

Aus dem Institut für molekulare Pathogenese des Friedrich-Loeffler-Instituts,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie und
die Klinik für Klauentiere des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Ermittlung von Einflussfaktoren auf die *intra vitam* Diagnostik der Paratuberkulose

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Franziska Gierke

Tierärztin aus Jena

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3375

Diese Arbeit wurde von der Thüringer Tierseuchenkasse unterstützt.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. Dr. Petra Reinhold
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

paratuberculosis, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, diagnostic techniques, cattle diseases, elisa, faeces, serology, milk, blood serum

Tag der Promotion: 14.06.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-815-9

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Coverbild: © António Duarte - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	12
2.	LITERATUR	13
2.1	Geschichte der Paratuberkulose	13
2.2	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	13
2.2.1	Taxonomie und Genetik	13
2.2.2	Erregereigenschaften und Kultivierung	14
2.2.3	Tenazität	14
2.3	Krankheitsbild der Paratuberkulose	16
2.3.1	Pathogenese und Immunologie	16
2.3.2	Erkrankungsstadien	18
2.3.3	Pathologisch-anatomische und histologische Veränderungen	19
2.4	Epidemiologie der Paratuberkulose	20
2.4.1	Erregerausscheidung	20
2.4.2	Übertragungswege	22
2.4.3	Wirtsspektrum und Empfänglichkeit der Wirtstiere	23
2.4.4	Geographische Verbreitung	24
2.4.5	Wirtschaftliche Bedeutung	26
2.5	Diagnostik der Paratuberkulose	28
2.5.1	Direkter Erregernachweis	28
2.5.1.1	Mikroskopische Untersuchung von Kotausstrichen und Organabklatschpräparaten	28
2.5.1.2	Kultureller Erregernachweis und Speziesidentifizierung mittels PCR aus Kulturmaterial	28
2.5.1.3	Molekularbiologischer Erregernachweis in Organmaterial, Kot und Milch	31
2.5.2	Indirekter Erregernachweis	32
2.5.2.1	Johnin Hauttest	32
2.5.2.2	Interferon- γ -Test	32
2.5.2.3	Komplementbindungsreaktion (KBR)	33
2.5.2.4	Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT)	33
2.5.2.5	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)	34
2.5.2.6	Protein Arrays	36
2.6	Bekämpfung der Paratuberkulose	37
2.6.1	Bekämpfung der Paratuberkulose in Deutschland und Thüringen	37
2.6.2	Bekämpfung der Paratuberkulose auf internationaler Ebene	38
2.6.3	Impfungen	38

3.	MATERIAL UND METHODEN	40
3.1	Allgemeine Projektbeschreibung	40
3.2	Tierbestände	40
3.3	Proben	45
3.4	Serologische Untersuchungen	45
3.4.1	Aufbereitung der Blut- und Milchproben für die serologischen Untersuchungen	45
3.4.2	Durchführung des Svanovir-ELISA	46
3.4.3	Durchführung des Pourquier-ELISA	47
3.5	Erregernachweis in Kotproben	49
3.5.1	Dekontamination der Kotproben im Projektzeitraum	49
3.5.2	Beimpfen und Bebrüten der Kotkulturröhrchen	49
3.5.3	Beurteilung der Kotkulturröhrchen	50
3.5.4	Mikroskopische Untersuchung von Koloniematerial	50
3.5.5	DNA-Isolierung aus Koloniematerial	51
3.5.6	IS900-PCR und Duplex-PCR der DNA-Proben	51
3.5.7	Agarosegel-Elektrophorese	54
3.6	Versuch zur Dekontamination von Kotproben	55
3.7	Erfassung der tierspezifischen Daten	58
3.8	Statistische Auswertung	58
3.8.1	Berechnung von Sensitivitäten	59
3.8.2	Berechnung von Spezifitäten	59
3.8.3	Kriterien für die Bildung von Tiergruppen zur Untersuchung der tier-spezifischen Einflussfaktoren auf die Diagnostik der Paratuberkulose	60
3.8.3.1	Bestände und Kotbefundgruppen	61
3.8.3.2	Altersgruppen	61
3.8.3.3	Laktationsphasen	61
3.8.3.4	Milchleistungsgruppen	61
3.8.3.5	Milchparameter	62
3.8.4	Berechnung von Konfidenzintervallen	62
3.8.5	Pearson`s Chi-Quadrat Test	63
3.8.6	Fisher`s exakt Test	63
3.8.7	Kontingenztafeln für die Prüfung der Übereinstimmungen serolo-gischer Tests und Berechnung des Kappawertes nach Cohen	63
3.8.8	Multinomiale logistische Regression	65

4. ERGEBNISSE 66

Untersuchungsbefunde

4.1	Befunde der Untersuchungen auf Paratuberkulose in drei Thüringer Milchviehbetrieben	66
4.1.1	Zusammenfassung der Kotbefunde in den Betrieben A, B und C	66
4.1.2	Kotbefunde für die Bestände A, B und C zu 4 verschiedenen Untersuchungszeitpunkten	67
4.1.3	Entwicklung der Kotbefunde in den Beständen A und B	70
4.1.4	Analyse des zeitlichen Auftretens von Map-Koloniewachstum bei der Untersuchung von Kotproben aus zwei Thüringer Milchviehherden	73
4.1.5	Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit zwei Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren	74

**Ergebnisse der Sensitivitäts-, Spezifitätsberechnungen und der Ermittlung von Befund-
übereinstimmungen**

4.2	Ermittlung der diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten zweier ELISA-Testverfahren anhand der Untersuchungsergebnisse aus drei Thüringer Milchviehbetrieben	76
4.2.1	Berechnung der Sensitivitäten des Svanovir- und des Pourquier-ELISA für Blut- und Milchserum	76
4.2.2	Berechnung der Spezifitäten des Svanovir- und des Pourquier-ELISA für Blut- und Milchserum im Bestand C	82
4.3	Untersuchung der Übereinstimmungen der Befunde zweier Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren zu einem identischen Probennahmezeitpunkt	83
4.3.1	Vergleich der blutserologischen Befunde	83
4.3.2	Vergleich der milchserologischen Befunde	83
4.3.3	Vergleich von blut- und milchserologischen Befunden	84

Ergebnisse der Untersuchungen von Einflussfaktoren

4.4	Einflussfaktoren auf die Kotkultivierung	86
4.4.1	Methodenspezifische Einflussfaktoren	86
4.4.1.1	Einfluss der Dekontaminationsmethode auf das Ergebnis der Kotkultivierung	86
4.4.1.2	Einfluss der Anzahl der Kulturröhrchen auf das Ergebnis d der Kotkultivierung	88
4.4.1.3	Einfluss von Kontaminationen auf die Auswertung von Kotkultivierung	89
4.4.2	Tierspezifische Einflussfaktoren	90
4.4.2.1	Alter	90
4.4.2.2	Laktationsphase	91
4.4.2.3	Tagesmilchleistung	91

4.5	Einflussfaktoren auf die serologische Diagnostik	99
4.5.1	Tierspezifische Einflussfaktoren	99
4.5.1.1	Alter	100
4.5.1.2	Laktationsphase	104
4.5.1.3	Tagesmilchleistung	106
4.5.1.4	Milchparameter	110
4.6	Multinomiale logistische Regressionen der Einflussfaktoren	113
4.6.1	Multinomiale logistische Regression der Einflussfaktoren auf die Kotuntersuchung	113
4.6.2	Multinomiale logistische Regression der Einflussfaktoren auf die ELISA-Untersuchungen	113
<u>Ergebnisse der Wiederholungsuntersuchungen bei identischen Tieren</u>		
4.7	Wiederholung koprologischer Untersuchungen	114
4.7.1	Verlauf der Kotbefunde bei mehrfach untersuchten Tieren aus dem Bestand A und Einfluss der Wiederholung auf die Testsensitivität	114
4.7.2	Verlauf der Kotbefunde bei mehrfach untersuchten Tieren aus dem Bestand B und Einfluss der Wiederholung auf die Testsensitivität	115
4.8	Mehrfache Wiederholung serologischer Untersuchungen von Einzeltieren – Einflüsse auf Sensitivitäten und Spezifitäten der ELISA-Verfahren	117
4.8.1	Einfluss der Wiederholung blutserologischer Untersuchungen auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren	118
4.8.2	Einfluss der Wiederholung milchserologischer Untersuchungen auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren	120
4.8.3	Einfluss der Wiederholung blutserologischer Untersuchungen auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren	121
4.8.4	Einfluss der Wiederholung milchserologischer Untersuchungen auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren	122
5.	DISKUSSION	124
5.1	Paratuberkuloseprävalenzen in den Beständen A und B	124
5.2	Entwicklung der Kotbefunde in den Beständen A und B	124
5.3	Wiederholung kotkultureller Untersuchungen	125
5.4	Methodische Einflüsse auf die kotkulturelle Paratuberkulosedagnostik	126
5.4.1	Einfluss der Lagerung der Kotproben auf die Vitalität von Map	126

5.4.2	Einfluss der Dekontamination auf das Wachstum von Myzeten	127
5.4.3	Einfluss der Dekontamination auf das Wachstum von Map	129
5.4.4	Einfluss der Anzahl eingesetzter Kulturröhrchen auf die Ergebnisse der Kotkultivierung und Auswertung der Map-Wachstumszeiten	130
5.5	Tierspezifische Einflüsse auf die kotkulturelle Paratuberkulosediagnostics	131
5.5.1	Alter	131
5.5.2	Laktationsphase	132
5.5.3	Tagesmilchleistung	133
5.6	Kotkultur als Goldstandardverfahren	134
5.7	Serologische Untersuchungen in den Beständen A, B und C	136
5.7.1	Sensitivitäten der untersuchten ELISA-Testverfahren	136
5.7.2	Spezifitäten der untersuchten ELISA-Testverfahren	139
5.7.3	Einfluss der Milchparameter auf die milchserologischen Untersuchungsbefunde	142
5.7.4	Wiederholung serologischer Untersuchungen	144
5.7.5	Übereinstimmungen der Ergebnisse zweier ELISA-Testverfahren	145
5.8	Empfehlungen zur Untersuchung und Bekämpfung der Paratuberkulose in mittleren bis großen subklinisch infizierten Herden	146
6.	ZUSAMMENFASSUNG	148
7.	SUMMARY	150
8.	LITERATURVERZEICHNIS	152
9.	ANHANG	183
9.1	Blut- und Milch-ELISA-Befunde nach den Klassen der tierspezifischen Parameter	183
9.2	Mehrfache Wiederholung serologischer Untersuchungen von Einzeltieren	188
9.3	Untersuchungsbefunde des Dekontaminationsversuches	191
9.4	Ergebnisse der multinomialen logistischen Regressionen	192
9.5	Abbildungsverzeichnis	197
9.6	Tabellenverzeichnis	198
10.	Publikationsverzeichnis	203
11.	Danksagung	204
12.	Selbstständigkeitserklärung	205

Abkürzungsverzeichnis

95% CI	95%-Konfidenzintervall
μ	mikro
Abb.	Abbildung
<i>Aqua dest.</i>	Aqua destillata; destilliertes Wasser
AGIDT	Agargelimmunodiffusionstest
AVID	Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CR	Komplementrezeptor (engl. Complement Receptor)
DEPC	Diethylene Pyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epub	Elektronische-/ Online-Publikation
Fa.	Firma
FAP	Fibronectin Attachment Protein
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
h	Stunde
HEYM	Herrold`s Egg Yolk Medium
HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid
i. d. R.	in der Regel
IFN-γ	Interferon gamma
IS900	Insertionssequenz 900
KBE	Kolonie bildende Einheit

KBR	Komplementbindungsreaktion
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomannan
l	Liter
m	milli
M	mol/l
M.	Mycobacterium
Maa	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i>
Mah	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>hominissuis</i>
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
Map	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
n	Stichprobenumfang
n. d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte / Extinktionswerte der Kontroll- und Patientenseren
OIE	World Organisation for Animal Health
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PO	Pourquier-ELISA
<i>p.p.</i>	<i>post partum</i>
PPD	Johnin, Paratuberkulin (engl.: purified protein derivative)
RRR	relative Risikoreduktion (engl.: relative risk reduction)
sec	Sekunde
Spe	Spezifität
Sen	Sensitivität
ssp.	Subspezies

subsp.	Subspezies
SV	Svanovir-ELISA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffergemisch
TLLV	Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TSK	Thüringer Tierseuchenkasse (Anstalt des Öffentlichen Rechts)
TSN	Tierseuchennachrichtensystem
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettstrahlung
v. a.	vor allem
vs.	<i>versus</i>
z. B.	zum Beispiel
zw.	zwischen
+ +	Starke Map-Ausscheidung
+ -	Mittelstark bis schwache Map-Ausscheidung
- -	Schwache bis keine Ausscheidung von Map
*	signifikantes Testergebnis

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Paratuberkulose ist eine chronische, therapieresistente Darminfektion der Rinder und anderer Wiederkäuer. Klinisch erkrankte Rinder magern zunehmend ab, weisen stark wässrige Durchfälle sowie Leistungsminderungen auf. Nach der Infektion der Tiere im Kälberalter kann die Inkubationszeit der Erkrankung bis zum Auftreten erster klinischer Krankheitssymptome bis zu 10 Jahre dauern. Der Krankheitserreger *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) wird von subklinisch infizierten Tieren intermittierend und von klinisch erkrankten Tieren zumeist permanent mit dem Kot ausgeschieden. Besonders während der langen subklinischen Erkrankungsphase, in der infizierte Tiere den Erreger mit dem Kot unbemerkt ausscheiden, findet eine Weiterverbreitung von Map in infizierten Rinderbeständen statt. In Deutschland ist die Paratuberkulose seit 1970 eine meldepflichtige Erkrankung der Wiederkäuer. Seit 1995 wurden im TSN bundesweit 4.138 Paratuberkulosemeldungen registriert (Stand:12/2008), wobei besonders in den vergangenen 5 Jahren eine steigende Anzahl gemeldeter Paratuberkulosefälle festzustellen war. In Thüringen wurde ein vermehrtes Auftreten der Erkrankung ab Ende der 1990er Jahre registriert. Dabei waren auch Hochleistungsbetriebe betroffen, die nach der Wiedervereinigung Deutschlands aus züchterischen Gründen eine Vielzahl an Tieren vor allem aus dem nordwestdeutschen Raum hinzugekauft hatten. Thüringen ist eines der wenigen Bundesländer, welches die „nicht offensichtliche“ Erkrankung Paratuberkulose gegenwärtig als ernst zu nehmendes Problem in Rinderherden ansieht, betroffene Betriebe bei der Diagnostik und Sanierung der Erkrankung unterstützt und darüber hinaus bestrebt ist, nicht-infizierte Bestände zu schützen. Besonders die Identifizierung subklinisch infizierter Tiere erwies sich in den vergangenen Jahren aufgrund der begrenzten Sensitivitäten der momentan verfügbaren direkten und indirekten Nachweisverfahren als problematisch. Subklinisch infizierte Tiere wurden beim ausschließlichen Einsatz serologischer Nachweismethoden nur unzureichend identifiziert. Aus diesem Grund förderte die Thüringer Tierseuchenkasse (TSK) ein Forschungsprojekt zur Diagnostik der Paratuberkulose in subklinisch infizierten Rinderherden. Dabei wurden 3 Thüringer Milchviehherden über 2½ Jahre blut- und milchserologisch sowie koprologisch in jeweils 5 Bestandsuntersuchungen untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die diagnostischen Befunde des Projektes sowie tierspezifische Daten ausgewertet. Die Ergebnisse der zeit- und kostenintensiven kotkulturellen Map-Anzüchtung und die Ergebnisse schnell durchführbarer, kostengünstiger serologischer Nachweismethoden wurden gegenübergestellt. Das Ziel der Arbeit war die Bewertung der Sensitivität der kotkulturellen Untersuchung sowie die Berechnung der Sensitivitäten und Spezifitäten zweier Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren bei der Anwendung in subklinisch infizierten Rinderherden und die Untersuchung von Einflüssen auf die angewendeten Testverfahren. Es wurde betrachtet, welche tier- und methodenspezifischen Faktoren die einzelnen Testverfahren beeinflussen. Die Untersuchung der tierspezifischen Einflussfaktoren wie Lebensalter oder Laktationsphase erfolgte mit dem Ziel, optimale Probenentnahmezeitpunkte für die jeweiligen diagnostischen Verfahren zu ermitteln. Ein wichtiges Ziel der Arbeit war die Auswertung der milchserologischen Untersuchungen, da Milch als leicht zu gewinnendes Untersuchungsmedium unter anderem bei der monatlichen Milchleistungsprüfung regelmäßig zur Verfügung steht. Es sollte bewertet werden, ob blutserologische durch milchserologische Untersuchungen ersetzt werden können. Die Erkenntnisse des Forschungsprojektes dienen der Optimierung der Diagnostik im Rahmen des freiwilligen Paratuberkulose-Bekämpfungsprogrammes in Thüringen.

2. LITERATUR

2.1 Geschichte der Paratuberkulose

Im Jahre 1895 beschrieben Johnne und Frothingham mit den Worten eine „besondere Form der Darmtuberculose“ erstmals die Paratuberkulose des Rindes. Sie wiesen säurefeste Mikroorganismen in Darmgewebeproben eines Rindes mit chronischer Enteritis nach. Die Paratuberkulose wird heute nach dem Erstentdecker auch als „Johnne`sche Krankheit“ bezeichnet. Bang erkannte 1906 trotz der Ähnlichkeit der Erkrankung zur Tuberkulose die Eigenständigkeit der Paratuberkulose und definierte sie als „pseudotuberkulöse Enteritis“. Die Isolierung und Anzucht des Krankheitserregers gelang Twort und Ingram 1912, sie bezeichneten den Erreger als „*Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*“. Das Bakterium wurde lange Zeit als eigene Spezies, *Mycobacterium paratuberculosis*, angesehen. Erst 1990 wurde der Erreger, aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades, der Spezies *Mycobacterium avium* zugeordnet und in *Mycobacterium avium* subspecies (subsp.) *paratuberculosis* umbenannt (Thorel et al. 1990).

2.2 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

2.2.1 Taxonomie und Genetik

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (Map) gehört zur Ordnung Actinomycetales, zur Familie der Mycobacteriaceae, dem Genus *Mycobacterium* (*M.*) sowie zur Spezies *M. avium*. Die enge Verwandtschaft der Spezies *M. avium* und *M. intracellulare* führte zur Zusammenfassung in einer Gruppe, dem *Mycobacterium-avium*-Komplex (MAC). Innerhalb der MAC-Gruppe mit 28 Serotypen spielen Serotypisierungen heute zur Differenzierung eine untergeordnete Rolle, es erfolgt vielmehr die Bestimmung von spezies- und subspezies-spezifischen Gensequenzen zur Identifikation zugehöriger Erreger. Die Insertionssequenz IS900, ein kleiner mobiler Genabschnitt, wurde als spezifisch für Map identifiziert (Green et al. 1989). Zum molekularbiologischen Nachweis von Map wird derzeit vorwiegend die IS900-Polymerasekettenreaktion (PCR) unter der Verwendung hochspezifischer Primer genutzt, da IS900-ähnliche Sequenzen auch bei anderen atypischen Mykobakterien detektiert wurden (Englund et al. 2002). Das Genom des Map-Stammes K10 wurde entschlüsselt und öffentlich zur Verfügung gestellt (Li et al. 2005). Es besteht aus 4.829.781 Basenpaaren; neben dem IS900-Element wurden drei weitere Map-spezifische Insertionssequenzen des Stammes K10 identifiziert: ISMav2 (3 Kopien), ISMap02 (6 Kopien) und ISMap04 (4 Kopien). Als Map-spezifische Gensequenzen wurden auch das f57-Element (Poupart et al. 1993) und das *hsp* X-Gen (Ellingson et al. 1998, Bannantine und Stabel 2000) nachgewiesen.

Die Map-Isolate werden in 3 Biotypen unterteilt (Stevenson et al. 2002, Dohmann et al. 2003, de Juan et al. 2005). Der Biotyp I wird auch als „oviner Typ“ bezeichnet, da er bislang überwiegend aus Schafen isoliert wurde. Er ist durch ein sehr langsames Wachstum und eine häufige Pigmentierung der flachen und gleichförmigen Kolonien gekennzeichnet. Dem gegenüber wachsen Stämme des Biotyps II, der bisher überwiegend aus Proben von Rindern angezüchtet wurde, ebenfalls langsam in nicht-pigmentierten Kolonien verschiedener Formen. Bei der Primärkultivierung sind die Kolonien des „bovinen Typs“ zumeist cremefarben bis transparent, klein, glatt und glänzend (Merkal und Curran 1974). Der Biotyp

III wird auch als „intermediärer“ Typ bezeichnet und wurde bisher nur aus Proben von Schafen und Ziegen isoliert. Der Biotyp III wächst wie der Biotyp I langsam, aber nicht pigmentiert (de Juan et al. 2005). Für die Map-Biotypen wurden zudem genotypische Unterschiede ermittelt unter anderem (u. a.) mittels IS900-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (Moreira et al. 1999, Pavlik et al. 2000, Cousins et al. 2000).

2.2.2 Erregereigenschaften und Kultivierung

Map ist ein schwach grampositives, aerobes, nicht bewegliches und nicht sporenbildendes, säure- und alkoholfestes Stäbchenbakterium mit einer durchschnittlichen Breite von 0,5 µm und einer Länge zwischen 1–1,5 µm (Manning und Collins 2001). Die komplexe, hydrophobe Zellwand des Erregers ist reich an Lipiden (Clarke 1997), sie besteht aus einer Peptidoglykanschicht mit angelagerten Arabino-Galactanen, an die wiederum spezifische, langkettige Lipide, die Mykolsäuren, gebunden sind (Jalier und Nikaido 1994, Brennan und Nikaido 1995). Lipoarabinomannan (LAM) wird als besondere, immunmodulatorische Zellwandkomponente von Map, aber auch anderer Mykobakterien, wie z. B. *M. tuberculosis* angesehen. Aufgrund der besonderen Zellwandeigenschaften ist Map mit der Gramfärbung kaum anfärbbar. Zum Nachweis von Mykobakterien wird im Allgemeinen die Ziehl-Neelsen-Färbung (Ziehl 1882, Neelsen 1885) angewendet. Bei der mikroskopischen Beurteilung von Kotausstrichen, Organ- oder Kulturmaterial liegt der Erreger typischerweise nestartig in Aggregaten vor. Der genaue Mechanismus der mykobakteriellen Aggregation ist nicht bekannt. Im Rahmen elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurden interzelluläre Filamente zwischen den Bakterienzellen identifiziert (Merkal 1973). Das Fibronectin attachment protein (FAP) scheint maßgeblich an der Aggregatbildung, die einen Schutzmechanismus des Erregers gegenüber der Phagozytose darstellt, beteiligt zu sein (Miyamoto et al. 2004).

Aufgrund der hohen Substratansprüche des Erregers erfolgt die Primäransucht auf eidotterhaltigen Nährböden. Das Wachstum von Map ist vom Vorhandensein des Mykobaktin J (Merkal und Curran 1974), einem zellwandständigen Eisenchelatbildner, abhängig.

Mykobaktine dienen der Bereitstellung von Eisen und werden von anderen Mykobakterien eigenständig synthetisiert. Während frisch isolierte Map-Stämme bei der *in vitro* Kultivierung auf den Zusatz von Mykobaktin J angewiesen sind, wurde von einem spontanen Verlust der Mykobaktinabhängigkeit (Merkal und Curran 1974) bei Laborstämmen berichtet. Das Wachstum des Bakteriums erfolgt mit Generationszeiten zwischen 1,3 und 4,4 Tagen sehr langsam (Lambrecht et al. 1988). Die Kultivierungszeit beträgt häufig 16 Wochen, wobei erste Kolonien zumeist ab der 4. Kultivierungswoche sichtbar werden (Hermann 1998).

2.2.3 Tenazität

Map weist aufgrund seiner speziellen Zellwandeigenschaften eine sehr hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber thermischen und chemischen Umwelteinflüssen auf.

In den ersten Untersuchungen zum Überleben des Erregers im Rinderkot außerhalb des Wirtes wurden Kotproben infizierter Tiere in offenen Gefäßen natürlichen Temperaturschwankungen zwischen -3°C und 23°C sowie Luft und Sonneneinstrahlung ausgesetzt (Lovell et al. 1944). Das Bakterium überlebte, bei unbekannter Erregerdichte, mindestens 246 Tage. In Kotproben natürlich infizierter Rinder mit einer geschätzten Erregerdichte von

< 10³ Map/g Kot, die bei -70°C gelagert wurden lag die Map-Überlebenszeit unterhalb von 15 Wochen (Richards und Thoen 1977, Richards 1981).

Der Erreger blieb auch in Flüssigmist bei 5°C 9 Monate und bei 15°C maximal 3,5 Monate infektiös (Jørgensen 1977). Die Überlebensfähigkeit von Map wurde für 2 verschiedene Kompostierungsverfahren mit Temperaturen von 55°C und 25°C und bei einer Flüssigmistlagerung in Gülletanks verglichen (Grewal et al. 2006). Im Flüssigmist war der Erreger mindestens 56 Tage und bei einer Kompostierung bei 25°C mindestens 28 Tage lebensfähig. Zur schnellen und sicheren Abtötung des Erregers wurde eine Kompostierung des Dungs bei 55°C über 3 Tage empfohlen. Hohe Ammoniakkonzentrationen verkürzten die Map-Überlebenszeit, in einem Gemisch aus 10 % Kot und 90 % Rinderurin war nach 30 Tagen der Nachweis vitaler Erreger nicht mehr möglich (Larsen et al. 1956). In einem Modellversuch wurde gezeigt, dass der Erreger auch während des Silierprozesses unter Luftabschluss und bei raschem pH-Wert-Abfall für maximal 14 Tage lebensfähig bleibt (Katayama et al. 2000, 2001).

Auch das Überleben von Map in Böden kontaminierter Weiden wurde untersucht, dabei waren noch nach 11 Monaten infektiöse Erreger nachweisbar (Gay und Sherman 1992). Zudem war die Überlebenszeit des „ovinen Biotyps“ bei sauren Boden-pH-Werten verlängert und variierte in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen (Whittington et al. 2004). Eine durchschnittliche Überlebenszeit des Biotyps I im Kot in einer schattigen, trockenen Umgebung von maximal 13,8 Monaten und von 2,3 Monaten auf Gras in einer Umgebung mit 70 % Schatten wurde ermittelt. Der Erreger erwies sich daher als empfindlich gegenüber UV- und Sonneneinstrahlung, eine Inaktivierung des Bakteriums innerhalb von 100 Stunden direkter Sonneneinstrahlung wurde nachgewiesen (Gay und Sherman 1992).

In Leitungswasserproben, die künstlich kontaminiert wurden, überlebte Map bis zu 19 Monate (Lovell et al. 1944, Larsen et al. 1956). Daneben war das Bakterium kulturell und molekularbiologisch in 15 von 192 unbehandelten Wasserproben aus nordirischen Wasseraufbereitungsanlagen nachweisbar (Whan et al. 2005).

Map zeichnet sich durch eine hohe Hitze- und Kältestabilität aus. Bei der Lagerung ausgetrockneter Kulturen mit einer geschätzten Erregerkonzentration von 10¹⁰ Erregern/g bei -14°C, waren noch nach 12 Monaten lebensfähige Keime zu finden (Larsen et al. 1956).

In Studien zur Hitzestabilität, wurde der Erreger bei der Pasteurisierung, mit Temperaturen zwischen 60 und 75°C, nicht vollständig inaktiviert (Chiodini und Hermon-Taylor 1993, Meylan et al. 1996, Grant et al. 1998, Hammer et al. 2003). Allerdings wurden bei allen veröffentlichten Versuchen hohe Erregerdosen bei nicht kommerziellen Pasteurisierungsbedingungen eingesetzt (Coussens 2001). In einem Versuch wurden eine industrielle Pasteurisierungsanlage und zuvor tiefgefrorene, ultraschallbehandelte Bakterien verwendet (Stabel et al. 1997b). In der pasteurisierten Milch waren anschließend keine lebenden Bakterien mehr nachweisbar. Kulturell und molekularbiologisch wurde Map auch in 4 von 244 industriell pasteurisierten, tschechischen Konsummilchproben detektiert, die Proben stammten aus zwei subklinisch infizierten Herden (Ayele et al. 2005). Es kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass Map kurzzeitige Erhitzungsprozesse übersteht und eine Übertragung des Erregers auf Mensch und Tier über die Aufnahme von erregerhaltiger Milch erfolgt.

Map zeichnet sich durch seine Unempfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl an Desinfektionsmitteln aus. Gegen den Erreger wirksam sind formaldehydhaltige oder phenolhaltige Desinfektionsmittel (Chiodini et al. 1984).

Das Überleben von Map in der Umwelt wird von verschiedenen Faktoren maßgeblich beeinflusst. Temperatur, Feuchtigkeit, UV-Strahlung, pH-Wert und Ammoniakgehalt der jeweiligen Umgebung entscheiden darüber, wie lange das Bakterium infektiös bleibt. Die hohe Tenazität des Erregers wird heute auch genutzt, um infizierte Herden durch die Untersuchung von Umweltproben zu identifizieren (Berghaus et al. 2006b, Lombard et al. 2006b). Nach Berghaus et al. (2006b) sind mittels der kulturellen oder molekularbiologischen Nachweise aus Umweltproben Rückschlüsse auf die Herdenprävalenzen möglich.

2.3 Krankheitsbild der Paratuberkulose

2.3.1 Pathogenese und Immunologie

Nach der oralen Aufnahme des Paratuberkuloseerregers, der einen ausgeprägten Darmtropismus aufweist, wird dieser überwiegend transzytotisch durch hochspezialisierte M-Zellen aus dem Darmlumen durch das Oberflächenepithel in die Darmmukosa transportiert (Momotani et al. 1988, Lugton 1999, Sigurethardóttir et al. 2001, Coussens 2001). M-Zellen befinden sich in den Epithelien, die das Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT), so auch die Peyer'schen Platten des Darmes, bedecken. Sie weisen eine unregelmäßige Morphologie auf, besitzen Microplicae und dienen benachbarten Makrophagen sowie Lymphozyten zur Antigenpräsentation (Landsverk 1981, Liebler et al. 1991).

Die Anheftung und die Aufnahme des Erregers in die M-Zellen wird durch Fibronectin attachment Proteine (FAP) vermittelt (Secott et al. 2002, 2004). FAP werden von Map exprimiert und binden Fibronectin, ein extrazelluläres Glykoprotein. M-Zellen weisen auf ihrer luminalen Zelleite in großer Anzahl β 1-Integrine auf (Clark et al. 1998). Die Aufnahme von Map in die M-Zellen wird durch die Bindung des Fibronectins an die β 1-Integrine auf der Zelloberfläche der M-Zellen ermöglicht (Secott et al. 2002, 2004, Sigurethardóttir et al. 2004). Daneben wurde gezeigt, dass ein 35 kDa Membranprotein an der Bindung und Aufnahme von Map in Epithelzellen beteiligt ist (Bannantine et al. 2003). Es wurde vermutet, dass bei adulten, über 2 Jahre alten Rindern die Anzahl der M-Zellen im Darmepithel vermindert ist und damit auch die Aufnahme von Map stark eingeschränkt wird, wodurch sich die Altersresistenz gegenüber dieser Erkrankung erklären ließe (Chiodini 1996). Andererseits wurde angenommen, dass die Resistenz gegenüber einer Map-Infektion mit steigendem Alter durch die Involution der Peyer'schen Platten des Darms bedingt ist (Larsen et al. 1978, Lepper und Wilks 1988).

Nach der Ausschleusung des Erregers aus den M-Zellen in die Darmmukosa wird dieser mittels Phagozytose von intra- und subepithelialen Makrophagen aufgenommen. Eine Vielzahl an Rezeptoren, wie zum Beispiel (z. B.) der Mannose-Rezeptor oder die Komplementrezeptoren (CR) CR1, CR3 und CR4 wurden für die Aufnahme von Mykobakterien in Makrophagen ermittelt (Schlesinger und Horwitz 1991, Schlesinger 1993). In den unaktivierten Makrophagen verhindert Map die Ausreifung von Phagosomen und deren Fusion mit Lysosomen (Russell 1998, Hostetter et al. 2003), der Mechanismus dafür ist noch weitgehend unbekannt. Bisher wurde gezeigt, dass die Ansäuerung der Phagosomen in den Makrophagen und in Folge dessen die Ausbildung von Phagolysosomen unterbunden wird (Cheville et al. 2001). In anderen Untersuchungen war nachweisbar, dass lediglich eine milde und verzögerte Ansäuerung in Phagosomen, die lebende Paratuberkuloseerregere enthalten, erfolgt (Kühnel et al. 2001).

Es gilt als gesichert, dass bei einer vorherigen Aktivierung der Makrophagen durch das proinflammatorische Cytokin Interferon-gamma (IFN- γ) oder den Tumornekrosefaktor α (TNF- α) die Ausbildung eines Phagolysosoms mit anschließender Inaktivierung von Mykobakterien und auch die Suppression des mykobakteriellen Wachstums möglich ist (Flynn et al. 1993). Nach Meinung anderer Autoren wird durch die Wirkung des IFN- γ die Phagozytose über Komplementrezeptoren verhindert (Schlesinger und Horwitz 1991).

Darüber hinaus wird vermutet, dass die IFN- γ -Produktion in der frühen Infektionsphase vor allem (v. a.) durch $\gamma\delta$ -T-Zellen erfolgt, die sich vermehrt in unmittelbarer Nähe des Darmepithels anreichern (Coussens 2001). In einer Studie mit humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese unmittelbar von mykobakteriellen Antigenen stimuliert werden und keine Interaktion mit den Haupthistokompatibilitätskomplexen (Major Histocompatibility Complex; MHC) für ihre Aktivierung notwendig ist (Kabelitz et al. 2000). Etwa 80 % der zirkulierenden CD3+-T-Lymphozyten bei Kälbern unter 6 Monaten sind $\gamma\delta$ -T-Zellen (Mackay und Hein 1989, 1991), währenddessen über 6 Monate alte Tiere nur zu 10–25 % $\gamma\delta$ -T-Zellen aufweisen. Der Abfall der IFN- γ -Produktion mit zunehmendem Alter wird als eine Ursache für eine verstärkte Vermehrung des Erregers in persistent infizierten Makrophagen diskutiert, wodurch ein Fortschreiten des Infektionsgeschehens ermöglicht wird. Die frühzeitige Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Rahmen einer Map-Infektion von Jungtieren scheint daher eine Schlüsselrolle für den weiteren Verlauf der Erkrankung einzunehmen. Umso mehr unaktivierte Makrophagen infiziert werden, desto wahrscheinlicher wird die Ausbildung einer chronischen Map-Infektion, die jeweilige Infektionsdosis hat dabei offenbar eine entscheidende Bedeutung (Coussens 2001).

