP-Antigen beschichtet. Im Eluat enthaltene MAP-Antikörper können an das Antigen binden. Nachdem die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert wurden, wurde ungebundenes Material mit 3 x 300 µl Waschpuffer (Tecan M8/4R Washer) entfernt. Jede Kavität wurde anschließend mit 100 µl Peroxidase-konjugierten anti-Wiederkäuer-IgG-Antikörpern (Konjugat) befüllt und nach 30-minütiger Inkubation erneut mit 3 x 300 µl Waschpuffer gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl Substrat je Kavität wurde eine Farbreaktion hervorgerufen, die nach 10 Minuten durch Zugabe von 100 µl Stopplösung je Kavität unterbrochen wurde. Die hervorgerufene Farbreaktion war direkt proportional zur Menge der in der Probe befindlichen Antikörper.

2. *ID Screen Paratuberculosis Indirect* (IDVet) (Zul. Nr. FLI-B 443)

Die Anwendung des *ID Screen Paratuberculosis Indirect* erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben, die verwendeten Reagenzien sind im Testkit enthalten. Jeweils 92 der aufgetauten Eluate wurden in einer 1:2 Verdünnung mit *Mycobacterium phlei*-haltigem Verdünnungsmittel auf eine Vorinkubationsplatte aufgetragen. Dazu wurden

pro Platte zwei Positiv- und zwei Negativkontrollen 1:12 verdünnt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben in eine beschichtete Testplatte überführt. Antikörper aus der Probe bildeten einen Antigen-Antikörper-Komplex mit dem in der Testplatte enthaltenen MAP-Extrakt. Nichtgebundenes Material wurde nach 45-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch Waschen mit 3 x 300 µl Waschlösung entfernt. Jeweils 100 µl anti-Wiederkäuer-IgG-Peroxidase-Konjugat wurden in die Kavitäten gefüllt. Nach 30-minütiger Inkubation und erneuten Auswaschens überschüssigen Materials wurde in jede Kavität 100 µl Substratlösung gefüllt. Die dadurch hervorgerufene Farbreaktion war direkt proportional zur Menge der in der Probe befindlichen Antikörper. Eine starke Blaufärbung deutete auf hohe Antikörpergehalte in der Probe hin. Waren keine Antikörper in der Probe enthalten, erfolgte kein Farbumschlag. Nach 15 Minuten beendeten 100 µl Stopplösung je Kavität die Reaktion.

3.11 Serologische Untersuchung Milchproben: Ergebniserfassung

Unmittelbar im Anschluss an die Zugabe der Stopplösung wurde mit Hilfe eines Photometers (Tecan Reader Sunrise Tecan Basic, Software: Magellan) die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

1. *Cattletype* MAP Ab (LDL)

Aus den optischen Dichten der Negativ- und Positivkontrollen wurde jeweils der Mittelwert berechnet. Der Mittelwert der optischen Dichten der Negativkontrollen (Mittelwert $OD_{\text{Negativkontrolle}}$) wurde jeweils von der optischen Dichte der Probe (OD_{Probe}) und vom Mittelwert der optischen Dichte der Positivkontrolle (Mittelwert $OD_{\text{Positivkontrolle}}$) abgezogen. Das Verhältnis der optischen Dichten der Probe (OD_{Probe}) zur optischen Dichte der Positivkontrolle (Mittelwert $OD_{\text{Positivkontrolle}}$) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{S / P- Quotient} = \frac{OD_{\text{Probe}} - \text{Mittelwert } OD_{\text{Negativkontrollen}}}{\text{Mittelwert } OD_{\text{Positivkontrollen}} - \text{Mittelwert } OD_{\text{Negativkontrollen}}}$$

Formel 1: Formel zur Errechnung des S / P-Quotienten, *Cattletype* MAP Ab (LDL)

Zur Ergebniserfassung wurde nach Angaben des Herstellers folgende S / P-Quotienten zugrunde gelegt:

Negativ	S / P-Quotient < 0,8
Verdächtig	S / P-Quotient 0,8 bis 1,0
Positiv	S / P-Quotient > 1,0

2. ID Screen Paratuberculosis Indirect (IDVet)

Aus den optischen Dichten der Negativ- und Positivkontrollen wurde jeweils der Mittelwert berechnet. Der Mittelwert der optischen Dichten der Negativkontrollen (Mittelwert $OD_{\text{Negativkontrolle}}$) wurde jeweils von der optischen Dichte der Probe (OD_{Probe}) und vom Mittelwert der optischen Dichte der Positivkontrolle (Mittelwert $OD_{\text{Positivkontrolle}}$) abgezogen. Das prozentuale Verhältnis der optischen Dichte der Proben (OD_{Probe}) zur optischen Dichte der Positivkontrolle (Mittelwert $OD_{\text{Positivkontrolle}}$) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$S / P = \frac{OD_{\text{Probe}} - \text{Mittelwert } OD_{\text{Negativkontrollen}}}{\text{Mittelwert } OD_{\text{Positivkontrollen}} - \text{Mittelwert } OD_{\text{Negativkontrollen}}} \times 100$$

Formel 2: Formel zur Errechnung des S / P–Quotienten, *IDVet Paratuberculosis Indirect* (IDVet)

Nach Anwendervorschrift wurde zur Ergebniserfassung folgende S / P– Werte verwandt:

Negativ	S / P–Quotient $\leq 35 \%$
Verdächtig	S / P–Quotient 35 % bis 45 %
Positiv	S / P–Quotient $\geq 45 \%$

3.12 Statistische Analyse

Wies eine der dreifach beimpften Kulturen ein bestätigtes Wachstum von MAP auf, so galt das Tier beziehungsweise die Umgebungskotprobe als positiv. Kam es zum Wachstum in zwei oder drei der beimpften Röhrrchen, war das Röhrrchen mit dem höchsten Ergebnis maßgebend für die eingestufte Quantität.

Die angegebenen Einzeltierprävalenzen wurden als Anteil der MAP-positiven Rinder an der Tieranzahl des Bestandes, mit einem Alter über 24 Monaten, errechnet. Die prozentualen Angaben der negativen und nicht auswertbaren Kotkulturen beziehen sich ebenfalls auf den Tierbestand über 24 Monaten. Befunde der Umgebungskotproben wurden getrennt nach Frühjahr und Sommer betrachtet. Die Darstellung der MAP-positiven, MAP-negativen und nicht auswertbaren Befunde erfolgte getrennt nach Entnahmeort in der Stallumgebung.

Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2007 (Fa. Microsoft Corporation) ausgewertet.

Die Statistiksoftware SPSS 11.5 für Windows (Fa. SPSS Inc., Illinois, Chicago, USA) diente zur Berechnung von Korrelationen und zum Erstellen von Kreuztabellen. Zur Überprüfung der Normalverteilung diente der Kolmogorov-Smirnov-Test. Mittels χ^2 -Test wurden die Ergebnisse auf Inhomogenität getestet. Ergebnisse der Einzeltierprävalenzen, Umgebungskotprobenbefundung, 25er ELISA LDL, 50er ELISA LDL, 25er ELISA IDVet und 50er ELISA IDVet wurden je Herde gegeneinander getestet. Zur Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen Einzeltierprävalenz und Umgebungskotprobenbefundung, sowie der Befundung der Stichprobe diente der nichtparametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman. Die Art des Verhältnisses wurde mit einem einfachen linearen Regressionsmodell beschrieben. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Signifikanzniveau $p < 0,05$) festgelegt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen der Einzeltierkotproben

Die vorliegende Studie beinhaltet die Ergebnisse kultureller Untersuchungen von 5063 Rindern im Alter von über 24 Monaten aus 20 Thüringer Milchviehbetrieben.

Tabelle 3: Herdencharakteristik der Einzeltierkotproben

Betrieb	Tiere über 24 Monate [n]	MAP +		MAP –		MAP n. a.	
		[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]
A	224	0	0	221	98,7	3	1,3
B	301	13	4,3	288	95,7	0	0
C	236	10	4,2	225	95,3	1	0,4
D	259	13	5,0	239	92,3	7	2,7
E	182	13	7,1	169	92,9	0	0
F	168	14	8,3	154	91,7	0	0
G	150	9	6	141	94	0	0
H	198	7	3,5	191	96,5	0	0
I	322	19	5,9	303	94,1	0	0
J	465	32	6,9	430	92,5	3	0,6
K	211	0	0	211	100	0	0
L	538	26	4,8	512	95,2	0	0
M	40	1	2,5	39	97,5	0	0
N	380	16	4,2	364	95,8	0	0
O	204	1	0,5	203	99,5	0	0
P	253	0	0	253	100	0	0
Q	417	0	0	416	99,8	1	0,2
R	195	66	33,9	129	66,1	0	0
S	135	56	41,5	59	43,7	20	14,8
T	185	22	11,9	163	88,1	0	0
SUMME	5063	318	6,3	4710	93,0	35	0,7

+ = positiv, – = negativ, n. a. = nicht auswertbar, n = Anzahl

Ergebnisse

Bei 318 Tieren (6,3 %) wurde ein positiver Nachweis von MAP geführt. 4710 Kulturen (93 %) zeigten kein Wachstum von MAP. 35 Kulturen (0,7 %) waren so stark kontaminiert, dass eine Auswertung nicht möglich war (Tabelle 3).

Es wurden vier Herden (Bestand A, K, P, Q) als Paratuberkulose–negativ identifiziert. Dabei handelt es sich bei zwei der Paratuberkulose–negativen Betriebe (Bestand A und K) um Betriebe, deren Tiere in den Vorjahren einen Nachweis von MAP hatten. Bestände P und Q sind historisch–freie Betriebe ohne einen Erregernachweis in den vorangegangenen und der aktuellen Untersuchung. Von den 20 zu untersuchenden Herden wurden 16 als Paratuberkulose–positiv kategorisiert. Dabei hatten 13 Herden eine niedrige Prävalenz (> 0 % bis 10 %) und drei Herden zeigten eine hohe Prävalenz (> 10 %).

4.2 Untersuchungen der Umgebungskotproben

Die teilnehmenden Rinderbetriebe wurden im Frühjahr und im Sommer an jeweils fünf definierten Bereichen des Stalls, die stark und von großen Teilen der Herde täglich frequentiert werden, beprobt. Insgesamt wurden 100 Umgebungskotproben im Frühjahr und 100 Umgebungskotproben im Sommer untersucht.

Von im **Frühjahr** entnommenen Umgebungskotproben zeigten 18 Proben (18 %) ein Wachstum von MAP. In 76 Proben (76 %) ließ sich kein Paratuberkuloseerreger nachweisen. In sechs Proben (6 %) war auf Grund sekundärer Kontaminationen durch Pilze, Hefen oder Fremdbakterien kein Ergebnis in einer der drei Kulturen ermittelbar (Tabelle 4).

Die Untersuchungen der Abkalbebereiche lieferten keine positiven Kulturergebnisse. Am häufigsten waren Proben, die im Haupttriebweg oder im Melkbereich einschließlich des Vorwartehofes entnommen wurden, mit MAP bewachsen: Jeweils sechs der 18 positiven Erreger–Nachweise (33,3 %) waren aus Proben dieser Lokalisationen zu verifizieren. In vier Betrieben erbrachte die Kultivierung aus dem Laufbereich der Tiere einen positiven MAP–Nachweis (22,2 %). Zwei der 18 positiven MAP–Befunde (11,1 %) entstammen Proben, die im Übergang zum Kälberbereich entnommen wurden (Tabelle 4).

Ergebnisse

Tabelle 4: Befunde der Kultivierung von im Frühjahr entnommenen Umgebungskotproben nach Lokalisation

	MAP +		MAP -		MAP n. a.		UP gesamt
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	
Abkalbebereich	0	0	19	25	1	16,7	20
Melkbereich/ Vorwarte Hof	6	33,3	12	15,8	2	33,3	20
Haupttriebweg	6	33,3	13	17,1	1	16,7	20
Laufbereich	4	22,2	16	21,1	0	0	20
Übergang zu den Kälbern	2	11,1	16	21,1	2	33,3	20
	18	100	76	100	6	100	100

+ = positiv, - = negativ, n. a. = nicht auswertbar, n = Anzahl, UP = Umgebungskotproben

Umgebungskotproben, die im **Sommer** entnommen wurden, zeigten im Vergleich zu denen, die im Frühjahr gewonnen wurden eine auffällig hohe Kontaminationsrate (Tabelle 5). Trotz wiederholtem Dreifach-Ansatz und verstärkter Dekontamination, wiesen 23 Proben (23 %) eine sehr starke Kontamination (K4) auf und wurden als nicht auswertbar eingestuft. Sieben Proben (7 %) zeigten ein Wachstum von MAP. In 70 Proben (70 %) konnte kein Wachstum des Erregers beobachtet werden (Tabelle 5).

Ergebnisse

Tabelle 5: Befunde der Kultivierung von im Sommer entnommenen Umgebungskotproben nach Lokalisation

	MAP +		MAP -		MAP n. a.		UP gesamt
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	
Abkalbebereich	1	14,3	16	22,9	3	13	20
Melkbereich/ Vorwarthof	3	42,9	9	12,9	8	34,8	20
Haupttriebweg	1	14,3	15	21,4	4	17,4	20
Laufbereich	2	28,6	16	22,9	2	8,7	20
Übergang zu den Kälbern	0	0	14	20	6	26,1	20
	7	100	70	100	23	100	100

+ = positiv, - = negativ, n. a. = nicht auswertbar, n = Anzahl, UP = Umgebungskotproben

In Tabelle 6 ist die Kontamination der entnommenen Umgebungskotproben dargestellt. Auffällig ist der hohe Anteil starker (K3) und sehr starker (K4) Kontamination der im Sommer entnommenen Umgebungskotproben. Bei den im Frühjahr entnommenen Umgebungskotproben zeigten sieben Primärkulturen eine sehr starke (K4) Kontamination, wohingegen 65 Proben der im Sommer entnommenen Umgebungskotproben in der Primärkultur so stark kontaminiert (K4) waren, dass eine Auswertung nicht möglich war. Weitere 33 Proben des Wiederholungsansatzes der Sommerproben waren sehr stark (K4) kontaminiert (Tabelle 6).

Ergebnisse

Tabelle 6: Kontamination der entnommenen Umgebungskotproben

Kontaminations- Score	Frühjahr		Sommer	
	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur
K0	61	8	7	9
K1	0	0	0	0
K2	21	2	3	17
K3	11	4	25	41
K4 (n. a.)	7	21	65	33
Summe	100	35	100	100

K0 = ohne Kontamination; K1 = geringe Kontamination (Fremdflora von 1 bis 2 mm); K2 = mäßige Kontamination; K3 = starke Kontamination (Fremdflora < Hälfte des Nährbodens); K4 = sehr starke Kontamination (Fremdflora > Hälfte des Nährbodens = Befundung als „nicht auswertbar“)

Tabelle 7 stellt den Nutzen der Wiederholungskultur dar. In der Primärkultur, der im Frühjahr entnommenen Umgebungskotproben waren 17 Kulturen MAP-positiv. Eine weitere konnte durch die zusätzliche Wiederholungskultur nachgewiesen werden. Sieben Primärkulturen waren nicht auswertbar, durch die zusätzliche Wiederholungskultur wurden nur sechs Umgebungskotproben als nicht auswertbar befundet. Im Sommer zeigten 65 Umgebungskotproben der Primärkultur eine so starke Kontamination (K4), dass eine Auswertung nicht möglich war. Mit Hilfe der Wiederholungskultur war es möglich in 42 Umgebungskotproben doch noch einen Befund zu ermitteln. 23 der im Sommer entnommenen Umgebungskotproben zeigten sowohl eine sehr starke Kontamination (K4) in der Primärkultur als auch in der Wiederholungskultur und waren abschließend nicht auswertbar. Fünf, der im Sommer entnommenen, Umgebungskotproben zeigten in der Primärkultur ein Wachstum von MAP. Das Wachstum von MAP konnte auf weiteren zwei Umgebungskotproben der Wiederholungskultur nachgewiesen werden (Tabelle 7). In Tabelle 21 (Anhang) sind die Befunde der Umgebungskotproben detailliert aufgelistet.

Ergebnisse

Tabelle 7: Ergebnisse der wiederholten Umgebungskotproben im Verhältnis zu den Ergebnissen der Primärkultur, getrennt nach Frühjahr und Sommer

	Frühjahr	Sommer
Primärkultur MAP +	17	5
Wiederholungskultur MAP +	0	2
Wiederholungskultur MAP –	0	1
Wiederholungskultur MAP n. a.	0	2
Wiederholungskultur nicht durchgeführt	17	0
Primärkultur MAP –	76	30
Wiederholungskultur MAP +	1	2
Wiederholungskultur MAP –	12	20
Wiederholungskultur MAP n. a.	15	8
Wiederholungskultur nicht durchgeführt	48	0
Primärkultur MAP n. a.	7	65
Wiederholungskultur MAP +	0	0
Wiederholungskultur MAP –	1	42
Wiederholungskultur MAP n. a.	6	23

+ = positiv, – = negativ, n. a. = nicht auswertbar

Die Ergebnisse der Umgebungskotproben und die ermittelte Einzeltierprävalenz ist in Tabelle 8 entsprechend der Betriebe zusammengefasst. Umgebungskotproben, die im Sommer entnommen wurden, waren zu fast einem Viertel (23 %) nicht auswertbar. Die Anzucht von MAP gelang häufiger aus Proben, die im Frühjahr entnommen wurden als vergleichsweise aus im Sommer entnommenen Umgebungskotproben.