Aktivierte Makrophagen, die Bakterienzellen und Zelldetritus enthalten, wandern zur Antigenpräsentation in die lymphoiden Gewebe der Darmwand, die Peyer'schen Platten und in die Mesenteriallymphknoten. Sie präsentieren Map-Antigene über MHC-II und geben Interleukin (IL)-1, ein T-zellstimulierendes Cytokin ab (Adams and Czyprynski 1994, Cheville et al. 2001). CD4+-T-Zellen werden aktiviert, proliferieren und produzieren überwiegend IFN- γ , TNF- α sowie IL-2 und bewirken damit die Aktivierung weiterer Makrophagen und das Fortschreiten der granulomatösen Entzündung betroffener Darmabschnitte (Basse und Collins 1997, Simutis et al. 2007). Bei der experimentellen Stimulation von CD4+-T-Zellen mit Map-infizierten, murinen Makrophagen war die IFN- γ -Produktion der T-Zellen unzureichend (zur Lage et al. 2003). In einer anderen Studie bewirkte die *in vitro* IFN- γ -Produktion durch aktivierte CD4+-T-Zellen keine effektive Aktivierung der Makrophagen zur Elimination des Erregers (Simutis et al. 2007).

Es wurde bewiesen, dass im Rahmen einer Map-Infektion auch cytotoxische CD8+-T-Zellen aktiviert werden, die in der Lage sind infizierte Makrophagen zu eliminieren (Adams et al. 1993, Basse und Collins 1997). Der Mechanismus dafür ist nicht genau bekannt, da diese Zellfraktion normalerweise über eine MHC-I-Antigenpräsentation aktiviert wird, dieser Weg ist jedoch untypisch für intrazelluläre bakterielle Infektionen. Möglicherweise findet ein sogenanntes „cross-priming“, welches für die Tuberkulose nachgewiesen wurde (Winau et al. 2004), auch im Rahmen einer Paratuberkuloseinfektion statt. Dabei werden CD8+-T-Zellen durch dendritische Zellen, die Debris infizierter Makrophagen aufnehmen aktiviert.

Der größte Anteil der Mykobakterien in Makrophagen-Phagosomen überlebt aufgrund diverser passiver und aktiver Schutzmechanismen (Tessema et al. 2001). Überlebende

Erreger vermehren sich intrazellulär und werden bei der Apoptose von Makrophagen erneut freigesetzt und von weiteren Makrophagen aufgenommen. Durch das Freisetzen von Map in das Darmlumen ist die Infektion weiterer Darmabschnitte möglich (Coussens 2001). Zudem wandern Makrophagen zunehmend in infizierte Darmabschnitte ein. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kommt es somit zur Ausbildung zahlreicher granulomatöser Entzündungsherde des Darmes, die eine zunehmende Verdickung der Darmwände in betroffenen Arealen verursachen (Buergelt et al. 1978).

Es gilt als gesichert, dass in den frühen Infektionsstadien der Paratuberkulose die zelluläre Abwehr überwiegt und die humorale Abwehr erst später verstärkt und individuell verschieden einsetzt (Chiodini 1996). Über den Zeitpunkt und den Auslöser einer B-Zell-Aktivierung im Rahmen einer Map-Infektion gibt es keine gesicherten Angaben. Eine extrem variable, individuell verschiedene IgG1-Immunantwort kann sich in Abhängigkeit von der Infektionsdosis und der Eintrittspforte des Erregers jederzeit ausbilden (Coussens 2001, 2004).

B-Zellen können dabei entweder direkt von mykobakteriellen Antigenen durch rezeptorvermittelte Endozytose oder von T-Helfer-Zellen aktiviert werden (Coussens 2001). Bei experimentellen Infektionen führte die Infektion der Tonsillen bei Kälbern zur raschen Antikörperbildung (Waters et al. 2003). Es wird angenommen, dass die Bildung von Antikörpern im Rahmen von mykobakteriellen Infektionen keine protektive Immunantwort darstellt (Hartmann und Plum 1999). Von besonderem Interesse für die Diagnostik der Paratuberkulose ist die Bildung von Antikörpern während der subklinischen Erkrankungsphase. Nach einer Theorie führt der intermittierende Zerfall infizierter Makrophagen innerhalb der granulomatösen Entzündungsherde und das zeitweise Freiwerden des Bakteriums in das Darmlumen in der subklinischen Erkrankungsphase zu einer intermittierenden „low-level“ Stimulation der humoralen Immunabwehr (Coussens 2001). Bei klinisch erkrankten Tieren werden häufig hohe IgG1-Antikörper-Serumspiegel ermittelt (Collins et al. 1991, Whitlock und Buergelt 1996). Die erhöhte Antikörperbildung könnte sogar die Aufnahme von Map in Makrophagen durch die Opsonisierung von Bakteriellenzellen verstärken (Coussens 2001). Bei Tieren in weit fortgeschrittenen klinischen Erkrankungsstadien wurde ein Abfall der IgG-Serumtiter nachgewiesen (Coussens 2001).

2.3.2 Erkrankungsstadien

Die Paratuberkulose ist durch eine sehr lange Inkubationszeit, mit einer Dauer von bis zu 10 Jahren, gekennzeichnet (Whitlock und Buergelt 1996). Es werden 3 Erkrankungsstadien unterschieden: das latente, das subklinische und das klinische Erkrankungsstadium (Coussens 2001).

Latentes Erkrankungsstadium

Nach der oralen Infektion im Kälberalter, mit anschließender Ansiedlung des Erregers im Magen-Darm-Trakt, folgt das latente Erkrankungsstadium. In diesem Zeitraum erscheinen die infizierten Tiere klinisch gesund und Map wird nicht oder nur in sehr geringem Umfang und meist unterhalb der Nachweisgrenze mit dem Kot ausgeschieden. Erste pathohistologische Veränderungen können 1,5 bis 3 Monate *post infectionem* sichtbar werden (Valentin-Weigand 2002). Epitheloidzellen und Riesenzellen vom Langerhans-Typ infiltrieren die Darmwand (Whitlock und Buergelt 1996). Granulomatöse Läsionen treten in den inter-

follikulären Regionen der Peyer'schen Platten und der Mesenteriallymphknoten auf (Valentin-Weigand 2002). Der histologische Erregernachweis in Gewebeproben als auch die kulturelle Anzucht von Map aus Darmlymphknotengewebe sind möglich (Valentin-Weigand 2002).

Subklinisches Erkrankungsstadium

Im subklinischen Erkrankungsstadium findet eine verstärkte, intrazelluläre Vermehrung von Map statt. Makrophagen apoptieren und setzen den Erreger frei, der in das Darmlumen oder ins umliegende Gewebe gelangt, um erneut von rekrutierten Makrophagen aufgenommen zu werden. Die granulomatöse Entzündung der Darmwand schreitet fort, es kommt zu einer makroskopisch meist noch nicht sichtbaren Schleimhauthypertrophie und -ödematierung sowie zur Hypertrophie der Darmlymphknoten (Buegelt et al. 1978). Offensichtliche Krankheitssymptome sind im subklinischen Erkrankungsstadium nicht zu beobachten, jedoch ist bereits die intermittierende Ausscheidung von Map mit dem Kot möglich (Coussens 2001).

Klinisches Erkrankungsstadium

Im klinischen Erkrankungsstadium ist eine zunehmende Abmagerung erkrankter Tiere bei erhaltener Fresslust sichtbar (Clarke 1997). In unterschiedlicher Stärke treten permanent oder intermittierend stark wässrige Durchfälle auf. Der Krankheitserreger wird dabei in großen Mengen ausgeschieden (Coussens 2001). Die häufig starke Verdickung der Darmwände, infolge der granulomatösen Entzündung der Darmschleimhäute, bedingt eine Malabsorption der Nährstoffe in deren Folge die Kachexien sowie Diarrhoen eintreten. Die Mesenteriallymphknoten klinisch erkrankter Tiere erscheinen stark vergrößert und auch die Lymphgefäße der Darmwand sind häufig auffällig verdickt. Infizierte Tiere mit klinischen Krankheitssymptomen weisen gegenüber symptomfreien Tieren eine reduzierte Milchleistung auf (Benedictus et al. 1987). Häufige Krankheitssymptome sind außerdem Ödembildungen im Kehlgangs- und Trielbereich sowie ein stumpfes Haarkleid und blasse Schleimhäute. Proteinverluste bei klinisch erkrankten Tieren zeigen sich auch durch geringe Totalprotein- und Albuminwerte im Serum (Scott et al. 1995). Im Endstadium der Erkrankung verstärken sich die unstillbaren, chronischen Durchfälle. Infolge des hohen, durchfallbedingten Flüssigkeitsdefizits kommt es zu einer fortschreitenden Dehydratation der Tiere. Die hohen Flüssigkeitsverluste sowie der absolute Nährstoffmangel führen schließlich zum Niederbruch und zum Verenden der Tiere.

2.3.4 Pathologisch-anatomische und histologische Veränderungen

Typische pathologisch-anatomische Veränderungen des Darmes Paratuberkulose erkrankter Tiere sind hirnwindungsartige Verdickungen und Faltungen der Darmschleimhaut in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (Selbitz 2002). Die Darmschleimhaut der betroffenen Darmabschnitte ist häufig graugelblich gefärbt und ödematös (Selbitz 2002). Die Peyer'schen Platten als auch die Mesenteriallymphknoten erscheinen geschwollen und vergrößert, sie können beim Anschnitt granulomatöse Entzündungsherde aufweisen (Buegelt et al. 1978). Die mesenterialen Lymphgefäße sind in fortgeschrittenen klinischen Erkrankungsstadien infolge einer chronischen Lymphangitis verdickt (Clarke 1997). Veränderungen der Darmschleimhaut sind vor allem im Bereich des distalen Ileums mit

abrupter Unterbrechung in Höhe der Ileocäcalklappe zu finden (Buergelt et al. 1978). Andere Autoren gaben an, dass pathologische und histologische Veränderungen des Darmes sowohl im Ileum als auch im Zäkum, den Ileocäcalklappen, sowie dem Colon zu finden sind (Chacon et al. 2004) oder auch zunächst ausschließlich in Jejunum und Ileum (González et al. 2005) auftreten. Bei experimentellen Infektionen sind häufig ausgedehnte Veränderungen im gesamten Darmbereich sichtbar (Taylor 1953). Eine lymphogene oder hämatogene Streuung des Erregers wurde von verschiedenen Autoren beschrieben, granulomatöse Herde wurden dabei in Leber, Milz, Nieren oder Lungen detektiert (Chiodini et al. 1984, Hines et al. 1987).

Der histologische Nachweis des Erregers erfolgt überwiegend in Proben aus verändertem Darmgewebe oder Darmlymphknoten. Während in kleinen, unscheinbaren Läsionen überwiegend nur wenige säurefeste Stäbchen zu finden sind, ist der Nachweis großer Erregermengen in deutlich makroskopisch sichtbaren Veränderungen möglich (Clarke 1997). In Lymphknotenpräparaten sowie Präparaten der Darmschleimhaut sind granulomatöse Entzündungsherde mit Infiltraten bestehend aus epitheloiden Zellen, Riesenzellen vom Langhanstyp und Makrophagen sichtbar. Das Cytoplasma der Zellen enthält säurefeste Stäbchen (Buergelt et al. 1978, Brady et al. 2008). Die granulomatösen Veränderungen dehnen sich in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien auf die Submukosa der Darmwand aus, daneben atrophieren die Dünndarmzotten zunehmend und die Dünndarmkrypten verstreichen (González et al. 2005). Nach Brady et al. (2008) ist das Auftreten klinischer Krankheits-symptome nicht mit dem Umfang der histologischen Veränderungen des Darmes korreliert.

2.4 Epidemiologie der Paratuberkulose

2.4.1 Erregerausscheidung

Map-Ausscheidung mit dem Kot

Die Ausscheidung des Paratuberkuloseerregers durch subklinisch infizierte und klinisch erkrankte Tiere erfolgt über den Kot (Rosenberger 1978, Chiodini et al. 1984). Mit dem Kot werden abgeschilferte, erregerhaltige Darmzellen sowie Erreger aus zu Grunde gegangenen Makrophagen ausgeschieden. Die Map-Ausscheidung beginnt im Verlauf des Lebens infizierter Tiere individuell verschieden (Lepper et al. 1989). Während klinische Krankheits-symptome in der Regel erst im Alter zwischen 5 bis 7 Jahren auftraten (Clarke 1997), war die Ausscheidung von Map mit dem Kot bereits bei unter 2 Jahre alten Tieren nachweisbar (Antognoli et al. 2007, Kalis et al. 1999). In einer Studie war der Erreger regelmäßig aus dem Kot von 13-14 Monate alten Färsen kultivierbar (Kalis et al. 1999). Die Ausscheidung des Erregers mit dem Kot wurde in einer weiteren Untersuchung bei 3 % der unter 8 Monate alten, natürlich infizierten Jungtiere nachgewiesen (Antognoli et al. 2007). Damit wurde bewiesen, dass eine Ausscheidung des Erregers bereits durch latent infizierte Jungtiere möglich ist und nicht erst in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien auftritt. Bei subklinisch infizierten Tieren verläuft die fäkale Ausscheidung intermittierend (Chiodini et al. 1984). Die Erregermengen, die mit dem Kot freigesetzt werden sind ebenso schwer messbar wie die Verbreitung des Bakteriums in der Umwelt. Es wurde geschätzt, dass von klinisch erkrankten Tieren mit dem Kot täglich bis 5×10^{12} KBE ausgeschieden werden (Chiodini et al. 1984).

Map-Ausscheidung mit der Milch

Die Ausscheidung des Erregers über Kolostrum und Milch durch infizierte Tiere wurde untersucht, ein Nachweis von Map in den Milchdrüsensekreten war dabei sowohl bei klinisch erkrankten als auch bei subklinisch infizierten Tiere möglich (Tab. 1).

Tab. 1: Ausgewählte Studien zum Nachweis von *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in Milch und Kolostrum

Autoren	Anzahl (n) untersuchter Tiere	Map-Nachweisrate in % von n
Sweeney et al. 1992b	77	11,6 % in der Milch
Streeter et al. 1995	36	8,3 % in der Milch; 22,2 % im Kolostrum
Giese und Ahrens 2000	11	45,5 % in der Milch

Der Nachweis des Bakteriums in den Euterlymphknoten bei 27 % von 81 untersuchten Tieren belegt das Vorhandensein des Erregers im Euter (Sweeney et al. 1992b). Es ist jedoch fraglich, ob mit der Milchsekretion infektiöse Erregermengen frei werden, oder ob die externe Kotkontamination während des Melkprozesses den größeren Eintrag des Erregers in die Milch verursacht. Dennoch müssen Kolostrum und Milch infizierter Tiere, trotz hygienischer Gewinnung, als potenzielle Infektionsquellen für Jungtiere angesehen werden.

Map-Ausscheidung über die Sekrete der männlichen Geschlechtsorgane und Sperma

Map war in Studien mit geringem Stichprobenumfang in den Geschlechtsorganen und im Sperma von kot- und organpositiven Bullen nachweisbar (Tab. 2). Nach den bisherigen Ergebnissen kann nicht ausgeschlossen werden, dass bereits subklinisch infizierte Bullen das Bakterium mit dem Sperma ausscheiden können. Eine Infektion durch die Übertragung des Erregers mit dem Sperma infizierter Bullen wurde bisher jedoch nicht dokumentiert.

Tab. 2: Ausgewählte Studien zum Nachweis von *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in männlichen Geschlechtsorganen und im Sperma

Autoren	Anzahl	Map-Nachweis
Larsen et al. 1981	1 natürlich infizierter Bulle	8 von 31 Spermaproben sowie Hoden-, Prostata- und Samenblasengewebe Map-positiv
Glawischnig et al. 2004	1 natürlich infizierter Bulle	Map-Nachweis im Hodengewebe
Ayele et al. 2004	4 natürlich infizierte Bullen	Hoden-, Nebenhodengewebe von 2 Bullen Map-positiv, bei 2 Bullen Map-Nachweis in der Samenblase und bei einem Bullen im Sperma

2.4.2 Übertragungswege

Fäkal-orale Infektion

Die Infektion von Jungtieren mit Map in einer kontaminierten Umwelt erfolgt auf oralem Weg. Neugeborene Kälber nehmen den Erreger von kotkontaminierten Zitzen, aus kontaminierter Einstreu und von sämtlichen Gegenständen der Umwelt, die mit Erregern behaftet sind, auf (Sweeney 1996). Einen wichtigen Risikofaktor stellt dabei eine mangelnde Geburtshygiene dar. Die Gefahr einer Infektion steigt, wenn Kälber in stark kontaminierten Abkalbeboxen, unter mangelhaften hygienischen Bedingungen geboren werden und in diesen längere Zeit nach der Geburt verbleiben (Benedictus et al. 2008). Ältere Kälber können sich über die Aufnahme von kontaminiertem Futter und Tränkwasser infizieren. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass bereits Jungtiere das Bakterium mit dem Kot ausscheiden (van Roermund et al. 2007, Antognoli et al. 2007) und andere Tiere ihrer Altersgruppe infizieren können (van Roermund et al. 2007). Diese Studie belegte erstmals, dass eine horizontale Infektion von Kalb zu Kalb möglich ist. Als Infektionsquellen für Jungtiere müssen darüber hinaus auch von infizierten Haus- und Wildwiederkäuern kontaminierte Weiden und Gewässer angesehen werden.

Bislang unbekannt sind die Erregermengen, die für eine natürliche Infektion notwendig sind. Es wurde vermutet, dass schon eine geringe Erregerdosis bei neugeborenen Kälbern zur chronischen Infektion führt, während mit zunehmendem Alter ausschließlich höhere Infektionsdosen ein Überleben des Erregers in der Darmschleimhaut verursachen (Sweeney 1996). Auch beim experimentellen Einsatz gleicher Infektionsdosen bei Kälbern wurden stets zahlreiche Variationen der Krankheitsausprägung und der Ausscheidungszeitpunkte ermittelt (Sweeney et al. 1992a).

Intrauterine Übertragung

Die stark angezweifelte intrauterine Übertragung von Map wurde durch den Nachweis des Erregers in den Organen der Feten (Pearson und Mc Clelland 1955, Mc Queen und Russell 1979) sowie in Uterusspülproben (Rohde und Shulaw 1990) belegt. Die Detektion von Map in Oozysten und Embryonen war nicht möglich (Kruip et al. 2003, Perry et al. 2006), daher wird angenommen, dass ausschließlich eine transplazentale Infektion der Feten erfolgt (Sweeney 1996). In einer Untersuchung von tragenden Rindern mit positivem Kotbefund wurde Map in Organproben der Feten (9 von 34; 26,4 %) nachgewiesen (Seitz et al. 1989). In einer weiteren Studie mit 58 tragenden und kotpositiven Rindern wurde der Erreger ausschließlich in Feten starker Ausscheider (5 von 28; 17,8 %) detektiert (Sweeney et al. 1992c). Die Gefahr einer intrauterinen Map-Übertragung besteht daher vor allem bei Tieren in fortgeschrittenen Krankheitsstadien mit starker Erregerausscheidung. In einer Meta-Analyse wurde eine Abhängigkeit zwischen der Herdenprävalenz und der Häufigkeit intrauteriner Erregerübertragungen nachgewiesen (Whittington und Windsor 2007). Das Risiko für eine intrauterine Infektion lag bei subklinisch infizierten Tieren zwischen 9–14 % und bei klinisch erkrankten Tieren zwischen 20–60 % (Whittington und Windsor 2007). Nach diesen Ergebnissen wurde resümiert, dass der Erfolg von Paratuberkulose Kontroll- und Sanierungsprogrammen stark vom Umfang intrauteriner Erregerübertragungen beeinflusst wird.

2.4.3 Wirtsspektrum und Empfänglichkeit der Wirtstiere

Alle Haus- und Wildwiederkäuer sind empfänglich für eine Map-Infektion und können subklinisch infiziert sein oder klinisch erkranken (Clarke 1997). Die höchste Empfänglichkeit für eine Infektion besteht im Jungtieralter. Rinder, Schafe und Ziegen werden bis zu einem Alter von 2 Jahren als empfänglich und darüber hinaus als weitgehend resistent gegenüber einer Map-Infektion angesehen (Rankin 1961a, Bendixen 1978, Chiodini et al. 1984). Bei der experimentellen Infektion von Kälbern im Alter von 1 Monat und von Jungrindern im Alter von 9 Monaten, wies die jüngere Altersgruppe 150 Tage *post infectionem* die prägnantesten Gewebeveränderungen auf (Larsen et al. 1975). Es wurde geschlussfolgert, dass die Krankheitserscheinungen und die pathologischen Veränderungen des Darmes und seiner lymphatischen Gewebe bei Tieren, die geburtsnah infiziert wurden gravierender sind als bei Tieren, die sich zu einem späteren Zeitpunkt infizierten (Sweeney 1996).

Rinder scheinen weniger empfindlich gegenüber einer Infektion mit dem „ovinen Biotyp“ zu sein (Moloney und Whittington 2008). In ovinen Proben waren alle Map-Biotypen nachweisbar, aus caprinen Proben wurden bisher ausschließlich die Biotypen II und III isoliert (Bauerfeind et al. 1996, de Juan et al. 2005). Experimentell wurde gezeigt, dass die Infektion von Schafälammern mit dem „bovinen Biotyp“ möglich ist (Juste et al. 1994) und Kälber auch mit einem caprinen Map-Stamm infiziert werden können (Saxegaard 1990). In der Vergangenheit wurde eine höhere Empfindlichkeit einzelner Rinderrassen, z. B. Jersey und Guernsey gegenüber einer Infektion mit Map vermutet (Rosenberger 1978). Andere Autoren begründeten das häufigere Auftreten der Erkrankung bei bestimmten Rassen mit ihrer Haltung in Regionen mit prädisponierenden Umweltbedingungen, so dass nach ihrer Meinung eine Rassedisposition vorgetäuscht wird (Chiodini et al. 1984). Auch eine genetisch bedingte, erhöhte Empfänglichkeit einzelner Tiere, unabhängig von ihrer Rasse, gegenüber einer Map-Infektion wurde vermutet (Koets et al. 2000).

Map wird regelmäßig aus Wildwiederkäuern isoliert. Der Nachweis des Erregers gelang in 33 verschiedenen Wildtierspezies, u. a. in Rotwild, Reh, Damhirsch, Mufflon, Elch und Bison (Machackova et al. 2004, Motiwala et al. 2004). Die Haltung von Wildwiederkäuern in Gattern führte zur starken Zunahme der Infektionen und klinischen Erkrankungen bei Wildtieren (Mackintosh et al. 2003). Die Mehrzahl der aus Gatterwild isolierten Map-Stämme gehörten in die Gruppe des „bovinen Biotyps“ (de Lisle 2006, O'Brien et al. 2006).

Der Nachweis von Map wurde auch bei wildlebenden Nicht-Wiederkäuern durchgeführt. In zahlreichen Untersuchungen gelang der Erregernachweis in Wildkaninchen, welche anschließend als Wildtierreservoir eingestuft wurden (Beard et al. 2001, Raizman et al. 2005, Judge et al. 2005 and 2006). Map wurde auch aus den Mesenteriallymphknoten und der Dünndarmschleimhaut von Katzen angezüchtet, die aus einem Paratuberkulosebetrieb stammten (Palmer et al. 2005). Makroskopische und mikroskopische Veränderungen waren dabei nicht sichtbar, so dass davon auszugehen ist, dass die Tiere lediglich Träger des Erregers waren. Auch bei anderen monogastrischen Tieren, z. B. bei Schweinen, Eseln, Hunden oder Hühnern wurde Map aus Organproben isoliert (Runnels 1955, van Ulsen 1970, Larsen und Moon 1972, Vogel 1977). Experimentell war die Anreicherung von Map in Geweben von Ratten oder Mäusen nachweisbar (Chandler 1961). Die genetisch bedingte Resistenz eines Mausstammes gegenüber der Vermehrung von Map wurde publiziert (Roupie et al. 2008b).

Der Mensch wurde in den letzten Jahren wiederholt als Map-Wirt in Betracht gezogen. Map wird als ein ursächliches Agens der Faktorenkrankheit *Morbus Crohn*, eine chronisch-granulomatöse Ileocolitis des Menschen, angesehen und kontrovers diskutiert (Chiodini und Rossiter 1996). Der Erreger wurde aus menschlichen Darmbiopsaten, die von *Morbus Crohn*-Patienten stammten isoliert (Chiodini und Rossiter 1996, Bull et al. 2003). Andererseits gelang die experimentelle Infektion neugeborener Lämmer mit humanen Map-Isolaten (van Kruiningen et al. 1986), dabei wiesen die Tiere klinische Krankheitssymptome sowie pathologische Veränderungen des Darmes auf. Das Vorkommen des Bakteriums bei *Morbus Crohn*-Patienten sowie die Ähnlichkeit zwischen dieser humanen Erkrankung und der Paratuberkulose der Wiederkäuer wurden vielfach belegt. Jedoch wurde bisher nicht geklärt, ob der Erreger ursächlich, z. B. als Kofaktor an der Ausbildung der Erkrankung *Morbus Crohn* beteiligt ist. Humane Map-Infektionen sind zudem nur sehr schwer zu detektieren, da der Erreger in den nachgewiesenen Fällen nur in geringen Mengen und im sogenannten Ziehl-Neelsen-negativen Phänotyp vorlag. Diese Form des Erregers, mit einer veränderten Zellwandstruktur, ist nur schwer anzüchtbar und gleichzeitig jedoch relativ resistent gegenüber einer chemischen oder enzymatischen Lyse (Hermon-Taylor 2009).

2.4.4 Geographische Verbreitung

Das Vorkommen der Paratuberkulose wurde weltweit mit Ausnahme weniger Länder dokumentiert (Abb. 1), wobei aufgrund des Tierhandels mit einer weiteren Verbreitung der Erkrankung zu rechnen ist. In einzelnen Ländern und Gebieten erfolgten Prävalenzschätzungen, die jedoch aufgrund der Verwendung unterschiedlicher diagnostischer Testverfahren nicht miteinander zu vergleichen sind (Nielsen und Toft 2008). Die Paratuberkulose wurde von der World Organisation for Animal Health (OIE) als Erkrankung mit sozioökonomischer Bedeutung und Bedeutung für die menschliche Gesundheit eingestuft. In Europa, z. B. in den Niederlanden (Muskens et al. 2000), in Belgien (Boelaert et al. 2000), Dänemark (Nielsen 2003) oder in Österreich (Gasteiner et al. 2000, Khol et al. 2007) wird zunehmend vom Vorkommen der Paratuberkulose berichtet. Schweden galt zeitweise als frei von Paratuberkulose (Viske et al. 1996), jedoch wurden zwischen 1993 und 2005 insgesamt 53 infizierte Herden identifiziert (Sternberg und Larsson 2005).

In den USA wurden in einzelnen Bundesstaaten Prävalenzschätzungen durchgeführt. Bisher wurde jedoch nur eine landesweite Studie veröffentlicht, bei der ein direktes Map-Nachweisverfahren angewendet wurde (Merkal et al. 1987). Dabei wurden die Ileocäcallymphknoten von 7.540 Schlachtrindern aus 32 amerikanischen Bundesstaaten untersucht, Map war bei 1,6 % der Tiere kulturell nachweisbar. Bei einer stichprobenartigen Untersuchung von 1.004 amerikanischen Herden erwiesen sich 3,4 % der Tiere als serologisch positiv, während bei der alleinigen Betrachtung der Milchrinderpopulation 21,6 % der Tiere seropositiv reagierten (Wells und Wagner 2000).

Die Paratuberkulose wurde in Kanada sowohl in Milchviehherden als auch bei Fleischrindern beobachtet (Scott et al. 2007a, b). In Prävalenzstudien für einzelne kanadische Bundesstaaten wurden stets Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Verfahren eingesetzt. Dabei wurden in einer Studie mit 304 teilnehmenden Herden 15,2 % seropositive Tiere detektiert.

In einzelnen Ländern Südamerikas wird die Verbreitung der Paratuberkulose in Rinder- und Ziegenherden zunehmend untersucht (Ristow et al. 2007, Salgado et al. 2007). In Argentinien

tinien wird die Paratuberkuloseprävalenz in Fleischrind- und Milchviehherden als hoch eingeschätzt (Paolicchii et al. 2003), während die Paratuberkulose in Brasilien derzeit als importierte und seltene Erkrankung betrachtet wird (Ristow et al. 2007).

In Australien und Neuseeland ist die Infektionskrankheit in Rinder-, Schaf- und Ziegenherden (Dhand et al. 2007) weit verbreitet und wird zunehmend als Problem bei der Gatterwildhaltung wahrgenommen (O'Brien et al. 2006, de Lisle et al. 2006).

In Japan wurde das Vorkommen der Paratuberkulose erstmals 1971 und seit Mitte der 1990er Jahre gehäuft registriert (Kobayashi et al. 2007).

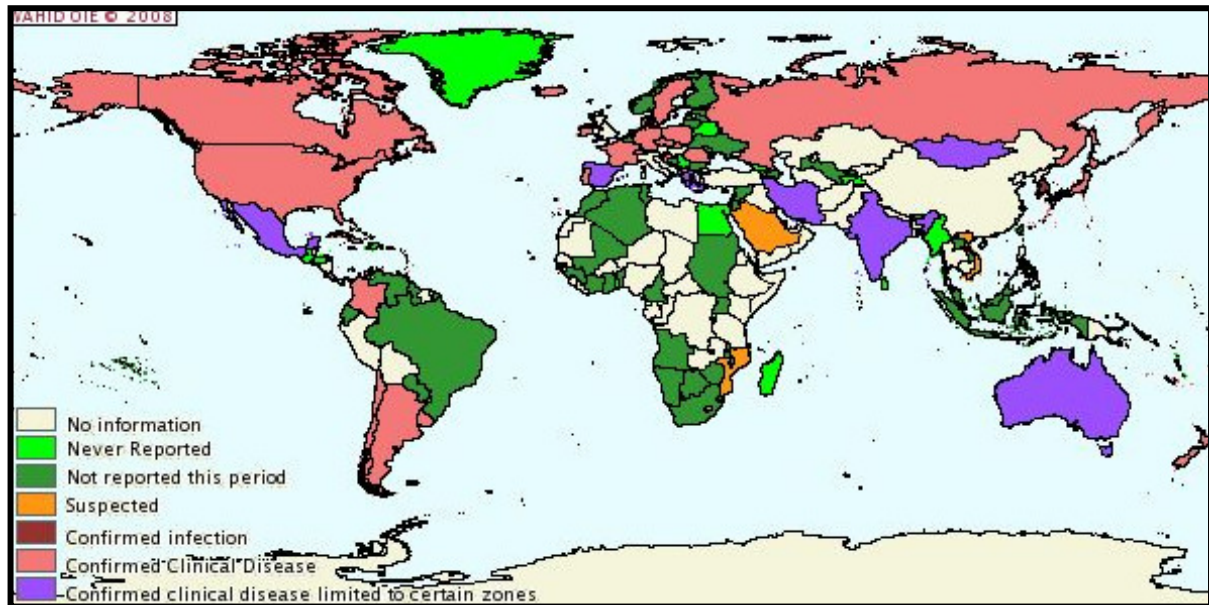
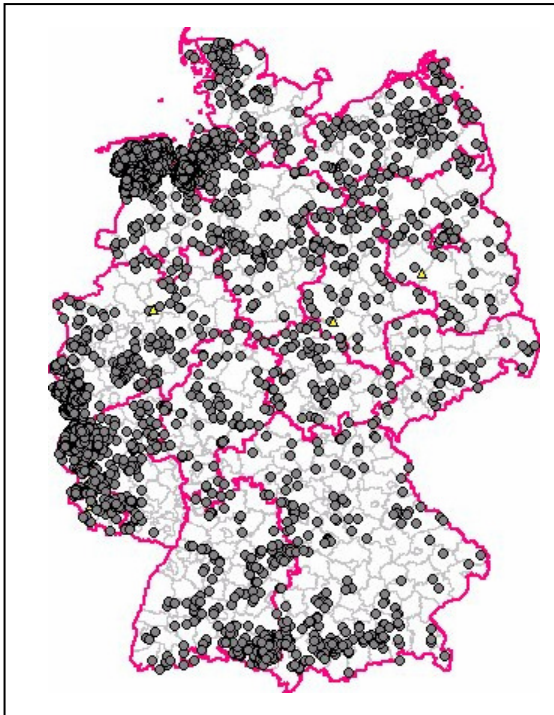


Abb. 1: Weltweites Vorkommen der Paratuberkulose (OIE 2008)

In Deutschland gibt es bisher keine flächendeckenden, bundesweiten Untersuchungen zum Vorkommen der Paratuberkulose, damit sind auch Prävalenzschätzungen für Deutschland derzeit nicht möglich. Traditionell wurde das Vorkommen der Erkrankung vor allem im norddeutschen Raum dokumentiert, so dass insbesondere Landkreise in Niedersachsen als Endemiegebiete angesehen werden (Abb. 2). In Niedersachsen wurde bereits 1990 ein freiwilliges Programm zur Sanierung der Paratuberkulose eingeführt. Auch in einzelnen anderen Bundesländern wie z. B. Nordrhein-Westfalen und Thüringen wurden Paratuberkulose-Sanierungs- und Bekämpfungsprogramme etabliert. In den neuen Bundesländern trat die Paratuberkulose bis Ende der 1980er Jahre klinisch und ökonomisch kaum in Erscheinung und wurde nach umfangreichen Tierzukaufen ab Mitte der 1990er Jahre zunehmend als Problem wahrgenommen (Geue et al. 2007). Die gezielte Untersuchung der Paratuberkulose in Thüringen begann im Jahr 2000 (Elschner 2003). In repräsentativen Milchviehbeständen Thüringens wurden mittels milchserologischer Tests epidemiologische Untersuchungen vorgenommen. Bei 75 % der in die Untersuchungen einbezogenen Bestände wurden Map-Antikörper detektiert und 13 % der untersuchten Tiere erwiesen sich als milchserologisch positiv (Elschner 2003).