Ergebnisse

Tabelle 8: Anzahl und Anteil positiver, negativer und nicht auswertbarer Umgebungskotproben nach Betrieben

	Einzeltier- prävalenz [%]	Umgebungskotproben Frühjahr			Umgebungskotproben Sommer		
		MAP + [n]	MAP - [n]	MAP n. a. [n]	MAP + [n]	MAP - [n]	MAP n. a. [n]
A	0	0	5	0	0	3	2
B	4,3	0	3	2	0	4	1
C	4,2	0	4	1	0	4	1
D	5,0	1	4	0	0	4	1
E	7,1	2	3	0	0	4	1
F	8,3	2	3	0	1	3	1
G	6	0	5	0	0	3	2
H	3,5	0	5	0	0	4	1
I	5,9	3	2	0	0	5	0
J	6,9	1	4	0	0	5	0
K	0	0	5	0	0	5	0
L	4,8	2	2	1	1	3	1
M	2,5	0	5	0	0	3	2
N	4,2	0	3	2	0	2	3
O	0,5	0	5	0	0	4	1
P	0	0	5	0	0	3	2
Q	0	0	5	0	0	2	3
R	33,9	1	4	0	0	4	1
S	41,5	3	2	0	3	2	0
T	11,9	3	2	0	2	3	0
		18	76	6	7	70	23

+ = positiv, - = negativ, n. a. = nicht auswertbar, n = Anzahl

Ergebnisse

4.3 Klimatische Verhältnisse am Tag der Probenentnahme der Umgebungskotproben

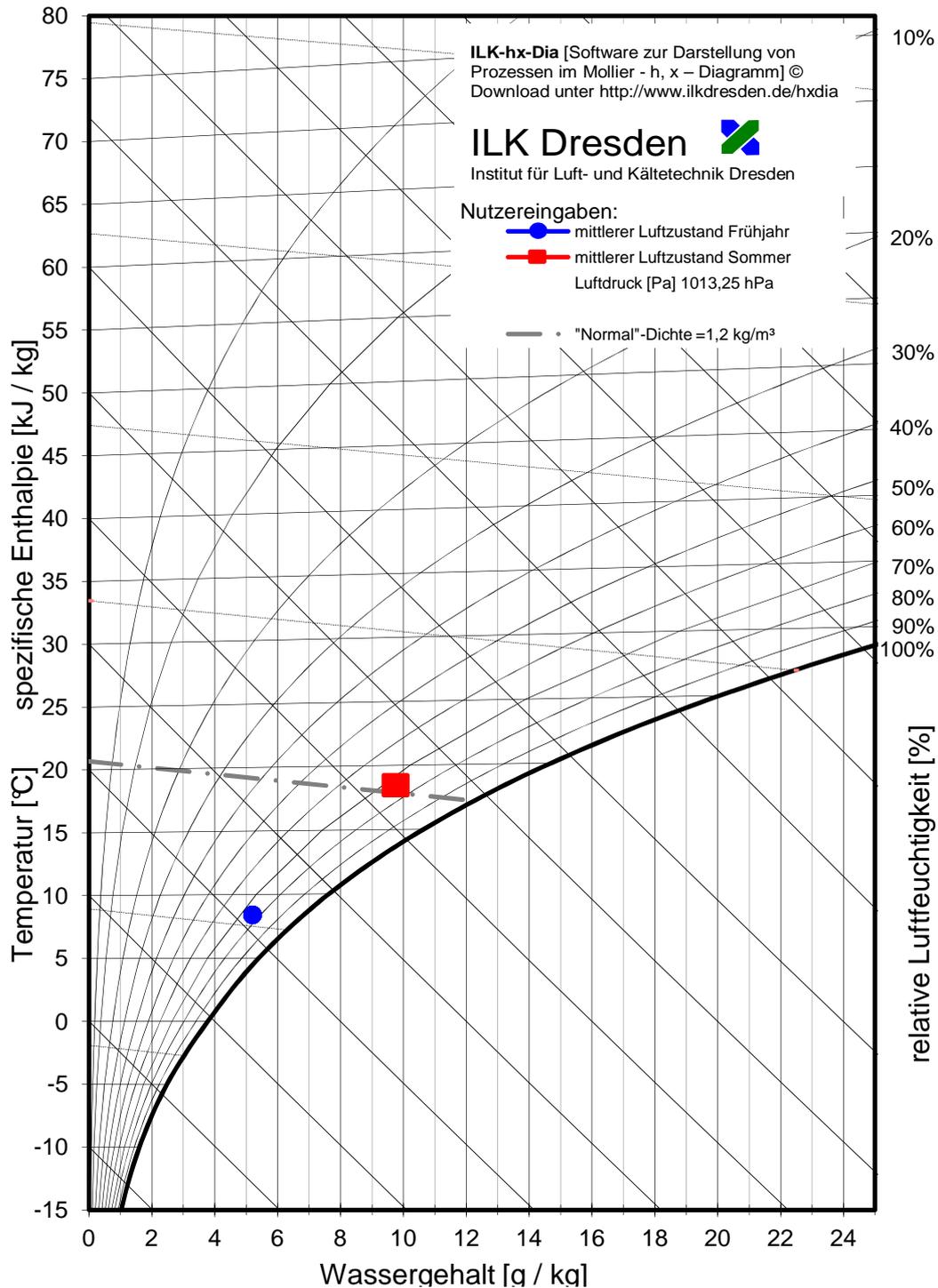
In Tabelle 9 sind die klimatischen Verhältnisse (Temperatur, relative Luftfeuchte) am Tag der Probenentnahme der Umgebungskotproben aufgelistet.

Tabelle 9: Klimadaten zum Tag der Entnahme der Umgebungskotproben

	Umgebungskotproben Frühjahr		Umgebungskotproben Sommer	
	Mittel der Temperatur [°C]	Mittel der relativen Feuchte [%]	Mittel der Temperatur [°C]	Mittel der relativen Feuchte [%]
A	6,5	62,5	18,8	61
B	10,8	78	16,7	67,1
C	10,8	78	16,7	67,1
D	6,5	62,5	14,7	73,8
E	7,5	68,2	21,9	73,6
F	10,8	78	20,3	73,3
G	9	86	17,9	79,5
H	5,6	97	19,7	80,8
I	5,6	97	22,7	74,9
J	7,3	69,3	22,7	74,9
K	6,7	70	18,1	65,6
L	10,8	78	16,7	67,1
M	13,2	71,6	20,8	68,7
N	10,8	78	20,3	73,3
O	9	86	17,9	79,5
P	9	86	17,9	79,5
Q	9,5	85	16	81,6
R	7,6	66,5	20,3	73,3
S	4,6	64,1	13,7	64,8
T	7	62	18,1	65,6
Mittelwert	8,4	76,2	18,6	72,3

Quelle: Deutscher Wetterdienst 17.7.2012

Ergebnisse



● = mittlerer Luftzustand Frühjahr (Temperatur $t = 8,4^{\circ}\text{C}$; relative Luftfeuchtigkeit $\varphi = 76,2\%$; Dichte $\rho = 1,25\text{ kg/m}^3$; Taupunkttemperatur $t_t = 4,5^{\circ}\text{C}$; Wassergehalt $x = 5,2\text{ g/kg}$)

■ = mittlerer Luftzustand Sommer (Temperatur $t = 18,6^{\circ}\text{C}$; relative Luftfeuchtigkeit $\varphi = 72,3\%$; Dichte $\rho = 1,20\text{ kg/m}^3$; Taupunkttemperatur $t_t = 13,5^{\circ}\text{C}$; Wassergehalt $x = 9,6\text{ g/kg}$)

Abbildung 2: Mollier h-x-Diagramm zur Darstellung der unterschiedlichen Luftzustände bei der Entnahme von Umgebungskotproben im Frühjahr und im Sommer

Quelle: Institut für Luft- und Kältetechnik Dresden 25.6.2012

Ergebnisse

In Abbildung 2 sind die mittleren Umgebungsluftzustände der Tage der Probenentnahme im Frühling und im Sommer aus Tabelle 9 eingetragen. Die Abbildung veranschaulicht einen erhöhten Wassergehalt in der Umgebungsluft im Sommer (9,6 g/kg) im Vergleich zum Frühjahr (5,2 g/kg).

4.4 Kalkulation einer Stichprobe

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Stichprobenbeurteilung getrennt nach Betrieben aufgelistet. Durch das Programm FreeCalc 2.0 (CAMERON und BALDOCK 1998) wurden Stichprobengrößen von 40 bis 80 Tieren kalkuliert. Bei einer retrospektiven Stichprobenuntersuchung wurden 1458 Einzeltiere aus den 20 Betrieben betrachtet.

Die vier MAP–negativen Bestände (Bestand A, K, P und Q) waren entsprechend auch in der Stichprobenuntersuchung MAP–negativ. Von den 16 MAP–positiven Beständen wurden 15 Herden (93,7 %) mittels Stichprobenuntersuchung als Bestand mit Paratuberkulosevorkommen identifiziert. Bestand O, welcher nur eine MAP–positive Reagente bei einer Tierzahl von 204 Rindern hatte, wäre durch eine Stichprobenuntersuchung als falsch–negativ beurteilt wurden (Tabelle 10).

Ergebnisse

Tabelle 10: Übereinstimmung der Stichprobenbeurteilung mit der Prävalenz der Einzeltierkotproben

Betrieb	Einzeltierkotproben			Stichprobe		
	Tierzahl [n]	MAP +		kalkulierte Anzahl [n]	MAP +	
		[n]	[%]		[n]	[%]
Herden ohne MAP–Nachweis						
A	224	0	0	76	0	0
K	211	0	0	71	0	0
P	253	0	0	74	0	0
Q	417	0	0	78	0	0
Herden mit MAP–Nachweis						
B	301	13	4,3	77	4	5,2
C	236	10	4,2	74	1	1,4
D	259	13	5	76	6	7,9
E	182	13	7,1	73	4	5,5
F	168	14	8,3	75	7	9,3
G	150	9	6	67	6	9
H	198	7	3,5	73	5	6,8
I	322	19	5,9	78	3	3,8
J	465	32	6,9	80	5	6,3
L	538	26	4,8	80	7	8,8
M	40	1	2,5	40	1	2,5
N	380	16	4,2	78	3	3,8
O	204	1	0,5	75	0	0
R	195	66	33,9	72	25	34,7
S	135	56	41,5	67	27	40,3
T	185	22	11,9	74	8	10,8
SUMME	5063	318	6,3	1458	112	7,8

+ = positiv, n = Anzahl

4.5 Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe

Bei der Auswertung von drei Kulturröhrchen pro Einzeltierkotprobe konnten 270 Tiere als Ausscheidertiere von MAP ermittelt werden. In Tabelle 11 ist die Betrachtung nur eines Nährmediums pro Tier dargestellt, so dass die vorliegende Studie direkt der Studie von DONAT et al. (2011) gegenübergestellt werden kann. Die Betrachtung von „Röhrchen 1“ ergab 164 MAP-positive Tiere; „Röhrchen 2“ lieferte 178 Paratuberkulosebefunde und „Röhrchen 3“ isoliert bewertet, ergab 146 Paratuberkulose-positive Rinder. Bei der Verwendung von nur einem Kulturröhrchen ist von einer Sensitivität der Methode von 60,2 % im Vergleich zur Verwendung von drei Kulturröhrchen auszugehen.

Der Anteil nicht auswertbarer Proben wurde durch die Verwendung von drei Kulturröhrchen im Mittel um das 4,75fache gesenkt. Der Gebrauch von nur einem Nährmedium ergab 143 („Röhrchen 1“), 177 („Röhrchen 3“) beziehungsweise 179 („Röhrchen 2“) nicht auswertbare Proben. Durch die zwei weiteren Kulturröhrchen wurden nur 35 Proben als nicht auswertbar eingestuft.

Tabelle 11: Kalkulation der Sensitivität des Untersuchungsansatzes mit einem Kulturröhrchen im Vergleich zum Untersuchungsansatz mit drei Kulturröhrchen durch Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe (n = 5015)

betrachtete Kulturröhrchen	MAP –	MAP n. a.	MAP +	
	[n]	[n]	[n]	[%]
Röhrchen 1 bis 3	4710	35	270	100
nur Röhrchen 1	4708	143	164	60,7*
nur Röhrchen 2	4658	179	178	65,9**
nur Röhrchen 3	4692	177	146	54,1***
Mittelwert von nur Röhrchen 1,2 oder 3	4686	166,3	162,7	60,2

+ = positiv, – = negativ, n. a. = nicht auswertbar, n = Anzahl

* = Anzahl Röhrchen 1 MAP-positiv/ Anzahl Röhrchen 1 bis 3 positiv

** = Anzahl Röhrchen 2 MAP-positiv/ Anzahl Röhrchen 1 bis 3 positiv

*** = Anzahl Röhrchen 3 MAP-positiv/ Anzahl Röhrchen 1 bis 3 positiv

Ergebnisse

In Tabelle 22 (Anhang) sind die einzelnen MAP-Befunde nach Kulturröhrchen und Betrieben getrennt aufgelistet. Die Verwendung nur eines Kulturröhrchens je untersuchter Einzeltierkotprobe senkte den Anteil MAP-positiver Befunde am Untersuchungsgut von 6,6 % („Röhrchen 1, 2 und 3“) auf 3,9 % („Röhrchen 1), 4,3 % („Röhrchen 2“) beziehungsweise 3,6 % („Röhrchen 3“). Der Anteil nicht auswertbarer Einzeltierkotproben bei Verwendung nur eines Kulturröhrchens ist dahingegen höher: Im Mittel waren bei Betrachtung nur eines Kulturröhrchens je Einzeltierkotprobe 3,6 % („Röhrchen 1“), 4,4 % („Röhrchen 2“) beziehungsweise 4,2 % („Röhrchen 3“) so stark kontaminiert, dass eine Auswertung nicht möglich war. Durch die zwei weiteren Kulturröhrchen waren nur 1,2 % („Röhrchen 1, 2 und 3“) nicht auswertbar (Tabelle 22).

In Tabelle 12 ist die Betrachtung nur eines Nährmediums pro Einzeltierkotprobe im Vergleich zur Betrachtung aller drei Nährmedien getrennt nach Betrieben dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 12: Kalkulation der Sensitivität des Untersuchungsansatzes mit einem Kulturröhrchen im Vergleich zum Untersuchungsansatz mit drei Kulturröhrchen durch Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe, getrennt nach Betrieben, MAP-positive Kulturröhrchen

Betrieb	Kotein- sendungen 2011	MAP +						
		Röhrchen 1 bis 3	Röhrchen 1		Röhrchen 2		Röhrchen 3	
		[n]	[n]	[%]*	[n]	[%]**	[n]	[%]***
A	224	0	0	∞	0	∞	0	∞
B	297	9	7	77,8	6	66,7	4	44,4
C	236	10	5	50	7	70	3	30
D	255	9	5	55,6	6	66,7	6	66,7
E	182	13	7	53,8	9	69,2	10	76,9
F	168	14	7	50	7	50	7	50
G	150	9	4	44,4	6	66,7	7	77,8
H	198	7	4	57,1	5	71,4	5	71,4
I	318	15	10	66,7	9	60	8	53,3
J	465	32	20	62,5	22	68,8	17	53,1
K	211	0	0	∞	0	∞	0	∞
L	529	17	10	58,8	7	41,2	6	35,3
M	40	1	0	0	0	0	1	100
N	378	14	8	57,1	9	64,3	8	57,1
O	204	1	0	0	0	0	1	100
P	253	0	0	∞	0	∞	0	∞
Q	417	0	0	∞	0	∞	0	∞
R	195	66	38	57,6	47	71,2	37	56,1
S	110	31	20	64,5	20	64,5	13	41,9
T	185	22	19	86,4	18	81,8	13	59,1
SUMME	5015	270	164		178		146	

+ = positiv, n = Anzahl, ∞ = mathematisch nicht durchführbar

* = Anzahl Röhrchen 1 MAP positiv/ Anzahl Röhrchen 1 bis 3 positiv

** = Anzahl Röhrchen 2 MAP positiv/ Anzahl Röhrchen 1 bis 3 positiv

*** = Anzahl Röhrchen 3 MAP positiv/ Anzahl Röhrchen 1 bis 3 positiv

4.6 Untersuchungen der Milchproben

Die Ergebnisse der gepoolten und aufbereiteten Milchproben sind in den Abbildungen 3 bis 6 getrennt nach ELISA-Testkit und Poolgröße dargestellt. In den Abbildungen 3 und 5 sind die Ergebnisse der 25er Milchpools aufgeführt, die Abbildungen 4 und 6 zeigen jeweils die Ergebnisse der aus Milch von 50 Tieren gepoolten Milchproben.

4.6.1 LDL Cattletype MAP Ab 25er Milchpools

Abbildung 3 zeigt die anteilige Verteilung der Ergebnisse im LDL Cattletype MAP Ab der zu 25 Tieren gepoolten Milchproben. Die Poolanzahl betrug 165. Mit diesem Testkit wurden 60 Milchpools als positiv, 90 als negativ und 15 als verdächtig klassifiziert. Die in der Studie als historisch negativ geführten Betriebe zeigten Ergebnisse mit stark positiven Werten.