Legende zu Abb. 2:

- Paratuberkulose-Feststellung
- Paratuberkulose-Verdacht

Abb. 2: Paratuberkulose-Meldungen in Deutschland
aus dem TSN – Zeitraum: 1.1.1995 – 1.12.2008 (n=4.138)

2.4.5 Wirtschaftliche Bedeutung

Die Paratuberkulose zählt vor allem in den USA zu den verlustreichsten Erkrankungen der Milchviehwirtschaft (Collins 1994). Die jährlichen finanziellen Einbußen infolge der Erkrankung wurden in den USA bereits in den 80er Jahren auf 1,5 Billionen US\$ geschätzt (Jones 1989). Der Vergleich der finanziellen Aufwendungen für verschiedene Infektionskrankheiten in kanadischen Rinderherden ergab, dass die Paratuberkulose mit 2.472 US\$ in einer Herde mit durchschnittlich 50 Tieren gegenüber den Infektionskrankheiten Bovine Virusdiarrhoe, Leukose und Neosporose die höchsten jährlichen Kosten verursacht (Chi et al. 2002). Auch in einer französischen Studie wurden beim Vorkommen der Paratuberkulose in einer Milchviehherde mit 40 Tieren zusätzliche Kosten in Höhe von 1.940 € pro Jahr berechnet (Dufour et al. 2004). Die wirtschaftlichen Einbußen werden dabei durch unmittelbare Tierverluste, frühzeitige Schlachtungen, verminderte Schlachtgewichte, reduzierte Milchleistungen, durch erhöhte Fruchtbarkeitsstörungen sowie eine höhere Empfänglichkeit gegenüber anderen Erkrankungen, durch zusätzliche Tierarztkosten und Kosten für die Diagnostik verursacht (Collins 1994, Hutchinson 1996, McKenna 2006b).

Das durchschnittliche Alter bei der Schlachtung war bei klinisch erkrankten (4,3 Jahre) und subklinisch infizierten Tieren (4,9 Jahre) signifikant reduziert gegenüber dem durchschnittlichen Alter (7,7 Jahre) nicht-infizierter Tiere (Buergelt und Duncan 1978). Zudem wiesen kotkulturpositive Tiere gegenüber nicht infizierten Tieren im Durchschnitt ein um 59 kg reduziertes Schlachtgewicht auf, damit war zum Untersuchungszeitpunkt ein finanzieller Verlust von 58 US\$ pro Schlachttier verbunden (Whitlock et al. 1985). Eine Reduktion der

Schlachtgewichte bei klinisch erkrankten Rindern um 20-30 % gegenüber nicht infizierten Tieren wurde in einer weiteren Studie ermittelt (Benedictus et al. 1987).

Ein Abfall der Milchleistung, der hohe wirtschaftliche Verluste verursacht, war bei klinisch und subklinisch erkrankten Rindern nachweisbar (Tab. 3). In einer nationalen amerikanischen Studie im Jahr 1996 betragen die jährlichen finanziellen Einbußen infolge reduzierter Milchleistungen in Paratuberkuloseherden pro Tier 100 US\$ (Ott et al. 1999). Durchschnittlich war die Milchleistung der amerikanischen Herden mit hoher Paratuberkuloseprävalenz um 700 kg pro Tier und Laktation reduziert.

Tab. 3: Ausgewählte Studien zur Untersuchung des Einflusses der Erkrankung auf die Milchleistung infizierter Tiere

Autor	Map-Nachweis	Ermittelter Einfluss der Paratuberkulose auf die Milchleistung infizierter Tiere
Benedictus et al. 1987	kulturell	Durchschnittliche Reduktion der Milchleistung bei klinisch erkrankten Tieren um 19,5 % und bei subklinisch erkrankten Tieren um 16 % gegenüber der Leistung in vorheriger Laktation
Raizman et al. 2007	kulturell	Reduktion der Milchleistung bei leichten, moderaten und starken Ausscheidern um 537, 1403 und 1534 kg/Laktation gegenüber dem Herdendurchschnitt
Nordlund et al. 1996	serologisch	Milchleistung bei serologisch positiven Tieren um 4 % vermindert gegenüber serologisch negativen Tieren der gleichen Herde

Der Einfluss der Paratuberkulose auf die Fruchtbarkeit der Rinder ist umstritten und gilt als noch nicht vollständig wissenschaftlich belegt (McKenna et al. 2006b). Die Unfruchtbarkeitsraten bei Kühen mit subklinischer Paratuberkulose und positivem Gewebebefund (68,8 %) waren höher als bei Tieren mit negativem Organkulturbefund (60,2 %, Merkal et al. 1975). Zudem wurde eine Verlängerung der Zwischentragezeiten bei serologisch positiven Tieren um durchschnittlich 28 Tage gegenüber serologisch negativen Tieren der gleichen Herde beobachtet (Johnson-Ifearulundu et al. 2000). Die Autoren vermuteten, dass die Paratuberkuloseinfektionen negative Energiebilanzen verursachen, die eine Unterdrückung des Östrus bedingen. In einer weiteren Studie waren die Zwischentragezeiten ausschließlich bei serologisch positiven Tieren in der ersten Laktation um durchschnittlich 49 Tage verlängert (Tiwari et al. 2003).

Es wird diskutiert, ob Paratuberkuloseinfektionen mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber anderen Erkrankungen einhergehen und somit zusätzlich Behandlungskosten und verringerte Leistungen infolge der Erkrankung verursacht werden. In einer Untersuchung wurde bei infizierten Tieren signifikant gehäuft das Auftreten von Pneumonien ermittelt (Raizman et al. 2007). Der Einfluss der Erkrankung auf die Eutergesundheit wurde besonders untersucht. Tiere, die chronisch mastitiserkrankt waren, wurden signifikant häufiger gemerzt, wenn sie gleichzeitig einen positiven Kotbefund aufwiesen (Merkal et al. 1975). Bei blutserologischen Untersuchungen in 304 kanadischen Milchviehherden waren signifikant höhere Zellzahlen der Milch bei Tieren mit blutserologisch positivem Befund nachweisbar (Mc Nab et al. 1991). Seropositive Tiere wiesen zudem ein 2,9fach höheres Risiko auf, infolge einer Mastitis, einer verminderten Milchleistung oder einer verminderten

Reproduktionsleistung frühzeitig geschlachtet zu werden (Tiwari et al. 2002). Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher diagnostischer Testverfahren in verschiedenen Ländern mit sehr unterschiedlichen Bedingungen sind die bisherigen Studien zu den Einflüssen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit und den damit verbundenen wirtschaftlichen Schäden nicht miteinander vergleichbar, und es können hierzu bislang keine eindeutigen Aussagen getroffen werden.

2.5 Diagnostik der Paratuberkulose

2.5.1 Direkter Erregernachweis

2.5.1.1 Mikroskopische Untersuchung von Kotausstrichen und Organabklatschpräparaten

Eine einfache und schnell durchführbare Methode, um *Map* in Kotausstrichen und Abklatschpräparaten, z. B. von postmortal entnommenen Mesenteriallymphknoten zu detektieren, ist die lichtmikroskopische Untersuchung Ziehl-Neelsen gefärbter Präparate. Bei der traditionellen Ziehl-Neelsen-Färbung (Ziehl 1882, Neelsen 1885) wird die Säure- und Alkoholfestigkeit des Bakteriums nachgewiesen. Dabei kann der eingedrungene, rote Farbstoff Carbofuchsin durch die Behandlung mit salzsaurem Alkohol aufgrund der besonderen Zellwandeigenschaften des Erregers nicht entfernt werden. *Map* wird deutlich rot angefärbt und ist typischerweise in Nestern zusammengeballt lichtmikroskopisch sichtbar. Eine neuere Färbemethode, die ebenso die Säurefestigkeit der Mykobakterien ausnutzt, ist die Acridinorange-Fluoreszenzfärbung (Smithwick et al. 1995).

Die mikroskopische Untersuchung von Kotausstrichen wird häufiger bei klinischen Verdachtsfällen durchgeführt und ist nicht für die Identifizierung subklinisch erkrankter Tiere geeignet (Merkal et al. 1968). Bei Kotproben mit positivem Kulturergebnis wurde eine Sensitivität von 46 % und eine Spezifität von 94 % für die mikroskopische Untersuchung von Kotausstrichen errechnet (Jørgensen 1983). In einer weiteren Studie gelang der direkte mikroskopische Erregernachweis nur zu 25–35 % bei kulturell positiven Kotproben und bei 60 % der kulturell positiven Lymphknoten (Hietala 1992).

2.5.1.2 Kultureller Erregernachweis und Speziesidentifizierung mittels PCR aus Kulturmaterial

Die kulturelle Anzucht von *Map* aus Kot- und Organproben wird bis heute als sensitivste Methode zum Nachweis des Erregers angesehen und als „Goldstandardmethode“ zur Evaluierung anderer diagnostischer Methoden verwendet (Whittington und Sergeant 2001, Köhler et al. 2003). *Map* wurde auch aus Milchproben kulturell angezüchtet (Taylor et al. 1981).

Die Sensitivität der Kultivierung von *Map* aus Kot liegt bei einer einmaligen Herdenuntersuchungen zwischen 10 und maximal 50 % (Whitlock und Rosenberger 1990, Mc Nab et al. 1991, Whitlock et al. 2000) und wird vom Erregergehalt des Kotes, von der Zwischenlagerung der Kotproben bis zur Aufarbeitung sowie von den verwendeten Kultivierungsmethoden beeinflusst (Eamens et al. 2000). Ein Mindestkeimgehalt von 50-100 *Map*/g Kot wurde für die erfolgreiche Erregeranzucht angegeben (Merkal 1973). Für die Spezifität der kulturellen Erregeranzucht mit angeschlossenen molekulargenetischem Erregernachweis

aus Koloniematerial wird ein Wert von 100 % angenommen (Chiodini et al. 1984, Sockett et al. 1992a und b). Die Methoden des kulturellen Nachweises wurden häufig variiert. Dabei unterschieden sich die Art der Kotdekontamination, die Anwendung von Sedimentations- oder Zentrifugationsverfahren sowie die verwendeten Nährmedien und Zusätze.

Dekontamination von Rinderkot für die kulturelle Anzucht von Map

Eine Voraussetzung für die Map-Anzucht aus Kotproben ist die Abtötung der unerwünschten Begleitflora des Kotes, ohne dabei Map zu schädigen. Insbesondere Pilzkontaminationen stören den Erregernachweis in Kotproben (Merkal und Richards 1972, Turcotte et al. 1986, Stabel 1997a). Für die chemische Dekontamination der Kotproben wurde die Verwendung von Benzalkoniumchlorid 0,3 % und Oxalsäure 2,5–5 % (Merkal et al. 1964) sowie, um die Ausbeute an Map zu erhöhen, die Verwendung von Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) empfohlen (Merkal et al. 1982). HPC in 0,75 %iger Konzentration wird heute am häufigsten zur Reduktion der unerwünschten Begleitflora in Kotproben eingesetzt. Forscher der Cornell Universität entwickelten zur Dekontamination von Kotproben eine Doppelinkubationsmethode (Shin 1989). Bei der so genannten Cornell Methode soll das Auskeimen der Pilzsporen in einem ersten Inkubationsschritt bei 37 °C über 24 h in einer Mischung aus HPC und einer Hirn-Herz-Bouillon erfolgen. Die vegetativen Formen der Pilze und sporenbildender Bakterien werden anschließend mit einer antibiotisch-antimykotisch wirksamen Lösung behandelt und bei Empfindlichkeit der Erreger abgetötet. Eine vollständige Elimination der Kontaminanten wurde jedoch mit dieser Methode nicht erzielt (Whitlock und Rosenberger 1990).

Nach der chemischen Dekontamination des Kotes folgt eine Sedimentationsphase, eine Zentrifugation oder eine Filtration der Kotsuspensionen (Collins et al. 1990). Der Vergleich von Sedimentations- und Zentrifugationsmethoden zeigte, dass die Map-Koloniezahlen bei zentrifugierten Proben erhöht sind (Kim et al. 1988 und 1989, Kalis et al. 1999, Whitlock und Rosenberger 1990), jedoch waren gleichzeitig signifikante Zunahmen der Kontaminationen nach Zentrifugation feststellbar (Kim et al. 1988 und 1989, Stabel 1997a).

Um die Kontaminationen der Kotkulturen zu reduzieren wurde der Einsatz antibakteriell und antimykotisch wirksamer Zusätze zur Abtötung der Begleitflora im Kot getestet, dabei wurde v. a. betrachtet, ob die eingesetzten Hemmstoffe auch einen Einfluss auf das Map-Wachstum ausüben (Merkal und Richards 1972). Amphotericin B erwies sich als potentester Wirkstoff zur Unterdrückung des Pilzwachstums in Kotkulturen, der Zusatz des Wirkstoffes zum jeweiligen Nährmedium wurde empfohlen (Merkal und Richards 1972). Als Antimykotika, die das Wachstum von Map nicht beeinflussen, wurden neben Amphotericin B die Stoffe Ketoconazol, Cycloheximid, Miconazol und Natamycin zur Kotdekontamination eingesetzt (Callihan 1986, Turcotte et al. 1986, Kim et al. 1989, Johansen et al. 2006). Der heute am häufigsten in Kotkulturen verwendete antimikrobielle Zusatz besteht aus den Hemmstoffen Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin (Eamens et al. 2000, Johansen et al. 2006).

Kultivierungsmethoden und Nährmedien

Map wird bei der Primäranzucht auf eigelbhaltigen Nährböden mit Mykobaktinzusatz kultiviert (Merkal und Curran 1974). Aufgrund des langsamen Wachstums des Erregers werden die Kulturen in der Regel über 16 Wochen bebrütet. Dabei erscheinen 97 % aller

Kolonien bereits in den ersten 12 Kultivierungswochen (Whitlock et al. 1989). Die Anzucht des Erregers erfolgt am häufigsten auf einem Eidotter-Medium (Merkal und Curran 1974), dem Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM; Herrold 1931). In der AVID-Methodensammlung (2007) wird die Verwendung eines HEYM-Nährbodens mit Mykobaktinzusatz und antibiotisch-antimykotischen Zusätzen zur Anzucht von Map empfohlen. Für die Anzucht des Erregers ist auch die Verwendung modifizierter Volleinährböden nach Löwenstein-Jensen möglich (Jørgensen 1982, Kalis et al. 1999). Die Nährböden enthalten den fungiziden Farbstoff Malachitgrün zur Verbesserung des Sichtbarwerdens der Kolonien und zur Dekontamination.

Zur Prüfung der Mykobaktinabhängigkeit des Erregers wird zu untersuchendes Material zusätzlich auf einem mykobaktinfreien Nährboden, z. B. HEYM ohne Mykobaktin J aufgebracht, dabei erfolgt kein Erregerwachstum (Whipple et al. 1991). Die Anzucht von Map ist auch in flüssigen Nährmedien, z. B. Middlebrook-7H10-Tween-Bouillon (Stephan 2007) sowie in radiometrischen Flüssigkultursystemen (Bactec System, Fa. Becton Dickinson) möglich. Das Bactec System wurde ursprünglich für die humanmedizinische Tuberkulose-diagnostik entwickelt und für die Anzucht von Map, z. B. durch den Zusatz von Eidotter und Mykobaktin J modifiziert. (Sockett et al. 1992a, Cousins et al. 1995, Collins et al. 1990, Whittington et al. 1998). Ein neueres, vollautomatisches Flüssigkultursystem zur Anzucht von Mykobakterien ist das Bactec-MGIT-960-System (Fa. Becton Dickinson). Der indirekte Nachweis von Map in automatisierten Flüssigkultursystemen erfolgt bereits nach 2 bis 4 Wochen (Cousins et al. 1995). Die Map-Anzucht in Flüssigkultursystemen wurde zudem als sensitiver gegenüber der herkömmlichen Kultivierung bewertet (Sockett et al. 1992a, Whittington et al. 1998), zu den Spezifitäten der Map-Kultivierung in automatisierten Flüssigkultursystemen wurden bisher jedoch kaum Ergebnisse publiziert. Die vollautomatisierte Kultivierung mit dem MGIT-System erbrachte letztlich eine unwesentliche Zeitersparnis, da stets eine Subkultivierung aus dem Flüssigkulturmaterial, welches PCR inhibierende Eidotterzusätze enthielt, notwendig war (Köhler und Gierke 2006).

DNA-Isolation und PCR aus Kulturmaterial

Die Bestätigung der Map-Anzucht erfolgt heute molekularbiologisch mittels PCR. Zuvor ist jedoch die Isolation mykobakterieller DNA aus Kulturmaterial notwendig. Die Isolierung der DNA aus Bakterienzellen erfolgt in 3 Schritten. Zunächst werden die Zellwände der Bakterienzellen lysiert. Die Lyse der Zellwände erfolgt thermisch, z. B. im Wasserbad (Moss et al. 1991), chemisch mit oberflächenaktiven Substanzen, enzymatisch (Visuvanathan et al. 1989) oder mechanisch, z. B. mit Glasbeads (Collins et al. 1993). Darauf findet eine Entfernung des Zelldetritus, freier Proteine und anderer Verunreinigungen durch Bindung der DNA an Matrices oder durch Präzipitations- bzw. Sedimentationsverfahren statt. In einem letzten Schritt wird die gewonnene template-DNA in Puffern resuspendiert. Kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits werden ebenfalls verwendet, sie basieren häufig auf Chloroform-Phenol-Extraktionen (Sambrook et al. 1989) oder enthalten DNA-bindende Matrices, z. B. auf Siliziumbasis.

Mit spezifischen Primerpaaren wird aus dem gewonnenen DNA-Material am häufigsten der Map-spezifische Genabschnitt IS900 (Green et al. 1989) zur Identifikation des Erregers nachgewiesen, sowohl für die „single-round“ als auch für die „nested“ IS900-PCR wurden diverse Primerpaare entwickelt (Vary et al. 1990, Bauerfeind et al. 1996, Englund

et al. 1999). Beim Vergleich von 8 „single-round“ und 5 „nested“ PCR-Verfahren sowie 12 verschiedenen Primerpaaren wurden zwei nicht Map-spezifische Primerpaare (IS900/150 und IS900/921; p90 und p91) identifiziert (Möbius et al. 2008). Für den sicheren Map-Nachweis mittels IS900-PCR ist jedoch der Einsatz hochspezifischer Primer notwendig, mit den Primern MP3 und MP4 (Bauerfeind et al. 1996) wurden bislang die spezifischsten IS900-PCR-Reaktionen erzielt (Möbius et al. 2008). Auch andere Gensequenzen, wie die Insertionssequenz IS*Mav2* (Strommenger et al. 2001), das *hspX*-Gen (Ellingson et al. 1998), die Sequenz f57 (Poupart et al. 1993) und die Insertionssequenz IS*Map02* (Stabel und Bannantine 2005) werden zum Nachweis von Map mittels PCR genutzt.

2.5.1.3 Molekularbiologischer Erregernachweis in Organmaterial, Kot und Milch

Post mortem ist der molekularbiologische Erregernachweis in Organmaterial wie Darmschleimhaut, Lymphknoten- oder Lebergewebe möglich (Challans et al. 1994, Erume et al. 2001). Sehr häufig wird Gewebe der Mesenteriallymphknoten zum Map-Nachweis aufgearbeitet. Zur Freisetzung der Map-DNA ist die Lyse der Gewebeproben notwendig, diese kann, z. B. enzymatisch oder mechanisch erfolgen. Heute werden zur Gewebeaufarbeitung zumeist DNA-Extraktionskits genutzt (Erume et al. 2001).

Zur schnellen *in vivo* Diagnostik der Paratuberkulose wurde in den vergangenen Jahren intensiv an der Entwicklung von Direkt-PCR-Verfahren zum Nachweis von Map im Rinderkot gearbeitet. Für die Direktaufarbeitung von Kot, der eine Vielzahl an PCR-Inhibitoren enthält, sind kommerzielle Map-DNA-Extraktionskits erhältlich.

In den ersten molekularbiologischen Map-Direktnachweisen in Rinderkot wurden für den Erregernachweis sehr hohe Keimzahlen von mindestens 10^4 KBE/g Kot benötigt (Whipple et al. 1992, van der Giessen et al. 1992). Eine starke Abhängigkeit der Sensitivität der Direkt-PCR vom Erregergehalt der Kotproben konnte nachgewiesen werden, die Sensitivität einer IS900-PCR betrug 81 % bei > 70 KBE/g Kot und nur 45 % bei weniger als 1 KBE/g Kot. (Stabel et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass die Sensitivitäten und Spezifitäten der Direkt-PCR-Verfahren gegenüber der Kotkultivierung, aufgrund der schwierigen Gewinnung der mykobakteriellen DNA aus Kot, vermindert sind (Sockett et al. 1992a, Whipple et al. 1992, van der Giessen et al. 1992, Collins et al. 1993, Taddei et al. 2004, Eamens et al. 2007). In neueren Untersuchungen wurden vermehrt Real-Time-PCR-Verfahren für die Gensequenzen IS900, f57 und IS*Map02* zum Nachweis von Map in Kot verwendet und als sensitiver gegenüber den herkömmlichen PCR-Verfahren beurteilt (Bögli-Stuber et al. 2005, Stabel und Bannantine 2005, Scott et al. 2007a, Schönenbrücher et al. 2008). Auch für gepoolte Kotproben erwies sich die Kultivierung als sensitivere Methode zum Map-Nachweis gegenüber den Direkt-PCR-Verfahren (Eamens et al. 2007, Scott et al. 2007a).

Zur Detektion von Map in Milchproben wurden überwiegend IS900-PCR-Verfahren angewendet. Evaluierungen von Milch-PCR-Verfahren erfolgten häufig unter Verwendung künstlich kontaminierter Milchproben (Pillai und Jayarao 2002, Khare et al. 2004, Donaghy et al. 2008). Milch inhibiert die PCR sehr stark, zudem gilt es als gesichert, dass natürlich infizierte Rohmilch mit maximal 8 KBE/50 ml gegenüber Kot geringere Erregerzahlen enthält (Sweeney et al. 1992b). Zur Isolierung von Map aus Milchproben wurden immunomagnetische Separationsmethoden angewendet (Grant et al. 1998, 2000, Khare et al. 2004, Stratmann et al. 2002). Bei der Kombination immunomagnetischer Separationen mit

enzymatisch-mechanischen Zell-Lysen waren weniger als 10 KBE/50 ml Milch in der PCR nachweisbar (Grant et al. 2000). Durch die Verwendung von Real-Time-PCR-Verfahren konnte die Sensitivität der Milch-Direkt-PCR erhöht werden (Khare et al. 2004, Bosshard et al. 2006, Donaghy et al. 2008), so wurden bei Verwendung eines DNA-Extraktionskits und einer IS900-Real-Time-PCR Sensitivitäten zwischen 100 %, beim Vorhandensein von 300 IS900 Kopien/ml Milch und 25 % bei einer Konzentration von 0,3 IS900 Kopien/ml Milch berechnet (Donaghy et al. 2008).

2.5.2 Indirekter Erregernachweis

Der indirekte Nachweis einer Map-Infektion erfolgt mit dem Johnin Hauttest, dem Interferon- γ -Test oder mittels serologischer Nachweismethoden. Zu den serologischen Nachweisverfahren zählen die Komplementbindungsreaktion, der Agargelimmunodiffusionstest, der Enzyme-linked Immunsorbent Assay sowie Protein Arrays.

2.5.2.1 Johnin Hauttest

Analog zur Tuberkulinisierung wird beim Johnin Hauttest intradermal 0,1 ml eines proteinhaltigen Map-Antigen-Gemisches (purified protein derivative, PPD) injiziert. Das PPD wird auch als Johnin oder Paratuberkulin bezeichnet. An der Injektionsstelle, die sich seitlich am Hals befindet, wird anschließend eine Zunahme der Hautdicke gemessen, die durch eine zellvermittelte Typ IV-Überempfindlichkeitsreaktion bedingt ist. Eine Hautdickenzunahme von mehr als 3 mm innerhalb von 24 bis 72 h wird als positive Reaktion gewertet (de Lisle et al. 1980).

In zwei Studien reagierten nur 48,5 % und 58,1 % der kotpositiven Tieren positiv bei der Anwendung des Intrakutantests (Körmendy 1990, Klawonn et al. 2002). Eine Spezifität der Methode von 93,5 % bei ausschließlicher Wertung positiver Reaktionen mit einer Hautdickenzunahme von mindestens 4 mm wurde errechnet, daneben wurde eine Herdenabhängigkeit der Spezifität, die zwischen 58 und 100 % lag, festgestellt (Kalis et al. 2003). Die diagnostische Sensitivität und Spezifität dieser Methode sind daher gering (de Lisle et al. 1980, Körmendy 1988, Collins 1996) und der Test wird heute in Deutschland zum Nachweis der Paratuberkulose nicht mehr angewendet.

2.5.2.2 Interferon- γ -Test

Der Interferon- γ -Test weist als *in vitro* Testverfahren zur Diagnostik der Paratuberkulose die zellvermittelte Immunantwort infizierter Tiere nach (Collins 1996). Dabei wird Vollblut mit mykobakteriellem Antigen stimuliert und die Produktion des Cytokins Interferon- γ durch sensibilisierte T-Zellen mittels IFN- γ -ELISA (Stabel 1996, Bassey und Collins 1997) gemessen. Bei infizierten Tieren bis zu einem Alter von 2 Jahren wurde häufiger eine positive IFN- γ -Reaktion als ein positiver Antikörpernachweis ermittelt (Huda et al. 2004), der IFN- γ -Test ist daher v. a. für den Nachweis früher Erkrankungsstadien von Bedeutung (Stabel et al. 2007). Die Sensitivität des Testverfahrens ist mit Werten zwischen 66,7 % und 93,3 % begrenzt (Billmann-Jacobe et al. 1992, Robbe-Austermann et al. 2006). Auch die diagnostische Spezifität des IFN- γ -Tests wurde als limitiert bewertet (Huda et al. 2003, McDonald et al. 1999), so wurde in einer Studie lediglich eine Testspezifität von 93,5 %

errechnet (Robbe-Austermann et al. 2006) und eine Abhängigkeit der Spezifität vom stimulierenden Antigen nachgewiesen. In einer Studie waren bei unter 15 Monate alten Tieren falsch positive Testergebnisse nachweisbar und es wurde empfohlen den Test lediglich unterstützend bei der Untersuchung von Jungtieren einzusetzen (Jungersen et al. 2002). Nach der vorangehenden intradermalen Applikation von Johnin war bei subklinisch infizierten Tieren eine signifikante Steigerung der IFN- γ -Produktion detektierbar (Stabel et al. 2007).

2.5.2.3 Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die Komplementbindungsreaktion, der erste serologische Test zum Nachweis von Map-Antikörpern im Blutserum infizierter Tiere (Twort und Ingram 1912, Bang und Andersen 1913), ist heute für die Diagnostik der Paratuberkulose nicht mehr von Bedeutung, da die Sensitivität der Methode besonders bei subklinisch infizierten Tieren mangelhaft ist (Rankin 1961b, Wilks et al. 1981, Jørgensen 1983, Abbas et al. 1983, Sherman et al. 1990), so wurde in einer Untersuchung subklinisch infizierter Tiere eine Sensitivität der KBR von 10,8 % berechnet (Sherman et al. 1990). Zudem wurde nachgewiesen, dass bei der Anwendung der KBR zur Diagnostik der Paratuberkulose häufig Kreuzreaktionen auftreten, die die Spezifität des Nachweisverfahrens limitieren (Wilks et al. 1981). Ein Grund dafür ist der Einsatz von Vollantigenen bei diesem Testverfahren, zumeist werden Map als auch Maa verwendet. Die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen führt anschließend zum Verbrauch von Komplementfaktoren und die Messung des Verbrauchs der Komplementfaktoren erfolgt über ein hämolytisches System.

2.5.2.4 Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT)

Der AGIDT wird in verschiedenen Ländern, z. B. Australien, traditionell als schneller und kostengünstiger Test für die Diagnostik der Paratuberkulose in Schaf- und Ziegenherden eingesetzt (Gumber et al. 2006). Dabei befinden sich Map-Antigene in einem Gelmedium, Serum wird hinzu gegeben und vorhandene Antikörper diffundieren bis sich im Grenzbereich eine Präzipitationslinie aus Antigen-Antikörper-Komplexen ausbildet. Die Sensitivität des Testverfahrens erwies sich mit Werten zwischen 8,3 % und 29,1 % als begrenzt (Robbe-Austermann et al. 2006, Ferreira et al. 2002, Gumber et al. 2006), allerdings wurde eine Zunahme der Testsensitivität von 26,6 % auf 40,7 % bei aktueller Kotausscheidung des Krankheitserregers nachgewiesen (Sockett 1992b). Für den AGIDT wurden Testspezifitäten zwischen 92,5 % und 99,5 % berechnet (Robbe-Austermann et al. 2006, Ferreira et al. 2002). Die Spezifität der Methode wurde durch die Vorabsorption mit einem *M. phlei*-Extrakt erhöht (Merkal 1984). Der AGIDT sollte ausschließlich zur schnellen Diagnosestellung bei klinisch erkrankten Tieren angewendet werden (Merkal 1984). Die Methode ist nicht zum Screening subklinisch infizierter Herden geeignet (Ferreira et al. 2002).

2.5.2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Antikörper-ELISA ist die am häufigsten eingesetzte Methode zum indirekten Nachweis von Map. Antikörper aus dem Blut- und Milchserum binden dabei an Antigene, die wiederum an eine Festphase, in der Regel (i. d. R.) Mikrotiterplatten, gebunden sind. Zum Antigen-Antikörper-Komplex wird Enzym-markiertes Antiglobulin gegeben und nach dem Zusatz des

Enzymsubstrats wird aus einer Extinktionsänderung die Antikörperreaktion bestimmt. Der erste Paratuberkulose-ELISA wurde von Berg Jörgenson und Jensen (1978) entwickelt. Bei den heute kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits werden verschiedene Map-Antigenpräparationen, z. B. protoplasmatische Antigene oder Zellwandbestandteile, zur Beschichtung der Mikrotiterplatten eingesetzt. Es wird angenommen, dass infizierte Tiere gegenüber den möglichen Map-Antigenen eine Vielzahl an Antikörperpopulationen ausbilden, und dass einzelne Tiere vorrangig bestimmte Antikörpergruppen aufweisen (Sugden et al. 1997). In kommerziellen Paratuberkulose-ELISA-Systemen werden häufig protoplasmatische Extrakte als Antigene verwendet, die nicht näher charakterisiert werden (Abbas et al. 1983, Yokomizo et al. 1983 und 1991, Milner et al. 1990). Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen und der daraus resultierenden Steigerung der Testspezifität wurde die Vorabsorption der zu untersuchenden Seren mit einem *M. phlei*-Extrakt entwickelt (Yokomizo et al. 1985).

Ein Map-Zellwandantigen, das in Paratuberkulose-ELISA-Systemen eingesetzt wird, ist das LAM (Sugden et al. 1989, Mc Nab et al. 1991, Sweeney et al. 1994, Jark et al. 1997). LAM wird als hochimmunogen angesehen (Sibley et al. 1988) und ist dabei jedoch kein spezifisches Map-Zellwandantigen, da es ebenso bei anderen Mykobakterien nachgewiesen wurde, so z. B. in der Zellwand von *M. tuberculosis* (Hunter et al. 1986, Hunter und Brennan 1990), *M. leprae* (Hunter et al. 1986) oder *M. smegmatis* (Khoo et al. 1995).

Bei der Kombination eines LAM-ELISA mit einer *M. phlei*-Präabsorption wurde keine Reduktion der Positivrate gegenüber einem ELISA mit protoplasmatischem Antigen verzeichnet (Sugden et al. 1997), zur Erklärung wurde angenommen, dass Map-infizierte Tiere einen höheren LAM-Antikörpergehalt im Serum aufweisen und somit trotz Präabsorption und Bindung eines Teils der LAM-Antikörper als positiv erkannt werden.

Es wurden weiterhin ELISA-Testsysteme entwickelt, die als Antigene ganze Paratuberkuloseerreger enthalten, die zur Inaktivierung mit Formaldehyd und Ultraschall behandelt wurden (Speer et al. 2006), es ist jedoch anzunehmen, dass dabei das Ausmaß der unspezifischen Bindungen hoch ist. In neueren Untersuchungen wurden sekretierte Antigene aus Flüssigkulturen eines Feldisolates gewonnen und als ELISA-Antigene eingesetzt (Shin et al. 2008). In Tab. 4 wurden beispielhaft die Ergebnisse ausgewählter Studien aufgeführt, in denen Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren mit unterschiedlichen Antigenen getestet wurden.

Tab. 4: ELISA-Antigene, ermittelte Sensitivitäten und Spezifitäten in beispielhaft ausgewählten Paratuberkulose-Blut-ELISA-Untersuchungen

Autor und Jahr	Blut-ELISA-Antigen	Sensitivität (in %)	Spezifität (in %)
Yokomizo et al. (1991)	Protoplasmatisches Antigen und <i>Mycobacterium phlei</i> -Präabsorption	67,9	99,9
Klausen et al. (2003)		49 - 64	80 - 96
Köhler et al. (2008)		33,9 – 77,4	99,0 – 99,5
Mc Nab et al. (1991)	Lipoarabinomannan (LAM)	49	87
Jark et al. (1997)		74	99
Köhler et al. (2008)		54,8 - 90,3	67,7 - 81,3
Vannuffel et al. (1994)	34 kDA Protein	70	95
Speer et al. (2006)	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> -Kulturen mit Ultraschall und Formaldehyd behandelt	> 95	> 95
Shin et al. (2008)	Sekretierte Antigene aus einer <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> -Flüssigkultur	20 - 91,1	99
Leroy et al. (2008)	Antigen 6; MAP1637c	72 ; 82	98

In Studien zur Evaluation kommerziell erhältlicher Paratuberkulose-ELISA-Testkits wurden bei der Untersuchung identischer Proben große Unterschiede der Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Testverfahren berechnet (van Maanen et al. 1999, Collins et al. 2005, Mc Kenna et al. 2006a, Köhler et al. 2008), so wurden z. B. bei der vergleichenden Untersuchung von 5 verschiedenen ELISA-Tests Variationen der Spezifitäten zwischen 73,2 % und 99,8 % ermittelt (van Maanen et al. 1999). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Spezifität der ELISA-Verfahren ohne *M. phlei*-Vorbehandlung vermindert ist (Köhler et al. 2008).

Auch ein Einfluss der jeweils untersuchten Tierpopulation auf die ELISA-Testergebnisse war nachweisbar. Bei der Anwendung der ELISA-Verfahren bei subklinisch erkrankten Tieren wurden überwiegend geringe Sensitivitäten ermittelt (Collins et al. 1991, Bech-Nielsen et al. 1992), während positive Testergebnisse bei der Untersuchung von Tieren in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien mit höherer Wahrscheinlichkeit auftraten und somit auch signifikant höhere Sensitivitäten für die ELISA-Tests berechnet werden konnten (Milner et al. 1990, Sockett et al. 1992b, Sweeney et al. 1995, van Maanen et al. 1999, Whitlock et al. 2000, Dargatz et al. 2001, Sweeney et al. 2006, Köhler et al. 2008). In Tab. 5 wurden die Untersuchungsergebnisse ausgewählter Studien zusammengefasst, in denen die Sensitivitäten eines Tests bei starken Map-Ausscheidern, die sich zumeist in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien befanden und die Sensitivitäten bei schwachen Map-Ausscheidern miteinander verglichen wurden.

Tab. 5: Vergleich der Sensitivitäten von Paratuberkulose Blut-ELISA-Testverfahren für jeweils 2 Tiergruppen in 3 ausgewählten Studien

Autor und Jahr	Sensitivität (in %) des verwendeten ELISA bei <u>schwachen</u> Ausscheidern	Sensitivität (in %) des verwendeten ELISA bei <u>starken</u> Ausscheidern
Whitlock et al. (2000)	15,0	75,0
Dargatz et al. (2001)	15,4	88,1
Sweeney et al. (2006)	26,0	76,2

Die Eignung von Paratuberkulose-ELISA-Testsystemen für die Untersuchung von Milchserum wurde geprüft, dazu erfolgte der Vergleich milch- und blutserologischer Untersuchungsbefunde bei identischen Tieren und zeitgleich entnommenen Proben. Es wurden sowohl gute (Sweeney et al. 1994, Geisbauer et al. 2007, van Weering et al. 2007) als auch mäßige bis schlechte (Hardin und Thorne 1996, Klausen et al. 2003, Hendrick et al. 2005, Lombard et al. 2006a) Übereinstimmungen der Ergebnisse eines ELISA-Tests bei der Untersuchung paariger Blut- und Milchserumproben erhoben. In einer amerikanischen Studie wurde eine bessere Übereinstimmung der milchserologischen Befunde mit den Ergebnissen der Kotkultur ermittelt (Hendrick et al. 2005).

Für Sammelmilchproben, die mit dem Pourquier-ELISA untersucht wurden, konnte beim Herabsetzen des Cut-off-Wertes in Herden mit einer Seroprävalenz von mindestens 3 % eine ausreichend hohe Sensitivität (85 %) und eine Spezifität (96 %) des Pourquier-ELISA erzielt werden (van Weering et al. 2007). Die Untersuchung von Tankmilchproben mit ELISA-Testverfahren ergab kontroverse Ergebnisse. In einer Studie wurde die Untersuchung von Tankmilchproben mittels ELISA in Kombination mit einer Peptid-vermittelten „Capture-PCR“ für Milch zur Kontrolle und Überwachung der Paratuberkulose in Milchviehherden empfohlen (Stratmann 2006). Im Gegensatz dazu wurden in einer anderen Studie mit zwei ELISA-Testsystemen maximal 8 von 44 Betrieben, die zuvor als „Paratuberkulose positiv“ eingeschätzt wurden, wieder erkannt und die ELISA-Tankmilchuntersuchungen als ungeeignet für die Durchführung flächendeckender Prävalenzschätzungen beurteilt (Geue et al. 2007). Tankmilchproben wurden zudem als schlecht zu definierende Medien eingeschätzt, die wegen unbestimmter Verdünnungseffekte nicht mit im Labor hergestellten Sammelmilchproben zu vergleichen sind (Geue et al. 2007, Nielsen et al. 2000).

Nach den bisherigen Erkenntnissen eignen sich Untersuchungen von Einzeltier- oder Sammelproben mittels ELISA, aufgrund der späten Ausprägung einer Antikörperantwort im Rahmen von Paratuberkuloseinfektionen, ausschließlich zur Identifikation von Herden mit fortgeschrittenem Infektionsgeschehen und nicht für die Einzeltierdiagnostik (Klausen et al. 2003, Mc Kenna et al. 2006a)

2.5.2.6 Protein Arrays

Eine neue Technologie zur Detektion von Map-Antikörpern im Serum infizierter Tiere sind Protein arrays, in denen ausgewählte, multiple Antigene eingesetzt werden (Bannantine et al. 2008a, b). Zur Herstellung der Protein Arrays wurden zunächst Map-Proteine aus Map-Ganzzelllysaten gewonnen, identifiziert, mit Hilfe von *E.coli*-Stämmen rekombinant syntheti-

siert und auf Nitrocellulosefilter in Form von dot arrays aufgebracht (Bannantine und Paustian 2006). Mit dieser Methode wurde die Möglichkeit geschaffen, die Immunogenität von Map-Antigenen zu vergleichen und auch quantitativ auszuwerten. Die Auswertung der erstellten Immunprofile bei experimentell infizierten Mäusen und Kaninchen ergab, dass die Tiere am deutlichsten auf ein Heat Shock Protein (MAP3840) und ein Membranprotein (Map 2121c) reagierten. Bei der Untersuchung von Serum klinisch erkrankter Rinder wurden die stärksten Immunreaktionen auf das Protein MAP3155c beobachtet. Bei einer vergleichenden Untersuchung von gesunden Kontrolltieren, natürlich und experimentell Map-infizierten Rindern sowie von Rindern, die eine *M. avium* subsp. *avium*- oder *M. bovis*-Infektion aufwiesen, wurden drei Membranproteine identifiziert, die die stärksten Immunreaktionen aller Serumproben der Map-infizierten Tiere verursachten. Für *M. avium* subsp. *avium* wurden zahlreiche kreuzreaktive Proteine ermittelt.

Protein Arrays wurden v. a. entwickelt, um neue Map-Antigene, sowie Antigene, die unspezifische Kreuzreaktionen verursachen zu identifizieren. Denkbar ist jedoch auch der zukünftige Einsatz des Protein Array als antigenbasierter, diagnostischer Test. Dazu bedarf es jedoch zunächst weiteren Untersuchungen der 3 bisher als spezifisch identifizierten Membranproteine mit einer Vielzahl an Seren infizierter Rinder (Bannantine et al. 2008a). Ein Nachteil der Protein Arrays ist die derzeit teure und aufwändige Herstellung.

2.6 Bekämpfung der Paratuberkulose

Die Bekämpfung der nicht therapierbaren Erkrankung Paratuberkulose erfolgt durch die Erkennung und Ausmerzung klinisch erkrankter oder nachweislich subklinisch infizierter Tiere und deren Nachkommen. Ein wichtiger Bestandteil der Bekämpfung der Erkrankung sind Management- und Hygienemaßnahmen in infizierten Beständen. Auch mit Impfungen wird versucht, in verschiedenen Ländern das Paratuberkulosegeschehen einzudämmen.

2.6.1 Bekämpfung der Paratuberkulose in Deutschland und Thüringen

Die meldepflichtige Erkrankung Paratuberkulose wird in Deutschland nicht staatlich bekämpft. In einzelnen Bundesländern gibt es jedoch Paratuberkulose Überwachungs- und Sanierungsprogramme auf freiwilliger Basis. Das Bundesministerium für Verbraucherschutz Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL) erließ 2005 die „Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen“ mit dem Ziel, die Bekämpfungs- und Überwachungsmaßnahmen bundesweit zu vereinheitlichen. Die Paratuberkuloseleitlinien setzen sich aus 3 Säulen zusammen: 1. Hygienemaßnahmen zur Vermeidung der Weiterverbreitung der Erkrankung, 2. Bestandsüberwachungen mittels klinischer, serologischer und kultureller Untersuchungen, 3. Vorbereitung flächendeckender, bundesweiter Überwachungsmaßnahmen.

In Thüringen wurde mit der Überwachung und Bekämpfung der Paratuberkulose im Jahr 2000 begonnen. Tierhalter können an einem freiwilligen „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens“ teilnehmen, das durch Beihilfen der TSK unterstützt wird (Elschner 2003). Bis zum Jahr 2006 wurden alle über 18 Monate alten Rinder teilnehmender Betriebe blutserologisch auf das Vorkommen von Map-Antikörpern getestet. Ausschließlich seropositive Tiere wurden koprologisch untersucht. Serologisch verdächtige und negative Tiere wurden halbjährlich mittels ELISA nachuntersucht.

Identifizierte Map-Ausscheidertiere waren abzusondern und sobald als möglich aus dem Bestand zu entfernen. Heute wird, aufgrund der Erkenntnis, dass die Sensitivitäten und Spezifitäten der ELISA-Testverfahren limitiert sind, eine jährliche Kotuntersuchung jedes Tieres eines Bestandes angestrebt. Wichtige Schwerpunkte des Thüringer Paratuberkulose-Bekämpfungsprogrammes sind die Erstellung von betrieblichen Bekämpfungsplänen, Hygienemaßnahmen und v. a. die „Paratuberkulosefreie Jungtieraufzucht“. Für die Zukunft ist die Zertifizierung „Paratuberkulose unverdächtiger“ Thüringer Bestände geplant.

2.6.2 Bekämpfung der Paratuberkulose auf internationaler Ebene

Die Paratuberkulosebekämpfung wird in einigen Ländern bereits durch übergeordnete, nationale Kontrollprogramme koordiniert. In den USA existieren in einzelnen Bundesstaaten freiwillige Paratuberkulose-Bekämpfungsprogramme. Zur Vereinheitlichung der Programme wurden 2002 grundlegende, nationale Standardanforderungen erlassen (McKenna et al. 2006b). Die Kernpunkte dabei sind die Aufklärung der Landwirte über die Erkrankung, die Verbesserung des Herdenmanagements und die regelmäßige Untersuchung der Herden. Als diagnostische Testverfahren sind Direktnachweise des Erregers wie die Kot- oder Organkultur vorgesehen. In Australien gibt es seit 1996 ein übergeordnetes, nationales Paratuberkulose-Kontrollprogramm für Rinder, das die Basis für eine Vielzahl untergeordneter Bekämpfungsprogramme darstellt (Baumgartner und Khol 2008). Die Herden werden dabei in Klassen eingeteilt, jedoch werden keine spezifischen Testmethoden vorgeschrieben. Daneben ist eine jährliche Beratung der Betriebe und eine Bewertung des Herdenmanagements im australischen Programm vorgesehen. Seit 1998 gibt es in den Niederlanden ein nationales, freiwilliges Paratuberkulose-Bekämpfungsprogramm (McKenna et al. 2006b, Baumgartner und Khol 2008). Im aktualisierten, niederländischen Bekämpfungsprogramm werden die Herden in 3 verschiedene Klassen eingeteilt. Auch in Dänemark wurde ein nationales Paratuberkulose-Kontrollprogramm etabliert, 24 % aller dänischen Milchviehbetriebe nehmen freiwillig an diesem Programm teil. Alle laktierenden Tiere werden dabei 4mal jährlich mit einem Paratuberkulose-Milch-ELISA untersucht (Nielsen 2007). In Schweden ist die Bekämpfung der Paratuberkulose gesetzlich geregelt. Die Merzung positiv getesteter Tiere und Herden ist vorgeschrieben. Es bestehen eindeutige Reglementierungen für den Tierimport nach Schweden (Holmström und Stenlund 2005). In Japan wurde 1997 ein Gesetz zur Kontrolle von Infektionskrankheiten domestizierter Tiere erlassen, seitdem wird jedes Rind mindestens einmal in 5 Jahren auf Paratuberkulose mittels indirekter oder direkter Nachweisverfahren getestet (Kobayashi et al. 2007). Infizierte Bestände werden in Japan ständig überwacht.

2.6.3 Impfungen

Zur Eindämmung der Paratuberkulose wird seit den 1960er Jahren intensiv an der Entwicklung von Paratuberkulose-Impfstoffen für Wiederkäuer gearbeitet. Die Wirkungen von hitzeinaktivierten Totimpfstoffen (Larsen et al. 1978, Körmendy 1994, Kalis et al. 2001) und attenuierten Lebendimpfstoffen (Molina et al. 1996, Gwozdz et al. 2000) wurden in experimentellen Studien und in Feldstudien untersucht. In neuen Paratuberkuloseimpfstoffen, die bisher nur experimentell eingesetzt wurden, werden rekombinante Map-Antigene in Form von DNA-Vektorvakzinen getestet (Bull et al. 2007, Roupie et al. 2008a).

In geimpften Beständen war ein Rückgang der Inzidenz klinischer Fälle zu beobachten (Larsen et al. 1978, Argent et al. 1991, Kalis et al. 1992, Wentink et al. 1994, Körmendy 1994, Klawonn et al. 2002). In 2 Studien, in denen Lebendvakzinen angewendet wurden, war auch eine Reduktion der Map-Ausscheidung zu verzeichnen (Argente et al. 1991, Gay und Sherman 1992). Die bisherigen Erkenntnisse belegen somit, dass Impfungen die Ausbildung klinischer Krankheitserscheinungen eindämmen können, jedoch die Infektion mit Map und auch die spätere Kotausscheidung des Erregers nicht verhindern.

Eine sehr häufig berichtete Nebenwirkung der Paratuberkulose-Impfung, v. a. bei der Anwendung von attenuierten Lebendvakzinen, ist die Bildung bis zu kindskopfgroßer Granulome an der Injektionsstelle (Windsor und Eppleston 2006, Lei et al. 2008). Bei geimpften Tieren wurden außerdem positive Reaktionen nach Tuberkulininjektionen (Halgaard 1983, Breukink et al. 1990, Köhler et al. 2001, Nedrow et al. 2007) und bei serologischen Untersuchungen mittels Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren (Spangler et al. 1991, Muskens et al. 2002, Mackintosh et al. 2008) ermittelt. Paratuberkulose-Impfprogramme sind daher derzeit unvereinbar mit der Tuberkulosedagnostik mittels Tuberkulinisierung (Halgaard 1983, Breuking et al. 1990). Die Nachteile der Paratuberkulose-Vakzinierung: Kreuzreaktionen bei der Tuberkulinisierung, falsch positive Reaktionen bei serologischen Untersuchungen und Granulombildungen führten dazu, dass in einigen Ländern die Impfung gegen Paratuberkulose vorläufig per Gesetz verboten wurde, so z. B. in Österreich. In Deutschland ist zur Zeit kein Paratuberkulose-Impfstoff zugelassen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeine Projektbeschreibung

In drei Thüringer Milchviehbetrieben wurden über zweieinhalb Jahre (November 2003 – Mai 2006) Proben zur Diagnostik der Paratuberkulose entnommen. Alle teilnehmenden Milchviehbetriebe wurden fünfmal untersucht, dabei betrug der Abstand zwischen den Einzeluntersuchungen jeweils 5–7 Monate. Zum Zeitpunkt der monatlichen Milchleistungsprüfung der Betriebe wurden Blut- und Kotproben von jedem Tier eines Bestandes durch die Bestandstierärzte entnommen. Die Untersuchungen wurden am Friedrich-Loeffler-Institut Jena (FLI Jena) durchgeführt. Nach der kulturellen Untersuchung des Kotes erfolgte zur Bestätigung des Erregerwachstums der molekularbiologische Nachweis von *Map* aus Koloniematerial. Die Milchproben aller laktierenden Tiere aus der Milchleistungsprüfung wurden nach Abschluss der monatlichen Milchkontrolle vom Zentrallabor des Thüringer Verbandes für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V. (TVL) dem FLI Jena für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Zwei kommerziell erhältliche Paratuberkulose-ELISA-Testkits wurden für die serologischen Untersuchungen der Blut- und Milchproben verwendet. Neben der Dokumentation diagnostischer Befunde erfolgte die Erfassung tierspezifischer Daten in einer Datenbank.

3.2 Tierbestände

Bestand A

Der Bestand A war ein im Weimarer Land (Thüringen) ansässiger Milchviehbetrieb. Im Untersuchungszeitraum befanden sich durchschnittlich 400 Rinder im Bestand. Die Anzahl der Milchkühe und Färsen, die an den Untersuchungen teilnahmen variierte (Abb. 3).

Der Betrieb kaufte in den Jahren 1990 bis 1993 Zuchtrinder aus dem westdeutschen Raum und 30 Färsen aus 3 Thüringer Milchviehbeständen hinzu. Im Jahr 1998 traten erstmals klinische Erkrankungen sowie Verendungen in Folge der Paratuberkulose auf. Der Betrieb nahm ab dem Jahr 2000 freiwillig am Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm zur Paratuberkulosesanierung der Thüringer Tierseuchekasse (TSK) teil. Auf der Grundlage serologischer und kotkultureller Untersuchungen der TSK wurde die Paratuberkuloseprävalenz des Bestandes als hoch eingeschätzt. Kotpositive Tiere wurden nach ihrer Erkennung nicht oder verzögert gemerzt.

Die Milchkühe des Bestandes waren in einem Liegeboxenlaufstall mit Stroheinstreu aufgestellt. Der Laufstall mit Liegeboxen wurde einmal täglich manuell mittels mobiler Technik entmistet. Die Fütterung erfolgte auf Futtertischen über Futtermittelwagen. Alle Milchkühe wurden zweimal täglich gemolken. Die durchschnittliche Milchleistung der Tiere betrug im Jahr 2003 6.786 kg Milch/Tier und wurde im Untersuchungszeitraum auf 7.212 kg Milch/Tier im Jahr 2006 gesteigert. Die Abkalbungen fanden in einem separaten Stalltrakt in Anbindehaltung mit Stroheinstreu statt. Die neugeborenen Kälber wurden tagsüber *post natum* sofort von der Mutter getrennt. Die Kälber erhielten über zwei Tage Kolostrum der eigenen Mutter, wenn diese kot- und seronegativ war. Kälber von Ausscheidertieren oder Tieren mit einem serologisch positiven oder fraglichen Befund erhielten Kolostrum eines serologisch negativen Tieres aus einer Kolostrumbank. Die Kälber wurden in den ersten 14

Lebenstagen einzeln in Kälberiglus aufgezogen. Es wurde zuvor auf 60°C erhitzte Mischmilch vertränkt. Ab der 3. Lebenswoche wurden die Kälber in Gruppen von bis zu 25 Tieren in einem Einraumtiefstreulaufstall untergebracht. Die Färsen waren in einem Zweiraumtiefstreulaufstall aufgestellt und wurden in den Sommermonaten auch auf Weiden gehalten.

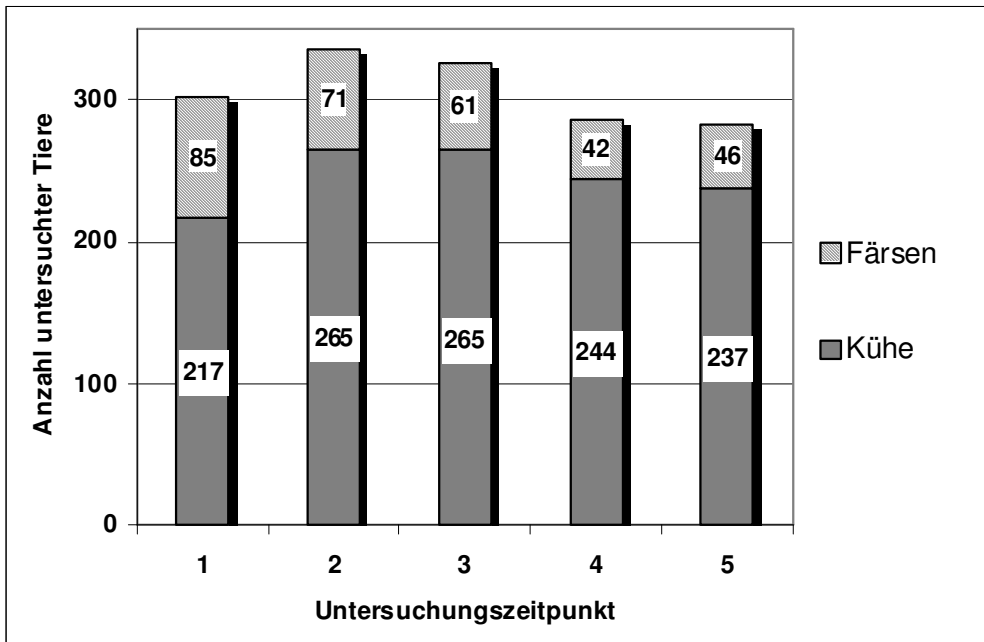


Abb. 3: Anzahl der untersuchten Tiere je Untersuchungszeitpunkt im **Bestand A**

Bestand B

Der Bestand B war ein Hochleistungsbetrieb, welcher sich im Weimarer Land (Thüringen) befand. An den Einzeluntersuchungen nahmen durchschnittlich 390 laktierende Milchkühe des Betriebes teil (Abb. 4). In den Jahren 1990 bis 2000 kaufte der Betrieb Tiere aus den USA und Frankreich, sowie aus Hessen, Niedersachsen und dem Saarland hinzu. In den folgenden Jahren wurde ausschließlich Eigenreproduktion durchgeführt. Ab dem Jahr 2001 erfolgten Untersuchungen auf Paratuberkulose durch die TSK. Auf der Basis der serologischen Untersuchungsergebnisse wurde die Paratuberkuloseprävalenz des Bestandes als mittel eingestuft. Kotpositive Tiere wurden überwiegend sofort nach ihrer Erkennung aus dem Bestand entfernt.

Die Milchkühe waren in einem Liegeboxenlaufstall mit Stroheinstreu untergebracht. Die Entmistung erfolgte über Faltschieber und mobile Technik. Totalmischrationen wurden mit Futterwagen auf die Futtertische ausgebracht. Das Melken der Kühe erfolgte zwei- oder dreimal täglich. Die durchschnittliche Herdenleistung betrug im Jahr 2003 11.199 kg Milch/Tier. Im Jahr 2006 lag die Durchschnittsleistung der Tiere des Bestandes B bei 11.404 kg Milch/Tier. Die Abkalbungen fanden in separaten Abkalbebuchten mit 1–3 Kühen pro Bucht statt. Nach der Geburt wurden die Kälber sofort von den Muttertieren getrennt und mit Kolostrum der eigenen Mutter, wenn diese kein Ausscheidertier und serologisch negativ war, versorgt. Tiere Paratuberkulose positiver Mütter erhielten Kolostralmilch von serologisch und koprologisch negativen Tieren aus einer Kolostrumbank. Bis zum 14. Lebenstag wurden die

Kälber einzeln in Iglus gehalten und danach in Gruppen von etwa 20 Tieren in Einraum-tiefstreulaufställen aufgestellt. Die Färsen verblieben in den ersten Lebensmonaten im Bestand. Die weitere Aufzucht mit Weidegang erfolgte in einem Partnerbetrieb an einem anderen Standort. Im Alter von 20 bis 24 Monaten wurden die tragenden Färsen wieder in den Bestand B zurück verbracht.

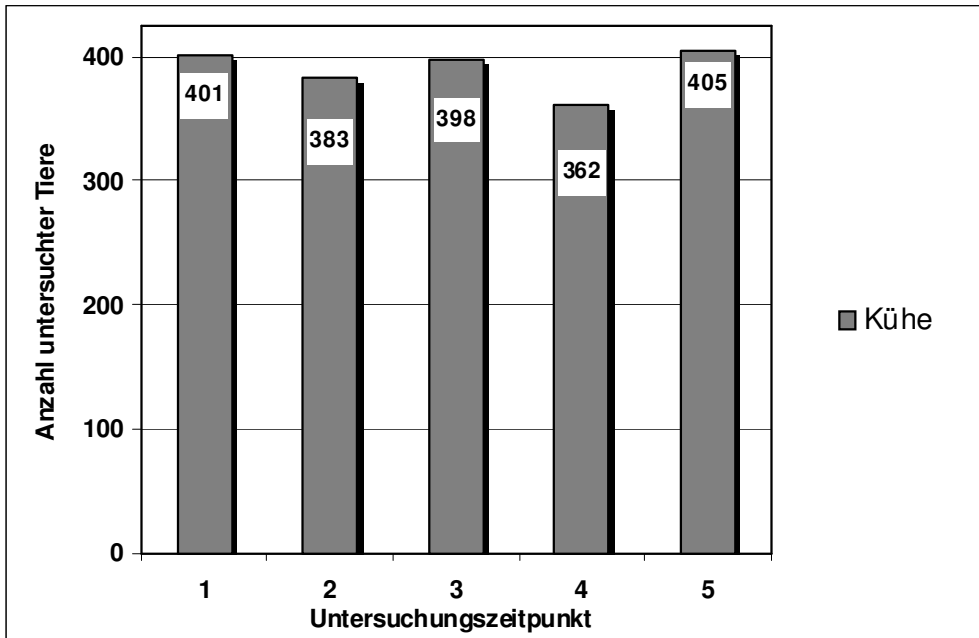


Abb. 4: Anzahl der untersuchten Tiere je Untersuchungszeitpunkt im **Bestand B**

Bestand C

Der Bestand C war ein in der Thüringer Rhön ansässiger Grünlandbetrieb, in dem durchschnittlich 740 Tiere gehalten wurden. Zum Betrieb gehörte eine Mutterkuhherde, die nur in die erste Untersuchung einbezogen wurde. Im Mittel befanden sich während des Untersuchungszeitraums 338 laktierende Milchkühe und 147 Färsen, die für die Probenentnahmen zur Verfügung standen, im Bestand (Abb. 5). Der Betrieb kaufte nach der Wiedervereinigung einmalig 7 in Thüringen geborene Färsen, sowie ein aus Frankreich stammendes Tier hinzu. Seit 1990 führte der Betrieb ausschließlich Eigenreproduktion durch. Der Bestand C nahm seit dem Jahr 2001 freiwillig am Programm zur Paratuberkulose-sanierung der TSK teil. Alle Befunde der Kotuntersuchungen der TSK und des FLI Jena waren in den Jahren 2001 bis 2008 negativ, jedoch wurden bei serologischen Untersuchungen fragliche und positive Befunde ermittelt. Klinische Verdachtsfälle traten zu keinem Zeitpunkt auf, so dass der Bestand C als Paratuberkulose unverdächtig eingestuft wurde und in den vorliegenden Untersuchungen als negativer Vergleichsbestand diente. Die Milchkühe waren in einem Liegeboxenlaufstall mit Schieberentmistung aufgestellt. Der Liegebereich war mit Gummimatten gepolstert. Die Fütterung erfolgte über Futtermittelwagen auf Futtertischen. Durchschnittlich wurden 85 Tiere dreimal täglich und alle übrigen Tiere zweimal täglich gemolken. Die durchschnittliche Milchleistung der Herde wurde von 8.336 kg Milch/Tier im Jahr 2003 auf 9.399 kg Milch/Tier im Jahr 2006 gesteigert. Die Abkalbungen fanden in einer separaten Abkalbebucht mit Tiefstreu und 1–3 Tieren pro Bucht statt. Die

Kälber verblieben einen Tag *post natum* bei der Mutter, weibliche Kälber serologisch positiver Tiere wurden sofort von der Mutter getrennt und erhielten das Kolostrum eines serologisch negativen Muttertieres aus einer Kolostrumbank. Über 7 Tage waren jeweils zwei Kälber zusammen in Kälberboxen aufgestellt und erhielten Mischkolostrum von serologisch negativen Kühen. Darauf wurden die Kälber in Gruppen von etwa 20 Tieren in einem Tiefstreulaufstall aufgestellt. Die Färsen wurden ebenfalls in einem Laufstall mit Stroheinstreu und in den Sommermonaten auf Weiden mit Zufütterung gehalten.

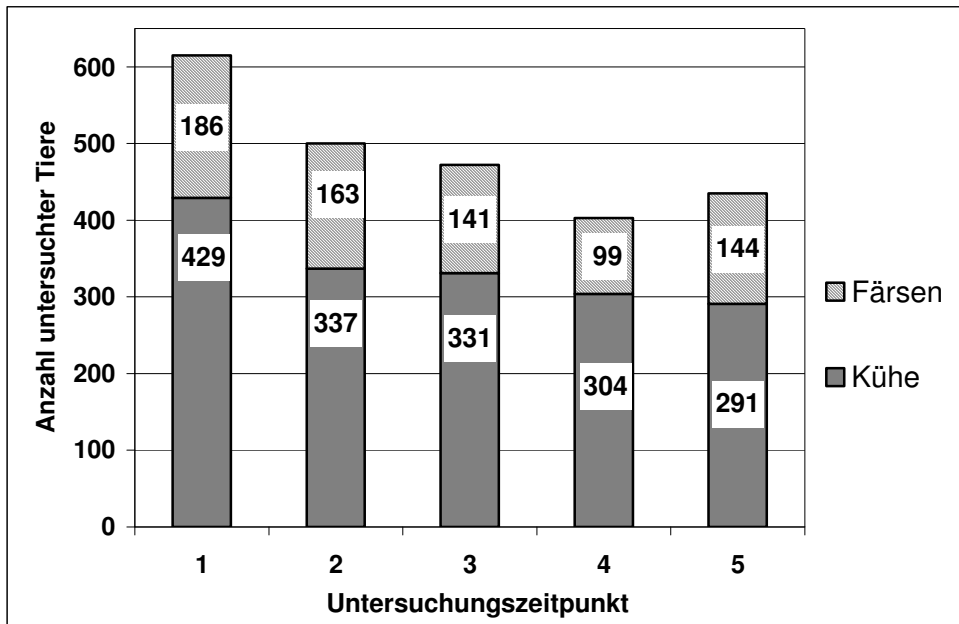


Abb. 5: Anzahl der untersuchten Tiere je Untersuchungszeitpunkt im **Bestand C**

Tab. 6 enthält Angaben zur Tierzahl, der Milchleistung, der Anzahl untersuchter Einzeltiere und zu den Untersuchungsergebnissen in den Beständen A, B und C.

Tab. 6: Tierzahlen, Milchleistungen und Untersuchungsbefunde der 3 untersuchten Milchviehbeständen

	Bestand A	Bestand B	Bestand C
Tierzahl	Ø 245 Milchkühe Ø 60 Färsen	Ø 390 Milchkühe	Ø 338 Milchkühe Ø 147 Färsen
Durchschnittliche Herdenleistung 2003 (kg Milch/Tier)	6.786 kg	11.199 kg	8.336 kg
Durchschnittliche Herdenleistung 2006 (kg Milch/Tier)	7.212 kg	11.404 kg	9.339 kg
Zuvor geschätzte Paratuberkuloseprävalenz	Hoch	Mittel	Unverdächtig
Anzahl durchgeführter Kot- und Blutuntersuchungen auf Paratuberkulose	1533	1949	2425
Anzahl untersuchter Einzeltiere (2003-2006)	521	792	807
Anzahl kotpositiver Einzeltiere (2003-2006)	158	161	-
Prozentualer Anteil kotpositiver Tiere an der Gesamtheit untersuchter Einzeltiere	30,3 %	20,3 %	-
Anzahl positiver Ergebnisse der Kotuntersuchungen	253	198	-
Anzahl positiver Ergebnisse der Organuntersuchungen	nicht durchgeführt	30 <u>19 Tiere:</u> kot- u. organpositiv <u>11 Tiere:</u> kotnegativ u. organpositiv	nicht durchgeführt

3.3 Proben

Kotproben

In den Beständen A und C wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt von den Milchkühen und den Färsen rektal mit einem Einmalhandschuh (Vet Basic 90 cm, Polyethylen, Fa. Euro Farm) eine Kotprobe entnommen. Im Bestand B wurde ausschließlich von den im Bestand aufgestellten Milchkühen jeweils eine Kotprobe pro Untersuchungszeitpunkt gewonnen. Die Kotproben wurden in Kotbecher (Stuhlgefäß, 52 ml, Polystyrol, 41 x 57 mm, PE-Löffelstopfen mit PE-Löffel, Fa. Greiner Bio One) aufgenommen und am Entnahmetag oder am Folgetag zum FLI Jena transportiert. Die Kotproben wurden sofort ohne Zwischenlagerung aufgearbeitet.

Blutproben

Zum Zeitpunkt der Entnahme einer Kotprobe erfolgte ebenfalls die Gewinnung einer Blutprobe aus der *Vena coccygea media*. In den Beständen A und C wurden zur Gewinnung der Blutproben 10 ml Serum-Kabevetten® (Fa. Kabe Labortechnik) verwendet. Im Bestand B wurden 7,0 ml Venoject® Röhrchen (Fa. Terumo) bei der Blutprobenentnahme benutzt. Die Blutproben wurden am Entnahmetag oder am Folgetag zum FLI Jena transportiert.

Milchproben

Die Entnahme von Kot- und Blutproben erfolgte zwischen 2 Tagen vor und 2 Tagen nach der monatlichen Milchleistungsprüfung der Betriebe. Die im Rahmen der Milchleistungsprüfung gewonnenen Milchproben wurden nach der Bearbeitung im Zentrallabor des TVL in das Labor des FLI Jena überführt. Die Milchproben befanden sich in Milchprobenflaschen aus Polypropylen (TVL), die zur Konservierung Natriumacid enthielten und mit Gummistopfen verschlossen waren.

3.4 Serologische Untersuchungen

3.4.1 Aufbereitung der Blut- und Milchproben für die serologischen Untersuchungen

Aufbereitung der Blutproben

Die Blutproben in Kabevetten® oder Venoject® Röhrchen wurden nach dem Eintreffen im Labor für 4 Stunden (h) bei Raumtemperatur (21 °C +/- 3°C) senkrecht aufgestellt. Nach vollständigem Absetzen des Blutkuchens wurde das Serum in Deep-well-Platten (2000 µl steril, Fa. Treff Lab) pipettiert. Jeweils zweimal 1000 µl einer Probe wurden in die Deep-well-Platten aufgenommen, die bis zur weiteren Bearbeitung bei -18° +/- 3°C für 1 bis 2 Monate gelagert wurden.

Aufbereitung der Milchproben

Etwa 10 ml einer Milchprobe wurden aus den Probenflaschen in je ein 12 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen, mit Verschluss (Fa. Corning) überführt. Die Röhrchen wurden zur Entrahmung der Milch bei 2000 x g und 15°C für 20 min zentrifugiert (Biofuge 22 R, Fa. Heraeus). Anschließend wurde das Milchserum nach Durchstechen der Milchfettschicht mit der Pipettenspitze (Fa. Eppendorf) aufgenommen und jeweils zwei Portionen einer Milchprobe wurden in 1000 µl Deep-well-Platten (Fa. Treff Lab) abgefüllt. Die Deep-well-Platten wurden bis zur weiteren Bearbeitung für 1 bis 3 Monate bei -18°C +/- 3°C gelagert.