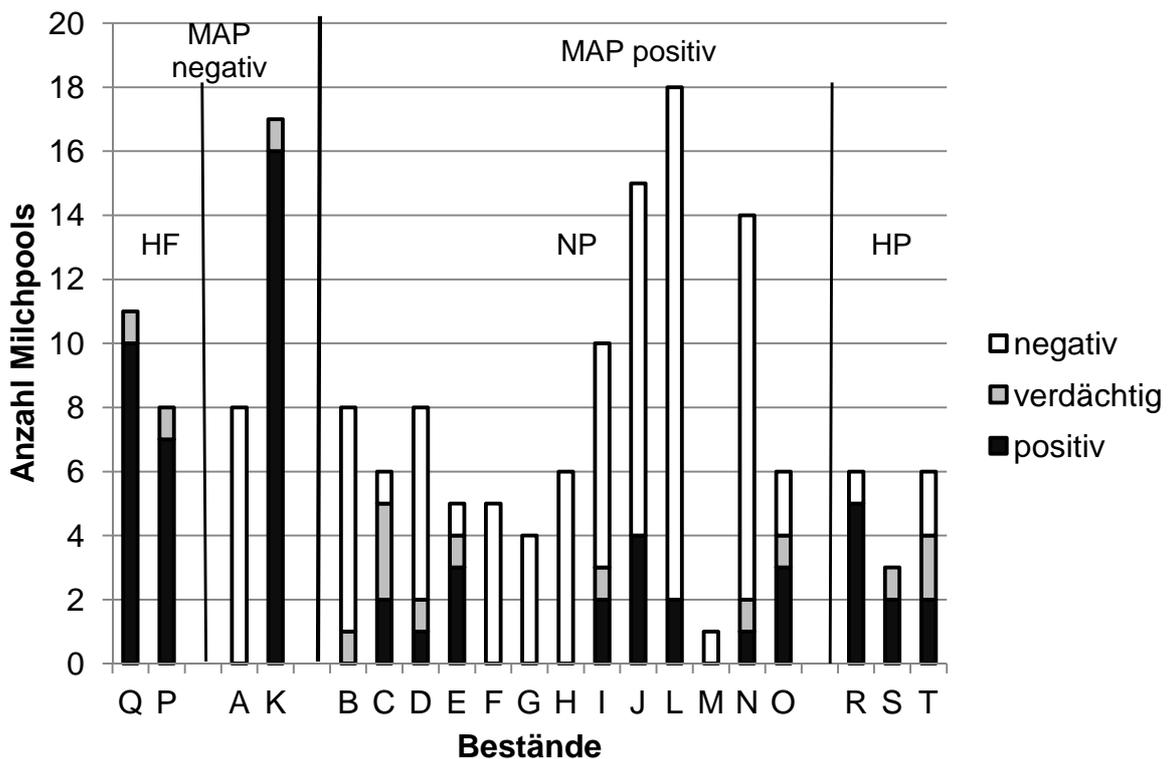


Abbildung 3: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 25 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *LDL Cattletype MAP Ab* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

4.6.2 *LDL Cattletype MAP Ab* 50er Milchpools

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der zu 50 Tieren gepoolten Milchproben mit dem *LDL Cattletype MAP Ab* dargestellt. Von 79 untersuchten Milchpools waren 34 positiv, 37 negativ und 8 Pools verdächtig. Die in der Studie als historisch negativ geführten Betriebe zeigten Ergebnisse mit stark positiven Werten.

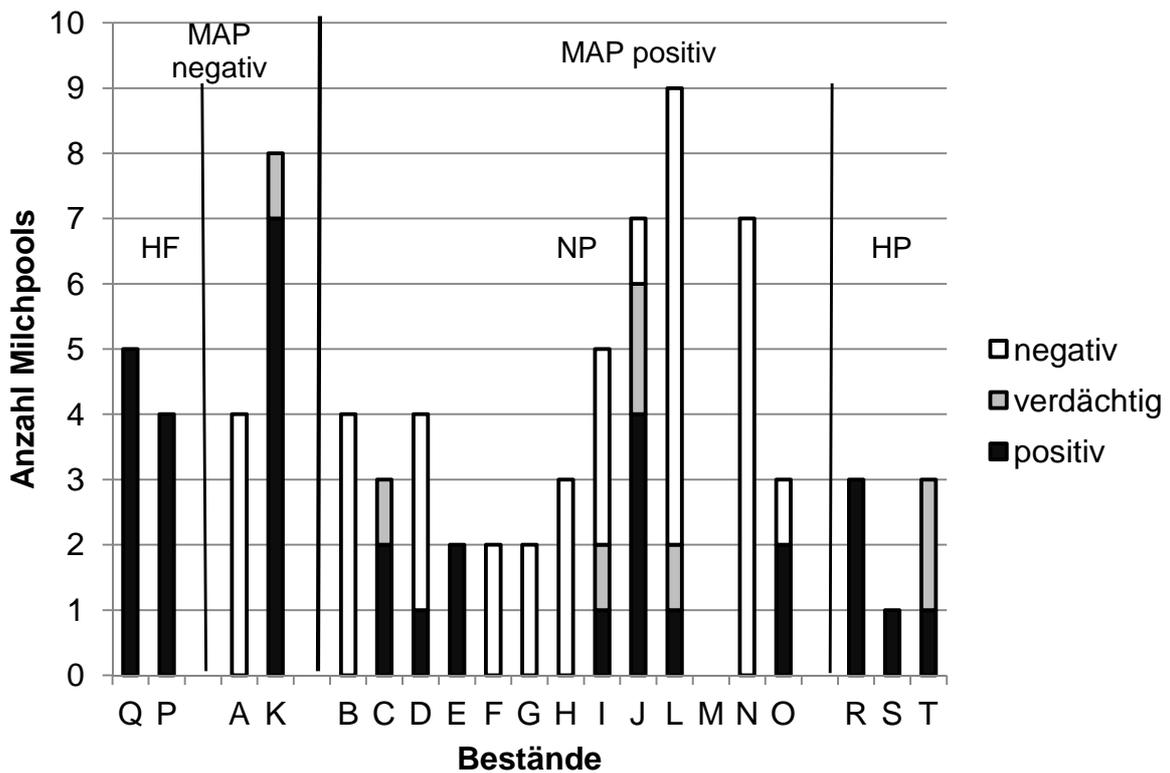


Abbildung 4: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 50 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *LDL Cattletype MAP Ab* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

4.6.3 ID Screen Paratuberculosis Indirect 25er Milchpools

Abbildung 5 zeigt die anteilige Verteilung der Ergebnisse im ELISA *ID Screen Paratuberculosis Indirect* der zu 25 Tieren gepoolten Milchproben. Aus 165 Pools wurden 87 positive, 34 verdächtige und 44 negative Antikörpernachweise gegen MAP ermittelt. Auch hier zeigten die in der Studie als historisch negativ geführten Betriebe Ergebnisse mit stark positiven Werten.

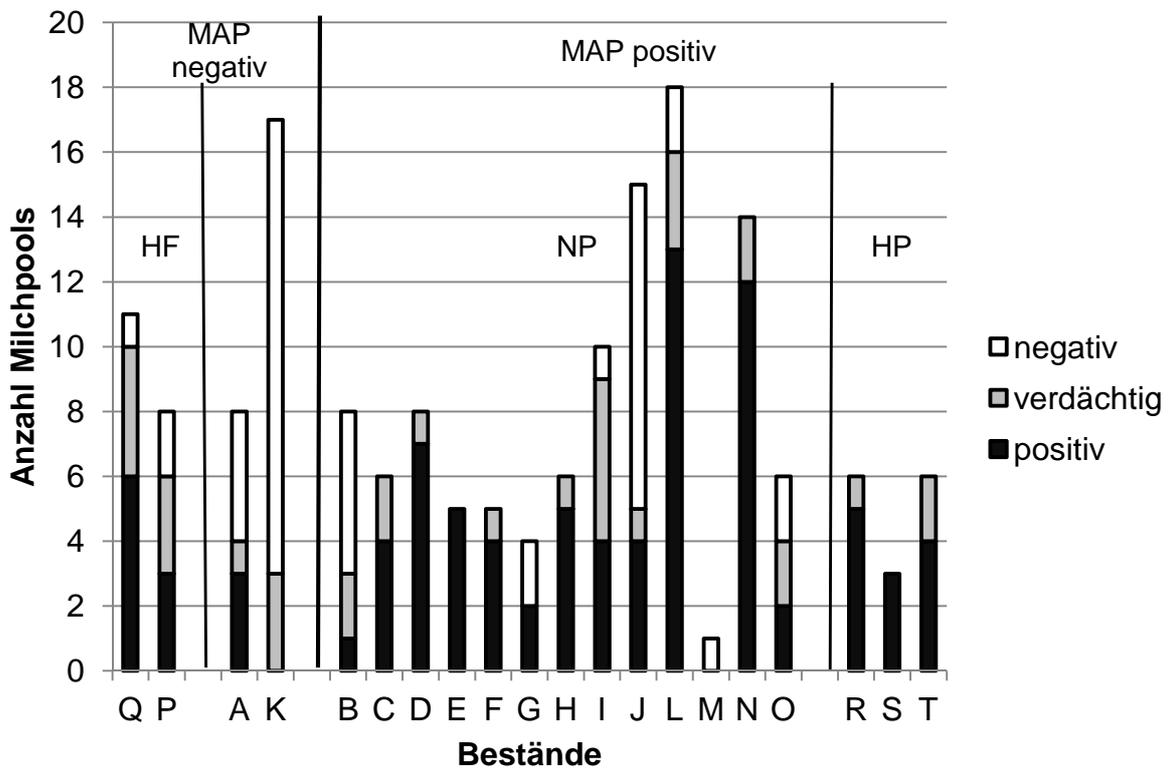


Abbildung 5: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 25 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *ID Screen Paratuberculosis Indirect* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

4.6.4 ID Screen Paratuberculosis Indirect 50er Milchpools

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Untersuchung der zu 50 Tieren gepoolten Milchproben mit dem *ID Screen Paratuberculosis Indirect*-Testkit dargestellt. Aus 79 Milchpools gingen 43 positive, 14 verdächtige und 22 negative Werte hervor. Die in der Studie als historisch negativ geführten Betriebe zeigten Ergebnisse mit stark positiven Werten.

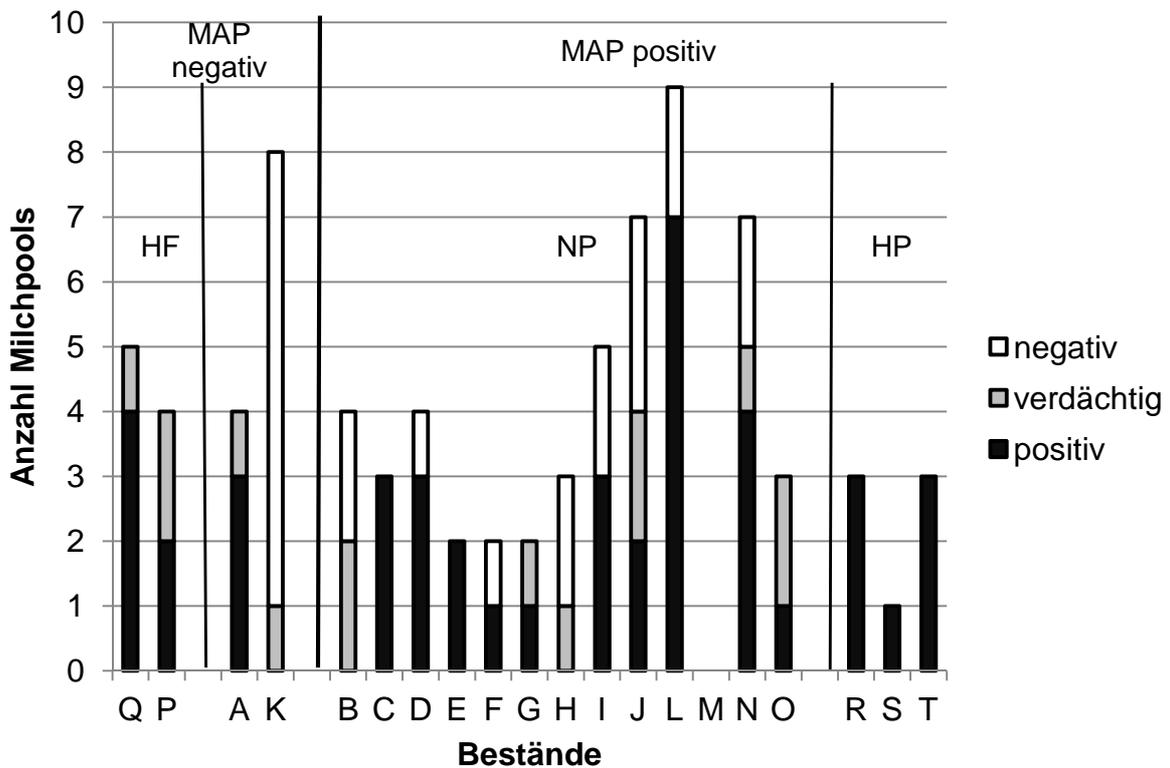


Abbildung 6: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 50 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *ID Screen Paratuberculosis Indirect* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

4.7 Zusammenhänge

4.7.1 Einzeltierprävalenz und Umgebungskotproben Frühjahr

Von den 16 MAP–positiven Betrieben wurden mittels Umgebungskotproben im **Frühjahr** neun Betriebe (56,3 %) detektiert. Betrachtet man die Bestände mit einer Einzeltierprävalenz über 2 %, so ergibt sich eine Detektionsrate von 60 %: 9 von 15 Betrieben wurden als Betrieb mit MAP–Vorkommen identifiziert. Betriebe mit einer Einzeltierprävalenz von über 4,5 % wurden in neun von zehn Fällen (90 %) sicher erkannt.

Ergebnisse

Tabelle 13: Ergebnisse im Frühjahr entnommener Umgebungskotproben nach Bereichen

Betrieb	Innerherden- prävalenz [%]	Summe und Befund Umweltproben	Befunde der Untersuchungen der Umgebungskotproben entnommen aus				
			Abkalbe- bereich	Melkbereich Vorwar- hof	Haupt- triebweg	Lauf- bereich	Übergang zu den Kälbern
Paratuberkulose-negative Herden mit negativen Umgebungskotproben							
A	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg
K	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg
P	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Q	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Paratuberkulose-positive Herden mit negativen Umgebungskotproben							
O	0,49	neg	neg	neg	neg	neg	neg
M	2,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg
H	3,54	neg	neg	neg	neg	neg	neg
N	4,21	neg	neg	n. a.	n. a.	neg	neg
C	4,24	neg	neg	neg	neg	neg	n. a.
B	4,32	neg	neg	n. a.	neg	neg	n. a.
G	6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Paratuberkulose-positive Herden mit positiven Umgebungskotproben							
L	4,8	2x pos	n. a.	neg	++	neg	+
D	5,02	1x pos	neg	+	neg	neg	neg
I	5,9	3x pos	neg	+	++++	+	neg
J	6,88	1x pos	neg	+	neg	neg	neg
E	7,14	2x pos	neg	+	neg	neg	++
F	8,33	2x pos	neg	neg	+	+	neg
T	11,89	3x pos	neg	+	+	+	neg
R	33,85	1x pos	neg	neg	++	neg	neg
S	41,48	3x pos	neg	++++	++++	+++	neg

n. a. = nicht auswertbar, neg = kein Nachweis von MAP, +/++/+++ /++++ = Anzahl der Kreuze beschreibt Quantität positiver MAP-Nachweise, 1x pos = 1 der 5 Umgebungskotproben mit MAP-Nachweis, 2x pos = 2 der 5 Umgebungskotproben mit MAP-Nachweis, 3x pos = 3 der 5 Umgebungskotproben mit MAP-Nachweis

Ergebnisse

Keiner der durch Einzelkotproben als MAP–negativ eingestuften Betriebe zeigte einen positiven Umgebungskotprobenbefund. Bestände mit niedrigen Prävalenzen (0,1 % bis 4,5 %) waren mit Hilfe der Umgebungskotproben nicht detektierbar. Prävalenzen über 4,5 % wurden bis auf eine Ausnahme zuverlässig erkannt. Im Abkalbbereich war kein MAP–Nachweis zu führen. Durch die Beprobung von Melkbereich/Vorwarte Hof und Haupttriebweg waren neun der 16 MAP–positiven Betriebe auffindbar (Tabelle 13).

Einzeltierprävalenz und MAP–Nachweise in der Umgebung eines Bestandes sind stark voneinander abhängig (Tabelle 14 und Abbildung 7). Die Prüfung mit dem *Exakten Test nach Fisher* verfehlte das Signifikanzniveau knapp ($p = 0,094$).

Tabelle 14: Kreuztabelle Betriebsstatus Einzeltierkotproben und Betriebsstatus Umgebungskotproben

Anzahl		Betriebsstatus Einzeltierkotproben		Gesamt
		negativ	positiv	
Betriebsstatus Umgebungskotproben	negativ	4	7	11
	positiv	0	9	9
Gesamt		4	16	20

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug $\rho = 0,797$. Die Korrelation ist mit $p = 0,01$ signifikant.

Die Art des Zusammenhanges wird mit folgender Regressionsgleichung (lineares Regressionsmodell) dargestellt (Abbildung 7):

$$\text{Anteil}_{\text{Umgebungskotproben}} = 0,093 \times \text{Anteil}_{\text{Einzeltierprävalenz}} + 0,012$$

Ergebnisse

Tabelle 15: Ergebnisse im Sommer entnommener Umgebungskotproben nach Bereichen

Betrieb	Innerherden- prävalenz [%]	Summe und Befund Umweltproben	Befunde der Untersuchungen der Umgebungskotproben entnommen aus				
			Abkalbe- bereich	Melkbereich Vorwar- hof	Haupt- triebweg	Lauf- bereich	Übergang zu den Kälbern
Paratuberkulose-negative Herden mit negativen Umgebungskotproben							
A	0	neg	neg	n. a.	neg	neg	n. a.
K	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg
P	0	neg	neg	neg	neg	n. a.	n. a.
Q	0	neg	n. a.	neg	n. a.	neg	n. a.
Paratuberkulose-positive Herden mit negativen Umgebungskotproben							
O	0,49	neg	neg	neg	neg	n. a.	neg
M	2,5	neg	neg	neg	n. a.	neg	n. a.
H	3,54	neg	neg	n. a.	neg	neg	neg
N	4,21	neg	neg	n. a.	n. a.	neg	n. a.
C	4,24	neg	n. a.	neg	neg	neg	neg
B	4,32	neg	neg	n. a.	neg	neg	neg
D	5,02	neg	neg	n. a.	neg	neg	neg
I	5,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg
G	6	neg	n. a.	n. a.	neg	neg	neg
J	6,88	neg	neg	neg	neg	neg	neg
E	7,14	neg	neg	n. a.	neg	neg	neg
R	33,85	neg	neg	n. a.	neg	neg	neg
Paratuberkulose-positive Herden mit positiven Umgebungskotproben							
L	4,8	1x pos	neg	+	n. a.	neg	neg
F	8,33	1x pos	+	neg	neg	neg	n. a.
T	11,89	2x pos	neg	++	neg	+++	neg
S	41,48	3x pos	neg	+	++	+++	neg

n. a. = nicht auswertbar, neg = kein Nachweis von MAP, +/++/+++ /++++ = Anzahl der Kreuze beschreibt Quantität positiver MAP-Nachweise, 1x pos = 1 der 5 Umgebungskotproben mit MAP-Nachweis, 2x pos = 2 der 5 Umgebungskotproben mit MAP-Nachweis, 3x pos = 3 der 5 Umgebungskotproben mit MAP-Nachweis

Ergebnisse

4.7.3 Umgebungskotproben Frühjahr und Umgebungskotproben Sommer

Tabelle 16 zeigt die Nachweisrate von MAP bei der kulturellen Untersuchung der Umgebungskotproben. Aus Proben, die im Frühjahr entnommen wurden, wurde der Erreger in 1,9 % (18 aus 94) der Umgebungskotproben angezüchtet. Im Sommer waren sieben der 77 Umgebungskotproben MAP-positiv (0,9 %).