3.4.2 Durchführung des Svanovir-ELISA

Testkit: Mycobacterium paratuberculosis Svanovir™ ELISA Testkit (Fa. Svanova)

Im Testkit enthaltenes Material:

Mikrotiterplatten, beschichtet mit nicht infektiösem Paratuberkulose-Antigen (LAM)
Anti-Rind-IgG-HRP-Konjugat
PBS-Tween-Lösung, 20-fach konzentriert
Substratlösung, Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in Substratpuffer gelöst
Stopplösung, 2 M Schwefelsäure
Positives Kontrollserum vom Rind, konserviert mit 0,05 % Merthiolat
Negatives Kontrollserum vom Rind, konserviert mit 0,05 % Merthiolat
Klebefolie zum Abdecken der Mikrotiterplatten

Auf einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 46 Serumproben, sowie das positive und das negative Kontrollserum im Doppelansatz untersucht. Für die Bearbeitung einer Mikrotiterplatte wurden 500 ml Wasch- und Verdünnungslösung benötigt, die aus 25 ml der 20-fach konzentrierten PBS-Tween-Lösung und aus 475 ml *Aqua destillata* (*Aqua dest.*; steril, eigene Herstellung FLI Jena) hergestellt wurden. In 96-well-Platten wurden die Blutserumproben mit der Pufferlösung im Verhältnis 1:100 und die Milchserumproben im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Kontrollseren wurden in gleicher Art verdünnt. In jede Reaktionsvertiefung der Mikrotiterplatten wurden jeweils 100 µl der verdünnten Serum- bzw. Milchprobe pipettiert. Die Platten wurden mit Klebefolien abgedeckt und für 30 min auf einem Plattenschüttler (IKA®-Schüttler MTS 4, Fa. IKA) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein maschinelles Waschen der Platten (Skan-Washer, Fa. Skatron). Der Skan-Washer arbeitete mit einem Druck von 0,1 bar. Zunächst wurde der Überstand aus den Reaktionsvertiefungen aspiriert. Darauf folgten 3 Waschschrte, es wurden jeweils 300 µl Waschlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben und wieder aspiriert. Die Aspirationszeit betrug jeweils 2 sec, die vierte, abschließende Aspiration erfolgte für 6 sec. Anschließend wurden 100 µl des HRP-Konjugates in jede Reaktionsvertiefung pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden für 30 min mit einer Schutzfolie abgedeckt, bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert und anschließend zur Entfernung des nicht gebundenen HRP-Konjugates mit dem Skan-Washer wiederholt gewaschen. In jedes well wurden darauf 100 µl der Substratlösung pipettiert. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 15 min. Um die Substratreaktion zu unterbrechen wurden 50 µl Stopplösung nach Ablauf der Inkubationszeit

in jedes well gegeben. Innerhalb von 15 min nach Zugabe der Stopplösung wurden mit einem ELISA-Reader (Spectra Fluor, Fa. Tecan) die Extinktionswerte (OD) der Kontroll- und Patientenseren bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Aus den gemessenen OD-Werten eines Doppelansatzes wurde jeweils der Mittelwert berechnet. Der Hersteller gab für die Kontrollseren Validitätsgrenzen an. Das positive Kontrollserum musste eine OD > 1,00 aufweisen, die bei der Doppelbestimmung gemessenen Einzelwerte des Kontrollserums durften zu höchstens 25 % voneinander abweichen. Wenn diese Bedingungen nicht erfüllt waren, so wurde der Test als ungültig erklärt. Die beiden Einzelwerte des negativen Kontrollserums mussten <10 % der gemittelten optischen Dichte des positiven Kontrollserums sein, lagen einer oder beide Werte außerhalb dieser Grenze, war der Test nicht auswertbar. Die Berechnung der prozentualen Probenwerte erfolgte wie vom Hersteller angegeben mit den Mittelwerten der gemessenen OD-Werte nach Formel 1. Die Auswertung der Testergebnisse wurde nach den Referenzbereichen des Herstellers vorgenommen (Tab. 7 und 8).

$$\text{Probenwert (\%)} = \frac{\text{OD (Probe)}}{\text{OD (Positivkontrolle)}} \times 100 \quad (1)$$

Tab. 7: Svanovir-ELISA-Auswertung von Blutserumproben

Befund	negativ	fraglich	positiv
Probenwert (%)	≤ 31 %	> 31 % < 52 %	≥ 52 %

Tab. 8: Svanovir-ELISA-Auswertung von Milchserumproben

Befund	negativ	fraglich	positiv
Probenwert (%)	≤ 26 %	> 26 % < 56 %	≥ 56 %

3.4.3 Durchführung des Pourquier-ELISA

Testkit: Pourquier® ELISA Paratuberculosis Antibody Screening Testkit
(Fa. Institut Pourquier)

Im Testkit enthaltenes Material:

96-well-Mikrotiterplatten, mit inaktiviertem, protoplasmatischem Map-Extrakt beschichtet

Waschlösung (20fach konzentriert)

Verdünnungspuffer Nr.12 (grün)

Verdünnungspuffer Nr.1 (blau)

Anti-Wiederkäuer-IgG-Peroxidase-Konjugat

TMB-Substrat Nr. 2, gebrauchsfertig

Stopplösung (H₂SO₄ 0,5M)

positive und negative Kontrolle

Dem Pourquier-ELISA war stets eine Vorinkubation der Proben mit einem Verdünnungspuffer, welcher *M. phlei* enthielt vorangeschaltet. Die Vorinkubation der Proben diente der

Bindung unspezifischer Antikörper. Dazu wurden die Serumproben sowie die Kontrollseren in 96-well-Platten (Fa. Treff Lab) im Verhältnis 1:20 mit dem „Verdünnungspuffer Nr.12“ verdünnt. Die Milchproben wurden im Verhältnis 1:2 mit dem Puffer verdünnt. Es erfolgte jeweils ein Doppelansatz der Proben, sowie der Kontrollseren. Die 96-well-Platten wurden während der 15minütigen Vorinkubationszeit leicht auf einem Plattenschüttler (IKA®-Schüttler MTS 4) bewegt. Jeweils 100 µl der verdünnten Proben und Kontrollseren wurden anschließend in 96-well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden mit einer Klebefolie abgedeckt und bei 5°C +/- 3°C über Nacht, für etwa 16 h, im Kühlschrank inkubiert. Map-Antikörper wurden während der Inkubation am Boden der Plattenvertiefungen, die mit protoplasmatischen Antigenen des Bakteriums beschichtet waren, gebunden. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Platten zur Entfernung des Überstandes maschinell (Skan Washer, Fa. Skatron) gewaschen. Zuvor wurde die gebrauchsfertige Waschlösung je nach Bedarf aus einer 20-fach konzentrierten Waschlösung und *Aqua dest.* hergestellt. Es erfolgten 3 Waschzyklen, dabei wurden jeweils 400 µl der gebrauchsfertigen Waschlösung in die Reaktionsvertiefungen mit einem Druck von 0,25 bar dispensiert und anschließend für 2 sec wieder aspiriert. Bei Milchanalysen wurde nach den Empfehlungen des Herstellers bei jedem der 3 Waschzyklen eine zweiminütige Einwirkzeit der Waschlösung zwischengeschaltet, bevor die Flüssigkeit erneut aspiriert wurde. Die abschließende Aspiration der Waschlösung dauert 6 sec an. Anschließend wurde das Anti-Wiederkäuer-IgG-Peroxidase-Konjugat im Verhältnis 1:200 mit dem Verdünnungspuffer Nr.1 verdünnt und jeweils 100 µl der Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Die mit Folie abgedeckten Mikrotiterplatten inkubierten 30 min lang bei Raumtemperatur. Die Platten wurden nach Abschluss der Inkubationszeit erneut wie oben beschrieben maschinell gewaschen. Nach dem Waschen wurden jeweils 100 µl des gebrauchsfertigen Enzymsubstrates (TMB) in jede Reaktionsvertiefung gegeben und die Mikrotiterplatten wurden mit Folie abgedeckt für weitere 10 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurden 100 µl der Stopplösung in jedes well pipettiert. Darauf erfolgte die Messung der optischen Dichte der Kontroll- und Patientenseren bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem ELISA-Reader (Spectra Fluor, Fa. Tecan). Aus den gemessenen OD-Werten eines Doppelansatzes wurde jeweils der Mittelwert berechnet. Nach den vom Hersteller angegebenen Validitätskriterien musste der Mittelwert der optischen Dichte des positiven Kontrollserums mindestens 0,350 betragen. Es musste weiterhin ein Mindestverhältnis zwischen den OD-Nettowerten der Positiv- und der Negativkontrolle von 3,5:1 eingehalten werden. Die Berechnung der prozentualen Probenwerte erfolgte, wie vom Hersteller angegeben, nach Formel 1. Den Probenwerten wurden nach Referenzbereichen des Herstellers Befunde zugeordnet (Tab. 9 und 10).

Tab. 9: Pourquier-ELISA-Auswertung von Blutserumproben

Befund	negativ	fraglich	positiv
Probenwert (%)	≤ 60 %	> 60 % < 70 %	≥ 70 %

Tab. 10: Pourquoi-ELISA-Auswertung von Milchserumproben

Befund	negativ	fraglich	positiv
Probenwert (%)	≤ 30 %	> 30 % < 40 %	≥ 40 %

3.5 Erregernachweis in Kotproben

Der Nachweis von Map in Kotproben wurde als Goldstandardverfahren zur Charakterisierung der untersuchten Tiere ausgewählt. Die Aufarbeitung der Kotproben, die Kultivierung des Erregers aus Kotproben sowie der molekularbiologische Erregernachweis aus Koloniematerial erfolgte wie unter den Punkten 3.5.1 bis 3.5.7 beschrieben.

3.5.1 Dekontamination der Kotproben im Projektzeitraum

In sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden (Fa. Greiner Bio One) wurden jeweils 30 ml einer 0,75 %igen Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC)-Lösung (Fa. Sigma) pipettiert. Die Kotproben wurden mit dem zum Deckel des Kotbechers gehörenden Löffel zunächst durchmischt, ~3 g pro Kotprobe wurden anschließend in das Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem 0,75 %igem HPC gegeben. Nach Verschluss und kurzem manuellen Schütteln der Zentrifugenröhrchen, folgte eine fünfminütige Sedimentation der groben Kotbestandteile bei Raumtemperatur. Darauf wurde der Überstand von etwa 15-20 ml in ein steriles 20 ml Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden (Fa. Greiner Bio One) überführt. Die gut verschlossenen 20 ml Zentrifugenröhrchen wurden für 30 min bei 200 MOT/min und Raumtemperatur geschüttelt (Laborschüttler IKA US 250 basic, Fa. IKA). Für Kotproben aus den Beständen A und B folgte darauf eine HPC-Einwirkzeit von 48 h bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Aufgrund der häufig auftretenden Pilzkontaminationen variierte die weitere Behandlung der Kotproben im Bestand C. Bei der 2. Bestandsuntersuchung im April 2004 wurde nach einer HPC-Einwirkzeit von 24 h der Überstand bis auf etwa 1 ml aus dem Zentrifugenröhrchen abgegossen und 100 µl ANV-Lösung: Amphotericin (Fa. Sigma): 50 µg/ml; Nalidixinsäure (Fa. Sigma): 100 µg/ml; Vancomycin (Fa. Fluka): 100 µg/ml in sterilem *Aqua dest.* wurden hinzu pipettiert. Nach kurzem manuellem Schütteln folgte eine Inkubationszeit von 24 h. Bei einer Wiederholungsuntersuchung von 98 Tieren im Juli 2004 wurde die HPC-Einwirkzeit auf 48 h verlängert und mit dem Sediment anschließend wie zuvor beschrieben verfahren. Bei der 3. Untersuchung des Bestandes C wurde die HPC-Dekontaminationszeit auf 72 h, sowie bei der 4. und 5. Untersuchung auf 96 h verlängert. Die zusätzliche Behandlung des Sediments mit der antibiotisch-antimykotisch wirksamen ANV-Lösung wurde bei der 3., 4. und 5. Untersuchung der Kotproben aus dem Bestand C nicht durchgeführt.

3.5.2 Beimpfen und Bebrüten der Kotkulturröhrchen

Nach Vollendung der Dekontaminationszeit wurde der Überstand aus den Zentrifugenröhrchen bis auf etwa 2 ml abgegossen. Von jeder Probe wurden je 2 HEYM-Kulturröhrchen mit Mycobactin J und ANV (Fa. Becton Dickinson) mit je 200 µl des Sediments beimpft. Das Übertragen des dickflüssigen Sediments erfolgte mit einer Eppendorf-Pipette unter Verwendung von Pipettenspitzen mit stumpfer Öffnung und Aerosolfilter (Fa. Molecular

BioProducts). Die Röhrrchen wurden verschlossen und durch leichtes Schwenken der Kulturröhrrchen verteilte sich das Inokulum auf der Nährbodenoberfläche. Um einen optimalen Kontakt der Mykobakterien mit dem Nährboden sowie eine Anheftung der Bakterien an der Nährbodenoberfläche zu erzielen, wurden die Röhrrchen in einem Brutraum für 7 Tage bei 37°C in Schräglage inkubiert. Ab der 2. bis zur 16. Kultivierungswoche erfolgte die Inkubation der Kulturröhrrchen in senkrechter Position bei 37°C.

3.5.3 Beurteilung der Kotkulturröhrrchen

Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen wurden die Kulturröhrrchen erstmals auf Koloniewachstum kontrolliert. Zur Beurteilung der Röhrrchen wurde die Bebrütung bei 37°C für etwa 1 bis 3 h unterbrochen. Jeweils 2 Untersucher betrachteten die Nährböden und erfassten semiquantitativ das Wachstum von Map-Kolonien, aber auch das Vorkommen von Kontaminanten z. B. Hefen oder Pilze. Bei einem geringen Map-Koloniewachstum (bis zu 20 Kolonien pro Kulturröhrrchen) wurde die gezählte Koloniezahl angegeben. Bei größerem Koloniewachstum wurde die Koloniezahl geschätzt und in eine von vier Gruppen eingeordnet: I. Zwischen 20 und 50 Kolonien, II. Zwischen 50 und 100 Kolonien, III. ≥ 100 Kolonien, IV. ≥ 200 Kolonien. Die Beurteilung wurde in 14-tägigen Abständen bis zur Vollendung der 16. Kultivierungswoche wiederholt und dokumentiert.

3.5.4 Mikroskopische Untersuchung von Koloniematerial

Mit einer Einmalpipette (steril, 1 ml, Fa. VWR) wurde jeweils 1 Tropfen steriles *Aqua dest.* auf einen Objektträger (Fa. Roth) gegeben und Koloniematerial mit einer Einmalimpföse (steril, SAL 10e-3, Fa. Greiner Bio One) darin verrieben und ausgestrichen. Nach Abschluss der Lufttrocknung erfolgte eine Inaktivierung und Hitze-fixierung der Ausstriche bei 80°C für 20 min in einem Heißluftsterilisator (WST 310, Fa. WST). Die Objektträger wurden nach der Ziehl-Neelsen-Methode zur Darstellung säurefester Stäbchen gefärbt. Auf die Präparate wurde dazu eine Carbol-Fuchsin-Lösung (Fa. Dr. Hollborn & Sohn) gegeben und es erfolgte eine kurze Erwärmung der Objektträger über dem Bunsenbrenner bis eine Dampf-bildung (bei ~80°C) sichtbar wurde. Nach einer Einwirkzeit der Carbol-Fuchsin-Lösung von 5 min wurden die Präparate mit *Aqua dest.* gespült und zweimal zum Entfernen der Carbol-Fuchsin-Lösung aus nicht säurefesten Strukturen in Färbeküvetten mit einem 3%igem Salzsäure-Alkohol-Gemisch (Fa. Merck) geschwenkt. Nach der Entfärbung der Präparate folgte eine Spülung mit *Aqua dest.* und eine zweiminütige Gegenfärbung mit Methylenblau (Fa. Dr. Hollborn & Sohn), die wiederum mit einer *Aqua dest.* Spülung abgeschlossen wurde. Die Präparate wurden luftgetrocknet und anschließend mit Immersionsöl (Fa. Roth) bei 100facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Axiolab, Fa. Zeiss) betrachtet. Die säurefesten, stäbchenförmigen Mykobakterien lagen dabei typischerweise in Nestern zusammengeballt und waren rot angefärbt. Bei Vorkommen säurefester Stäbchen wurde eine DNA-Isolierung aus dem Koloniematerial angeschlossen.

3.5.5 DNA-Isolierung aus Koloniematerial

In sterile, DNase und RNAase freie Eppendorf-Tubes (Fa. Eppendorf) wurden je 100 µl steriles *Aqua dest.* vorgelegt. Mit einer Einmalimpföse (steril, SAL 10³, Fa. Greiner Bio One) wurde jeweils eine Einzelkolonie von einem Kulturröhrchen abgenommen und in das vorgelegte *Aqua dest.* eingerieben. Zur Inaktivierung der Mykobakterien folgte eine Inkubation der Tubes für 20 min bei 80°C im Wasserbad (Unitek HB-130, Fa. Unitek). Die Tubes wurden anschließend in Schwimmständer umgesetzt und für 10 min im Ultraschallbad (Gen-Probe Typ 460, HF-Frequenz: 35, Fa. Elma) mit 35 kHz behandelt. Die im Ultraschallbad erzeugte Kavitation führte zum Aufschluss der Mykobakterienzellen. Dabei freigesetzte Enzyme wurden durch eine weitere Inkubation im Wasserbad für 10 min bei 100°C inaktiviert. Zur Entfernung der Zellrümmen folgte darauf eine zweimalige Zentrifugation der Tubes bei 12.000 U/min für jeweils 5 min (Biofuge 13, Fa. Heraeus Instruments). Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die DNA-Proben in den Eppendorf-Tubes bei -20°C aufbewahrt.

3.5.6 IS900-PCR und Duplex-PCR der DNA-Proben

Zum molekularbiologischen Nachweis von Map in den zuvor gewonnenen DNA-Proben wurde eine IS900-PCR nach Englund et al. (1999) durchgeführt. Dabei erfolgte die Amplifikation des für Map spezifischen Gensegments IS900 (Tab. 12). Eine Duplex-PCR wurde parallel angewendet (Kunze et al. 1992, Guerrero et al. 1995). Sie ermöglichte die Identifikation von *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (Maa) und *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Mah) (Tab. 13 und 14). Vor Arbeitsbeginn wurden 2 PCR-Arbeitsstationen (Clene Cab, Fa. Herolab), die sich in einem gesonderten Raum befanden für 30 min mit UV-Licht bestrahlt und anschließend mit DNA Away® Sprühdekontamination (Fa. Roth) ausgesprüht. In der 1. PCR-Arbeitsstation erfolgte der Ansatz des Mastermix (Tab. 11) und die Vorbereitung der Reaktionsgefäße. Die Eppendorf-Tubes mit einem Volumen von 0,2 ml wurden entsprechend der Probenanzahl vorbereitet und beschriftet. Der Mastermix wurde für alle Proben zunächst in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube angesetzt. Die bei -20°C gelagerten Reagenzien für den Mastermix wurden auf einem Cooler (Fa. Eppendorf) bereitgestellt. Die Taq-DNA-Polymerase (Fa. QIAGEN) wurde nur kurzzeitig für die Zugabe aus der -20°C Tiefkühlung entnommen. Nach der Zugabe aller Reagenzien in das 1,5 ml Eppendorf-Tube, wurden die Tubes kurz gevortext und für 3-5 sec zentrifugiert. Anschließend wurden je 19 µl des Mastermix in je ein Reaktionsstube pipettiert. In einer 2. PCR-Arbeitsstation erfolgte die Zugabe der Proben und der Kontrollen in die Reaktionsgefäße mit vorgelegtem Mastermix. Je 1 µl einer Probe oder einer Kontrolle wurde hinzu pipettiert. Bei Bedarf erfolgte eine Vorverdünnung der Proben oder der Kontrollen aus jeweils 45 µl DEPC-Wasser (Fa. Invitrogen) und 5 µl Probe. Bei jeder PCR wurden jeweils eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt (Tab. 15). Die Reaktionsgefäße wurden anschließend verschlossen, kurz gevortext, für 3–5 sec zentrifugiert und im Thermozykler (Biometra T3, Fa. Biometra biomedizinische Analytik GmbH) plaziert. Das jeweilige PCR-Programm wurde ausgewählt (Tab. 16 und 17). Nach Abschluss der PCR wurden die Reaktionsgefäße aus dem Thermozykler entnommen und bis zur Durchführung der Elektrophorese bei -20°C gelagert.

Tab. 11: Mastermix für die IS900-PCR zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

IS900- PCR - Mastermix	
Reagenzien	Volumen / 1 Probe
DEPC - Wasser (Fa. Invitrogen)	15,5 µl
PCR - Puffer, portioniert 10fach (Fa. QIAgen)	2,0 µl
Primer: IS900, S 749, 20 µM (Fa. Jena Bioscience)	0,5 µl
Primer: IS900, S 204, 20 µM (Fa. Jena Bioscience)	0,5 µl
Deoxy-Nucleotid-triphosphate: alle 4 Basen: A; T; C; G, 10 mM (Fa. QIAgen)	0,4 µl
Taq-DNA-Polymerase 5 Units/µl (Fa. QIAgen)	0,1 µl

Tab. 12: Sequenzen der Primer der IS900-PCR nach Englund et al. (1999)

Primersequenzen IS900-PCR	
IS900, S 749	5` - CGC GGC ACG GCT CTT GTT - 3`
IS900, S 204	5` - TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG - 3`

Tab. 13: Mastermix für die Duplex-PCR zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *avium* und *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*

Duplex-PCR	
Reagenzien	Volumen / 1 Probe
DEPC - Wasser (Fa. Invitrogen)	15,5 µl
PCR - Puffer 10fach (Fa. QIAgen)	2,0 µl
Primer: IS901, P 1, 50 µM (Fa. Jena Bioscience)	0,4 µl
Primer: IS901, P 2, 50 µM (Fa. Jena Bioscience)	0,4 µl
Primer: IS1245, P 1, 25 µM (Fa. Jena Bioscience)	0,1 µl
Primer: IS1245, P 2, 25 µM (Fa. Jena Bioscience)	0,1 µl
Deoxy-Nucleotid-triphosphate (alle 4 Basen: A; T; C; G) 10 mM (Fa. QIAgen)	0,4 µl
Taq-DNA-Polymerase 5 Units/µl (Fa. QIAgen)	0,1 µl

Tab. 14: Sequenzen der Primer der Duplex-PCR

Primersequenzen Duplex-PCR	
IS901, P 1	5` - GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA - 3`
IS901, P 2	5` - TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT - 3`
IS1245, P 1	5` - GCC GCC GAA ACG ATC TAC - 3`
IS1245, P 2	5` - AGG TGG CGT CGA GGA AGA - 3`

Tab. 15: Positiv- und Negativkontrollen für die PCR

Kontrollen	Mykobakterium	FLI Bezeichnung	DSM- Nummer	ATCC- Nummer
Positivkontrolle IS900-PCR	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	03A2388	44133	19698
		02A0267	44135	-
Positivkontrolle Duplex-PCR	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i>	M 128	44156	-
Negativkontrolle	DEPC-Wasser in Mastermix			

Tab. 16: Programmablauf der IS900-PCR im Thermozykler

IS900-PCR - Programm			
Reaktionsname	Reaktionsschritt (Step)	Temperatur	Reaktionszeit
Denaturierung	1	96 °C	1 min
	2	96 °C	15 sec
Annealing	3	60 °C	1 min
Elongation	4	72 °C	1 min
	5	72 °C	5 min
	6	4 °C	
Zyklen	Step 2 bis 4 wurden 30mal wiederholt		

Tab. 17: Programmablauf der Duplex-PCR im Thermozykler

Duplex-PCR - Programm			
Reaktionsname	Reaktionsschritt (Step)	Temperatur	Reaktionszeit
Denaturierung	1	94 °C	3 min
	2	94 °C	1 min
Annealing	3	60 °C	45 sec
Elongation	4	72 °C	4 min
	5	7 °C	3 min
	6	4 °C	
Zyklen	Step 2 bis 4 wurden 33mal wiederholt		

3.5.7 Agarosegel-Elektrophorese

In einem Erlenmeyerkolben wurde aus 1,5 g Agarose (Fa. PEQLAB) und 100 ml TBE-Puffer (0,45 M Tris Borate, 0,01 M EDTA, pH 8,3, Fa. Eppendorf) unter Aufkochen in der Mikrowelle bei 600 W ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Nach Abkühlen des noch flüssigen Gels auf 60–70 °C wurden 2 Tropfen Ethidiumbromidlösung (Fa. Sigma) hinzu getropft und der Kolben zur gleichmäßigen Verteilung des Ethidiumbromids leicht geschwenkt. Das Gel wurde anschließend in das vorbereitete Geltablett (Fa. Biozym) gegossen, es polymerisierte für eine Stunde bei Raumtemperatur bevor es aus der Gießvorrichtung in die Elektrophoresekammer (Biozym Midi, Fa. Biozym) umgesetzt wurde. Die Kammer wurde mit TBE-Puffer aufgefüllt bis das darin liegende Gel mit Puffer bedeckt war. In die erste Tasche des Gels wurden stets 10 µl des Molekulargewichtsmarkers (peqGOLD Low Range DNA-Leiter, Fa. PEQLAB) pipettiert. Auf einem Parafilmstreifen wurden im Abstand von etwa 1,5 cm nach Bedarf je 2 µl des Farbstoffes Bromphenolblau (Fa. Sigma) aufgetragen. Je 10 µl einer PCR Probe und der Kontrollen wurden anschließend auf 2 µl Bromphenolblau aufpipettiert, mit der Pipettenspitze gemischt und nach einem Protokoll in die entsprechende Geltasche des Agarosegels wurden 10 µl der Mischung aus Probe und Bromphenolblau gegeben. Nachdem alle Proben aufgetragen waren, wurde die Elektrophoresekammer an das Stromversorgungsgerät angeschlossen (1 h, 130 Volt). Anschließend wurde das Agarosegel aus der Elektrophoresekammer entnommen und mit der Software GenSnap Version 4.00 (Fa. Syngene) unter einem UV-Transilluminator (Gene Genius, Fa. Syngene) ausgewertet. Es erfolgte eine fotografische Dokumentation der Ergebnisse (Sony Digital Graphik Printer UP-D890). Bei der Auswertung des Ausdrucks wurden die Banden der Proben mit denen der Positivkontrollen und der DNA-Leiter verglichen (Tab. 18 und Abb. 8). Bei Proben mit eindeutig positiver Ziehl-Neelsen-Färbung und negativem PCR-Ergebnis erfolgte eine Wiederholung der DNA-Isolation und eine PCR der Originalprobe sowie der 1:10 Verdünnung des Originals mit DEPC-Wasser. Die PCR wurde wiederholt, wenn die Positivkontrollen negativ ausfielen oder die Banden nicht eindeutig auswertbar waren. Die PCR wurde ebenfalls als ungültig erklärt, wenn die Negativkontrolle bei der Auswertung ein positives Ergebnis aufgrund einer Kontamination aufwies.

Tab. 18: Auswertung der Ergebnisse der PCR und der Gelelektrophorese

Mykobakterium	Banden	Amplifizierte Insertionssequenzen	Molekulargewicht
<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	1	IS900	563 bp
<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i>	2	IS901 IS1245	1108 bp 427 bp
<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>hominisuis</i>	1	IS1245	427 bp

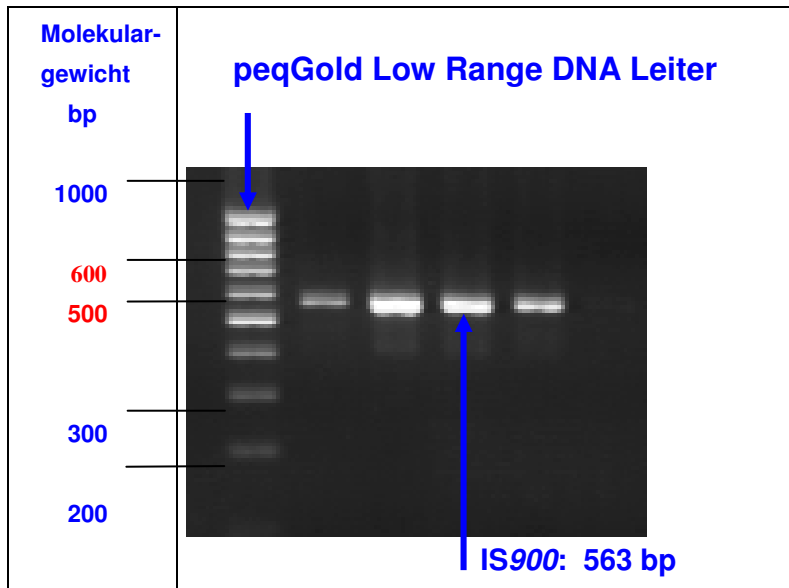


Abb. 8: Fotografische Dokumentation des amplifizierten Genabschnittes IS900

3.6 Versuch zur Dekontamination von Kotproben

Im Rahmen des Paratuberkulose Projektes wurden 32 Rinderkotproben, die aus den Beständen A, B und C stammten untersucht und anschließend 4 bis 8 Monate bei -20°C tiefgekühlt gelagert. Die Proben wurden in einen zusätzlichen Versuch zum Vergleich verschiedener Kotdekontaminationsmethoden zur Anzüchtung von Map einbezogen. Während der ersten Kultivierung mit angeschlossener molekularbiologischer Untersuchung erwiesen sich 20 Kotproben (Proben Nr. 1–20) aus den Beständen A und B als Map positiv. Bei der Erstkultivierung zeigten 12 der untersuchten Kotproben (Proben Nr. 21–32), die alle aus dem Bestand C stammten, kein Koloniewachstum. Als Negativkontrollen wurden 10 der 12 Proben aus dem Bestand C eingesetzt. Den Kotproben Nr. 21 und Nr. 22 wurde Map zugesetzt. Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Einflüsse der in Tab. 17 genannten Dekontaminationsmethoden auf das Map-Koloniewachstum und auf das Wachstum von Myzeten und anderen Kontaminanten bewertet.

In sterile 500 ml Erlenmeyerglaskolben wurden jeweils 18 g einer Kotprobe (Nr. 1 bis Nr. 32) aufgenommen und in 180 ml 0,75 %igem HPC suspendiert. Zwei der negativen Kotproben (Nr. 21 und Nr. 22) des Bestandes C wurde Map aus einer Flüssigkultur zugesetzt. Dazu wurde der Map-Stamm ATCC 19698 zuvor in Middlebrook–7H9–Bouillon (Fa. Difco – Becton Dickinson) kultiviert. 3 ml der Kultur wurden in sterile 10 ml Falconröhrchen aufgenommen. Die optische Dichte der Kultur wurde bei einer Wellenlänge von 670 nm photometrisch (CADAS 30, Dr. Lange Fotometer, Fa. Dr. Lange) gemessen und betrug 0,713.

Anschließend erfolgte die Herstellung zweier Verdünnungsstufen mit Middlebrook–7H9–Bouillon und die Messung der optischen Dichte der verdünnten Map-Suspensionen (Tab. 19). Zu den zuvor in die Erlenmeyerkolben eingewogenen Kotproben (Nr. 21 und Nr. 22) wurden jeweils 500 μl der jeweiligen Verdünnungsstufe gegeben und mit der Pipettenspitze gut gemischt.

Tab. 19: Verdünnung und optische Dichte der *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Suspension zum Spiken der Kotproben Nr. 21 und 22

	Probe Nr. 21	Probe Nr. 22
Verdünnung der Flüssigkultur	1:10	1:100
Optische Dichte (670nm)	0,468	0,083
Zugesetztes Volumen	500 µl	500 µl

Alle Erlenmeyerkolben (Nr. 1 bis Nr. 32) wurden im Anschluss für 15 min bei 150 MOT/min und Raumtemperatur geschüttelt (Laborschüttler IKA US 250 basic, Fa. IKA), dabei war die Öffnung der Kolben mit Aluminiumfolie abgedeckt. Nach dem gründlichen Suspendieren des Kotes folgte eine Sedimentationsphase von 5 min. Ein Überstand von etwa 150 ml wurde aus jedem Kolben in ein steriles Becherglas überführt. Der Überstand jeder Probe wurde anschließend in jeweils 6 Portionen à 20 ml in sterile 30 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Nach Abschluss der Portionierung folgte ein weiteres Schütteln der Röhrchen auf einem Laborschüttler für 30 min bei 200 MOT/min und Raumtemperatur. Damit sollte eine homogene Map-Verteilung in den Proben erzielt werden. Im Anschluss folgte eine Sedimentationsphase, die je nach Dekontaminationsmethode mindestens 24 h und bis zu 96 h (bei Dunkelheit und Raumtemperatur) andauerte. Jede der 32 Kotproben wurde mit 6 verschiedenen Dekontaminationsmethoden behandelt. Die einzelnen Methoden sind schematisch in Abb. 9 dargestellt. Bei den Methoden a, b, c und d handelte es sich um Sedimentationsmethoden, dabei wurden unterschiedliche Einwirkzeiten des HPC verglichen (Tab. 20 und Abb. 9). Nach Abschluss der jeweiligen Sedimentationszeit wurde der Überstand aus den Falconröhrchen abgegossen. Ein Volumen von etwa 3 ml Sediment verblieb in den Röhrchen, davon wurden von jeder Kotprobe 3 Herrold's Egg Yolk Medium Röhrchen mit Mycobactin J und ANV (Fa. Becton Dickinson®) beimpft. Jedes Kulturröhrchen wurde anschließend mit 200 µl des Sediments inokuliert.

Tab. 20: Dekontaminationsmethoden a – f

Methode a.	Dekontamination mit 0,75 % HPC für 24 h
Methode b.	Dekontamination mit 0,75 % HPC für 48 h
Methode c.	Dekontamination mit 0,75 % HPC für 72 h
Methode d.	Dekontamination mit 0,75 % HPC für 96 h
Methode e.	Dekontamination mit 0,75 % HPC für 24 h, ANV-Lösung für 24 h
Methode f.	Dekontamination mit 0,75 % HPC für 24 h, Amphotericin-Lösung für 24 h

Die Methoden e und f waren Zentrifugationsmethoden, bei denen zusätzlich Antibiotika und Antimykotika für die Dekontamination der Kotproben eingesetzt wurden. Die Falconröhrchen wurden dabei nach einer 24stündigen HPC-Einwirkzeit bei 900 x g für 30 min und Raumtemperatur zentrifugiert (Megafuge 2.OR, Fa. Hareus). Der Überstand wurde anschließend verworfen. Nach Methode e wurde das verbliebene Pellet in 1 ml ANV-Lösung (Amphotericin B: 50 µg/ml; Nalidixinsäure: 100 µg/ml; Vancomycin: 100 µg/ml in sterilem *Aqua dest.*) resuspendiert. Bei Methode f erfolgte eine Lösung des Pellets in jeweils 1 ml einer hochkonzentrierten Amphotericin B-Lösung (500 µg Amphotericin B/1 ml sterilem *Aqua*

dest.). Bei beiden Methoden (e, f) wurden die Zentrifugenröhrchen im Anschluss für 5 min bei 200 MOT/min und Raumtemperatur geschüttelt und für weitere 24 h bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Wie bei den Methoden a bis d wurden darauf jeweils 3 HEYM-Röhrchen mit Mycobactin J und ANV (Fa. Becton Dickinson®) beimpft. Die Kultivierung, der Nachweis von Map aus Koloniematerial, sowie die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie in den Punkten 3.5.2 bis 3.5.7 beschrieben. Zusätzlich wurde das Koloniewachstum für die einzelnen Methoden bewertet. In der 16. Kultivierungswoche erfolgte dazu die Erfassung der Koloniezahlen. Dabei wurden die Kolonien aller 3 Kulturröhrchen einer Kotprobe zusammen gezählt und in eine von 3 Kategorien (Tab. 21) eingeordnet. Für den Vergleich der Dekontaminationsmethoden wurde anschließend ein Durchschnittswert aus den erhobenen Koloniekategorien gebildet.