Tabelle 16: Anteil positiver und negativer Umgebungskotproben, getrennt nach Frühjahr und Sommer

	Umgebungskotproben Frühjahr	Umgebungskotproben Sommer
positiv	18	7
negativ	76	70
Gesamt	94	77

4.7.4. Vergleich der Einzeltierprävalenz und der errechneten Stichprobenuntersuchung

Die ermittelte Einzeltierprävalenz und die Befunde der systematischen Stichprobenuntersuchung eines Bestandes sind stark voneinander abhängig (Tabelle 17 und Abbildung 8). Die Prüfung mit dem Exakten Test nach Fisher ergab eine hohe Signifikanz ($p = 0,001$).

Tabelle 17: Kreuztabelle Betriebsstatus Einzeltierkotproben und Betriebsstatus Stichproben

Anzahl		Betriebsstatus Einzeltierkotproben		Gesamt
		negativ	positiv	
Betriebsstatus Stichproben	negativ	4	1	5
	positiv	0	15	15
Gesamt		4	16	20

Ergebnisse

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug $\rho = 0,800$. Die Korrelation ist mit $p < 0,01$ signifikant.

Die Art des Zusammenhanges wird mit folgender Regressionsgleichung (lineares Regressionsmodell) dargestellt (Abbildung 8):

$$\text{Anteil}_{\text{Stichproben}} = 0,411 \times \text{Anteil}_{\text{Einzeltierprävalenz}} + 0,982$$

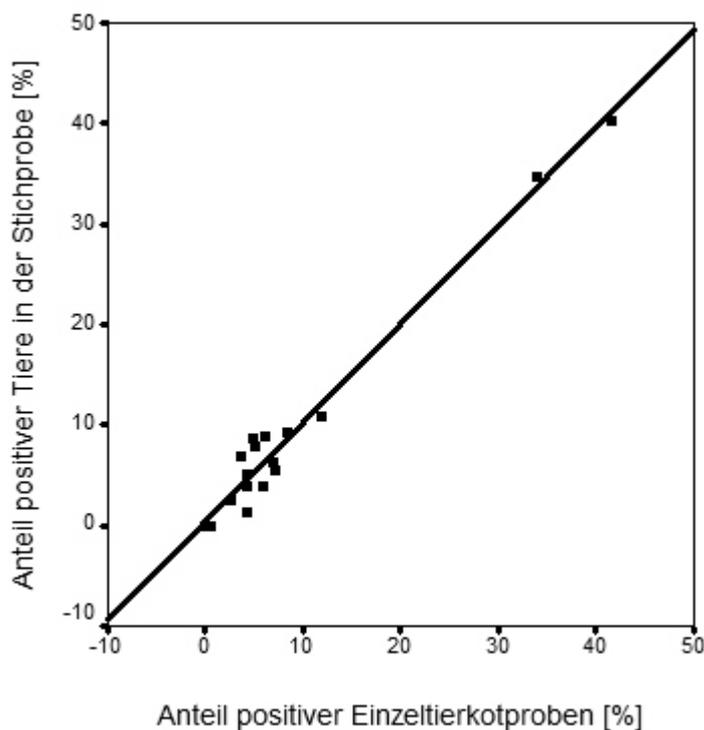


Abbildung 8: Abhängigkeit des Anteils positiver Stichproben vom Anteil positiver Einzeltierkotproben (Einzeltierprävalenz)

4.7.5 Stichprobenuntersuchung und Umgebungskotproben Frühjahr

Die Ergebnisse der Stichprobenuntersuchung und die MAP-Nachweise in der Umgebung eines Bestandes sind stark voneinander abhängig (Tabelle 18). Die Prüfung mit dem *Exakten Test nach Fisher* zeigte mit $p = 0,038$ einen signifikanten Unterschied. Von den in der Stichprobenuntersuchung als MAP-negativ

Ergebnisse

klassifizierten Tieren war keines bei der Untersuchung der Umgebungskotproben MAP-positiv; von den in der Stichprobenuntersuchung als MAP-positiv eingestuft Tieren wurden jedoch neun in der Untersuchung der Umgebungskotproben ebenfalls als MAP-positiv befundet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Kreuztabelle Betriebsstatus Stichproben und Betriebsstatus Umgebungskotproben Frühjahr

Anzahl		Betriebsstatus Umgebungskotproben		Gesamt
		negativ	positiv	
Betriebsstatus Stichproben	negativ	5	0	5
	positiv	6	9	15
Gesamt		11	9	20

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug $\rho = 0,675$. Die Korrelation ist mit $p = 0,01$ signifikant.

4.7.6 Einzeltierprävalenz und ELISAs

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Einzeltierprävalenz und den Ergebnissen aus beiden ELISAs nach der Untersuchung der 25er Milchpools. Zwischen Einzeltierprävalenz und Ergebnissen der ELISAs der 50er Milchpools bestand ebenfalls keine signifikante Korrelation (Tabelle 19).

Ergebnisse

Tabelle 19: Kreuztabelle Betriebsstatus Einzeltierkotproben und LDL ELISA 25er Pools, IDVet ELISA 25er Pools, LDL ELISA 50er Pools und IDVet ELISA 50er Pools

Anzahl		Betriebsstatus Einzeltierkotproben		Gesamt
		negativ	positiv	
Betriebsstatus LDL 25er Pools	negativ	1	4	5
	fraglich	0	1	1
	positiv	3	11	14
Gesamt		4	16	20
Betriebsstatus IDVet 25er Pools	negativ	0	1	1
	fraglich	1	2	3
	positiv	3	13	16
Gesamt		4	16	20
Betriebsstatus LDL 50er Pools	negativ	1	6	7
	positiv	3	10	13
Gesamt		4	16	20
Betriebsstatus IDVet 50er Pools	fraglich	1	2	3
	positiv	3	13	16
	fehlt	0	1	1
Gesamt		4	16	20

4.8 Gegenüberstellung der Ergebnisse verschiedener Untersuchungsansätze zur Feststellung des Herdenstatus

In Tabelle 20 sind alle Ergebnisse der Studie getrennt nach Betrieben gegenübergestellt. Betriebe mit negativen Einzeltierproben zeigten positive ELISA-Befunde, nicht jedoch einen positiven Nachweis von MAP in den Umgebungskotproben oder einen MAP-positiven Stichprobenbefund.

Ergebnisse

Tabelle 20: Gesamtübersicht

Bestand	Einzeltierkotproben		Umgebungskotproben		ELISA			
	Gesamtbestand	Herdenstatus	Herdenstatus		Herdenstatus			
	Prävalenz [%]	Stichprobe	Winter	Sommer	LDL (25)	LDL (50)	IDVet (25)	IDVet (50)
A	0	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos
B	4,32	pos	neg	neg	verd	neg	pos	verd
C	4,24	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos
D	5,02	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos
E	7,14	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos
F	8,33	pos	pos	pos	neg	neg	verd	pos
G	6	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos
H	3,54	pos	neg	neg	neg	neg	verd	verd
I	5,9	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos
J	6,88	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos
K	0	neg	neg	neg	pos	pos	verd	verd
L	4,83	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
M	2,5	pos	neg	neg	neg	/	neg	/
N	4,21	pos	neg	neg	pos	neg	pos	pos
O	0,49	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos
P	0	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos
Q	0	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos
R	33,85	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos
S	41,48	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
T	11,89	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

pos = positiv (MAP-Nachweis), neg = negativ (kein MAP-Nachweis), verd = verdächtig

5 DISKUSSION

Die vorliegende Untersuchung stellt einen Vergleich verschiedener diagnostischer Ansätze zur Ermittlung des Paratuberkulose-Status auf Herdenebene dar.

Im Unterschied zu den meisten bisher vorliegenden Studien zu dieser Fragestellung wurden in dieser Arbeit alle Rinder mit einem Alter über 24 Monate eines Bestandes beprobt und nach der Amtlichen Methodensammlung (FLI 2010) einzeln kulturell untersucht. Damit konnte sowohl der MAP-Herdenstatus, als auch die Prävalenz der MAP-Ausscheider mit der sensitivsten der gegenwärtig zur Diagnostik am lebenden Tier verfügbaren Methoden ermittelt werden. Dennoch ist auch bei der kulturellen Einzeltierkotprobenuntersuchung von keiner 100 %igen Sensitivität auszugehen. Aus den Daten der Untersuchungen von KÖHLER et al. (2008a) errechnet sich eine Sensitivität der Kotkultur von circa 70 %, Dieser Wert wird auch von RAIZMAN et al. (2011a) angenommen. Die Erfassung aller Tiere über 24 Monate wurde durch einen Datenabgleich mit der HIT-Datenbank sichergestellt.

Diese durch die individuelle Untersuchung jedes einzelnen Tieres ermittelte Prävalenz dient als Referenzmethode zur Bewertung der Ergebnisse der anderen Screening-Methoden. SMITH et al. (2011a) und DONAT et al. (2011) wählten die gleiche Referenzmethode. Andere Autoren beziehen sich auf Diagnose-Methoden, die durchaus eine schnellere oder auch preiswertere Diagnostik ermöglichen. So findet beispielsweise der Nachweis von Antikörpern im ELISA in Serum oder Milch (KUDAHL et al. 2008, COLLINS et al. 2010, NIELSEN und TOFT 2011, DENZIN et al. 2011, FAILING et al. 2012) oder die Untersuchung gepoolter Einzeltierkotproben (RAIZMAN et al. 2011a) Anwendung.

Als Stärke der vorliegenden Studie ist die Vorauswahl der teilnehmenden Betriebe zu sehen. Der Erreger verbreitet sich im Bestand langsam (SMITH et al. 2011a), so dass die Einzeltierprävalenzen in 2011 analog zu den Werten aus den Jahren 2008, 2009 und 2010 zu erwarten waren. Da die teilnehmenden Betrieben seit mehreren Jahren unter kultureller Bestandsbeobachtung stehen, konnte eine gezielte Vorauswahl der Betriebe nach bisheriger Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde erfolgen.

Das Augenmerk der Studie wurde gezielt auf niedrigprävalente Herden gelegt, da die Identifizierung dieser im Rahmen eines Herden-Screenings eine große Herausforderung darstellt.

Die für die Untersuchung ausgewählten 14 Bestände (Bestände A bis N) mit einer niedrigen Prävalenz von > 0 % bis 10 % in den vorangegangenen Jahren zeigten in der aktuellen Untersuchung Einzeltierprävalenzen von bis zu 8,3 %. In zwei der 14 Betriebe (Bestand A und K) konnte bei keinem Rind über 24 Monaten in der aktuellen Untersuchung ein Wachstum von MAP nachgewiesen werden. Die Senkung der Einzeltierprävalenz auf 0 % in den Beständen A und K ist möglicherweise auf eine konsequente Merzung der MAP-Ausscheider im Rahmen des „Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ zurückzuführen. In Bestand A war in den vergangenen Jahren eine abnehmende Einzeltierprävalenz nachzuweisen (Tabelle 2). Durch die Untersuchung im Rahmen dieser Studie im Jahr 2011 konnte der Bestand als MAP-negativ klassifiziert werden.

Im Betrieb S waren 20 von 135 kultivierten Proben (14,8 %) durch Überwucherung mit einer starken Fremdflora nicht auswertbar (Tabelle 3). Die Häufung der nicht auswertbaren Befunde ist auffallend bestandsspezifisch. Eine mögliche Ursache könnten Bestandteile des im Betrieb verwendeten Futters sein. Des Weiteren könnte eine Ursache in den vorherrschenden Betriebsabläufen des Fütterungsmanagements und der Fütterungshygiene zu suchen sein. RAIZMAN et al. (2004) geben an, dass stark kontaminierte Proben (> 50 koloniebildende Einheiten) in direktem Zusammenhang mit einer hohen Prävalenz (> 30 % positive Pools) stehen. In Betrieb S liegt eine hohe Einzeltierprävalenz von 41,5 % vor.

In der vorliegenden Untersuchung der Einzeltierkotproben wurden je Probe drei Kulturen angelegt. Dieses Vorgehen wird durch die Amtliche Methodensammlung (FLI 2010) empfohlen. Die Verwendung von drei beimpften Kulturröhrchen pro eingesandter Kotprobe erhöht, wie in dieser Studie nachgewiesen, erheblich die Sensitivität der kulturellen Untersuchung und vermindert die Anzahl nicht auswertbarer Proben (Tabelle 11). Somit ist die Verwendung von drei Kulturröhrchen empfehlenswert, jedoch aufwändiger als der bei den Bestandsuntersuchungen im Rahmen des „Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den

Rinderbeständen in Thüringen“ bisher übliche Ansatz auf einem Kulturröhrchen. Nach DONAT et al. (2012) belaufen sich die Kosten pro kulturell zu untersuchender Probe auf 19,87 €.

5.1 Umgebungskotproben

Um eine zukünftige Vereinfachung und Kostenminimierung in der Paratuberkulosedagnostik zu erzielen, wurden in der vorliegenden Studie Umgebungskotproben entnommen und mit den Ergebnissen der Einzeltierkotprävalenzen verglichen.

Viele der bisherigen Studien bewerteten Umgebungskotproben lediglich im Vergleich zu gepoolten Kotproben (BERGHAUS et al. 2006), Stichproben (RAIZMAN et al. 2004) oder serologischen Diagnoseverfahren (LOMBARD et al. 2006).

Im Frühjahr entnommene Umgebungskotproben aus Beständen mit einer Einzeltierprävalenz von über 4,5 % charakterisieren zuverlässig (90 %) die Anwesenheit von Paratuberkulose im Bestand. Bei einer Einzeltierprävalenz über 2 % wurde eine Detektionsrate von 60 % ermittelt. Die festgestellte Detektionsrate MAP-positiver Bestände entspricht weitgehend den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren. RAIZMAN et al. (2004) ermittelte eine Detektionsrate von 78 %, PILLARS et al. (2009a) wiesen eine Detektionsrate von 75 % bei über 2 %iger Einzeltierprävalenz nach. DONAT et al. (2011) belegten eine Herdensensitivität von 87 % bei der Erkennung von Herden mit einer Einzeltierprävalenz von über 2 %. Die im Vergleich zu PILLARS et al. (2009a) und RAIZMAN et al. (2004) verminderte Detektionsrate erklärt sich aus der gezielten Vorauswahl niedrigprävalenter Betriebe.

In Gegenzug zu den Untersuchungen von DONAT et al. (2011) wurden in der vorliegenden Untersuchung drei HEYM-Röhrchen beimpft, bebrütet und ausgewertet. Die Verwendung von nur einem Kulturröhrchen führt zu einer Unterschätzung der Einzeltierprävalenz der Bestände. Berücksichtigt man die im Punkt 4.4 ermittelte verminderte Sensitivität von 60 %, erhöht sich die von DONAT et al. (2011) festgestellte Einzeltierprävalenz zur Erkennung von MAP-infizierten Herden durch Umgebungskotproben rechnerisch von 2 % auf 3,3 % durch die Verwendung von drei Kulturröhrchen pro Einzeltierkotprobe.

Die Spezifität der Umgebungskotprobenuntersuchung in dieser Studie beträgt 100 %. Kein durch Einzeltierkotproben als Paratuberkulose–negativ klassifizierter Betrieb zeigte in der vorliegenden Umgebungskotprobenuntersuchung einen positiven Nachweis von MAP. Bei RAIZMAN et al. (2004) wurde eine „negative“ Herde mittels Umgebungskotproben als positiv detektiert. Allerdings erfolgte bei RAIZMAN et al. (2004) die Kategorisierung der Herde als „negativ“ an Hand von stichprobenbasierten Kotproben.

Umgebungskotproben, die im Sommer entnommen wurden, zeigten im Vergleich zu denen, die im Frühjahr gewonnen wurden eine auffällig hohe Kontaminationsrate. Proben, die mit dem Kontaminations–Score 3 oder 4 eingestuft sind, ermöglichen nur eine eingeschränkte Beurteilung. Kulturen der Kontaminationsklasse K0 bis K2 sind ohne Einschränkungen zu beurteilen. Starke (K3) und sehr starke (K4) Kontaminationen sind erschwert beziehungsweise gar nicht zu beurteilen. Insgesamt 65 Primärkulturen und 33 Wiederholungskulturen waren sehr stark (K4) kontaminiert (Tabelle 6). Tabelle 7 veranschaulicht den Nutzen der Wiederholungskultur mit verstärkter Dekontamination: Bei 23 Proben waren alle sechs angelegten Nährmedien stark kontaminiert und die Proben wurden somit als nicht auswertbar befundet. Ohne die zusätzliche Wiederholungskultur wäre die Anzahl nicht auswertbarer Proben deutlich höher gewesen. Möglicherweise hemmen kontaminierte Nährböden das Wachstum von MAP, so dass Nachweise des Erregers in den im Frühjahr entnommenen Umgebungskotproben nicht reproduzierbar waren. So konnte im hochprävalenten Betrieb R (33,9 %) kein positives Umgebungskotprobenergebnis im Sommer erzielt werden. Rückblickend hatte Betrieb R auch eine hohe Kontaminationsbelastung.

Die Unterschiede im Kontaminierungsgrad zwischen den im Frühjahr und den im Sommer entnommenen Umgebungskotproben ergibt sich möglicherweise aus den unterschiedlichen Luftzuständen bezüglich Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu den beiden Jahreszeiten.

Im Frühjahr waren durchschnittlich 5,2 g/kg und im Sommer 9,6 g/kg Wasser in der Umgebungsluft gelöst (Abbildung 2). 5,2 g/kg entsprechen bei einer Dichte von $1,2 \text{ kg/m}^3$ einen Wert von $11,5 \text{ g/m}^3$. 9,6 g/kg Wasser in der Umgebungsluft ergeben bei einer Dichte von $1,25 \text{ kg/m}^3$ einen Wassergehalt von $6,5 \text{ g/m}^3$. Durch den fast

doppelt so hohen gelösten Wasseranteil in der Sommerluft im Vergleich zu dem der Frühlingsluft und durch die im Durchschnitt um 10,2°C höhere Umgebungstemperatur ist das Wachstum von Fremdflora in den Sommerproben begünstigt. Demzufolge muss von einer Probenentnahme bei heißen Temperaturen abgeraten werden.

FERNANDEZ–SILVA et al. (2011) schätzten bei einer Untersuchung im tropischen Kolumbien die Kontamination gepoolter Einzeltier- und Gülleproben auf 8,3 %. Dieser Wert erscheint relativ gering. In der vorliegenden Studie handelt es sich im Gegensatz zu den Untersuchungen von FERNANDEZ–SILVA et al. (2011) um Umgebungskotproben, die per se eine höhere Kontaminationsrate aufweisen.

In Tabelle 7 ist zu sehen, dass wesentlich mehr nicht auswertbare Primärkulturen der Sommer–Umgebungskotproben durch eine Wiederholungskultur befundbar wurden, als dies bei den Frühjahr–Umgebungskotproben der Fall war. Das liegt zum einen daran, dass im Frühjahr nur die schon nach der 1. Ablesung sehr stark kontaminierten Proben wiederholt wurden (35 Proben). Zum anderen wurden alle 100 Sommer–Umgebungskotproben wiederholt und mit der doppelten Menge ANV dekontaminiert.

Bei der Entnahme der Umgebungskotproben wurde darauf geachtet, Bereiche auszuwählen, die stark und von großen Teilen der Herde täglich frequentiert wurden beziehungsweise für die Verbreitung der Krankheit innerhalb des Bestandes eine epidemiologische Bedeutung haben. So dienten die Lokalisationen „Abkalbebereich“ und „Übergang zum Kälberbereich“ der Überprüfung solcher Stallbereiche. Betriebe, die am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ teilnehmen, sind sensibilisiert eine strenge Hygiene vor, während und nach der Abkalbung zu verfolgen. Dies würde erklären, dass die Untersuchung der Abkalbebereiche in der vorliegenden Studie kein positives Kulturergebnis lieferte. Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises von MAP ist in Stallbereichen mit frequentem Tierverkehr am höchsten. Insbesondere Proben aus dem Melkbereich einschließlich des Vorwartehofes (33,3 %) und Proben des Haupttriebweges (33,3 %) gaben eine gute Übersicht. Ähnliche Aussagen sind von PILLARS et al. (2009a), SMITH et al. (2011a) und DONAT et al. (2011) bekannt. Laufbereich (22,2 %) und Übergang zum Kälberbereich (11,1 %) waren lediglich zusätzlich zu

einem Nachweis des Erregers an einer anderen Lokalisation (Melkbereich/Vorwarte Hof oder Haupttriebweg) positiv auf das Vorhandensein von MAP. Weiterhin ist in der Literatur das Dunglager als geeignete Nachweislokalisierung beschrieben (LOMBARD et al. 2006, PILLARS et al. 2009, SMITH et al. 2011a). Aus Gründen des Arbeitsschutzes wurde in dieser Studie eine Beprobung dieses Bereiches unterlassen.

Alle an der Studie teilnehmenden Betriebe sind Milchviehherden mit Laufstallhaltung. Viele Tiere des Bestandes halten sich täglich auf einem begrenzten Bewegungsradius auf. In Mutterkuhhaltungen mit weitläufigen und wechselnden Weideflächen und für Betriebe mit Anbindehaltung ist die Methode bisher nicht validiert. In diesen Haltungsformen müssten andere Lokalisationen beprobt werden.

Die Studie wurde an Herden in Thüringen durchgeführt. Die durchschnittliche Herdengröße aller Rinder über 24 Monate pro Bestand betrug 253 Tiere (Minimum: 40 Tiere, Maximum: 538 Tiere). Die Methode der Umgebungskotprobenuntersuchung ist sinnvoll ab dieser Herdengröße und einer mittleren Einzeltierprävalenz von 4,5 %.

Ein Ergebnis der kulturellen Untersuchung der Umgebungskotproben kann nach 12 Wochen erwartet werden. Dieser Zeitraum relativiert sich bei der langen Inkubationszeit der Erkrankung und eines nur langsam fortschreitenden Krankheitsverlaufs.

In Deutschland werden gegenwärtig Untersuchungskosten von 18 € bis 30 € (DONAT et al. 2012) pro kulturelle Untersuchung berechnet. Umgebungskotproben an fünf Lokalisationen pro Betrieb sind ausreichend eine Aussage bezüglich des Paratuberkulose–Infektionsstatus zu treffen. Es errechnen sich daraus Laborkosten von 90 € bis 150 € je Bestand.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Nachweis von MAP in Umgebungskotproben einer Einzeltierprävalenz von über 4,5 % entspricht. Bestände mit einer Einzeltierprävalenz unter 4,5 % waren durch die angewandte Diagnosemethode in dieser Untersuchung nicht zu erfassen. Die Untersuchung von Umgebungskotproben eines Betriebes stellt eine zuverlässige, praktikable und finanzielle überschaubare Screening–Methode dar, um eine Aussage zur

Anwesenheit des Paratuberkulose-Erregers im Betrieb zu treffen. Umgebungskotproben können die kulturelle Untersuchung aller Einzeltiere nicht ersetzen. Rinderhalter können jedoch prüfen, ob eine erhebliche Paratuberkuloseerkrankung in ihrem Bestand vorliegt und dadurch erleichtert zum Einstieg in ein Paratuberkulosesanierungsprogramm einwilligen. Umgebungskotproben mit positivem MAP-Nachweis müssen zu einer Einzeltierkotuntersuchung und nachfolgender Selektion führen. Ein negatives Ergebnis der Umgebungskotproben sollte regelmäßig (beispielsweise jährlich) bestätigt werden. Umgebungskotproben könnten alternierend zu kulturellen Einzeltierkotproben des Bestandes durchgeführt werden.

Die Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (BMELV 2005) enthalten strikte Hygienemaßnahmen. Die Empfehlungen stellen hohe, zum Teil praktisch nicht durchführbare, mit hohen Kosten für den Betrieb verbundene Ansprüche. Auch die Amtliche Methodensammlung zur Paratuberkulosedagnostik (FLI 2010) verlangt einen hohen finanziellen Aufwand. Aus den bisher sehr hohen Ansprüchen an die Erfüllung der Leitlinien ergibt sich möglicherweise eine geringe Beteiligung. An Hand der vorliegenden Studie wird die Aufnahme der Untersuchung von Umgebungskotproben in die Leitlinien empfohlen, um die Beteiligung der rinderhaltenden Betriebe zu erhöhen.

Des Weiteren können Landwirte Umgebungskotproben nutzen, um das Hygieneregime bezüglich MAP zu überprüfen.

5.2 Kalkulation einer Stichprobe

Auf Grundlage des erhobenen vollständigen Datenmaterials der 20 involvierten Bestände wurde die Aussagekraft der Methode einer stichprobenartigen Einzeltierkotprobenuntersuchung zur Evaluierung des Paratuberkulose-Status überprüft. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Stichprobenuntersuchung nachträglich simuliert.

Aus der Gesamtpopulation von 5063 Tieren wären in einer Stichprobenuntersuchung 1458 Tiere analysiert worden. Der labormedizinische Aufwand verringert sich gegenüber der kulturellen Einzeltierkotprobenuntersuchung des gesamten

Bestandes um das 3,5fache. Die kalkulierte Stichprobengröße befand sich zwischen 40 und 80 Tieren pro Betrieb bei einer Betriebsgröße von 40 bis 538 Rindern über einem Alter von 24 Monaten. Bei einer angenommenen Untersuchungsgebühr von 19,87 € je kulturell untersuchter Kotprobe (DONAT et al. 2012) belaufen sich die Kosten für eine stichprobenhafte Einzeltierkotprobenuntersuchung je nach Bestandsgröße auf 795 € bis 1590 €. Bei der kulturellen Einzeltierkotprobenuntersuchung des gesamten Bestandes sind mit Kosten in Höhe von 795 € bis 10511 € zu rechnen.

RAIZMAN et al. (2011a) nutzt die stichprobenbasierte kulturelle Untersuchung, untersucht allerdings gepoolt zu fünf Einzeltieren. Die Autoren arbeiten mit einer Stichprobengröße von 100 Tieren in Herden mit einer mittleren Größe von 222 Tieren (Minimum:44 Tiere, Maximum: 1500 Tiere).

Mit Hilfe des auf der Stichprobe beruhenden Untersuchungsansatzes wurden 15 der 16 MAP-positiven Herden detektiert. Lediglich eine Herde mit einer Einzeltierprävalenz von 0,5 % war bei dieser Betrachtung falsch-negativ. Das resultiert daraus, dass in dieser Herde nur ein Tier MAP-positiv war und dieses nicht in die Stichprobe inkludiert war.

Die kalkulierte Stichprobe nach CAMERON und BALDOCK (1998) eignet sich nur um das Vorhandensein eines Erregers in der Herde nachzuweisen. Um eine korrekte Prävalenzschätzung auf Basis einer untersuchten Stichprobe durchzuführen, bedarf es einer größeren Stichprobenmenge. Betriebe C und L haben eine vergleichbare Einzeltierprävalenz (Tabelle 10). Die kalkulierte Stichprobenmenge unterscheidet sich trotz circa doppelter Tieranzahl in Betrieb L kaum von der Stichprobenmenge des Betriebes C. In Betrieb L wurden bei einem Stichprobenumfang von 80 Tieren sieben MAP-positiv Befunde ermittelt; in Betrieb C hingegen war nur eine MAP-positiv Stichprobe bei 74 betrachteten Tieren detektierbar. Trotzdem wurden beide Herden richtig als MAP-positiv erkannt.

Die Untersuchung einer Stichprobe weißt in der vorliegenden Untersuchung eine bessere Detektionsrate, als die Entnahme und Diagnostik von Umgebungskotproben, auf. Bei RAIZMAN et al. (2004) war eine Umgebungskotprobe positiv obwohl die zugehörige Stichprobe zu einer MAP-negativen Einstufung geführt hatte. Durch die im Vergleich zur Beprobung des Bestandes mit Umgebungskotproben größere

Probenzahl entsteht ein mehr als 10fach höherer Aufwand, der zugleich entsprechend höhere Kosten verursacht. Es ist folglich abzuwägen, ob für die gewünschte Aussage dieser Mehraufwand der stichprobenbasierten Untersuchung getragen werden soll oder ob die Genauigkeit der Untersuchung von Umgebungskotproben eine ausreichende Aussagefähigkeit besitzt.

Eine stichprobenhafte kulturelle Untersuchung bei Beständen mit einer Tierzahl unter 55 Tieren ist nicht geeignet, da bei geringer Bestandsgröße (siehe Bestand M, Tabelle 10) die kalkulierte Stichprobengröße der Tierzahl aller Einzeltiere entspricht.

Sofern die Größe der Stichprobe entsprechend den Testeigenschaften und der geforderten Mindestsicherheitswahrscheinlichkeit kalkuliert wurde, ist eine stichprobenartige kulturelle Untersuchung von Einzeltieren eine sichere, praktikable und kostensparende Methode um das Vorhandensein des Erregers MAP in einer Herde nachzuweisen.

5.3 Milchserologie nach Anreicherung

ELISA–Untersuchungen von Tankmilch oder Einzelmilch überzeugen in der Literatur nicht durch zuverlässige Sensitivitäten und Spezifitäten (GEUE et al. 2007, SORGE et al. 2011). In dieser Studie wurde vor der Messung der Antikörper im ELISA eine Aufbereitung durchgeführt, um eine verbesserte Nachweisbarkeit der Antikörper zu erzielen. Um der Methode eine praktische Anwendung zu ermöglichen, wurden die Milchproben der laktierenden Rinder gepoolt zu 25 und zu 50 Tieren. Der Testkit *Cattletype Milk Prep* der Fa. LDL ist bereits in der BHV1–Diagnostik erprobt worden (GAUNITZ et al. 2010).

Die serologische Untersuchung einer Blutprobe und analog dazu auch einer Milchprobe kostet nach Kalkulation von DONAT et al. (2012) 4,82 €. Bei der Untersuchung einer Stichprobe von 30 Tieren, so wie das im freiwilligen Programm zur Feststellung des MAP–Herdenstatus in Minnesota, USA, vorgesehen war (WELLS et al. 2002), entstehen Kosten von circa 150 €. Der Stichprobenumfang von 30 Tieren ist allerdings für einen durchschnittlichen ostdeutschen Betrieb mit Herdengröße von über 300 laktierenden Rindern nicht ausreichend, um eine repräsentative Aussage zum Infektionsstatus des Bestandes zu treffen und für

Herden mit geringer Einzeltierprävalenz nicht geeignet (WELLS et al. 2002). Bei Herdengrößen von 26 bis 454 laktierenden Kühen (Tabelle 2) in der vorliegenden Studie wären bei Einzeltiermilchprobenuntersuchungen Kosten in Höhe von 125 € bis 2100 € entstanden, bei gepoolten Milchproben zu 25 Tieren entsprechend 8 € bis 90 € je Untersuchung.

Gegenwärtige serologische Testsysteme gewährleisten nur Sensitivitäten von 22,6 % bis 77,4 % (MCKENNA et al. 2005) beziehungsweise 23,3 % bis 32,2 % (DONAT et al. 2012). In der vorliegenden Untersuchung kamen zwei ELISA-Testkits zum Einsatz, zum einem der zum Aufbereitungskit gehörende *Cattletype MAP Ab* (Fa. LDL) und zum anderen der Testkit *ID Screen Paratuberculosis Indirect* (Fa. IDVet), der eine bessere Sensitivität aufweist (KÖHLER et al. 2008a).

Im ELISA der Fa. IDVet zeigten nahezu alle Milchprobenpools bei einem CutOff von 35 % (verdächtig) beziehungsweise 45 % (positiv) einen Nachweis von Antikörpern gegen MAP (Tabelle 20). Die in der Studie als Paratuberkulose-negativ geführten Betriebe zeigten Ergebnisse mit stark positiven Werten. Die S/P-Werte im ELISA ließen sich nicht von S/P-Werten aus Betrieben mit klinischen Paratuberkulosefällen unterscheiden. Eine Anpassung der CutOff-Werte konnte die Ergebnisse nicht korrigieren. Die Auswertung des ELISAs der Fa. LDL ergab ähnliche Probleme. Auch hier waren die Ergebnisse der negativen Referenzbetriebe nicht von Betrieben mit klinischen Paratuberkulosefällen zu unterscheiden.

Gepoolte und mit dem Aufkonzentrierungskit *Cattletype Milk Prep (LDL)* aufbereitete Milchproben erlaubten in beiden ELISAs keine verlässliche Aussage zum Prävalenzstatus der Herde. Im Gegensatz dazu zeigte diese Aufbereitungsmethode bei der Untersuchung von BHV1-Proben aus geimpften Betrieben gute Ergebnisse. Alle Milchpools aus BHV1-freien Herden wurden negativ auf BHV1-gE-Antikörper getestet (HORNER 2012).

Auffällig bei der vorliegenden Untersuchung waren die stark erhöhten Testergebnisse in den negativen Referenzbetrieben. Dafür kommen mehrere Gründe in Betracht: Eventuell vorhandene atypische Mycobakterien könnten die Reaktion stören. Bei der makroskopischen Untersuchung der Kulturen waren jedoch keine beziehungsweise nur sehr wenige atypische Mycobakterien sichtbar. Ebenso könnten bakterielle Sekundärkontaminationen ein falsch-positives Ergebnis

hervorrufen. Bestand K beispielsweise zeigte sehr wenige Kontaminationen und keine atypischen Mycobakterien und war im ELISA beider Testkits stark positiv auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP. Nach DONAT et al. (2012) sind die Spezifitäten der zur Verfügung stehenden Testsysteme von 96,8 % bis 98,6 % nur suboptimal. Eine nicht 100 %ige Spezifität des Testsystems führt zu falsch positiven Ergebnissen. Möglicherweise verursachten die in der vorliegenden Studie verwendeten aufkonzentrierten Proben eine Aufpotenzierung der unspezifischen serologischen Reaktionen. Eventuell sind die Tests noch nicht optimal auf den Erreger MAP abgestimmt. Möglicherweise befindet sich im Aufbereitungskit ein Inhaltsstoff (ein Protein oder ähnliches), der „falsch“ an MAP gebunden wird und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Diese Annahmen sind Spekulation und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Es konnte keine signifikante Beziehung zwischen Einzeltierprävalenz und ELISA-Ergebnissen der zu 25 oder zu 50 Tieren gepoolten Milchproben festgestellt werden (Tabelle 19). Auf weiterführende Vergleiche untereinander, beziehungsweise mit den Umgebungskotprobenergebnissen und den Befunden der Stichprobenuntersuchung wurde verzichtet.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist die Anwendung der in der Studie verwendeten serologischen Methode in der Routinediagnostik der Paratuberkulose, so wie es für die BHV1-Diagnostik geplant ist (persönliche Mitteilung, Martin Beer, Jena, 10. März 2012), gegenwärtig nicht zu empfehlen.