Tab. 21: Kategorien zur Beurteilung von Koloniezahlen im Dekontaminationsversuch

Kategorie	Koloniezahl	Beurteilungskriterien
1	bis 50 Kolonien	Kolonien zählbar
2	über 50 bis 200 Kolonien	Lockerer Rasen
3	über 200 Kolonien	Dichter Rasen

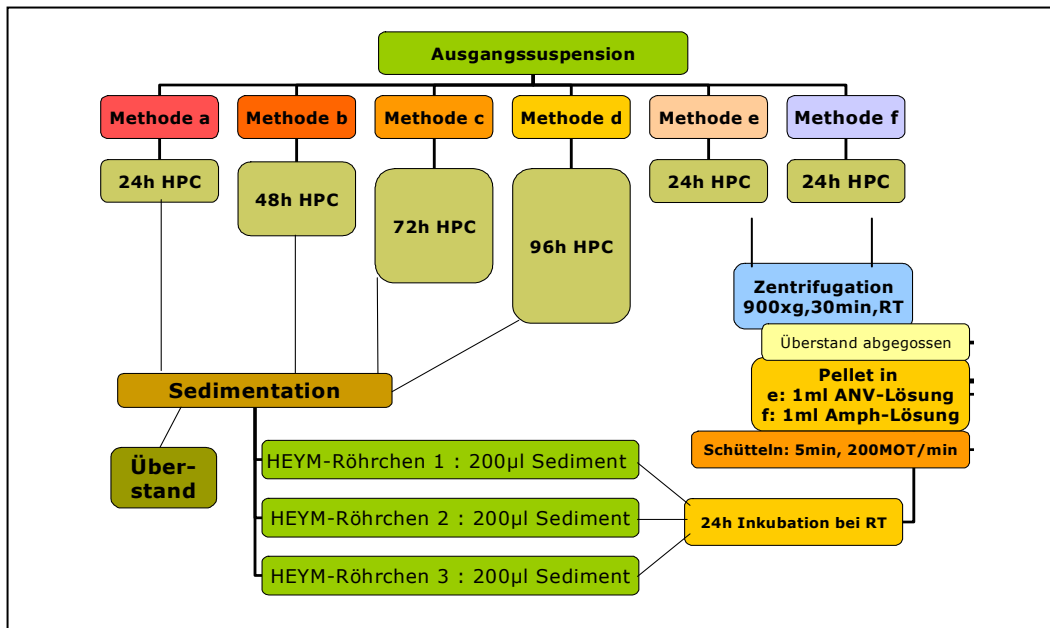


Abb. 9: Übersicht zum Versuchsablauf der 6 verglichenen Methoden zur Dekontamination von Kotproben für die Anzucht von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

3.7 Erfassung tierspezifischer Daten

In allen Beständen, die an den Untersuchungen teilnahmen wurden aus dem Bestandsverwaltungsprogramm HERDE® (Fa. dsp-agrosoft) für Milchviehherden Daten der untersuchten Tiere mit Hilfe des Softwareprogramms dBase Plus® ausgelesen. Die Identifizierung der Tiere erfolgte über Ohrmarkennummern.

Folgende Tierdaten wurden erfasst:

- Geburtsdatum
- Alter der Tiere in Tagen am jeweiligen Untersuchungstag
- Ohrmarkennummer der Mutter
- Vorangegangenes Abkalbedatum
- Laktationsnummer
- Laktationstag zum Untersuchungszeitpunkt

Folgende Daten der Milchleistungsprüfungen am jeweiligen Untersuchungstag wurden ausgelesen:

- Milchmenge in kg am Untersuchungstag
- Milcheiweißgehalt in %
- Milchfettgehalt in %
- Milchlaktosegehalt in %
- Milchwahnhstoffgehalt in mg/ml
- Zellzahl der Milch in 10^3 Zellen/ml

Die erfassten Datensätze wurden aus dem Programm dBase Plus® in das Microsoft® Office Excel 2003 übernommen. Die Untersuchungsbefunde aus den einzelnen Beständen zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wurden zuvor tabellarisch im Programm Microsoft® Office Excel 2003 erfasst. Die Zuordnung und Verknüpfung der tierspezifischen Daten und der Untersuchungsbefunde erfolgte über die Ohrmarkennummern der Tiere. Im Microsoft® Office Excel 2003 wurde eine umfangreiche Datenbank erstellt.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Softwareprogrammen Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft® Office Access 2003, SPSS 12.0 für Windows und dem Programm R (Version 2.4.0; <http://www.r-project.org>). Für alle genutzten statistischen Verfahren wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt (entspricht einer Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$). Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mit dem Softwareprogramm Microsoft® Office Excel 2003.

Kotpositive Tiere der Bestände A und B wurden bei allen statistischen Auswertungen als sicher infiziert bewertet. Die Tiere des unverdächtigen Bestandes C wurden als sicher nicht-infiziert betrachtet.

3.8.1 Berechnung von Sensitivitäten

Für die serologischen Testverfahren wurden diagnostische Sensitivitäten berechnet. Die Sensitivität gibt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses bei infizierten Tieren an (Greiner 2003). Als infiziert wurden ausschließlich Tiere aus den Beständen A und B bewertet, die innerhalb des Untersuchungszeitraumes mindestens einen positiven Kotbefund aufwiesen. Die Erhebungen enthielten Messwiederholungen an identischen Tieren zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. In die Berechnungen der Sensitivitäten nach Formel 2 wurden ausschließlich die positiven Ergebnisse der serologischen Tests einbezogen.

$$\text{SENSITIVITÄT (in \%)} = \frac{\text{Anzahl positiver Proben infizierter Tiere (m)}}{\text{Gesamtzahl Proben infizierter Tiere (n)}} \times 100 \quad (2)$$

Die Zusammenhänge zwischen tierabhängigen Faktoren und der Sensitivität der serologischen Testverfahren wurden untersucht, dabei wurde zwischen **positiven** und **nicht-positiven (negativen+fraglichen) Befunden** unterschieden.

Es erfolgte eine Prüfung der Abhängigkeit der Sensitivität der Kotkultur von den tiereigenen Faktoren Alter, Laktationsphase und Tagesmilchleistung. Um den Einfluss von Wiederholungsuntersuchungen auf die Testsensitivität zu bewerten, wurden die positiven Untersuchungsbefunde aus Einzeluntersuchungen zusammengefasst und die **kumulative Sensitivität** berechnet. Alle einmal positiv erkannten, sicher infizierten Tiere wurden bei Folgeuntersuchungen weiterhin als positiv gewertet.

3.8.2 Berechnung von Spezifitäten

Die Spezifität gibt die Wahrscheinlichkeit eines negativen Testergebnisses bei nicht-infizierten Tieren an (Greiner 2003). In die Spezifitätsberechnungen für die serologischen Verfahren wurden Untersuchungsbefunde von Tieren aus dem Paratuberkulose unverdächtigen Bestand C einbezogen. Die Tiere aus Bestand C wurden als nicht-infiziert bewertet. Im Bestand C war eine große Anzahl der Kotproben aufgrund von Pilzkontaminationen nicht auswertbar. Aus diesem Grund wurden je 2 verschiedene Varianten für die Spezifitätsberechnung gewählt. Einerseits wurden alle serologischen Befunde des Bestandes C für die Berechnungen verwendet (Gruppe a). Zum anderen wurde eine Subpopulation von Tieren ausgewählt, die mindestens 3mal in Folge ein negatives Ergebnis der Kotkultur aufwies (Gruppe b). Es wurden ausschließlich negative ELISA-Ergebnisse für die Berechnungen der Spezifität nach Formel (3) verwendet.

Der Zusammenhang zwischen tierabhängigen Faktoren und der Spezifität serologischer Tests wurde untersucht, dabei wurde zwischen den Befundgruppen **negativ** und **nicht-negativ (fraglich oder positiv)** unterschieden.

Um den Einfluss von Wiederholungsuntersuchungen auf die ELISA-Spezifität zu bewerten, wurde die Anzahl der nicht-infizierten Tiere mit durchgehend negativem serologischem Testergebnis an der Gesamtzahl der 3-fach untersuchten, nicht-infizierten Tiere gemessen. Die berechnete **kumulative Spezifität** eines Tests bei 3facher Untersuchung identischer Tiere gibt die Wahrscheinlichkeit für ein konstant negatives Testergebnis bei nicht-infizierten Tieren an.

$$\text{SPEZIFITÄT (in \%)} = \frac{\text{Anzahl negativer Proben nicht-infizierter Tiere (m)}}{\text{Gesamtzahl Proben nicht-infizierter Tiere (n)}} \times 100 \quad (3)$$

3.8.3 Kriterien für die Bildung von Tiergruppen zur Untersuchung der tierspezifischen Einflussfaktoren auf die Diagnostik der Paratuberkulose

Für die Untersuchung tierspezifischer Einflussfaktoren auf die Diagnostik der Paratuberkulose wurden für die jeweiligen Fragestellungen Tiergruppen gebildet und miteinander verglichen. Die Sensitivitäten und Spezifitäten der serologischen Testverfahren wurden für 2 Bestände, 3 Kotbefundgruppen, 6 Altersgruppen, 4 Laktationsphasen, 7 Milchleistungsgruppen und 5 Milchparameter vergleichend untersucht.

3.8.3.1 Bestände und Kotbefundgruppen

Die Untersuchungsbefunde in den Beständen A und B sowie in 3 Kotbefundgruppen (Befunde von Einzeltieren der Bestände A und B) wurden gegenübergestellt. Die Kotbefundgruppen wurden nach den Ergebnissen der Kotuntersuchungen mit jeweils 2 Kulturröhrchen pro Kotprobe gebildet (Tab. 22). Nur eindeutig auswertbare Befunde wurden in die Untersuchungen eingeschlossen. Die erste Kotbefundgruppe wies 2 mit Map bewachsene Kotkulturröhrchen auf, dies wurde als starke Map-Ausscheidung angesehen. In der zweiten Gruppe war lediglich ein Kulturröhrchen mit Map bewachsen, das weitere Kulturröhrchen war eindeutig unbewachsen und wies keine Kontaminationen auf, so dass eine mittlere bis schwache Ausscheidung des Bakteriums zum Untersuchungszeitpunkt angenommen wurde. Bei der dritten Gruppe wurden die Befunde infizierter Einzeltiere der Herden A und B betrachtet, bei welchen aktuell der Nachweis von Map im Kot nicht möglich war. Dabei waren beide Kulturröhrchen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt eindeutig nicht mit Map bewachsen und frei von Kontaminationen, die ein Map-Wachstum möglicherweise verhindert hätten. Bei einer vorangehenden oder nachfolgenden Untersuchung erfolgte jedoch bei diesen Tieren der Nachweis der Map-Ausscheidung. Für die Gruppe mit doppelt negativem Kotbefund wurde eine sehr schwache bzw. keine Map-Ausscheidung zum aktuellen Untersuchungszeitpunkt angenommen. Den Kotbefundgruppen wurden Symbole zugeordnet.

Tab. 22: Kotbefundgruppen für die statistische Auswertung

Kotbefund	Kulturröhrchen	Symbol	Stärke der Map Ausscheidung
Doppelt positiv	2 HEYM Röhrchen mit Map bewachsen	++	stark
Einfach positiv	1 HEYM Röhrchen mit Map bewachsen, 1 HEYM Röhrchen unbewachsen	+ -	schwach bis mittel
Doppelt negativ	2 HEYM Röhrchen unbewachsen	- -	schwache bis keine Ausscheidung

3.8.3.2 Altersgruppen

Für die Untersuchung des Alters als Einflussfaktor auf die Diagnostik der Paratuberkulose wurden 6 verschiedene Altersgruppen unterschieden (Tab. 23).

Tab. 23: Einteilung der Altersgruppen für die statistische Auswertung

Altersgruppe	Alter in Tagen
1,4 – 2 Jahre	521 – 730
2 – 3 Jahre	731 – 1095
3 – 4 Jahre	1096 – 1460
4 – 5 Jahre	1461 – 1825
5 – 6 Jahre	1826 – 2190
> 6 Jahre	> 2190

3.8.3.3 Laktationsphasen

Die Dauer der idealen Laktation des Rindes beträgt 305 Tage, gefolgt von einer 60tägigen Trockenstehzeit vor der nächsten Abkalbung (Huth 1995). Die Laktation dauert in der Praxis oft länger als 305 Tage an. Für die statistischen Auswertungen wurden nach dem physiologischen Verlauf der Laktation 4 Leistungsphasen unterschieden (Tab. 24). In der Phase 1 steigt die Milchleistung nach der Abkalbung rasch an und die Höchstleistung wird erreicht. In der 2. Phase findet ein allmählicher Leistungsabschwung statt. Darauf folgt die Phase 3, die durch einen verstärkten Leistungsabfall gekennzeichnet ist. Bei Tieren, die zum 316. Laktationstag oder darüber hinaus untersucht wurden, erfolgt eine Einordnung in die 4. Laktationsphase. Diese Tiere wiesen verlängerte Zwischenkalbezeiten auf, der verstärkte Leistungsabfall setzte sich in dieser Phase fort.

Tab. 24: Einteilung der Laktationsphasen

Laktationsphase	Laktationstage
1	0 – 105 d
2	106 – 210 d
3	211 – 315 d
4	≥ 316 d

3.8.3.4 Milchleistungsgruppen

Für die Untersuchung der Milchleistung als Einflussfaktor auf die Diagnostik der Paratuberkulose wurden die untersuchten Tiere nach der Tagesmilchleistung am Untersuchungstag in 7 Milchleistungsgruppen eingeteilt (Tab. 25).

Tab. 25: Einteilung der Milchleistungsgruppen

Milchleistungsgruppe	Untere Gruppengrenze in kg Milch	Obere Gruppengrenze in kg Milch
1		≤ 5 kg
2	> 5 kg	≤ 15 kg
3	> 15 kg	≤ 25 kg
4	> 25 kg	≤ 35 kg
5	> 35 kg	≤ 45 kg
6	> 45 kg	≤ 55 kg
7	> 55 kg	

3.8.3.5 Milchparameter

Die Einflüsse der Milchparameter: Eiweiß- und Laktosegehalt, sowie der Zell- und Harnstoffgehalt der Milch auf die Ergebnisse der Milch-ELISA-Testverfahren wurden geprüft.

Auf die Untersuchung eines Einflusses des Milchlactose wurde verzichtet, da das Milchlactose durch die vorangegangene Zentrifugation vom Milchserum abgetrennt wurde. Die milchserologischen Untersuchungsbefunde wurden den willkürlich gewählten Milcheiweißklassen ≤ 3,7 % und > 3,7 %, den Milchlactoseklassen ≤ 4,9 % und > 4,9 % sowie 4 verschiedenen Milchlactoseklassen (Tab. 26) und 5 verschiedenen Milchzellzahlklassen (Tab. 27) zugeordnet. Dabei wurde angenommen, dass ein Milcheiweißgehalt > 3,7 % sowie ein Milchlactosegehalt > 4,9 % über dem physiologischen Wert lag (Gürtler u. Schweigert, 2000). Es wurde zu Grunde gelegt, dass Milch eutergesunder Tiere ≤ 100.000 Zellen/ml enthält und maximal einen Harnstoffgehalt von ≤ 150 mg/ml aufweist (DVG 2002).

Tab. 26: Milchlactoseklassen

Klasse	Milchlactosegehalt in mg/ml
1.	≤ 150
2.	151 – 250
3.	251 – 350
4.	> 350

Tab. 27: Milchzellklassen

Klasse	Milchzellgehalt (x 10 ³ Zellen / ml)
1.	≤ 50
2.	> 50 ≤ 100
3.	> 100 ≤ 500
4.	> 500 ≤ 1000
5.	> 1000

3.8.4 Berechnung von Konfidenzintervallen

Für alle ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten wurden Konfidenzintervalle berechnet. Das Konfidenzintervall gibt einen Wertebereich an, in dem bei einer Wiederholungsuntersuchung ein Parameter der Grundgesamtheit zu erwarten ist (Weiß 2008). Für das Intervall wird zuvor eine Fehlerwahrscheinlichkeit festgelegt. Bei allen durchgeführten Untersuchungen wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % angenommen und das 95 %-Konfidenzintervall berechnet.

3.8.5 Pearson`s Chi-Quadrat Test

Der Pearson`s Chi-Quadrat Test (Weiß 2008) wurde als Signifikanztest zur Analyse unbekannter Häufigkeitsverteilungen eingesetzt (Formel 4). Die unbekanntes Häufigkeiten waren dabei die serologischen Untersuchungsbefunde die nach den tierspezifischen Parametern des Punktes 3.8.3 gruppiert und in Vierfeldertafeln erfasst wurden (Tab. 28). Die Nullhypothese dieses globalen Tests lautete: es bestehen keine Unterschiede zwischen den Anteilswerten einer Zeile und einer Spalte. Die Alternativhypothese besagte, dass Unterschiede zwischen den Anteilswerten vorhanden waren.

Tab. 28: Vierfeldertafel

	B	Nicht B	Summe
A	a	b	a+b
Nicht A	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	n=a+b+c+d

$$\chi^2 = \frac{n (ad - bc)^2}{(a + b) (a + c) (c + d) (b + d)} \quad (4)$$

3.8.6 Fisher`s exakt Test

Der exakte Test nach Fisher (Formel 5), eine Sonderform des Chi²-Test, wurde als Signifikanztest angewendet (Weiß 2008). Mit dem Fisher`s exakt Test wurden Vierfelder-Verteilungen (Tab. 28) geprüft. Dieser Test wurde gewählt, da die untersuchte Stichprobenanzahl vereinzelt sehr gering war.

$$p = \frac{\binom{a+c}{a} \binom{b+d}{b}}{\binom{n}{a+b}} \quad (5)$$

3.8.7 Kontingenztafeln für die Prüfung der Übereinstimmungen serologischer Tests und Berechnung des Kappawertes nach Cohen

Um die Übereinstimmungen der serologischen Ergebnisse zwischen 2 unabhängigen Testverfahren und innerhalb eines Tests bei Untersuchung von Blut und Milch zu bewerten wurden Kontingenztafeln gebildet (Tab. 29). Die prozentuale Häufigkeit der Übereinstimmungen wurde aus den Werten **a**, **e** und **j** ermittelt. Die Übereinstimmungen der Befunde

wurden jeweils für Paratuberkulose positive und Paratuberkulose unverdächtige Tiere geprüft.

Tab. 29: Kontingenztafel zur Darstellung der Übereinstimmungen der serologischen Befunde zweier ELISA-Testverfahren

		Befund Test B			
		negativ	fraglich	positiv	Gesamt
Befund Test A	negativ	a	b	c	a+b+c
	fraglich	d	e	f	d+e+f
	positiv	g	h	j	g+h+j
	Gesamt	a+d+g	b+e+h	c+f+j	Σ

Der Kappawert nach Cohen (Cohen 1960) wurde als statistisches Zusammenhangsmaß für die Bewertung der Übereinstimmungen zwischen zwei unabhängigen ELISA-Testverfahren gewählt (Formel 6). Nach Altmann (1998) wurden 5 Kategorien zur Bewertung des Kappawertes unterschieden (Tab. 30).

$$\mathcal{K} = \frac{p_0 - p_c}{1 - p_c} \quad (6)$$

p_0 - Gemessener Übereinstimmungswert der beiden Schätzer

p_c - Zufällig erwartete Übereinstimmung

Tab. 30: Bewertung des Kappawertes nach Cohen (Altmann 1998)

Kappawert	Übereinstimmungen
1,0 – 0,81	sehr gut
0,8 – 0,61	gut
0,6 – 0,41	mäßig
0,4 – 0,21	schlecht
≤ 0,2	sehr schlecht

3.8.8 Multinomiale logistische Regression

Die logistische Regression ist ein multiples, statistisches Verfahren, mit dem es möglich ist, die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Endereignisses basierend auf mehreren Einflussgrößen zu modellieren (Weiß 2008). Mittels einer multinomialen logistischen Regression wurde im Rahmen der Auswertungen zeitgleich die Stärke des Einflusses mehrerer Variablen auf eine Zielvariable untersucht.

Der Einfluss der Faktoren:

- Alter
- Laktationsphase
- Betrieb
- Tagesmilchmenge

auf die Ausscheidung von Map mit dem Kot, sowie auf die Ausprägung einer serologischen Reaktion wurde mit dieser Methode vergleichend geprüft. Für die serologischen Testverfahren wurde zusätzlich der Einfluss des Kotbefundes berechnet. Multinomiale logistische Regressionsmodelle beziehen sich stets auf eine zuvor bestimmte Referenzgruppe. Auf der Grundlage der Voruntersuchungen der Einzelparameter wurden die in Tab. 31 dargestellten Referenzgruppen gewählt.

Tab. 31: Merkmale der Referenzgruppen

Einflussfaktor	Referenzwerte
Alter	1096 – 1460 d
Laktationsphase	2: 106 bis 210 d
Betrieb	A
Tagesmilchmenge	>25 <=35 kg

Der Regressionskoeffizient, der Standardfehler und die relative Risikoreduktion (RRR) wurden berechnet. Ein Regressionskoeffizient von 1 gibt an, dass keine Veränderungen zu verzeichnen sind. Für jeden Einflussfaktor erfolgte die RRR-Berechnung für das Auftreten eines positiven Kotbefundes gegenüber einer Referenzgruppe. Die relative Risikoreduktion beschrieb beim Vergleich von 2 Studienpopulationen, um wie viel das relative Risiko (RR) durch eine Intervention im Vergleich zur Referenzgruppe (= 100 %) reduziert wurde.

4. ERGEBNISSE

Untersuchungsbefunde

4.1 Befunde der Untersuchungen auf Paratuberkulose in drei Thüringer Milchviehbetrieben

4.1.1 Zusammenfassung der Kotbefunde in den Betrieben A, B und C

In die Auswertungen der Kotkultivierungen wurden die Befunde von 4.707 Kotproben aus 4 Bestandsuntersuchungen (Gesamtbestandsuntersuchungen 2 bis 5) in 3 Milchviehbetrieben einbezogen (Tab. 32). Die kotkulturellen Befunde der ersten Untersuchung wurden aus den Auswertungen ausgeschlossen, da die Kultivierung des Erregers nicht nach den Verfahren, die unter den Punkten 3.5.1 und 3.5.2 beschrieben wurden erfolgte. Die serologischen Ergebnisse aus der 1. Gesamtbestandsuntersuchung wurden jedoch gewertet, wenn die Tiere an weiteren kulturellen Untersuchungen teilnahmen.

Tab. 32: Übersicht zu den Befunden der kulturellen Kotuntersuchungen in 3 Milchviehbeständen

Kotbefund		Bestand		
Kulturröhrchen 1	Kulturröhrchen 2	A	B	C
Map	Map	122	81	-
Map	negativ	73	63	-
Map	Kontamination	26	16	-
negativ	negativ	637	1.082	457
negativ	Kontamination	211	199	575
Kontamination	Kontamination	163	123	879
Σ (n=4.707)		1.232	1.564	1.911

Legende:

- Map** – Wachstum von *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*
Kontamination – Wachstum unerwünschter Pilze, Hefen oder Bakterien
negativ – Kulturröhrchen unbewachsen

Die prozentualen Anteile der Kotkulturergebnisse wurden für die 3 Bestände zusammengefasst (Abb. 10). Doppelt negative, doppelt Map-positive und einfach Map-positive Befunde waren sicher auswertbar, da keine Kontamination vorlag. Aufgrund einer Kontamination beider Kulturröhrchen waren 25 % der untersuchten Kotproben nicht auswertbar. Im Bestand C wiesen 46 % der Kotproben eine Kontamination auf beiden Kulturröhrchen auf (Tab. 32).

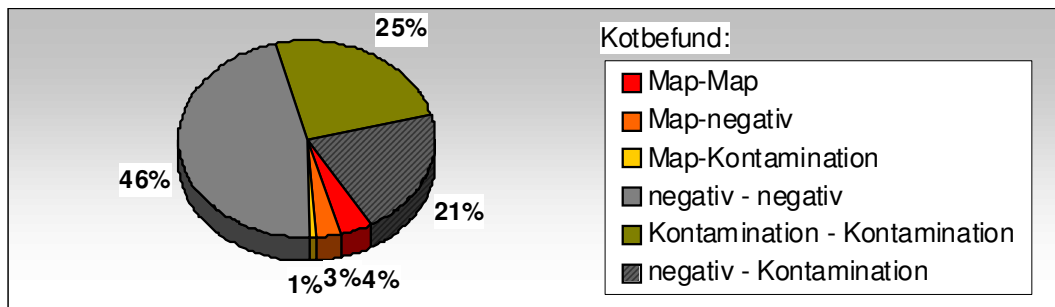


Abb. 10: Übersicht über die prozentualen Anteile der Kotkulturergebnisse in den Beständen A, B und C

Legende siehe Tab. 32

4.1.2 Kot- und ELISA-Befunde für die Bestände A, B und C zu 4 verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Bestand A

Im Bestand A verringerte sich die untersuchte Tierzahl im Verlauf der Untersuchungen (Tab. 33), währenddessen nahm der prozentuale Anteil kotpositiver Tiere zu (Abb. 11).

Tab. 33: Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen im Bestand A (n=1.232)

Untersuchung		2	3	4	5
Untersuchungszeitraum (Monat/Jahr)		9 /2004 11/ 2004	3/2005 5/2005	10/2005 12/2005	3/2006 5/2006
Kulturröhrchen 1	Kulturröhrchen 2	n=336	n=325	n=286	n=285
Map	Map	24	22	31	45
Map	negativ	15	15	18	25
Map	Kontamination	3	5	12	6
negativ	negativ	168	145	155	169
negativ	Kontamination	81	68	52	10
Kontamination	Kontamination	45	70	18	30

Legende siehe Tab. 32

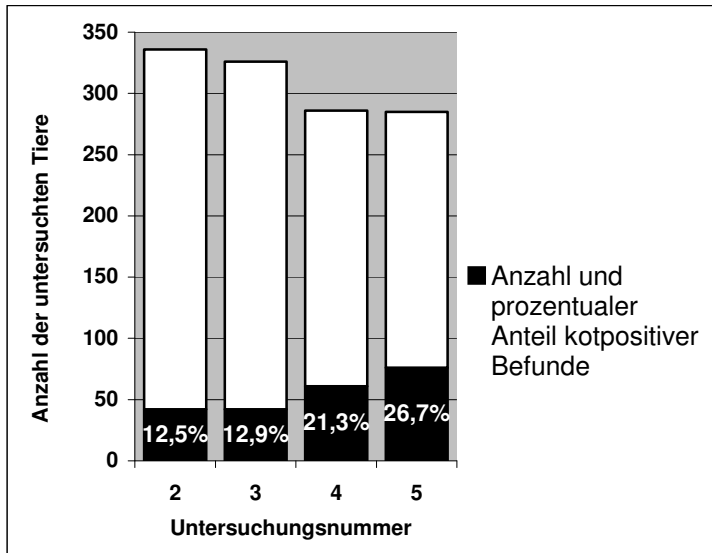


Abb. 11: Anzahl untersuchter Tiere und prozentualer Anteil *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* kulturpositiver Tiere zu 4 Untersuchungszeitpunkten im **Bestand A**

Bestand B

Die Kotbefunde des Bestandes B sind für 4 Einzeluntersuchungen tabellarisch zusammengefasst (Tab. 34). Die untersuchte Tierzahl variierte zwischen den Einzeluntersuchungen ebenso wie der prozentuale Anteil erkannter Map-Ausscheidertiere (Abb. 12).

Tab. 34: Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen im **Bestand B** (n=1.564)

Untersuchung		2	3	4	5
Untersuchungszeitraum (Monat/Jahr)		8/2004 10/2004	2/2005 4/2005	7/2005 9/2005	2/2006 5/2006
Kulturröhrchen 1	Kulturröhrchen 2	n=396	n=401	n=362	n=405
Map	Map	27	10	30	14
Map	negativ	13	13	19	18
Map	Kontamination	2	11	2	1
negativ	negativ	259	196	279	348
negativ	Kontamination	58	90	30	21
Kontamination	Kontamination	37	81	2	3

Legende siehe Tab. 32

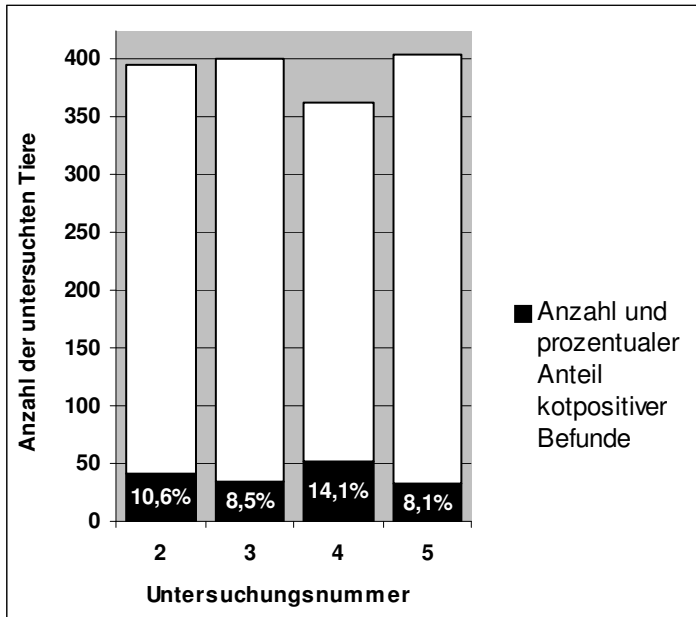


Abb. 12: Anzahl untersuchter Tiere und prozentualer Anteil *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* kulturpositiver Tiere zu 4 Untersuchungszeitpunkten im **Bestand B**

Bestand C

Die Kotbefunde der Einzeluntersuchungen des Bestandes C sind in Tab. 35 zusammengefasst, Map wurde in keiner der Kotproben aus 4 Bestandsuntersuchungen nachgewiesen. Aus 6 Kotproben wurden jedoch atypische Mykobakterien isoliert und mittels PCR identifiziert. Die Proben des Bestandes C wiesen häufig Kontaminationen mit Hefen oder Pilzen auf, daher waren 45,9 % der Kotproben aus dem Bestand C nicht auswertbar.

Tab. 35: Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen im **Bestand C** (n=1.911)

Untersuchung		2	3	4	5
Untersuchungszeitraum (Monat/Jahr)		4/2004 6/2004	11/2004 1/2005	4/2005 6/2005	11/2005 2/2006
Kulturröhrchen 1	Kulturröhrchen 2	n=599	n=475	n=403	n=434
negativ	negativ	139	178	49	91
negativ	Kontamination	180	193	105	92
Kontamination	Kontamination	275	104	248	251
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	negativ	1	-	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	negativ	3	-	-	-
<i>M. smegmatis</i>	negativ	1	-	-	-
<i>M. terrae</i>	Kontamination	-	-	1	-

Legende siehe Tab. 32

4.1.3 Entwicklung der Kotbefunde in den Beständen A und B

Die eindeutig auswertbaren Kotbefunde aus den infizierten Beständen A und B mit den Befundgruppen Map–Map, Map–negativ und negativ–negativ wurden zur Bewertung der Entwicklung der Kotbefunde über 4 Bestandsuntersuchungen verwendet (Tab. 36).

Tab. 36: Anzahl der eindeutig auswertbaren Kotbefunde aus 4 Untersuchungen in den Beständen A und B (n=2.059)

Bestand	Untersuchung			
	2	3	4	5
A	n=207	n=183	n=204	n=239
B	n=299	n=219	n=328	n=380

Für den Bestand A wurde eine stetige Zunahme der Tiere mit doppelt positivem Kotbefund ermittelt (Abb. 13). Es bestand ein signifikanter Unterschied der prozentualen Anteile doppelt positiver Kotbefunde zwischen 3. und 5. Bestandsuntersuchung (Fisher's exakt Test: $p=0,038$). Im Bestand B, in dem eine gezielte Eliminierung von Ausscheidertieren durchgeführt wurde, schwankte der Anteil der doppelt positiven Kotbefunde zwischen den Einzeluntersuchungen. Zwischen 2. und 3. Untersuchung erfolgte eine signifikante Abnahme der Map-Map-Befunde (Fisher's exakt Test: $p=0,036$), hingegen dazu wurde zwischen der 3. und 4. Untersuchung eine signifikante Zunahme (Fisher's exakt Test: $p=0,030$) sowie zwischen 4. und 5. Untersuchung wiederum eine signifikante Reduktion (Fisher's exakt Test: $p=0,001$) der starken Ausscheider (Map-Map-Befund) ermittelt.

Die Betrachtung der einfach positiven Kotbefunde (Map-negativ-Befund) im Bestand A ergab eine Zunahme des prozentualen Anteils dieser Befundgruppe zwischen der 2. und 5. Bestandsuntersuchung (Abb. 14), jedoch bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzeluntersuchungen und beim Vergleich der Anteile bei der 2. und 5. Untersuchung. Im Bestand B unterschieden sich die Ergebnisse der Einzeluntersuchungen nicht signifikant.

Der Anteil der doppelt negativen Kotbefunde reduzierte sich im Verlauf der Untersuchungen im Bestand A (Abb. 15), zwischen einer Untersuchung und der jeweiligen Folgeuntersuchung waren jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils doppelt negativer Kotbefunde wurde im Bestand A beim Vergleich der Ergebnisse der 2. und 5. Untersuchung ermittelt (Fisher's exakt Test: $p=0,006$). Im Bestand B unterschieden sich die prozentualen Anteile der doppelt negativen Kotbefunde zwischen den Einzeluntersuchungen nicht signifikant.

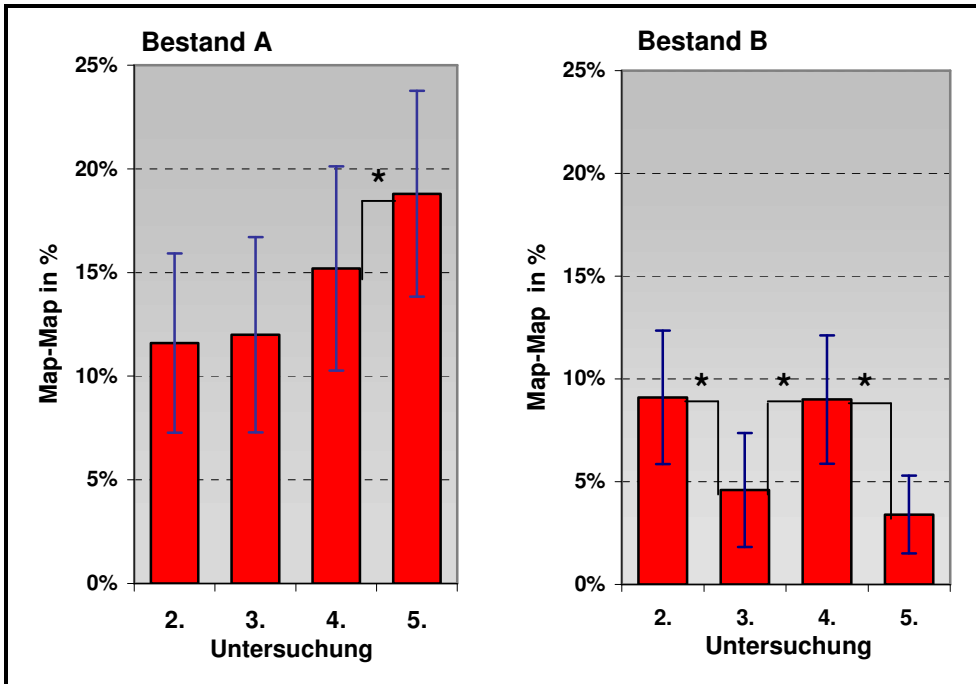


Abb. 13: Vergleich der prozentualen Anteile doppelt positiver Kotbefunde in den Beständen A und B nach Untersuchungszeitpunkt

Legende:

Map- Map - Doppelt positiver Kotbefund; 2 Map-bewachsene HEYM-Röhrchen

* - Signifikantes Ergebnis bei der Testung mit dem Fisher's exakt Test, $p \leq 0,05$

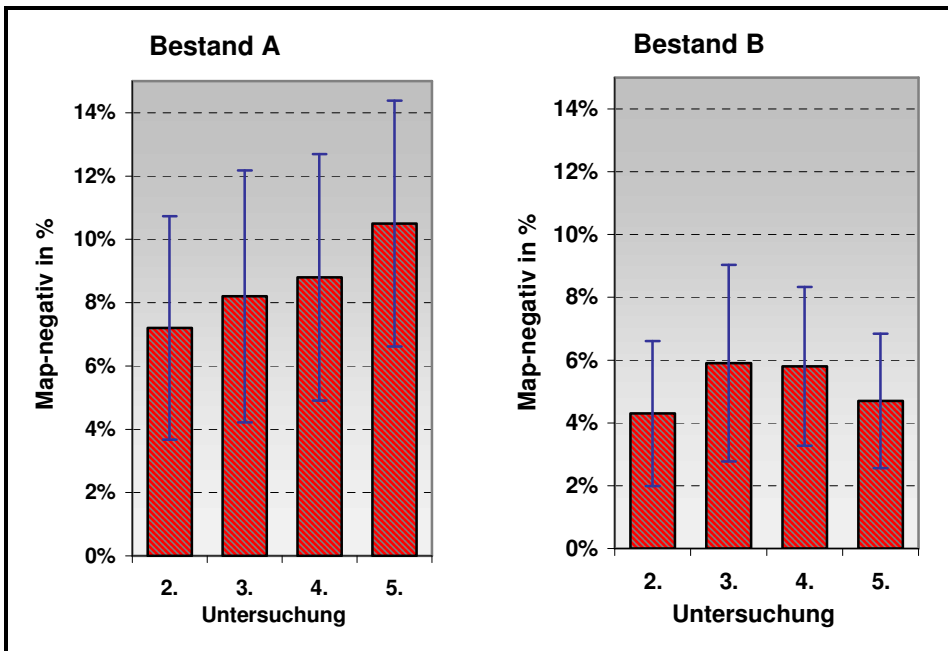


Abb. 14: Vergleich der prozentualen Anteile einfach positiver Kotbefunde in den Beständen A und B nach Untersuchungszeitpunkt

Legende: **Map-negativ** - Einfach positiver Kotbefund; 1 Map-bewachsenes HEYM-Röhrchen

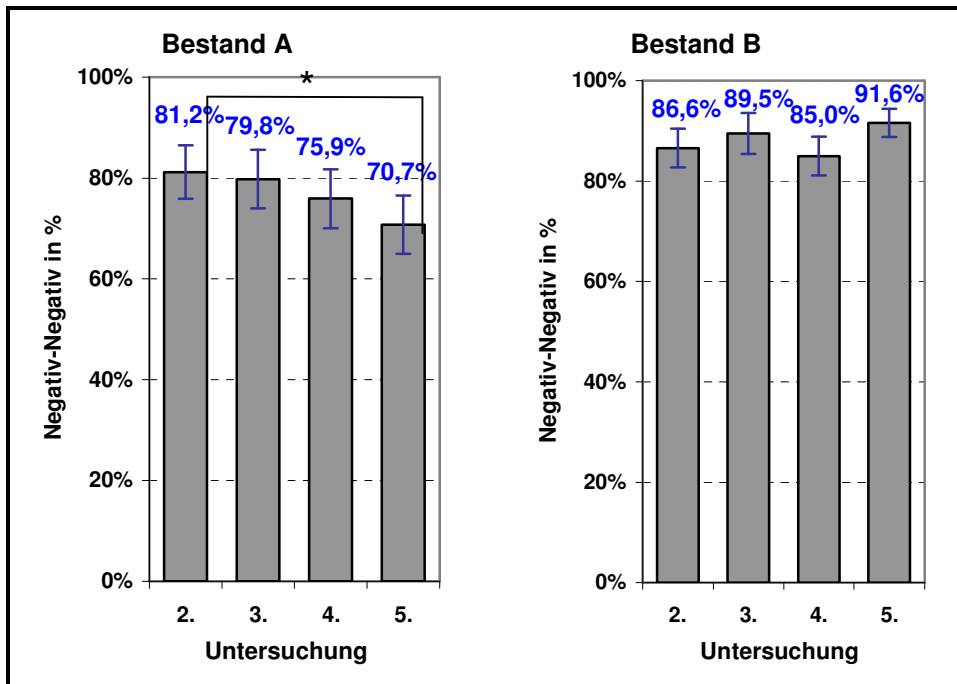


Abb. 15: Vergleich der prozentualen Anteile doppelt negativer Kotbefunde Gruppe in Beständen A und B nach Untersuchungszeitpunkt

Legende: Negativ-negativ - doppelt negativer Kotbefund; 2 unbewachsene HEYM-Röhrchen

* - Signifikantes Ergebnis bei der Testung mit dem Fisher's exakt Test, $p \leq 0,05$

4.1.4 Analyse des zeitlichen Auftretens von Map-Koloniewachstum bei der Untersuchung von Kotproben aus zwei Thüringer Milchviehherden

Das erste Map-Koloniewachstum war bei Kotproben der Bestände A und B in der Mehrzahl im Zeitraum zwischen 4. und 8. Kultivierungswoche sichtbar (Tab. 37). Das Ablesen der Kulturröhrchen in der 2. Kultivierungswoche erbrachte in beiden Beständen nur wenige Erstnachweise. Im Bestand A erfolgte ab der 14. Kultivierungswoche kein zusätzlicher Wachstumsnachweis. Im Bestand B wiesen 98,1 % der positiven Kotproben in den ersten 12 Kultivierungswochen ein Koloniewachstum auf.

Tab. 37: Erstnachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Koloniewachstum nach Kultivierungswochen in den Beständen A und B

A					B				
	Untersuchungsnummer					Untersuchungsnummer			
Woche	2 (n=42)	3 (n=42)	4 (n=61)	5 (n=76)	Woche	2 (n=42)	3 (n=34)	4 (n=51)	5 (n=33)
	Erste Erfassung von Map-Wachstum in % von n					Erste Erfassung von Map-Wachstum in % von n			
2	2,4	-	-	-	2	-	5,8	-	-
4	16,6	2,4	54,1	32,9	4	47,6	32,4	11,9	-
6	42,9	61,9	34,4	42,1	6	28,6	35,3	56,8	45,4
8	23,8	21,4	6,6	17,1	8	14,3	11,8	7,8	30,3
10	11,9	14,3	3,3	6,6	10	7,1	8,8	19,6	12,1
12	2,4	-	1,6	1,3	12	-	5,9	3,9	6,1
14	-	-	-	-	14	2,4	-	-	-
16	-	-	-	-	16	-	-	-	6,1

4.1.5 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit zwei Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren in 3 Thüringer Milchviehbeständen

Im Rahmen des Projektes wurden 5.898 Blutproben und 4.410 Milchproben aus den **Beständen A, B und C** mit zwei Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren untersucht. Die prozentualen Anteile **negativer**, **fraglicher** und **positiver** Befunde der Blut- und Milchproben wurden für die einzelnen Bestände und 5 Bestandsuntersuchungen zusammengefasst (Tab. 38a und 38b).

Tab. 38a: Zusammenfassung der Untersuchungsbefunde des **Svanovir-ELISA** für Blut- und Milchproben aus 3 Thüringer Milchviehherden

	Bestand A		Bestand B		Bestand C	
	n(Blut) =1534	n(Milch) =1211	n(Blut) =1948	n(Milch) =1538	n(Blut) =2416	n(Milch) =1661
	Svanovir-ELISA-Befund (in % von n)					
negativ	70,3	74,6	79,4	82,7	79,0	85,3
fraglich	14,1	15,3	10,7	10,8	11,4	8,7
positiv	15,6	10,1	9,9	6,5	9,6	6,0

Tab. 38b: Zusammenfassung der Untersuchungsbefunde des **Pourquier-ELISA** für Blut- und Milchproben aus 3 Thüringer Milchviehherden

	Bestand A		Bestand B		Bestand C	
	n(Blut) =1534	n(Milch) =1211	n(Blut) =1948	n(Milch) =1538	n(Blut) =2416	n(Milch) =1660
	Pourquier-ELISA-Befund (in % von n)					
negativ	93,7	88,3	97,1	97,0	99,3	99,1
fraglich	1,0	2,4	0,3	0,5	0,3	0,3
positiv	5,3	9,3	2,6	2,5	0,4	0,6

Die Anzahl Map ausscheidender Tiere wurde für die Bestände A und B und die Untersuchungen 2 bis 4 getrennt erfasst. Es wurde der prozentuale Anteil der kotpositiven Tiere mit zeitgleich ermitteltem seropositivem Befund berechnet (Tab. 39a und Tab. 39b).

Tab. 39a: Positive Blut-ELISA-Untersuchungsbefunde bei aktuell kotpositiven Tieren aus 4 Bestandsuntersuchungen

Unter- suchung	Bestand	Anzahl aktuell ausscheidender Tiere (n)	Svanovir Blut	Pourquier Blut
			Prozentualer Anteil der Tiere von n mit positivem Befund	Prozentualer Anteil der Tiere von n mit positivem Befund
2	A	42	30,9 %	26,2 %
	B	42	19,0 %	11,9 %
3	A	42	23,8 %	21,4 %
	B	34	26,5 %	17,6 %
4	A	61	29,5 %	26,2 %
	B	51	21,6 %	19,6 %
5	A	76	27,6 %	17,1 %
	B	33	30,3 %	15,2 %

Tab. 39b: Positive Milch-ELISA-Untersuchungsbefunde bei aktuell kotpositiven Tieren aus 4 Bestandsuntersuchungen

Unter- suchung	Bestand	Anzahl aktuell ausscheidender Tiere (n)	Svanovir Milch	Pourquier Milch
			Prozentualer Anteil der Tiere von n mit positivem Befund	Prozentualer Anteil der Tiere von n mit positivem Befund
2	A	34	17,6 %	38,2 %
	B	-	-	-
3	A	41	14,6 %	29,3 %
	B	34	11,8 %	23,5 %
4	A	57	21,1 %	26,3 %
	B	51	23,5 %	17,6 %
5	A	69	13,0 %	27,5 %
	B	32	18,8 %	12,5 %

Ergebnisse der Sensitivitäts-, Spezifitätsberechnungen und der Ermittlung von Befund-Übereinstimmungen

4.2 Ermittlung der diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten zweier ELISA-Testverfahren anhand der Untersuchungsergebnisse aus drei Thüringer Milchviehbetrieben

4.2.1 Berechnung der Sensitivitäten des Svanovir- und des Pourquier-ELISA für Blut- und Milchserum

Die Testsensitivitäten für zwei Paratuberkulose-Blut-/Milch-ELISA-Testverfahren wurden anhand der Befunde für 924 Blutproben und 744 Milchproben, die von **319 kotpositiven Einzeltieren** stammten berechnet (Tab. 40). Die Sensitivität des Svanovir-Blut-ELISA erwies sich als signifikant höher gegenüber den Sensitivitäten der übrigen Testverfahren (Tab. 41). Für den Pourquier-Milch-ELISA wurde eine signifikant größere Sensitivität gegenüber dem Pourquier-Blut-ELISA berechnet. Die Sensitivitäten des Svanovir- und des Pourquier-ELISA unterschieden sich bei der Untersuchung von Milch nicht signifikant.

Tab. 40: Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren

ELISA	Probenart	n	m	Sensitivität in %	95% CI der Sensitivität in %
Svanovir	Blut	924	177	19,2 *	16,6 - 21,7
	Milch	744	97	13,0	10,6 - 15,5
Pourquier	Blut	924	99	10,7	8,7 - 12,7
	Milch	744	108	14,5	12,0 - 17,0

Legende:

n - Anzahl untersuchter Proben infizierter (kotpositiver) Tiere

m - Anzahl positiver Proben von n

Sensitivität - Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses bei infizierten Tieren $[(m \times 100 / n)]$

95% CI - 95% Konfidenzintervall

***** - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Tab. 41: Vergleich der Sensitivitäten für 4 ELISA-Testverfahren:
p-Werte des zweiseitigen Fisher's exakt Test

Sensitivität	Svanovir-Milch	Pourquier-Blut	Pourquier-Milch
Svanovir-Blut	0,001 *	4,352e-7 *	0,013 *
Svanovir-Milch	-	0,147	0,452
Pourquier-Blut	-	-	0,021 *

Legende:

***** - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Abhängigkeit der berechneten Sensitivitäten von der Herkunft der Proben

Bei der getrennten Berechnung der Testsensitivitäten für die Bestände A und B ergaben sich stets höhere Sensitivitäten für den Bestand A (Tab. 42), jedoch war lediglich die Sensitivität des Pourquier-Milch-ELISA signifikant höher im Bestand A gegenüber der Sensitivität im Bestand B (Fisher`s exakt Test: $p=0,003$).

Tab. 42: Nach Beständen getrennt berechnete Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren

ELISA	Probenart	Bestand	n	m	Sensitivität in %	95% CI der Sensitivität in %
Svanovir	Blut	A	528	113	21,4	17,9 - 24,9
		B	396	64	16,2	12,5 - 19,8
	Milch	A	446	64	14,3	11,1 - 17,6
		B	298	35	11,7	8,1 - 15,4
Pourquier	Blut	A	528	66	12,5	9,7 - 15,3
		B	396	38	8,3	6,7 - 12,5
	Milch	A	446	82	18,4 *	14,8 - 22,0
		B	298	26	8,7	5,5 - 11,9

Legende:

n - Anzahl untersuchter Proben infizierter (kotpositiver) Tiere

m - Anzahl positiver Proben von n

Sensitivität - Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses bei infizierten Tieren $[(m \times 100)/n]$

95% CI - 95% Konfidenzintervall

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher`s exakt Test

Abhängigkeit der ELISA-Sensitivitäten von der Intensität der Erregerausscheidung

Bei der Prüfung des Zusammenhangs zwischen der aktuellen Stärke der Map-Ausscheidung und den Befunden der serologischen Untersuchungen (Abb. 16) zeigte sich, dass die Sensitivität aller ELISA-Verfahren bei aktuell starker Erregerausscheidung, mit doppelt positivem Kotbefund, signifikant höher war gegenüber der Testsensitivität bei den Gruppen mit nur einem positiven oder zwei negativen Kulturröhrchen. Für den Pourquier-Milch-ELISA wurde zusätzlich eine signifikant höhere Sensitivität berechnet, wenn bei infizierten Tieren zeitgleich ein einfach positiver anstatt eines doppelt negativen Kotbefundes ermittelt wurde.

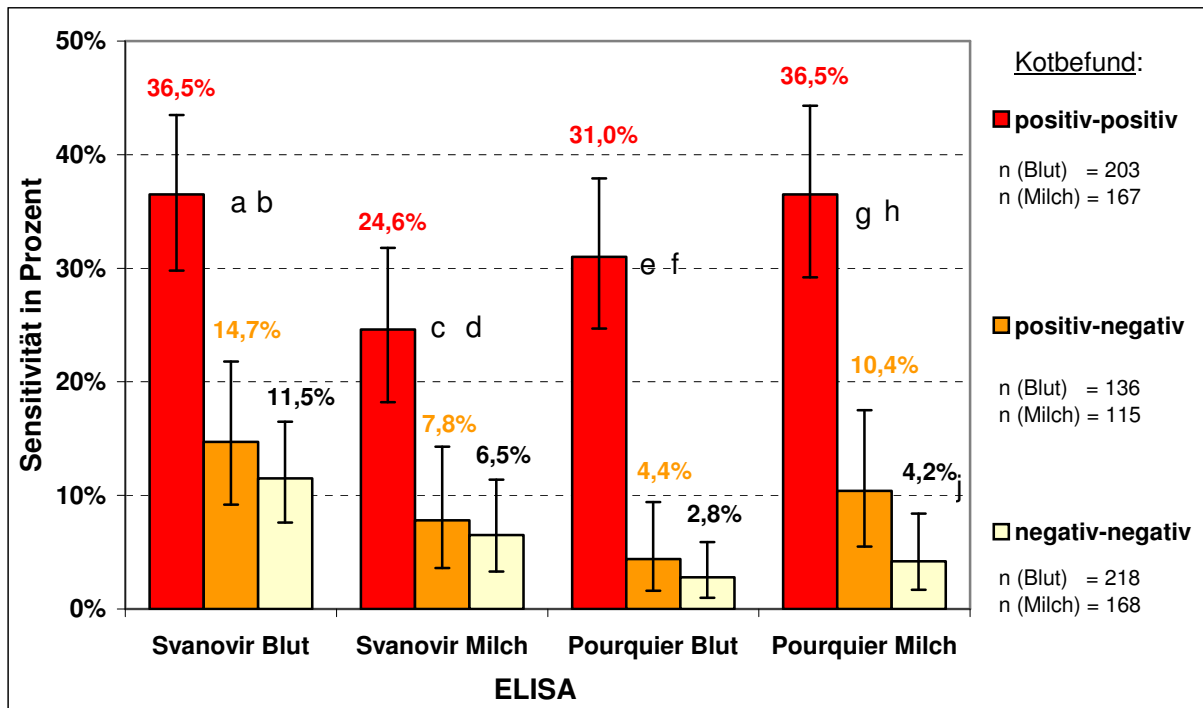


Abb. 16: Sensitivitäten 4 verschiedener ELISA-Verfahren in Abhängigkeit von der Intensität der Map-Ausscheidung zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt

Legende: Darstellung der mit dem Fisher's exakt Test ermittelten p-Werte mit den Symbolen a bis j

- a **Svanovir Blut:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für + - : $p = 0,00001^*$
- b **Svanovir Blut:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für - - : $p = 1,233e-9^*$
- c **Svanovir Milch:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für + - : $p = 0,0002^*$
- d **Svanovir Milch:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für - - : $p = 4,220e-5^*$
- e **Pourquier Blut:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für + - : $p = 1,902e-10^*$
- f **Pourquier Blut:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für - - : $p = 2,982e-16^*$
- g **Pourquier Milch:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für + - : $p = 4,543e-7^*$
- h **Pourquier Milch:** Sensitivität für ++ **vs.** Sensitivität für - - : $p = 1,502e-14^*$
- j **Pourquier Milch:** Sensitivität für + - **vs.** Sensitivität für - - : $p = 0,05^*$

* - signifikantes Testergebnis **vs.** - *versus*

Abhängigkeit der ELISA-Sensitivitäten von der Probenherkunft und der Intensität der Erregerausscheidung

Für die Bestände A und B wurden die Sensitivitäten der einzelnen ELISA-Verfahren nach aktueller Ausscheidungsstärke für 3 Kotbefundgruppen getrennt berechnet (Tabellen 43 bis 46), dabei unterschieden sich die Sensitivitäten des Svanovir-Blut/Milch-ELISA und des Pourquier-Blut-ELISA für die Bestände A und B nicht signifikant (Fisher's exakt Test). Für den Pourquier-Milch-ELISA ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Sensitivitäten in den Beständen A und B für die Gruppe der mittelstarken Ausscheider mit aktuell einfach positivem Kotbefund (Fisher's exakt Test: $p = 0,013$).

Tab. 43: Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand – Svanovir-Blut

ELISA	Kotbefund	Bestand	n	m	Sensitivität in %	95% CI der Sensitivität in %
Svanovir Blut	++	A	122	49	40,2	31,4 - 49,4
		B	81	25	30,9	21,1 - 42,1
	+-	A	73	11	15,1	7,8 - 25,4
		B	63	9	14,3	6,7 - 25,4
	--	A	122	14	11,5	6,4 - 18,5
		B	96	11	11,5	5,9 - 19,6

Tab. 44: Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand – Svanovir-Milch

ELISA	Kotbefund	Bestand	n	m	Sensitivität in %	95% CI der Sensitivität in %
Svanovir Milch	++	A	113	24	21,2	14,1 - 29,9
		B	54	17	31,5	19,5 - 45,6
	+-	A	66	5	7,6	2,5 - 16,8
		B	49	4	8,2	2,3 - 19,6
	--	A	109	8	7,3	3,2 - 14,0
		B	59	3	5,1	1,1 - 14,1

Legende zu Tab. 41 - 44

++ - doppelt positiv

+- - einfach positiv

-- - doppelt negativ

n - Anzahl untersuchter Proben infizierter Tiere

m - Anzahl positiver Proben von n

Sensitivität - Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses bei infizierten Tieren $[(m \times 100)/n]$

95% CI - 95% Konfidenzintervall

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Tab. 45: Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand –
Pourquier-Blut

ELISA	Kotbefund	Bestand	n	m	Sensitivität in %	95% CI der Sensitivität in %
Pourquier Blut	++	A	122	40	32,8	24,6 - 41,9
		B	81	23	28,4	18,9 - 39,5
	+-	A	73	5	6,8	2,3 - 15,3
		B	63	1	1,6	0 - 8,5
	--	A	122	1	0,8	0 - 4,5
		B	96	5	5,2	1,7 - 11,7

Tab. 46: Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand –
Pourquier-Milch

ELISA	Kotbefund	Bestand	n	m	Sensitivität in %	95% CI der Sensitivität in %
Pourquier Milch	++	A	113	44	38,9	29,9 - 48,6
		B	54	17	31,5	19,5 - 45,6
	+-	A	66	11	16,7 *	8,6 - 27,9
		B	49	1	2,0	0,1 - 10,9
	--	A	109	5	4,6	1,5 - 10,4
		B	59	2	3,4	0,4 - 11,7

Vergleich der ELISA-Testsensitivitäten bei starken Map-Ausscheidern

Beim Vergleich der Sensitivitäten der 4 untersuchten ELISA-Tests bei starken Ausscheidern waren im Bestand B keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Abb. 17). Im Bestand A wies der Svanovir-Blut-ELISA bei starken Ausscheidern die höchste Sensitivität auf, die sich signifikant von der Testsensitivität für Milchserum bei starken Ausscheidern unterschied (Tab. 47). Die Sensitivität des Pourquier-Milch-ELISA war im Bestand A signifikant höher als die Sensitivität des Svanovir-Milch-ELISA.

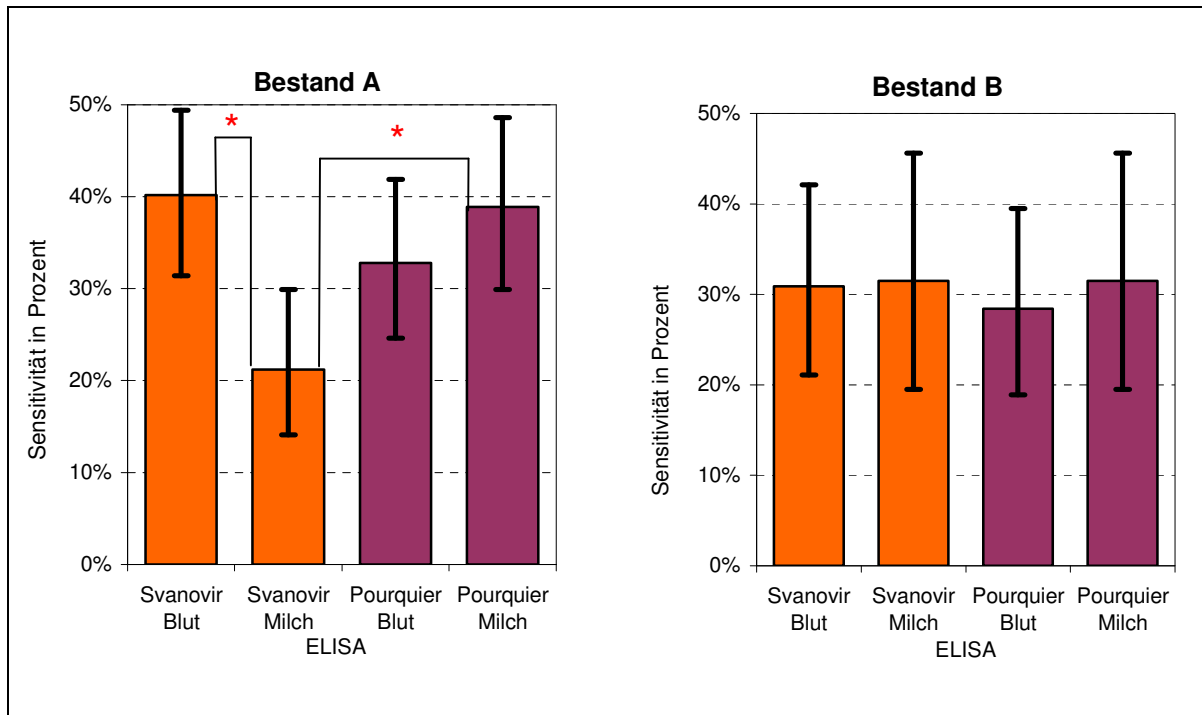


Abb. 17: Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren bei starken Ausscheidern im **Bestand A** [n(Blut)= 122; n(Milch)=113] und im **Bestand B** [n(Blut)= 81; n(Milch)=54]

Legende:

für Abb. 17 und Tab.47 * - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Tab. 47: Untersuchung der Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren bei starken Ausscheidern in den Beständen A und B mit dem Fisher's exakt Test

Sensitivität ELISA 1	Sensitivität ELISA 2	p-Werte des Fisher's exakt Test beim Vergleich der Sensitivitäten für ELISA 1 und ELISA 2	
		Bestand A	Bestand B
Svanovir Blut	Svanovir Milch	0,002 *	1,000
Svanovir Blut	Pourquier Blut	0,278	0,863
Svanovir Blut	Pourquier Milch	0,894	1,000
Pourquier Blut	Pourquier Milch	0,343	0,705
Svanovir Milch	Pourquier Milch	0,05 *	1,000
Svanovir Milch	Pourquier Blut	0,06	0,705

4.2.2 Berechnung der Spezifitäten des Svanovir- und des Pourquier-ELISA für Blut- und Milchserum im Bestand C

In die Berechnungen der ELISA-Spezifitäten wurden ausschließlich Proben aus dem Paratuberkulose unverdächtigen Bestand C einbezogen, dabei wurden jeweils 2 Tiergruppen unterschieden (Tab. 48). Für den Pourquier-ELISA wurden ausreichend gute Spezifitäten ermittelt (98,6–100 %), diese unterschieden sich signifikant von den unzureichenden Spezifitäten (78,9–87,1 %) des Svanovir-ELISA (Tab. 49). Die Spezifitäten der Blut- und Milch-ELISA-Tests waren bei beiden Nachweisverfahren nicht signifikant verschieden.

Tab. 48: Spezifitäten der ELISA-Testverfahren

ELISA	Probenart	Tiergruppe	n	m	Spezifität in %	95% CI der Spezifität in %
Svanovir	Blut	a	2.416	1.907	78,9	77,3 - 80,5
		b	80	68	85,0	75,3 - 92,0
Svanovir	Milch	a	1.661	1.417	85,3	83,5 - 87,0
		b	70	61	87,1	77,0 - 93,9
Pourquier	Blut	a	2.416	2.339	99,3	98,9 - 99,6
		b	80	80	100	95,5 - 100
Pourquier	Milch	a	1.660	1.645	99,1	98,5 - 99,5
		b	70	69	98,6	92,3 - 100

Legende:

a - Gesamtbestand C

b - Tiere des Bestandes C mit 3 negativen Kotbefunden

n - Anzahl untersuchter Proben nicht-infizierter Tiere

m - Anzahl negativer Proben von n

Spezifität - Wahrscheinlichkeit eines negativen Testergebnisses bei nicht-infizierten Tieren $[(m \times 100)/n]$

95% CI - 95% Konfidenzintervall

Tab. 49: Untersuchung der Spezifitäten der ELISA-Testverfahren zweier Tiergruppen des Bestandes C mit dem Fisher's exakt Test

Spezifität ELISA 1	Spezifität ELISA 2	p-Werte des Fisher's exakt Test beim Vergleich der Spezifitäten für ELISA 1 und ELISA 2	
		Gruppe a	Gruppe b
Svanovir-Blut	Pourquier-Blut	1,319e-88 *	0,0003 *
Svanovir-Milch	Pourquier-Milch	3,621e-58 *	0,017 *

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

4.3 Untersuchung der Übereinstimmungen der Befunde zweier Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren zu einem identischen Probennahmezeitpunkt

4.3.1 Vergleich der blutserologischen Befunde

Bei der Gegenüberstellung der Untersuchungsbefunde für 496 Blutproben infizierter (kotpositiver) Tiere wurden in 373 Fällen (75,2 %) für eine Probe identische Befunde mit dem Svanovir- und dem Pourquier-Blut-ELISA ermittelt (Tab. 50). Der berechnete Kappawert nach Cohen von 0,087 entsprach einer schlechten Übereinstimmung der Befunde für die verglichenen Testverfahren. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass 73,6 % der Blutproben infizierter Tiere von zwei verschiedenen ELISA-Testverfahren zeitgleich als negativ eingestuft wurden. Nur 15,1 % der Blutproben wurden von mindestens einem Testverfahren positiv bewertet.

Tab. 50: Vergleich der Ergebnisse des **Svanovir-Blut-** und des **Pourquier-Blut-ELISA** für **kotpositive Tiere** bei der Untersuchung der gleichen Blutprobe

		Befund Pourquier Blut			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Svanovir Blut	negativ	365 (73,6 %)	2	6	373
	fraglich	54	0 (0 %)	2	56
	positiv	58	1	8 (1,6 %)	67
	Σ	477	3	16	496 (100 %)

Bei kotnegativen Tieren aus dem Bestand C wiesen 77,1 % der untersuchten Blutproben einen identischen Befund für Svanovir- und Pourquier-ELISA auf (Tab. 51). Der Kappawert nach Cohen von 0,096 zeigte eine sehr schlechte Übereinstimmung der Befunde an.

Tab. 51: Vergleich der Ergebnisse des **Svanovir-Blut-** und des **Pourquier-Blut-ELISA** für **kotnegative Tiere** bei der Untersuchung der gleichen Blutprobe

		Befund Pourquier Blut			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Svanovir Blut	negativ	506 (75,6 %)	2	2	510
	fraglich	72	1 (0,15 %)	2	75
	positiv	75	0	9 (1,00 %)	84
	Σ	653	3	13	669 (100 %)

4.3.2 Vergleich der milchserologischen Befunde

Beim Vergleich der milchserologischen Untersuchungsbefunde für 2 ELISA-Verfahren bei kotpositiven Tieren wurde eine Übereinstimmungshäufigkeit von 82,6 % und ein Kappawert nach Cohen von 0,212 errechnet (Tab. 52). Das entsprach einer schlechten Übereinstimmung der Untersuchungsbefunde des Svanovir- und des Pourquier-Milch-ELISA. Von beiden Testverfahren wurden zeitgleich 80,1 % der untersuchten Milchproben infizierter Tiere als negativ beurteilt. Ein positives Ergebnis bei mindestens einem Test wurde lediglich bei 11,1 % der Milchproben erkrankter Tiere angezeigt.

Tab. 52: Vergleich der Ergebnisse des **Svanovir-Milch-** und des **Pourquier-Milch-ELISA** für **kotpositive Tiere** bei der Untersuchung der gleichen Milchprobe

		Befund Pourquier Milch			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Svanovir Milch	negativ	267 (89,2 %)	0	4	271
	fraglich	29	0 (0 %)	3	32
	positiv	21	1	8 (2,4 %)	30
	Σ	317	1	15	333 (100 %)

In 562 Fällen wurden Milchproben kotnegativer Tiere untersucht (Tab. 53), dabei stimmten zu 80,1 % die Befunde beider Testverfahren bei unverdächtigen Tieren überein. Der ermittelte Kappawert nach Cohen von 0,123 sprach für eine sehr schlechte Übereinstimmung der Untersuchungsbefunde.

Tab. 53: Vergleich der Ergebnisse des **Svanovir-Milch-** und des **Pourquier-Milch-ELISA** für **kotnegative Tiere** bei der Untersuchung der gleichen Milchprobe

		Befund Pourquier Milch			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Svanovir Milch	negativ	443 (78,8 %)	3	7	453
	fraglich	54	3 (0,6 %)	8	65
	positiv	39	1	4 (0,7 %)	44
	Σ	536	7	19	562 (100 %)

4.3.3 Vergleich von blut- und milchserologischen Befunden

In 333 Fällen wurden zeitgleich Blut- und Milchproben **kotpositiver Tiere** mit dem Svanovir-ELISA untersucht (Tab. 54), zusammengehörige Blut- und Milchproben wiesen dabei nur zu 76,0 % einen übereinstimmenden Befund auf. In 218 Fällen (65,5 %) wurde für den Svanovir-Blut- und den Svanovir-Milch-ELISA jeweils ein negativer Untersuchungsbefund erhoben. Der berechnete Kappawert nach Cohen von 0,419 zeigte eine mäßige Übereinstimmung der Untersuchungsbefunde an.

Tab. 54: Vergleich der Ergebnisse des **Svanovir-Blut-** und des **Svanovir-Milch-ELISA** bei **kotpositiven Tieren** und einem identischen Probennahmezeitpunkt

		Befund Svanovir Blut			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Svanovir Milch	negativ	218 (65,5 %)	32	21	271
	fraglich	7	11 (3,3 %)	14	32
	positiv	3	3	24 (7,2 %)	30
	Σ	228	46	59	333 (100 %)

Bei der Untersuchung von 553 paarigen Blut- und Milchproben **kotnegativer Tiere** mit dem Svanovir-ELISA wurde für 78,7 % der zusammengehörigen Proben ein identischer Befund ermittelt (Tab. 55). Der berechnete Kappawert nach Cohen von 0,448 entsprach einer mäßigen Übereinstimmung der Befunde des Svanovir-ELISA für Blut und Milch bei kotnegativen, Paratuberkulose unverdächtigen Tieren.