5.4 Schlussfolgerung

In Tabelle 20 sind alle Ergebnisse der Studie getrennt nach Betrieben gegenübergestellt. Betriebe mit negativen Einzeltierproben zeigten positive ELISA-Befunde, nicht jedoch einen positiven Nachweis von MAP in den Umgebungskotproben oder Stichproben.

Die kulturelle Untersuchung im Frühjahr entnommener Umgebungskotproben im Abkalbebereich, Melkbereich einschließlich Vorwarte Hof, Haupttriebweg, Laufbereich und Übergangsbereich zu den Kälbern je Bestand detektiert Betriebe mit einer Einzeltierprävalenz über 4,5 % zu 90 %. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich somit

Herden mit einer Prävalenz von 4,5 % mit hinreichender Sicherheit auffinden. Für eine Überwachung unverdächtiger Herden ist die Sensitivität dieses Untersuchungsansatzes jedoch zu gering.

Auf Grund starker Kontamination durch Fremdflora ist die Untersuchung von Umgebungskotproben im Sommer nicht zu empfehlen.

Die retrospektiven Untersuchungen einer entsprechend den Testeigenschaften und der geforderten Mindestsicherheitswahrscheinlichkeit kalkulierten systematischen Stichprobe nach CAMERON und BALDOCK (1998) zeigt eine bessere Detektionsrate als die Untersuchung von Umgebungskotproben. 93,7 % der Herden wurden mittels Stichprobenuntersuchung detektiert, lediglich ein Bestand mit nur einem Ausscheider wurde nicht als MAP-positiv identifiziert. Damit zeigte dieser Untersuchungsansatz eine ausreichend hohe Sensitivität, um bei der Überwachung größerer unverdächtiger Herden eingesetzt werden zu können.

Keine der bei der kulturellen Einzeltierkotprobenuntersuchung als MAP-negativ klassifizierten Herden zeigte MAP-positive Umgebungskotprobenbefunde oder MAP-positive Stichprobenergebnisse. Daraus leitet sich eine hohe Spezifität der beiden Untersuchungsansätze ab.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der aufbereiteten Milchpools wichen stark von den ermittelten Einzeltierprävalenzen ab. Zunächst zu 25 und zu 50 Tieren gepoolte Milchproben erzielten nach Aufkonzentrierung und serologischer Aufbereitung durch zwei verschiedene ELISA-Testsysteme keine nutzbaren Ergebnisse. Paratuberkulose-negative Herden erreichten in den Untersuchungen der Milchpools Werte mit stark positiver Antikörperreaktion. Ein Einsatz dieser Methodik zur Bewertung von Beständen zur Ermittlung des MAP-Infektionsstatus ist gegenwärtig nicht zu empfehlen.

Für die Überwachung größerer anerkannt unverdächtiger Bestände ist somit ein wechselnder Einsatz von Einzeltierkotproben aller Rinder über 24 Monaten und einer aussagekräftigen systematischer Stichprobenuntersuchung möglich und trägt damit zur Erleichterung der derzeit noch zeit- und kostenintensiven Paratuberkulose-Diagnostik bei. Die Untersuchung von Umgebungskotproben ist geeignet, sich einen Überblick über die Verbreitung von MAP im Betrieb zu verschaffen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Julia Kube

Vergleich verschiedener Methoden zur Identifizierung Paratuberkulose-positiver Rinderherden

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im August 2013

(86 Seiten, 22 Tabellen, acht Abbildungen, zwei Formeln, 164 Literaturstellen, zwei Seiten Anhang)

Schlüsselwörter: Paratuberkulose, Umgebungskotproben, Kotkultur, Stichproben

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Screening-Methoden zu prüfen, um auf einfache, kostensparende Weise und mit ausreichender statistischer Sicherheit festzustellen, ob der Erreger der Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*) in einer Herde vorhanden ist oder nicht. Dazu wurden zwei auf dem kulturellen Erregernachweis beruhende Verfahren, die Untersuchung individueller Kotproben auf der Basis von Stichproben und die Untersuchung von Umgebungskotproben, einem serologischen Untersuchungsansatz, dem Nachweis von MAP-Antikörpern nach Aufkonzentrierung in gepoolten Einzelmilchproben, gegenübergestellt. Als Referenzmethode diente die kulturelle Einzeltieruntersuchung aller über 24 Monate alten Tiere des jeweiligen Bestandes.

In 20 Thüringer Milchviehherden mit bekannter Einzeltierprävalenz wurden 5063 Einzeltierkotproben, 200 Umgebungskotproben und 262 aufkonzentrierte Milchpools aus 4337 laktierenden Rindern untersucht. Zusätzlich wurde eine systematische retrospektive Stichprobenkalkulation ($n_{\text{Stichprobe}} = 1458$ Einzeltierkotproben) vorgenommen. Die Kultivierung der Einzeltierkotproben und der Umgebungskotproben erfolgte über 12 Wochen auf HEYM-Nährmedium mit anschließender Speziesidentifizierung durch PCR und Ziehl-Neelsen-Färbung. Die Umgebungskotproben wurden zu zwei Untersuchungszeitpunkten (Frühjahr und Sommer) an jeweils fünf Lokalisationen eines Betriebes entnommen: Abkalbbereich, Melkbereich einschließlich Vorwartehof, Laufbereich,

Haupttriebweg, Übergang zum Kälberbereich. Die Untersuchung der Milchpools erfolgte nach vorheriger Aufkonzentrierung mittels zweier verschiedener ELISAs.

Im Frühjahr entnommene Umgebungskotproben aus 16 MAP-positiven Betrieben detektierten das Vorhandensein des Erregers in neun Betrieben (56,3 %). Betriebe mit einer Einzeltierprävalenz von über 4,5 % wurden in neun von zehn Fällen (90 %) sicher erkannt. Im Sommer entnommene Umgebungskotproben fielen durch eine sehr starke Kontamination auf. Von den 16 MAP-positiven Beständen wurden 15 Herden (93,7 %) mittels Stichprobenuntersuchung als Bestand mit Paratuberkulosevorkommen identifiziert, wobei lediglich ein Bestand mit einer Einzeltierprävalenz von 0,49 % nicht detektiert wurde. Die serologische Untersuchung der Milchpools lieferte keine verwendbaren Ergebnisse.

Mit Hilfe der Untersuchung von Umgebungskotproben lassen sich Herden mit einer durch kulturelle Untersuchung ermittelten Einzeltierprävalenz von 4,5 % und darüber mit hinreichender Sicherheit auffinden. Bei der Bewertung dieses Schwellenwertes ist zu beachten, dass bei Verwendung von nur einem Kulturröhrchen je Kotprobe von einer Sensitivität der Methode von 60 % im Vergleich zur Verwendung von drei Kulturröhrchen auszugehen ist. Für eine Überwachung unverdächtiger Herden ist die Sensitivität dieses Untersuchungsansatzes jedoch zu gering. Die individuelle kulturelle Untersuchung einer Stichprobe zeigte eine ausreichend hohe Sensitivität, um bei der Überwachung größerer unverdächtiger Herden eingesetzt werden zu können.

Ein Einsatz serologischer Milchuntersuchung ist zur Bewertung von Beständen zur Ermittlung des MAP-Infektionsstatus gegenwärtig nicht zu empfehlen. Für die Überwachung größerer, als Paratuberkulose-unverdächtig anerkannter Bestände ist somit ein wechselnder Einsatz von Einzeltierkotproben aller Rinder über 24 Monaten und einer aussagekräftigen systematischer Stichprobenuntersuchung möglich und trägt damit zur Erleichterung der derzeit noch zeit- und kostenintensiven Paratuberkulose-Diagnostik bei.

7 SUMMARY

Julia Kube

Comparison of various methods to identify paratuberculosis affected cattle herds

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in August 2013

(86 pages, 22 tables, eight figures, two formulas, 164 references, two pages appendix)

Keywords: Paratuberculosis, environmental samples, cultivation of fecal, random samples

The study focuses on three diagnostic tests which determine *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in order to identify a highly reliable disease control which is at the same time cost-effective and labor-efficient. Two methods involved the collection and culturing of samples (random fecal and environmental) for MAP. A third was based on the detection of antibody response to MAP in milk. For comparison individual animal fecal tests of all cattle older than 24 months of the same animal population was carried out.

A total of 5063 fecal samples, 200 environmental samples and 262 samples banks of 4337 individual milk samples of 20 Thuringian (Germany) herds were collected and analyzed. Furthermore a random fecal examination (n = 1458 fecal samples) were carried out. After twelve weeks cultivation on HEYM-medium positive samples were further characterized by PCR and Ziehl-Neelsen stain. The collection of environmental samples took place twice (spring and summer) each at five designated areas per farm: calving area, milking area, floor of lactating cows, main crossover area and the crossover to the calf area. Two different ELISAs were used to test milk samples.

In spring 9 out of 16 MAP-positive farms were detected by environmental cultures (56.3 %). Herds with prevalence above 4.5 % were identified in 9 out of 10 cases (90 %). In contrast to that samples taken in summer showed a strong contamination.

Summary

The random fecal samples identified 15 out of the 16 MAP–positive herds (93.7 %). Whereas the ratios of the number of occurrences in the one herd not detected gained 0.49 %. The ELISA tests did not show any reliable data.

Tests based on environmental samples lack sensitivity and can only be applied to herds with prevalence of 4.5 % or above. Random fecal samples are therefore necessary here as well as in huge herds. Keep in mind, samples just above or just below the cut–off point might show the opposite result when retested. Sensitivity is 60 % on single bovine fecal sample compared to a cultivation of one fecal sample in three separate tubes as recommend.

The use of ELISA cannot be recommended at present. In conclusion it can be said that in order to be less costly and less time–consuming vast herds with no previous evidence of Johne’s disease can only be screened by a combination of random fecal and individual fecal examinations of all cattle older than 24 months.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aly SS, Thurmond MC. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection of dairy cows attributable to infection status of the dam. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 227(3): 450–4.

Animal Health Committee (AHC) 2011. National Johne's Disease Program – Standard Definitions and Rules for Cattle and for goats, deer and camelids infected with cattle strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Edition 7B vom April 2011 (zitiert vom 8.12.2011): 1–46, <<http://www.animalhealthaustralia.com.au/programs/johnes-disease/national-johnes-disease-control-program-njdcp>>.

Balseiro A, García Marín JF, Solano P, Garrido JM, Prieto JM. Histopathological classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in free-ranging fallow deer (*Dama dama*). *J Comp Pathol.* 2008; 138(4): 180–8.

Bastida F, Juste RA. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2011; 9: 8.

Baumgartner W, Khol JL. Paratuberculosis – potentials and limits of control programs. *Proceedings of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress; 2008 Jul 6–11; Budapest; Hungary. Budapest: Magyar Állatorvosok Lapja vol 130 Suppl I; 2008. Seite 7–10.*

Benazzi S, el Hamidi M, Schliesser T. Paratuberculosis in sheep flocks in Morocco: a serological, microscopical and cultural survey. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1996; 43(4): 213–9.

Benedictus A, Mitchell RM, Linde–Widmann M, Sweeney R, Fyock T, Schukken YH, Whitlock RH. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev Vet Med.* 2008; 83(3–4): 215–27.

Benedictus G, Verhoeff J, Schukken YH, Hesselink JW. Dutch paratuberculosis programme history, principles and development. *Vet Microbiol.* 2000; 77(3–4): 399–413.

Berghaus RD, Farver TB, Anderson RJ, Jaravata CC, Gardner IA. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *J Dairy Sci.* 2006; 89(3): 963–70.

Bermudez LE, Petrofsky M, Sommer S, Barletta RG. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect Immun.* 2010; 78(8): 3570–7.

Bihrmann N, Nielsen SS, Toft N, Ersbøll AK. Spatial differences in occurrence of *paratuberculosis* in Danish dairy herds and in control programme participation. *Prev Vet Med.* 2012; 103(2–3): 112–9.

Bolton MW, Pillars RB, Kaneene JB, Mauer WA, Grooms DL. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally exposed dairy heifers and associated risk factors. *J Dairy Sci.* 2011; 94(9): 4669–75.

Botsaris G, Slana I, Liapi M, Dodd C, Economides C, Rees C, Pavlik I. Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. *Int J Food Microbiol.* 2010; 141: 87–90.

Boulais C, Wacker R, Augustin JC, Cheikh MH, Peladan F. Modeling the occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk raw milk and the impact of management options for exposure mitigation. *J Food Prot.* 2011; 74(7): 1126–36.

Brees DJ, Reimer SB, Cheville NF, Florance A, Thoen CO. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *J Vet Diagn Invest.* 2000; 12(1): 60–3.

Bülte M, Schönenbrücher H, Abdulmawjood A. From farm to fork– *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) als Zoonoseerreger? *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2005; 118(9–10): 377–385.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 2005. Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien) vom 17.1.2005. (zitiert vom 20.10.2011): 1–11, <http://www.animal-health-online.de/gross/wp-content/uploads/2005/02/Paratuberkulose-Leitlinien_17012005.pdf>.

Cameron AR, Baldock FC. A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev Vet Med.* 1998; 34(1): 1–17.

Carvalho IA, Silva A Jr, Campos VE, Moreira MA. Short communication: detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. *J Dairy Sci.* 2009; 92(11): 5408–10.

Cerf O, Griffiths M, Aziza F. Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in commercially pasteurized milk. *Foodborne Pathog Dis.* 2007; 4(4): 433–47.

Cetinkaya B, Erdogan HM, Morgan KL. Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Vet Rec.* 1998; 143(10): 265–9.

Chartier C, Mercier P, Pellet MP, Vialard J. Effect of an inactivated paratuberculosis vaccine on the intradermal testing of goats for tuberculosis. *Vet J.* 2012; 191(3): 360–3.

Collins MT, Eggleston V, Manning EJ. Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. *J Dairy Sci.* 2010; 93(4): 1638–43.

Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, Conrad TA, Thomas CB, Carr DJ. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc.* 1994; 204(4): 636–41.

Corn JL, Manning EJ, Sreevatsan S, Fischer JR. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(11): 6963–7.

Cossu D, Cocco E, Paccagnini D, Masala S, Ahmed N, Frau J, Marrosu MG, Sechi LA. Association of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with multiple sclerosis in Sardinian patients. *PLoS One.* 2011; 6(4): e18482.

Crawford GC, Ziccardi MH, Gonzales BJ, Woods LM, Fischer JK, Manning EJ, Mazet JA. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subsp. avium infections in a tule elk (*Cervus elaphus nannodes*) herd. *J Wildl Dis.* 2006; 42(4): 715–23.

Denzin N, Gehrman B, Ewert B, Rohde H. Estimation of the prevalence at animal level of paratuberculosis in female cattle of Saxony–Anhalt (Germany). *Veterinary Science Development* (ISSN 2038–9701). 2011; 1(e10): 42–46.

Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuán ML, Vilar MJ, López M, Yus E. Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev Vet Med*. 2007; 82(3–4): 321–6.

Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, de Juan L, Stratmann J, Kapur V, Bull TJ, Gerlach GF. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(11): 5215–23.

Donat K, Eulenberger K, Kämpfer P. Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in sächsischen Rinderbeständen. *Tierärztl Umschau*. 2005; 60(9): 497–501.

Donat K, Schau U, Soschinka A, Köhler H. Untersuchungen zur Herdenprävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderbeständen mithilfe serologischer Testverfahren: Möglichkeiten, Grenzen und Kosten. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2012; 125 (9/10) 10–9.

Donat K, Schau U, Soschinka A. Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mithilfe von Umgebungskotproben. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2011; 124(9–10), 360–7.

Donat K. Umsetzung des Thüringer Paratuberkulose–Landesprogrammes auf der Basis des Erregernachweises – ein Zwischenbericht. Tagungsbericht des 7. Stendaler Symposiums zur BHV 1–, BVD–, BTV– und Paratuberkulose–Bekämpfung; 2009 März 11–13; Stendal, Deutschland. Stendal: Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen–Anhalt; 2009.

Eisenberg SWF, Koets AP, Hoeboer J, Bouman M, Heederik D, Nielen M. Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Environmental Samples Collected on Commercial Dutch Dairy Farms. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(18): 6310–2.

Eltholth MM, Marsh VR, Van Winden S, Guitian FJ. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J Appl Microbiol.* 2009; 107(4): 1061–71.

Englund S, Ballagi–Pordány A, Bölske G, Johansson KE. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 33(3): 163–71.

Failing K, Wolter W, Hassan A, Zschöck M. Paratuberkulose in hessischen Milcherzeugerbetrieben – Planung, Auswertung und Resultate einer Querschnittsstudie. Tagungsband der DACH–Epidemiologietagung 2012 zur Früherkennung und Überwachung neu auftretender Krankheiten; 2012 Sep 5–7; Neuruppin, Deutschland. Gießen: Verlag der DVG–Service GmbH; 2012.

Favila–Humara LC, Chávez–Gris GG, Carrillo–Casas EM, Hernández–Castro R. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(4): 351–5.

Feller, M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn’s disease: a systematic review and meta–analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(9): 607–13.

Fernández–Silva JA, Abdulmawjood A, Bülte M. Diagnosis and Molecular Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Dairy Cows in Colombia. *Vet Med Int.* 2011; 352561: 1-12.

Ferreira R, Fonseca LS, Lilenbaum W. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine *paratuberculosis* in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 2002; 35(3): 173–5.

Ferrouillet C, Wells SJ, Hartmann WL, Godden SM, Carrier J. Decrease of Johne’s disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long–term management program. *Prev Vet Med.* 2009; 88(2): 128–37.

Friedrich–Loeffler–Institut (FLI) 2010. Amtliche Methodensammlung des Friedrich Löffler Instituts, Stand Juli 2010 (zitiert vom 17.6.2012): 271–285,

<http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Methodensammlung_2010-07-07.pdf>.

Friedrich–Loeffler–Institut (FLI) 2011. Liste der nach §17 c TierSG zugelassenen Mittel, Stand 2011–11–24 (zitiert vom 30.11.2011): 7, <www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf>.

Gaunitz C, Schroeder C, Buerger N, Engemann C, Gabert J. New diagnostic approaches of testing for Infectious bovine rhinotracheitis (IBR). 2010 (zitiert vom 1.5.2012): 1–30, <http://www.lab-leipzig.de/fileadmin/user_upload/downloads/Publikationen/2010_Gaunitz_IBR_BHV1.pdf>.

Geisbauer E, Khol JL, Wassertheurer M, Damoser J, Österreicher E, Dünser M, Revilla–Fernández S, Baumgartner W. Longterm investigation in an Austrian dairy herd with low prevalence of paratuberculosis detection of antibodies in blood and milk. *Vet Q.* 2007; 29(4): 138–48.

Geue L, Köhler H, Klawonn W, Dräger K, Hess RG, Conraths FJ. Untersuchungen zur Eignung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Tankmilchproben aus Rheinland–Pfalz. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2007; 120(1–2): 67–78.

Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio MN, Arrigoni N, Piva S, Florio D, Riu R, Zanoni RG. Sale of raw milk in northern Italy: food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9(4): 293–7.

Gierke F. Ermittlung von Einflussfaktoren auf die intra vitam Diagnostik der Paratuberkulose [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität Berlin, veterinärmedizinische Fakultät; 2009.

Gill CO, Saucier L, Meadus WJ. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *J Food Prot.* 2011; 74(3): 480–99.

- Glanemann B, Schönenbrücher H, Bridger N, Abdulmawjood A, Neiger R, Bülte M. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. *J Vet Intern Med.* 2008; 22(5): 1090–4.
- Groenendaal H, Nielen M, Hesselink JW. Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model. *Prev Vet Med.* 2003; 60(1): 69–90.
- Hacker U, Hüttner K, Konow M. Untersuchung zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2004; 117(3–4): 140–4.
- Hendrick S, Duffield T, Leslie K, Lissemore K, Archambault M, Kelton D. The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds in Ontario. *Can Vet J.* 2005a; 46(12): 1126–9.
- Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Duffield TF. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.* 2005b; 227(8): 1302–8.
- Hinger M, Brandt H, Erhardt G. Heritability estimates for antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in German Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 2008; 91(8): 3237–44.
- Hinger M. Untersuchung genetischer Ursachen der unterschiedlichen Empfänglichkeit für die Paratuberkulose des Rindes an Hand von Mikrosatelliten und Kandidatengenanalysen [Dissertation med. vet]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen, 2009.
- Hoe FG, Ruegg PL. Opinions and Practices of Wisconsin Dairy Producers About Biosecurity and Animal Well-Being. *J Dairy Sci.* 2006; 89(6): 2297–308.
- Hoffmann D, Gangl A, Meier N, Böttcher J. Die kulturelle Untersuchung von Umgebungsproben auf *M. avium* ssp. paratuberculosis. Tagungsbericht des 7. Stendaler Symposiums zur BHV 1-, BVD-, BTV- und Paratuberkulose-Bekämpfung; 2009 März 11–13; Stendal, Deutschland. Stendal: Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt; 2009.

Holzmann CB, Jorge MC, Traversa MJ, Schettino DM, Medina L, Bernardelli A. A study of the epidemiological behaviour of bovine paratuberculosis using time series in Tandil in the province of Buenos Aires, Argentina. *Rev Sci Tech.* 2004; 23(3): 791–9.

Horner S: BHV1 gE–Untersuchung in der Pool–Milch – was ist möglich? Tagungsbericht des 8. Stendaler Symposiums zur Diagnostik und Bekämpfung von Tierseuchen und anderen bedeutenden Infektionskrankheiten bei Rindern; 2012 Mai 9–11; Stendal, Deutschland. Stendal: Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen–Anhalt; 2012.

Hutchinson LJ. Economic impact of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1996; 12(2): 373–81.

Juste RA, Alonso–Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla A, Garrido JM. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in field trial. *BMC Res Notes.* 2009; 2: 233.

Kalis CH, Hesselink JW, Barkema HW, Collins MT. Use of long–term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in dairy herds. *Am J Vet Res.* 2001; 62(2): 270–4.

Kaur P, Folia G, Singh SV, Patil PK, Ravi Kumar GV, Sandhu KS. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: IS900 PCR identification and IS1311 polymorphism analysis from ruminants in the Punjab region of India. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis.* 2011; 34(2): 163–9.

Kennedy D. International efforts at paratuberculosis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011; 27(3): 647–54.

Khare S, Ficht TA, Santos RL, Romano J, Ficht AR, Zhang S, Grant IR, Libal M, Hunter D, Adams LG. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation–conventional PCR and real–time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3): 1075–81.

Khol JL, Damoser J, Dünser M, Baumgartner W. Paratuberculosis, a notifiable disease in Austria – current status, compulsory measures and first experiences. *Prev Vet Med.* 2007; 82(3–4): 302–7.

Klawonn W, Dräger KG, Köhler H, Labohm R. Einfluss der Paratuberkulose–Infektion und –Impfung auf den Intradermaltest mit Johnin, aviärem und Rindertuberkulin. Tagungsbericht des 7. Stendaler Symposiums zur BHV 1–, BVD–, BTV– und Paratuberkulose–Bekämpfung; 2009 März 11–13; Stendal, Deutschland. Stendal: Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen–Anhalt; 2009.

Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Nishiguchi A. Epidemiologic indicators associated with within–farm spread of Johne’s disease in dairy farms in Japan. *J Vet Med Sci.* 2007; 69(12): 1255–8.

Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, Martin G. Evaluierung von fünf ELISA Kits zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* im Serum von Rindern. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2008a; 121: 203–210.

Köhler H, Geue L, Conraths J. Zur Paratuberkulose–Situation in Deutschland. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle.* 2003; 10: 41–44.

Köhler H, Gierke F, Möbius P. Paratuberculosis–current concepts and future of the diagnosis. *Proceedings of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress;* 2008 Juli 6–11; Budapest; Hungary. Budapest: Magyar Állatorvosok Lapja vol 130 Suppl I; 2008b. Seite 67–69.

Köhler H, Möbius P. Paratuberkulose. *Tiergesundheitsjahresbericht 2010.* 11. Jahrgang 2011 (zitiert vom 16.08.2012): 66–67, Herausgeber: Friedrich–Loeffler–Institut, Greifswald Insel Riems, ISSN 1867–9374, <http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2010.pdf>.

Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S. Economy, efficacy, and feasibility of a risk–based control program against paratuberculosis. *J Dairy Sci.* 2008; 91(12): 4599–609.

Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S. Strategies for time of culling in control of paratuberculosis in dairy herds. *J Dairy Sci.* 2011; 94(8): 3824–34.

Kudahl AB, Nielsen SS. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2009; 92(9): 4340–6.

Küpper J, Brandt H, Donat K, Erhardt G: Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis status of German Holstein cows tested by fecal culture. *J Dairy Sci.* 2012; 95(5): 2734–9.

Larsen AB, Merkal RS, Vardaman TH. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 1956; 17(64): 549–51.

Lei L, Plattner BL, Hostetter JM. Live *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and a killed–bacterium vaccine induce distinct subcutaneous granulomas, with unique cellular and cytokine profiles. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15(5): 783–93.

Lepper AW, Wilks CR, Kotiw M, Whitehead JT, Swart KS. Sequential bacteriological observations in relation to cell–mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust Vet J.* 1989; 66(2): 50–5.

Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry FB, Salman MD. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis distribution and herd infection status on US dairy operations. *J Dairy Sci.* 2006; 89(11): 4163–71.

Lombard JE. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011; 27(3): 525–35.

Lu Z, Mitchell RM, Smith RL, Van Kessel JS, Chapagain PP, Schukken YH, Grohn YT. The importance of culling in Johne’s disease control. *J Theor Biol.* 2008; 254(1):135–46.

Manning EJ, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech.* 2001; 20(1): 133–50.

Marcé C, Beaudéau F, Bareille N, Seegers H, Fourichon C. Higher non–return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology.* 2009; 71(5): 807–16.

Marcé C, Ezanno P, Seegers H, Pfeiffer DU, Fourichon C. Predicting fadeout versus persistence of paratuberculosis in a dairy cattle herd for management and control purposes: a modeling study. *Vet Res.* 2011; 42(1): 36.

McKenna SLB, Keefe GP, Barkema HW, McClure J, VanLeeuwen JA, Hanna P, Sockett DC. Cow-level prevalence of paratuberculosis in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine. *J Dairy Sci.* 2004; 87(11): 3770–7.

McKenna SLB, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J, Barkema HW. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can Vet J.* 2006a; 47(11): 1089–99.

McKenna SLB, Sockett DC, Keefe GP, McClure J, VanLeeuwen JA, Barkema HW. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17(5): 463–6.

McKenna SLB, VanLeeuwen JA, Barkema HW, Jansen JT, Hauer G, Hendrick SH, Côte G, Salsberg EB, Empringham RE. Proposed Canadian Voluntary National Johne's Disease Prevention and Control Program. *Can Vet J.* 2006b; 47(6): 539–541.

Metzger-Boddien C, Khaschabi D, Schönbauer M, Boddien S, Schleder T, Kehle J. Automated high-throughput immunomagnetic separation-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk. *Int J Food Microbiol.* 2006; 110(3): 201–8.

Michel AL, Bastianello SS. Paratuberculosis in sheep: an emerging disease in South Africa. *Vet Microbiol.* 2000; 77(3–4): 299–307.

Möbius P, Hotzel H, Rassbach A, Köhler H. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 2008; 126(4): 324–33.

Münster P, Völkel I, Wemheuer W, Petschenka J, Wemheuer W, Steinbrunn C, Campe A, Schulz-Schaeffer WJ, Kreienbrock L, Czerny CP. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in ileocaecal lymph nodes collected from

elderly slaughter cows using a semi-nested IS900 polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 2011; 154(1–2): 197–201.

Muskens J, Barkema HW, Russchen E, van Maanen K, Schukken YH, Bakker D. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet Microbiol.* 2000; 77(3–4): 253–61.

Muskens J, van Zijderveld F, Eger A, Bakker D. Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet Microbiol.* 2002; 86(3): 269–78.

Nielsen SS, Krogh MA Enevoldsen C. Time to the occurrence of a decline in milk production in cows with various paratuberculosis antibody profiles. *J Dairy Sci.* 2009a; 92(1): 149–55.

Nielsen SS, Toft N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med.* 2009b; 88(1): 1–14.

Nielsen SS, Toft N. Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models. *Prev Vet Med.* 2007; 81(4): 306–17.

Nielsen SS, Toft N. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *J Dairy Sci.* 2011; 94(4): 1849–57.

Norton S, Johnson O, Jones G, Heuer C. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease (*Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis) in New Zealand dairy cows. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22(3): 341–51.

O'Reilly CE, O'Connor L, Anderson W, Harvey P, Grant IR, Donaghy J, Rowe M, O'Mahony P. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(9): 5138–44.

Ocepek M, Pogačnik M, Logar K, Ferme D, Pate M, Krt B. Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Slovenia. *Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis; 2009 Aug 9–14; Minneapolis, Minnesota.*

<<http://www.paratuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/907-506-1-PB.pdf>>

(Zugriff vom 16.08.2012), Seite 73–75.

Okura H, Toft N, Nielsen SS. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk at dairy cattle farms: a systematic review and meta-analysis. *Vet Microbiol.* 2012; 157(3–4): 253–63.

Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med.* 1999; 40(3–4): 179–92.

Paling RW, Waghela S, Macowan KJ, Heath BR. The occurrence of infectious diseases in mixed farming of domesticated wild herbivores and livestock in Kenya. II. Bacterial diseases. *J Wildl Dis.* 1988; 24(2): 308–16.

Paolicchi FA, Zumarraga MJ, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano M. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003; 50(1): 20–6.

Patel A, Shah N. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis—incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011; 44(6): 473–9.

Patton EA. Paratuberculosis vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011; 27(3): 573–80.

Pieterse MC, Eisenberg SW, Folmer GE, Liggett S, Griffin JF, Koets AP, Nielen M. Evidence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in Dutch farmed red deer. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2010; 135(23): 886–90.

Pillars RB, Grooms DL, Kaneene JB. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Can Vet J.* 2009a; 50(10): 1039–46.

Pillars RB, Grooms DL, Woltanski JA, Blair E. Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as determined by environmental sampling. *Prev Vet Med.* 2009b; 89(3–4): 191–6.

Pithua P, Wells SJ, Sreevatsan S, Godden SM. Lack of evidence for fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in calves born to fecal culture positive dams. *Prev Vet Med.* 2010; 93(2–3): 242–5.

Pozzato N, Capello K, Comin A, Toft N, Nielsen SS, Vicenzoni G, Arrigoni N. Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. *Prev Vet Med.* 2011; 102(1): 83–6.

Raizman EA, Espejo LA, Wells SJ. Long–Term Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fecal Samples Obtained from Naturally Infected Cows and Stored at –18° and –70°C. *Vet Med Int.* 2011b; 3 41691.

Raizman EA, Fetrow JP, Wells SJ. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci.* 2009; 92(10): 4929–36.

Raizman EA, Habteselassie MY, Wu CC, Lin TL, Negron M, Turco RF. Leaching of *Mycobacterium avium* Subsp *paratuberculosis* in Soil under In Vitro Conditions. *Vet Med Int.* 2011c; 506239.

Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Bey RF, Oakes MJ, Bentley DC, Olsen KE. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci.* 2004; 87(9): 2959–66.

Raizman EA, Wells SJ, Muñoz–Zanzi CA, Tavoranpanich S. Estimated within–herd prevalence (WHP) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a sample of Minnesota dairy herds using bacterial culture of pooled fecal samples. *Can J Vet Res.* 2011a; 75(2): 112–6.

Ris DR, Hamel KI, Ayling JM. The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. *N Z Vet J.* 1988; 36(3): 112–4.

Ristow P, Marassi CD, Rodrigues AB, Oelemann WM, Rocha F, Santos AS, Carvalho EC, Carvalho CB, Ferreira R, Fonseca LS, Lilenbaum W. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. *Vet J.* 2007; 174(2): 432–4.

Rohde RF, Shulaw WP. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1990; 197(11): 1482–3.

Salem M, Zeid AA, Hassan D, El-Sayed A, Zschoeck M. Studies on Johne's disease in Egyptian cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52(3): 134–7.

Salgado M, Collins MT, Salazar F, Kruze J, Bölske G, Söderlund R, Juste R, Sevilla IA, Biet F, Troncoso F, Alfaro M. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after application of contaminated dairy cattle manure to agricultural soils. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(6): 2122–9.

Salgado M, Herthnek D, Bölske G, Leiva S, Kruze J. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from wild guanacos (*Lama guanicoe*) on Tierra del Fuego Island. *J Wildl Dis.* 2009; 45(2): 295–301.

Santema W, Rutten V, Koets A. Bovine paratuberculosis: recent advances in vaccine development. *Vet Q.* 2011; 31(4): 183–91.

Secott TE, Lin TL, Wu CC. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect Immun.* 2004; 72(7): 3724–32.

Shankar H, Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Greenstein RJ. Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *Int J Infect Dis.* 2010; 14(2): e121–6.

Siggurdardóttir OG, Bakke-McKellep AM, Dønne B, Evensen O. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2005; 28(3): 223–30.

Singh AV, Singh SV, Singh PK, Sohal JS, Singh MK. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* ('Indian bison type') in animal attendants suffering from gastrointestinal complaints who work with goat herds endemic for Johne's disease in India. *Inf J Infect Dis.* 2011; 15(10): e677–83.

Slana I, Kralik P, Kralova A, Babak V, Pavlik I. Short communication: Examination of milk filters by real-time PCR as a herd-level indicator of the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. *J Dairy Sci.* 2012; 95(3): 1162–5.

Smith RL, Schukken YH, Pradhan AK, Smith JM, Whitlock RH, Van Kessel JS, Wolfgang DR, Grohn YT. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Prev Vet Med.* 2011a; 102 (1): 1–9.

Smith SI, West DM, Wilson PR, de Lisle GW, Collett MG, Heuer C, Chambers JP. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in skeletal muscle and blood of ewes from a sheep farm in New Zealand. *N Z Vet J.* 2011b; 59(5): 240–3.

Sohal JS, Singh SV, Subhodh S, Singh AV, Singh PK, Sheoran N, Sandhu K, Narayansamy K, Maitra A: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* diagnosis and strain typing – Present status and future developments. *Indian J Exp Biol.* 2007; 45(10): 843–852.

Sorge US, Lissemore K, Godkin A, Jansen J, Hendrick S, Wells S, Kelton DF. Changes in management practices and apparent prevalence on Canadian dairy farms participating in a voluntary risk assessment-based Johne's disease control program. *J Dairy Sci.* 2011; 94(10): 5227–37.

Stehman SM. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1996; 12(2): 441–55.

Sternberg Lewerin S, Ågren E, Frössling J, Bölske G, Holmström A, Lindberg A, Szanto E, Viske D. Control of paratuberculosis in Sweden. *Book of Abstracts 9th International Colloquium on Paratuberculosis; 2007 Oct 28 – Nov 2; Tsukuba, Japan.* <<http://www.paratuberculosis.info/assets/pdfs/proc9.pdf>> (Zugriff vom 16.08.2012), Seite 86.

Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(5): 1798–804.

Stratmann J, Homuth M, Gerlach GF. Überlegungen zur Kontrolle und Bekämpfung der Paratuberkulose in Milchviehbeständen. Dtsch Tierärztl Wochenschr. 2005; 112(8): 304–6.

Sweeney RW, Whitlock RH, Hamir AN, Rosenberger AE, Herr SA. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. Am J Vet Res. 1992a; 53(8): 1312–4.

Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. Am J Vet Res. 1992b; 53(4): 477–80.

Sweeney RW. Pathogenesis of paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011; 27(3):537–46.

Sweeney RW. Transmission of paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1996; 12(2): 305–12.

Tessema MZ, Koets AP, Rutten VP, Gruys E. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? Vet Q. 2001; 23(4): 153–62.

Tharaldsen J, Dønne B, Fredriksen B, Nyberg O, Siqueroardóttir O. The National Paratuberculosis Program in Norway. Acta Vet Scand. 2003; 44(3–4): 243–6.

Thorne JG, Hardin LE. Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA cattle. Prev Vet Med. 1997; 31(1–2): 51–7.

Thüringer Tierseuchenkasse (TSK): Geschäftsbericht 2010 und Bericht zu den Tiergesundheitsprogrammen für das Jahr 2010. Jena: Thüringer Tierseuchenkasse; 2011.

Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. Can Vet J. 2006; 47(9): 874–882.

United States Department of Agriculture (USDA) 2010. Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program. Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS 91–45–016, 1. September 2010 (zitiert vom 28.11.2011): 1–40,

<http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johne/downloads/johnes-ups.pdf>.

Uzoigwe JC, Khaitisa ML, Gibbs PS. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect.* 2007; 135(7): 1057–68.

Valentin–Weigand P. Intrazelluläre Invasion und Persistenz: Überlebenskonzepte von *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2004; 117(11–12): 459–63.

Valentin–Weigand P. Johne's disease: pathogenesis and problems related to diagnosis. *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine, Keynote Lectures of the XXII World Buiatrics Congress; 2002 Aug 18–23; Hannover, Germany.*

Weber MF, Kogut J, de Bree J, van Schaik G, Nielen M. Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis faecal culture positive. *Prev Vet Med.* 2010; 97(1): 29–36.

Wells SJ, Wagner BA. Herd–level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 216(9): 1450–7.

Wells SJ, Whitlock RH, Wagner BA, Collins J, Garry F, Hirst H, Lawrence J, Saville WJ, Naugle AL. Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. *J Am Vet Med Assoc.* 2002; 220(7): 1053–7.

Whitlock RH, Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1996; 12(2): 345–56.

Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(5): 2989–3004.

Whittington RJ, Sergeant ES. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust Vet J.* 2001; 79(4): 267–78.

Whittington RJ, Windsor PA. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J.* 2009; 179(1): 60–9.

Wilson DJ, Rood K, Biswas P, Byrem TM. Herd-level prevalence of Johne's disease in Utah and adjacent areas of the intermountain west as detected by a bulk-tank milk surveillance project. *J Dairy Sci.* 2010; 93(12): 5792–7.

Windsor PA, Whittington RJ. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J.* 2010; 184(1): 37–44.

World Organisation for Animal Health (OIE). Disease distribution MAPs, Paratuberculosis, Jul–Dec 2011. 2012 (zitiert vom 10.6.2012): <www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseasecontrol/controlmeasuresmap>.

Anhang

Tabelle 21: Befunde der Umgebungskotproben, getrennt nach Frühjahr und Sommer, Lokalisation und Betrieben

	Abkalbebereich				Melkbereich/ Vorweidehof				Haupttriebweg				Laufbereich				Übergang zu den Kälbern			
	Frühjahr		Sommer		Frühjahr		Sommer		Frühjahr		Sommer		Frühjahr		Sommer		Frühjahr		Sommer	
	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur	Primär- kultur	Wiederholungs- kultur
A	-	n. a.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	n. a.	-	n. d.	-	-	-	n. a.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	n. a.
B	-	n. d.	n. a.	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-	n. d.	-	n. a.	-	n. a.	n. a.	-	n. a.	n. a.	n. a.	-
C	-	-	n. a.	n. a.	-	n. d.	-	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-	n. a.	n. a.	n. a.	-
D	-	n. d.	-	-	-	+	n. a.	n. a.	-	n. d.	-	-	-	n. a.	n. a.	-	-	n. d.	-	-
E	-	n. d.	n. a.	-	+	n. d.	n. a.	n. a.	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-	++	n. d.	n. a.	-
F	-	-	+	+	-	n. d.	n. a.	-	+	n. d.	n. a.	-	+	n. d.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.	n. a.
G	-	n. d.	n. a.	n. a.	-	n. d.	n. a.	n. a.	-	-	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.	-
H	-	n. d.	-	-	-	-	n. a.	n. a.	-	n. d.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.	-	-	n. d.	-	-
I	-	-	-	n. a.	+	n. d.	n. a.	-	++++	n. d.	n. a.	-	+	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-
J	-	n. d.	n. a.	-	+	n. d.	-	-	-	n. d.	-	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-
K	-	n. d.	-	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	-	-	-	n. d.	-	-	-	n. d.	-	-
L	n. a.	n. a.	-	-	-	n. d.	-	+	++	n. d.	n. a.	n. a.	-	n. d.	n. a.	-	+	n. d.	-	-
M	-	n. d.	-	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	n. a.	-	-	n. a.	-	-	-	n. a.	n. a.
N	-	n. d.	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-	n. a.	-	-	-	n. d.	n. a.	n. a.
O	-	n. d.	n. a.	-	-	-	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-	n. a.	-
P	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	-	-	n. d.	n. a.	n. a.	-	n. a.	n. a.	n. a.
Q	-	-	n. a.	n. a.	-	-	-	-	-	n. d.	n. a.	n. a.	-	n. d.	-	-	-	-	n. a.	n. a.
R	-	n. d.	-	n. a.	-	n. a.	n. a.	n. a.	++	n. d.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.	-	-	n. a.	-	n. a.
S	-	-	-	n. a.	++++	n. d.	+	n. a.	++++	n. d.	++	-	+++	n. d.	+++	n. a.	-	n. d.	-	n. a.
T	-	-	n. a.	-	+	n. d.	-	++	+	n. d.	-	n. a.	+	n. d.	+++	++	-	n. a.	-	-

+ = positiv, - = negativ, n. a. = nicht auswertbar, n. d. = keine Untersuchung durchgeführt, +/++/+++/++++ = Anzahl der Kreuze beschreibt Quantität positiver

MAP-Nachweise

Anhang

Tabelle 22: Vergleich Untersuchungsansatz mit einem Kulturröhrchen zu Untersuchungsansatz mit drei Kulturröhrchen pro Einzeltierkotprobe, getrennt nach Betrieben

Betrieb	Tierzahl [n]	MAP –								MAP n. a.								MAP +							
		Röhrchen 1		Röhrchen 2		Röhrchen 3		Röhrchen 1 bis 3		Röhrchen 1		Röhrchen 2		Röhrchen 3		Röhrchen 1 bis 3		Röhrchen 1		Röhrchen 2		Röhrchen 3		Röhrchen 1 bis 3	
		[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]
A	224	208	92,9	203	90,6	201	89,7	221	98,7	16	7,1	21	9,4	23	10,3	3	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0
B	297	268	90,2	269	90,6	276	92,9	288	97	22	7,4	22	7,4	17	5,7	0	0	7	2,4	6	2	4	1,3	9	3,0
C	236	223	94,5	216	91,5	219	92,8	225	95,3	8	3,4	13	5,5	14	5,9	1	0,4	5	2,1	7	3	3	1,3	10	4,2
D	255	241	94,5	237	92,9	230	90,2	239	93,7	9	3,5	12	4,7	19	7,5	7	2,7	5	2	6	2,4	6	2,4	9	3,5
E	182	173	95,1	170	93,4	171	94	169	92,9	2	1,1	3	1,6	1	0,5	0	0	7	3,8	9	4,9	10	5,5	13	7,1
F	168	160	95,2	161	95,8	161	95,8	154	91,7	1	0,6	0	0	0	0	0	0	7	4,2	7	4,2	7	4,2	14	8,3
G	150	144	96	142	94,7	141	94	141	94	2	1,3	2	1,3	2	1,3	0	0	4	2,7	6	4	7	4,7	9	6,0
H	198	193	97,5	191	96,5	188	94,9	191	96,5	1	0,5	2	1	5	2,5	0	0	4	2	5	2,5	5	2,5	7	3,5
I	318	304	95,6	302	95	302	95	303	95,3	4	1,3	7	2,2	8	2,5	0	0	10	3,1	9	2,8	8	2,5	15	4,7
J	465	440	94,6	433	93,1	438	94,2	430	92,5	5	1,1	10	2,2	10	2,2	3	0,6	20	4,3	22	4,7	17	3,7	32	6,9
K	211	211	100	211	100	211	100	211	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L	529	515	97,4	516	97,5	507	95,8	512	96,8	4	0,8	6	1,1	16	3	0	0	10	1,9	7	1,3	6	1,1	17	3,2
M	40	40	100	38	95	37	92,5	39	97,5	0	0	2	5	2	5	0	0	0	0	0	0	1	2,5	1	2,5
N	378	353	93,4	350	92,6	356	94,2	364	96,3	17	4,5	19	5	14	3,7	0	0	8	2,1	9	2,4	8	2,1	14	3,7
O	204	204	100	203	99,5	202	99	203	99,5	0	0	1	0,5	1	0,5	0	0	0	0	0	0	1	0,5	1	0,5
P	253	252	99,6	250	98,8	252	99,6	253	100	1	0,4	3	1,2	1	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q	417	414	99,3	415	99,5	414	99,3	416	99,8	3	0,7	2	,5	3	0,7	1	0,20	0	0	0	0	0	0	0	0
R	195	145	74,4	131	67,2	146	74,9	129	66,2	12	6,2	17	8,7	12	6,2	0	0	38	19,5	47	24,1	37	19	66	33,8
S	110	57	51,8	62	56,4	70	63,6	59	53,5	33	30	28	25,5	27	24,5	20	18,2	20	18,2	20	18,2	13	11,8	31	28,2
T	185	163	88,1	158	85,4	170	91,9	163	88,1	3	1,6	9	4,9	2	1,1	0	0	19	10,3	18	9,7	13	7	22	11,9
SUMME	5015	4708		4658		4692		4710		143		179		177		35		164		178		146		270	
MITTEL –WERT			92,5		91,3		92,2		92,3		3,6		4,4		4,2		1,2		3,9		4,3		3,6		6,6

+ = positiv, – = negativ, n. a. = nicht auswertbar, n = Anzahl

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ausgewählte Studien zur Herdendetektion durch Umgebungskotproben im Vergleich zu kulturellen Einzeltieruntersuchungen	Seite 24
Tabelle 2: Bekannte Prävalenzen und Probenumfang der 20 teilnehmenden Betriebe	Seite 28
Tabelle 3: Herdencharakteristik der Einzeltierkotproben	Seite 43
Tabelle 4: Befunde der Kultivierung von im Frühjahr entnommenen Umgebungskotproben nach Lokalisation	Seite 45
Tabelle 5: Befunde der Kultivierung von im Sommer entnommenen Umgebungskotproben nach Lokalisation	Seite 46
Tabelle 6: Kontamination der entnommenen Umgebungskotproben	Seite 47
Tabelle 7: Ergebnisse der wiederholten Umgebungskotproben im Verhältnis zu den Ergebnissen der Primärkultur, getrennt nach Frühjahr und Sommer	Seite 48
Tabelle 8: Anzahl und Anteil positiver, negativer und nicht auswertbarer Umgebungskotproben nach Betrieben	Seite 49
Tabelle 9: Klimadaten zum Tag der Entnahme der Umgebungskotproben	Seite 50
Tabelle 10: Übereinstimmung der Stichprobenbeurteilung mit der Prävalenz der Einzeltierkotproben	Seite 53
Tabelle 11: Kalkulation der Sensitivität des Untersuchungsansatzes mit einem Kulturröhrchen im Vergleich zum Untersuchungsansatz mit drei Kulturröhrchen durch Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe (n = 5015)	Seite 54
Tabelle 12: Kalkulation der Sensitivität des Untersuchungsansatzes mit einem Kulturröhrchen im Vergleich zum Untersuchungsansatz mit drei Kulturröhrchen durch Betrachtung von jeweils einem Nährmedium pro Einzeltierkotprobe, getrennt nach Betrieben, MAP-positive Kulturröhrchen	Seite 56

Tabelle 13: Ergebnisse im Frühjahr entnommener Umgebungskotproben nach Bereichen	Seite 62
Tabelle 14: Kreuztabelle Betriebsstatus Einzeltierkotproben und Betriebsstatus Umgebungskotproben	Seite 63
Tabelle 15: Ergebnisse im Sommer entnommener Umgebungskotproben nach Bereichen	Seite 65
Tabelle 16: Anteil positiver und negativer Umgebungskotproben, getrennt nach Frühjahr und Sommer	Seite 66
Tabelle 17: Kreuztabelle Betriebsstatus Einzeltierkotproben und Betriebsstatus Stichproben	Seite 66
Tabelle 18: Kreuztabelle Betriebsstatus Stichproben und Betriebsstatus Umgebungskotproben Frühjahr	Seite 68
Tabelle 19: Kreuztabelle Betriebsstatus Einzeltierkotproben und LDL ELISA 25er Pools, IDVet ELISA 25er Pools, LDL ELISA 50er Pools und IDVet ELISA 50er Pools	Seite 69
Tabelle 20: Gesamtübersicht	Seite 70
Tabelle 21: Befunde der Umgebungskotproben, getrennt nach Frühjahr und Sommer, Lokalisation und Betrieben	Seite 106
Tabelle 22: Vergleich Untersuchungsansatz mit einem Kulturröhrchen zu Untersuchungsansatz mit drei Kulturröhrchen pro Einzeltierkotprobe, getrennt nach Betrieben	Seite 107

FORMELVERZEICHNIS

Formel 1: Formel zur Errechnung des S / PQuotienten, Cattletype MAP Ab (LDL)	Seite 40
Formel 2: Formel zur Errechnung des S / PQuotienten, <i>IDVet Paratuberculosis Indirect</i> (IDVet)	Seite 41

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Verbreitung der Paratuberkulose im Zeitraum Juli bis Dezember 2011

Seite 5

Abbildung 2: Molier h-x-Diagramm zur Darstellung der unterschiedlichen Luftzustände bei der Entnahme von Umgebungskotproben im Frühjahr und im Sommer

Seite 51

Abbildung 3: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 25 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *LDL Cattletype MAP Ab* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

Seite 57

Abbildung 4: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 50 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *LDL Cattletype MAP Ab* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

Seite 58

Abbildung 5: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 25 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *ID Screen Paratuberculosis Indirect* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

Seite 59

Abbildung 6: Anzahl positiver, verdächtiger und negativer Milchpools, getrennt nach Betrieben, aus Milchproben, die aus 50 Tieren eines Betriebes gepoolt und im ELISA *ID Screen Paratuberculosis Indirect* untersucht wurden (HF = historisch frei, NP = niedrigprävalent, HP = hochprävalent)

Seite 60

Abbildung 7: Abhängigkeit des Anteils positiver Umgebungskotproben vom Anteil positiver Einzeltierkotproben (Einzeltierprävalenz)

Seite 64

Abbildung 8: Abhängigkeit des Anteils positiver Stichproben vom Anteil positiver Einzeltierkotproben (Einzeltierprävalenz)

Seite 67

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karsten Donat, der es mir ermöglichte dieses Thema zu bearbeiten. Mit großem Vertrauen hatte er stets ein offenes Ohr für kleinere und größere Probleme und räumte mir Unklarheiten fachlicher, sowie finanzieller Art, kurzerhand aus dem Weg.

Ich danke meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Pfeffer für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung und eine geöffnete Bürotür auch wenn ich nach monatelanger Funkstille anklopfte.

Ein großer Dank gilt Herrn Klaus Sammer als Initiator meiner Dissertation.

Vielen Dank an die fleißigen Mitarbeiter des Paratuberkuloselabors der Thüringer Tierseuchenkasse. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung wäre es mir nicht möglich gewesen 5015 Kotproben und 4337 Milchproben in solch kurzer Zeit aufzuarbeiten. Ich danke Frau Ute Schau und Frau Dr. Esra Einax für die Befundung „meiner“ Kotproben. Frau Dr. Esra Einax danke ich vor allem für die fachliche Unterstützung und die Einweisung ins wissenschaftlich „schöne“ Arbeiten. Desweiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Thüringer Tierseuchenkasse für motivierende Worte, aufmunternde Eispausen, gebackene Kuchen und ausgegebene Frühstücksrunden.

Allen beteiligten Mitarbeitern und Tierärzten der 20 teilnehmenden Milchviehbetriebe danke ich für die gute Zusammenarbeit. Dabei danke ich auch dem Rindergesundheitsdienst Thüringen. Durch Herrn Wolfram Siebert, Frau Dr. Katja Hruschka und Herrn Dr. Andreas Ahrens war eine gute Kommunikation mit den Betrieben möglich. Weiterhin bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung der Landesvereinigung Thüringer Milch e.V., die zusammen mit der Thüringer Tierseuchenkasse die Durchführung der Untersuchungen ermöglichte. Ebenso danke ich dem Thüringer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht für die Bereitstellung der Milchproben und den Firmen LDL und IDVet für die Bereitstellung der verwendeten Testkits.

Vor allem möchte ich meiner Familie, insbesondere meinem Papa, Livo und Stefan, danken! Danke, dass ihr Motivationslöcher gestopft habt und immer einfach da seid!