Tab. 55: Vergleich der Ergebnisse des **Svanovir-Blut-** und des **Svanovir-Milch-ELISA** bei **kotnegativen Tieren** und einem identischen Probennahmezeitpunkt

		Befund Svanovir Blut			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Svanovir Milch	negativ	382 (69,1 %)	40	23	445
	fraglich	17	22 (4,0 %)	26	65
	positiv	5	7	31 (5,6 %)	43
	Σ	404	69	80	553 (100 %)

Die Übereinstimmungshäufigkeit der Pourquier-ELISA-Befunde für 333 paarige Blut- und Milchproben **kotpositiver Tiere** betrug 96,7 % (Tab. 56). Der ermittelte Kappawert nach Cohen von 0,640 zeigte eine gute Übereinstimmung der Testergebnisse an.

Tab. 56: Vergleich der Ergebnisse des **Pourquier-Blut-** und des **Pourquier-Milch-ELISA** bei **kotpositiven Tieren** und einem identischen Probennahmezeitpunkt

		Befund Pourquier Blut			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Pourquier Milch	negativ	312 (93,7 %)	2	3	317
	fraglich	1	0 (0 %)	0	1
	positiv	4	1	10 (3,0 %)	15
	Σ	228	46	59	333 (100 %)

Bei der Untersuchung paariger Proben **kotnegativer Tiere** mit dem Pourquier-ELISA stimmten 96,2 % der Befunde für Blut und Milch überein (Tab. 57). Der ermittelte Kappawert nach Cohen betrug 0,626 und entsprach einer guten Übereinstimmung der Untersuchungsbefunde.

Tab. 57: Vergleich der Ergebnisse des **Pourquier-Blut-** und des **Pourquier-Milch-ELISA** bei **kotnegativen Tieren** und einem identischen Probennahmezeitpunkt

		Befund Pourquier Blut			
		negativ	fraglich	positiv	Σ
Befund Pourquier Milch	negativ	522 (94,4 %)	2	3	527
	fraglich	7	0 (0 %)	0	7
	positiv	9	0	10 (1,8 %)	19
	Σ	538	2	13	553 (100 %)

Ergebnisse der Untersuchungen von Einflussfaktoren

4.4 Einflussfaktoren auf die Kotkultivierung

4.4.1 Methodenspezifische Einflussfaktoren

4.4.1.1 Einfluss der Dekontaminationsmethode auf das Ergebnis der Kotkultivierung

Die Untersuchungsbefunde der 32 Kotproben des Dekontaminationsversuches wurden zusammengefasst (Tab. 104 im Anhang 9.3). In 18 der 20 natürlich infizierten Kotproben wurde erneut ein Map nachgewiesen. Zwei der zuvor positiv getesteten Proben zeigten bei allen Methoden kein Koloniewachstum (Nr. 9 und Nr. 17). Die gespiketen Kotproben Nr. 21 und 22 wiesen bei allen Methoden ein Map-Wachstum. In den negativen Kotproben (Nr. 23 – 32: Bestand C) wurde Map wiederum nicht nachgewiesen.

Die Anzahl bewachsener Kulturröhrchen wurde für jede Methode und 4 verschiedene Zeitpunkte dargestellt (Abb. 18). In der 4. Kultivierungswoche war die Anzahl positiver Kulturröhrchen bei der Anwendung der Methoden a, b, c, e und f gegenüber der Methode d signifikant höher. Ab der 6. Kultivierungswoche unterschied sich die Anzahl bewachsener Kulturröhrchen zwischen den Methoden nicht mehr signifikant. Eine Dekontamination der Kotproben mit HPC (0,75 %) über 96 h (Methode d) verursachte in der 4. Kultivierungswoche eine Verzögerung des Map-Wachstums.

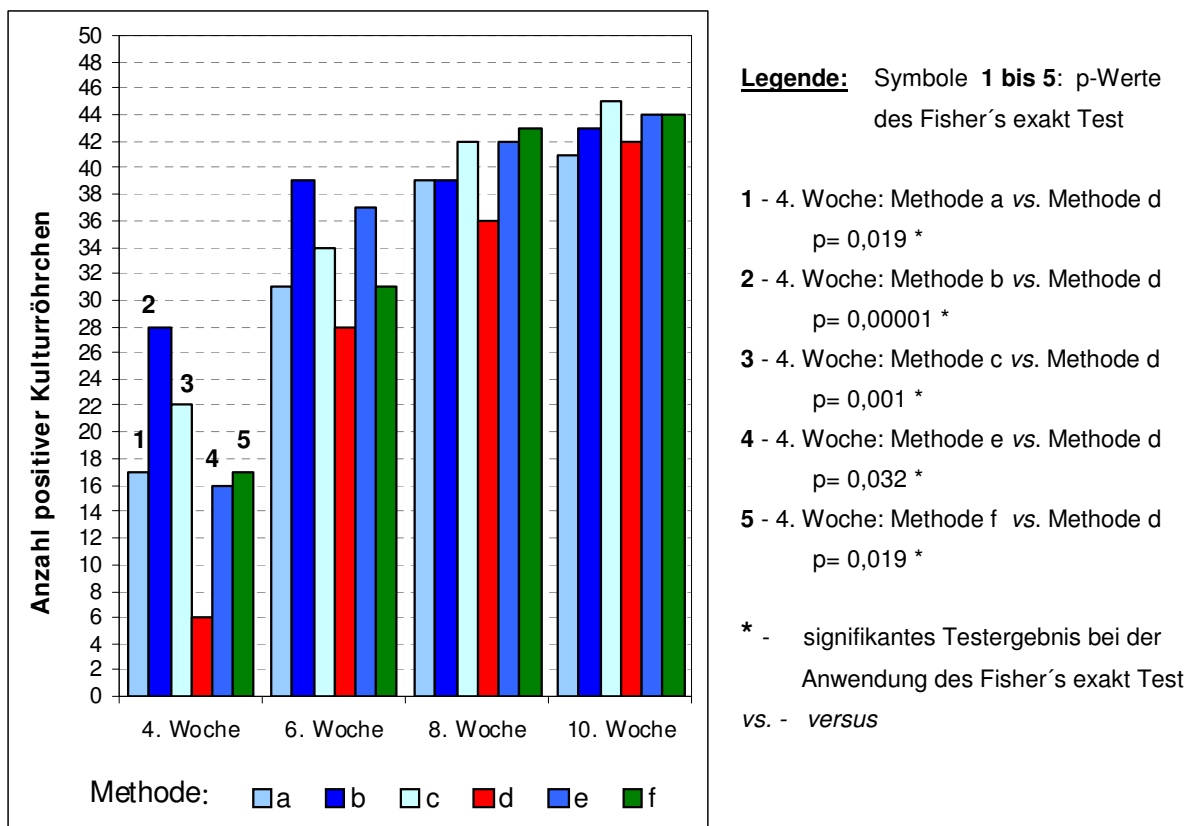


Abb. 18: Anzahl *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bewachsener Kulturröhrchen zu 4 Zeitpunkten – Vergleich 6 verschiedener Dekontaminationsmethoden

In die Bewertungen des Koloniewachstums wurden die Ergebnisse 12 natürlich infizierter und 2 gespiketer Kotproben einbezogen, die im Rahmen des Dekontaminationsversuches ein Koloniewachstum aufwiesen (Tab. 58).

Nach der Einordnung der jeweils ermittelten Koloniezahlen in die Kategorien 1, 2 und 3 und der Berechnung von Durchschnittswerten für jede Methode zeigte sich, dass die höchste geschätzte, durchschnittliche Koloniekategorie bei Proben, die nach Methode c behandelt wurden, nachweisbar war. Da es sich jedoch bei der Einordnung der Koloniezahlen in Kategorien um ein subjektives Auswerteverfahren handelte und bei der Beurteilung aller Methoden ähnliche Ergebnisse zu beobachten waren, wurden keine weiteren statistischen Auswertungen vorgenommen.

Tab. 58: Koloniekategorien für 14 Kotproben – Vergleich von 6 Dekontaminationsmethoden in der 16. Kultivierungswoche

Dekontaminationsmethode	Kotprobennummer														Ø
	1	4	5	7	8	10	12	14	15	16	19	20	21	22	
	Kategorien der Koloniezahlen														
a	3	3	1	3	2	2	3	1	2	2	2	2	3	2	2,1
b	3	3	3	3	3	1	3	1	2	2	2	2	3	2	2,3
c	3	3	3	3	3	3	3	1	2	2	2	2	3	2	2,5
d	2	2	3	3	3	1	3	1	2	2	2	2	3	2	2,2
e	2	3	3	3	2	2	3	1	2	2	2	2	2	2	2,2
f	3	3	3	2	3	3	3	2	2	1	2	2	3	2	2,4

4.4.1.2 Einfluss der Anzahl der Kulturröhrchen auf das Ergebnis der Kotkultivierung

In der 16. Kultivierungswoche des Dekontaminationsversuches waren im Mittel bei 14,6 von 20 Map enthaltenden Kotproben 2 von 3 Kulturröhrchen mit dem Erreger bewachsen (Abb. 19).

Bei durchschnittlich 3 der 20 bewerteten Kotproben war lediglich 1 von 3 eingesetzten Kulturröhrchen mit Map bewachsen. Beim Einsatz von nur 2 Kulturröhrchen pro Kotprobe wäre möglicherweise ein Nachweis von Map bei diesen Proben nicht gelungen.

Mit der Verwendung von 3 Kulturröhrchen wurde die sichere Map-Nachweisrate auf durchschnittlich 17,6 positive Proben aus 20 erregerhaltigen Proben gesteigert. Diese Steigerung der Sensitivität des Nachweisverfahrens war jedoch nicht signifikant (Fisher's exakt Test).

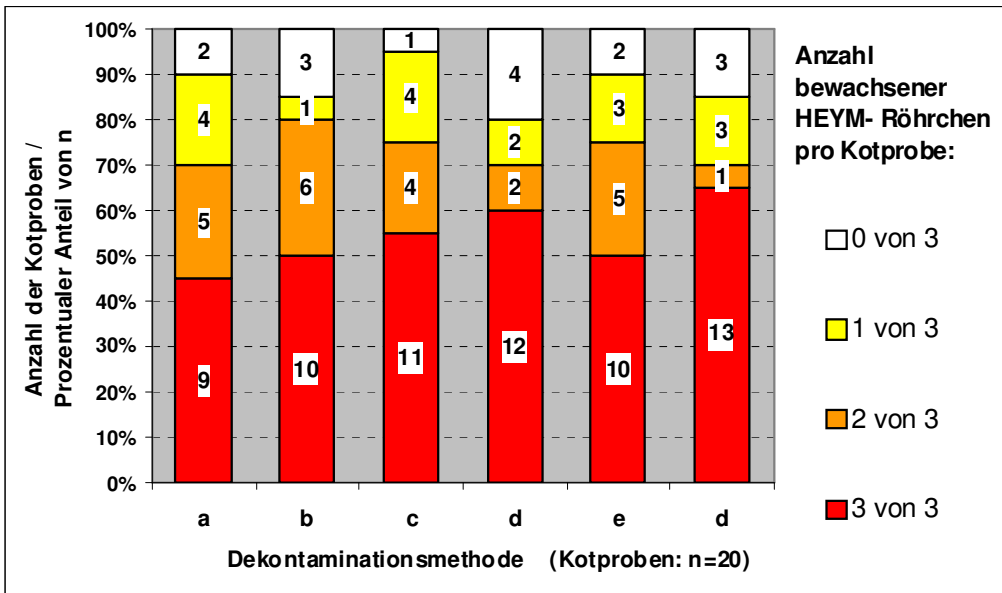


Abb. 19: Anzahl mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bewachsener HEYM-Röhrchen für 6 Dekontaminationsmethoden

4.4.1.3 Einfluss von Kontaminationen auf die Auswertung der Kotkultivierung

Für 32 Kotproben, die mit 6 verschiedenen Methoden behandelt wurden, wurde das Vorkommen von Kontaminationen sowie die jeweilige Anzahl kontaminierter Röhrchen pro Einzelprobe erfasst (Abb. 20). Die höchste Anzahl kontaminierter Kotproben (23 von 32) wurde für Methode a ermittelt. Nur 14 von 32 der nach Methode d behandelten Proben wiesen Kontaminationen auf. Die Anzahl kontaminierter Kotproben unterschied sich zwischen den Methoden a und d signifikant (Fisher's exakt Test: $p=0,042$). Die Anzahl der Proben, die eine Kontamination auf nur einem Kulturröhrchen aufwiesen, war bei der Methode d gegenüber der Methode a signifikant reduziert (Fisher's exakt Test: $p=0,022$).

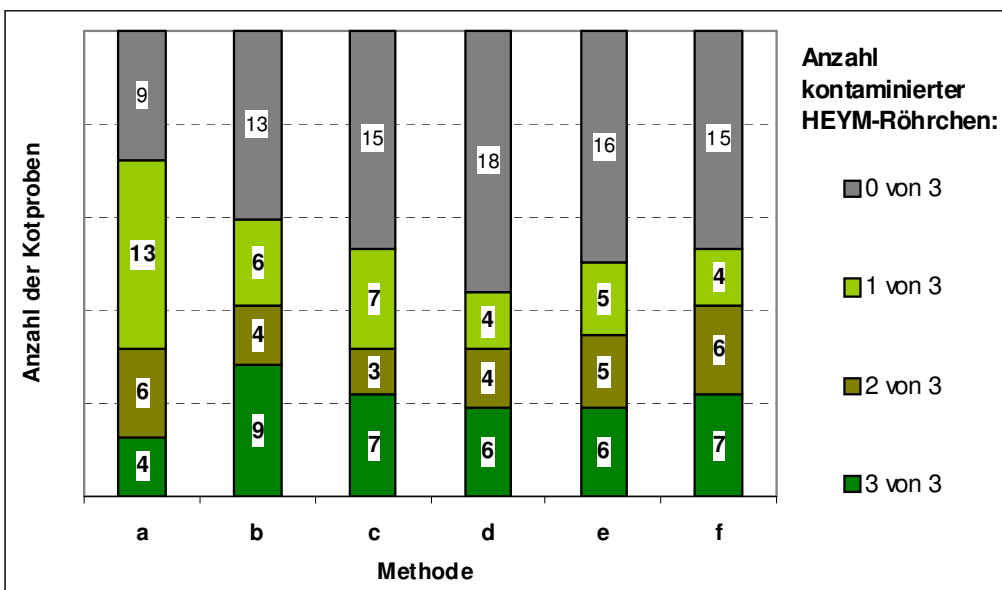


Abb. 20: Anzahl kontaminierter HEYM-Röhrchen für 32 Kotproben und 6 Dekontaminationsmethoden

Der Anteil kontaminierter Kulturröhrchen wurde für 6 Methoden und 3 Untersuchungszeitpunkte zusammengefasst (Tab. 59). Der prozentuale Anteil kontaminierter Kulturröhrchen bei Proben, die nach Methode d (31 %, 30 Röhrchen) behandelt wurden, war in der 16. Kultivierungswoche um 12 % geringer gegenüber den Proben, die nach Methode b (43 %, 41 Röhrchen) dekontaminiert wurden, dieser Unterschied war nicht signifikant (Fisher´s exakt Test: $p=0,099$).

Tab. 59: Prozentualer Anteil der Kulturröhrchen mit Pilzkontaminationen zu 3 verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

	Dekontaminationsmethode und Anzahl der Kulturröhrchen (n)					
	a (n=96)	b (n=96)	c (n=96)	d (n=96)	e (n=96)	f (n=96)
	Prozentualer Anteil kontaminierter Kulturröhrchen					
4.Woche	6 %	1 %	1 %	3 %	6 %	7 %
8.Woche	14 %	14 %	14 %	13 %	14 %	11 %
16.Woche	39 %	43 %	35 %	31 %	34 %	39 %

Für jede Methode wurde die Anzahl kontaminierter Röhrchen, die bereits bis zur 8. Kultivierungswoche kontaminiert waren mit der Anzahl der Röhrchen, die zusätzlich nach der 8. Kultivierungswoche das erste Pilzwachstum aufwiesen verglichen (Tab. 60). Bei allen Methoden verpilzten nach der 8. Kultivierungswoche mehr Röhrchen als in der ersten Kultivierungsperiode, jedoch wurde lediglich für die Methoden b und f eine signifikant höhere Kontaminationsrate in der 2. Kultivierungsperiode ermittelt.

Tab. 60: Vergleich der Anzahl kontaminierter Kulturröhrchen bis zur 8. Woche und zusätzlich kontaminierter Kulturröhrchen ab der 8. Woche mittels Fisher´s exakt Test

	Dekontaminationsmethode					
	a	b	c	d	e	f
x: Anzahl kontaminierter Kulturröhren bis zur 8. Woche	13	13	13	12	13	11
y: Anzahl zusätzlich kontaminierter Kulturröhrchen ab der 8. Woche	24	28	20	17	19	27
p-Werte des Fisher´s exakt Test beim Vergleich von x und y für jede Methode	0,066	0,013*	0,250	0,420	0,333	0,006*

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher´s exakt Test

Das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (TLLV) identifizierte bei der Subkultivierung eingesandter Pilzkulturen, die aus Proben des Bestandes C isoliert wurden, 4 verschiedene Schimmelpilzspezies: *Penicillium ssp.*, *Cephalosporium ssp.*, *Scopulariopsis ssp.* und *Monosporium apiospermum*.

4.4.2 Tierspezifische Einflussfaktoren

4.4.2.1 Alter

Bei der Zusammenfassung der Kotbefunde in 2 Paratuberkulosebeständen für 6 Altersklassen nahm der prozentuale Anteil der Ausscheider stetig bis zu einem Alter von 6 Jahren zu (Abb. 21).

Besonders in der jüngsten Altersgruppe der 1,4 bis 2 Jahre alten Tiere traten häufig Kontaminationen der Kotkulturen auf, der Anteil der kontaminierten Proben war gegenüber der nächst älteren Gruppe signifikant größer (Fisher's exakt Test: $p=1,469e-17$). Eine Auswertung der kontaminierten Kulturen war nicht möglich und in die statistischen Auswertungen wurden ausschließlich eindeutig negative und positive Kotbefunde einbezogen.

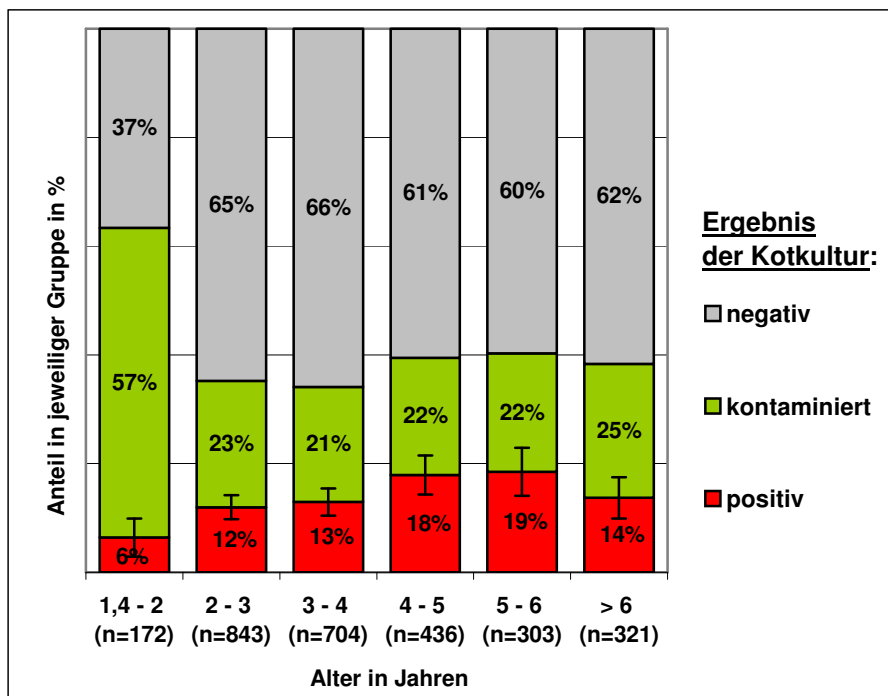


Abb. 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Kotkultivierungen für die Bestände A und B in Abhängigkeit vom Alter der Tiere ($\geq 17,3$ Monaten alt; $n=2.779$)

Legende:

- negativ** - kein Wachstum von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* oder Kontaminanten (Pilzen, Hefen, unerwünschten Bakterien)
- kontaminiert** - Wachstum von Kontaminanten
- positiv** - Wachstum von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Der Vergleich der Untersuchungsbefunde in 6 Altersgruppen im **Bestand A** ergab, dass der Anteil der Map-Nachweise in der Altersgruppe der 4–5jährigen Tiere gegenüber jüngeren Altersgruppen signifikant höher war (Abb. 22). Der Anteil doppelt positiver Kotbefunde nahm

im Bestand A mit steigendem Lebensalter zu und war in den Altersgruppen: 4 bis 5jährige und 5 bis 6jährige Tiere signifikant größer als der Anteil der Map-negativ-Befunde (Abb. 24). Starke Ausscheider wurden somit im Bestand A vor allem in den Altersgruppen der 4–5 und 5–6jährigen Tiere detektiert.

Die Kotbefunde verschiedener Altersklassen unterschieden sich im **Bestand B** nicht signifikant (Abb. 23). Bei den 2–3jährigen Tiere war der Anteil doppelt positiver Kotbefunde (starke Ausscheidung) gegenüber des Anteils einfach positiver Kotbefunde (schwache Ausscheidung) signifikant größer (Abb. 25).

4.4.2.2 Laktationsphase

In der 3. Laktationsphase zwischen dem 211. und 315. Laktationstag erfolgte im **Bestand A** signifikant häufiger die Ausscheidung von Map als in den anderen Laktationsphasen (Abb. 26). Der Anteil der doppelt positiven Kotbefunde war während der 1., 2. und 4. Laktationsphase gegenüber dem Anteil der einfach negativen Kotbefunde signifikant erhöht (Abb. 28). Für den prozentualen Anteil der doppelt positiven Kotbefunde waren für die 4 Laktationsphasen im Bestand A keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Der Anteil der einfach positiven Kotbefunde in der 1., 2. und 4. Laktationsphase unterschied sich signifikant vom Anteil dieser Gruppe in der 3. Laktationsphase. In der 3. Laktationsphase wurde der Anteil positiver Kotbefunde vor allem durch eine Zunahme der einfach positiven Kotbefunde signifikant gegenüber den anderen Laktationsphasen gesteigert.

Im **Bestand B** unterschieden sich die prozentualen Anteile positiver Kotbefunde in den einzelnen Laktationsphasen nicht (Abb. 27). Bei der Unterscheidung von doppelt und einfach positiven Befunden wurde jedoch eine starke Ausscheidung signifikant häufiger in der 3. Laktationsphase beobachtet (Abb. 29). Es bestand zudem ein signifikanter Unterschied des Anteils doppelt positiver Befunde in der 3. Laktationsphase gegenüber der 2. und 4. Laktationsphase.

4.4.2.3 Tagesmilchleistung

Tiere der 1. Milchleistungsgruppe wiesen keine eindeutig auswertbaren Kotbefunde auf und wurden bei den Untersuchungen zum Einfluss der Tagesmilchleistung auf den aktuellen Kotbefund ausgeschlossen (Abb. 30 und 31). Im **Bestand A** war der Anteil der Map-Ausscheider in der 2. Leistungsgruppe (5–15 kg) signifikant größer als in den übrigen Leistungsgruppen. Auch der Anteil der doppelt positiven Kotbefunde war gegenüber dem Anteil der einfach positiven Kotbefunde in der Milchleistungsgruppe 2 des Bestandes A signifikant größer (Abb. 32). Ebenso waren in der 4. Milchleistungsgruppe doppelt positive Befunde gegenüber Map-negativ-Befunden signifikant häufiger nachweisbar. Eine starke Ausscheidung wurde häufiger bei Leistungen zwischen 5 und 15 kg Milch (Gruppe 2) gegenüber Leistungen zwischen 15 und 25 kg (Gruppe 3) sowie 35 und 45 kg (Gruppe 5) ermittelt.

Für den **Bestand B** wurden keine signifikanten Unterschiede der Stärke der Map-Ausscheidung in den einzelnen Milchleistungsgruppen ermittelt. In der Leistungsgruppe 4 des Bestandes B mit Tagesmilchleistungen zwischen 25 und 35 kg wurde der höchste Prozentsatz an Map-Ausscheidern detektiert (Abb. 31), daneben wurde ein signifikant größerer Anteil doppelt positiver Kotbefunde in dieser Leistungsgruppe ermittelt (Abb. 33). Auch beim Vergleich mit der 5. und 6. Leistungsgruppe war der Anteil starker Ausscheider in der 4. Leistungsgruppe signifikant höher. Der prozentuale Anteil der Map-negativ-Befunde war in der 6. Leistungsgruppe mit Tagesmilchmengen zwischen 45 und 55 kg signifikant erhöht gegenüber der 5. Leistungsgruppe. Für die Gruppe 7 mit sehr hohen Tagesmilchleistungen > 55 kg wurde in 3 von 42 untersuchten Fällen eine schwache bis mittlere Map-Ausscheidung nachgewiesen.

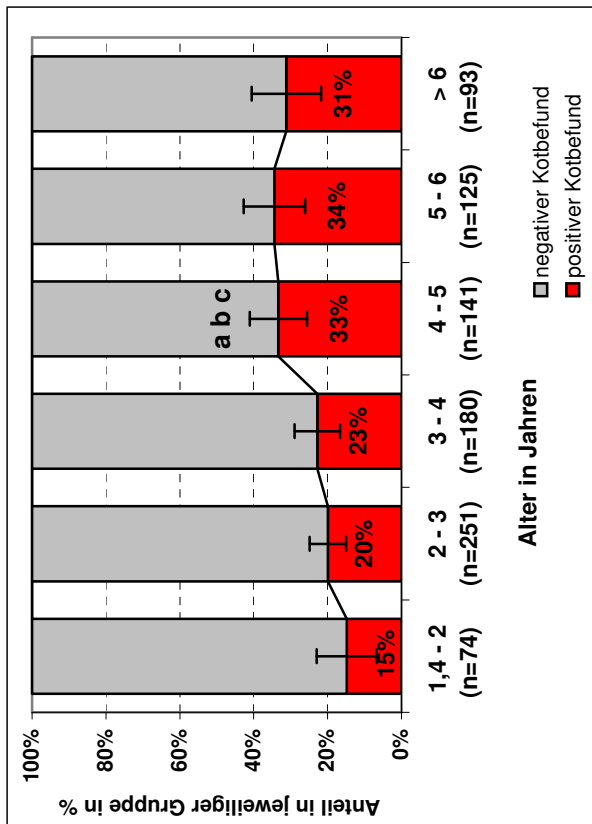


Abb. 22: Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere im **Bestand A**

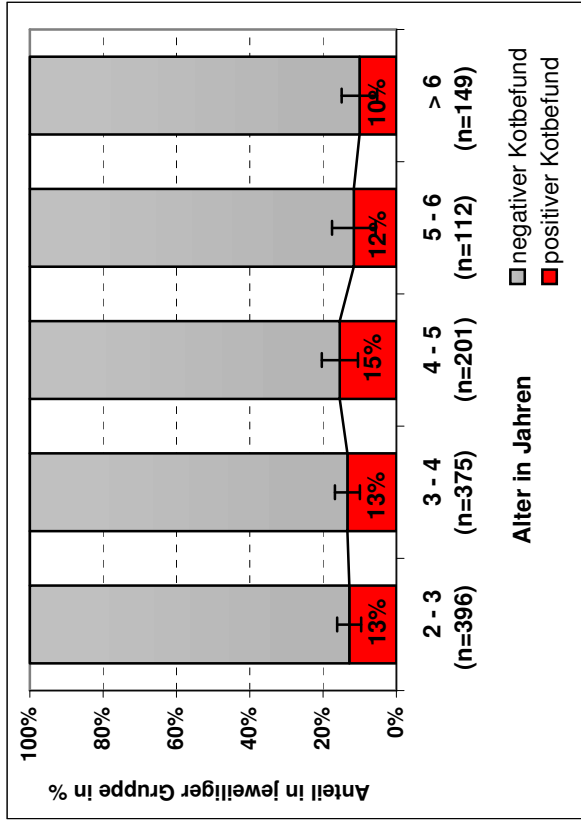


Abb. 23: Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere im **Bestand B**

Legende:

Symbole a-c: p-Werte des Fisher's exakt Test:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

a Vergleich der Gruppen 1,4 – 2 Jahre und 4 – 5 Jahre p=0,002 *

b Vergleich der Gruppen 2 – 3 Jahre und 4 – 5 Jahre p=0,003 *

c Vergleich der Gruppen 3 – 4 Jahre und 4 – 5 Jahre p=0,024 *

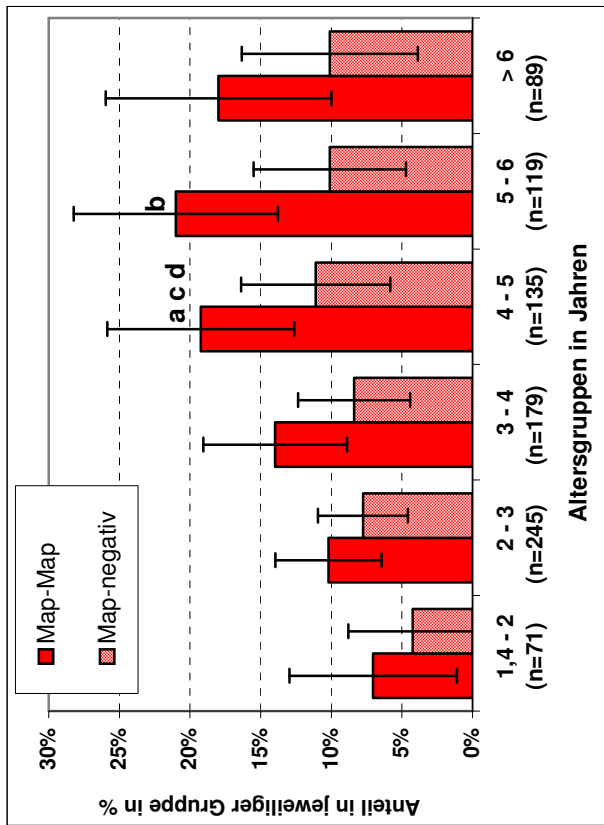


Abb. 24: Einfach und doppelt positive Kotbefunde nach Altersgruppen im Bestand A

Legende:

Symbole a-d: p- Werte des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test ; vs.- versus

a Vergleich der Map-Map und der Map-negativ Gruppe in der

Altersgruppe der 4-5jährigen p=0,044 *

b Vergleich der Map-Map und der Map-negativ Gruppe in der

Altersgruppe der 5-6jährigen p=0,015 *

c Vergleich der Map-Map-Gruppen der 1,4-2-jährigen und der

4-5-jährigen Tiere p=0,014 *

d Vergleich der Map-Map-Gruppen der 2-3-jährigen und der 4-5-jährigen Tiere p=0,011 *

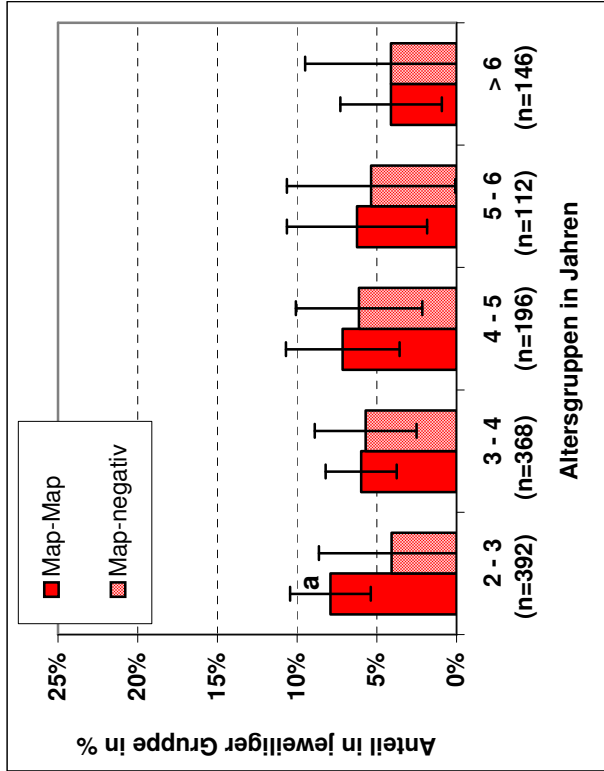


Abb. 25: Einfach und doppelt positive Kotbefunde nach Altersgruppen im Bestand B

Legende:

Symbol a: p-Wert des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

a Vergleich der Map-Map und der Map-negativ Gruppe in der

Altersgruppe der 2-3-jährigen p=0,017 *

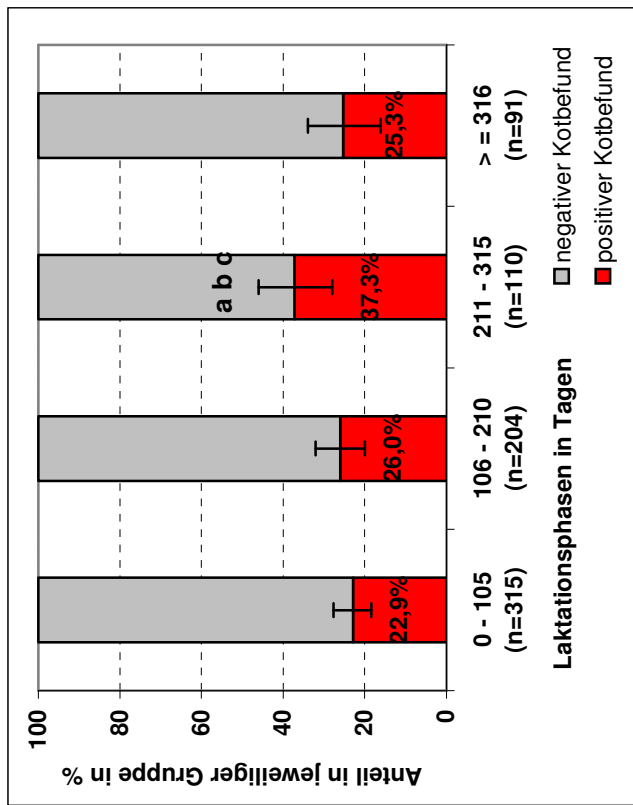


Abb. 26: Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit von der Laktationsphase im **Bestand A**

Legende:

Symbole a-c: p-Werte des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs.- versus

- a** Vergleich von 1. und 3.Phase p=0,003 *
- b** Vergleich von 2. und 3.Phase p=0,026 *
- c** Vergleich von 3. und 4. Phase p=0,047 *

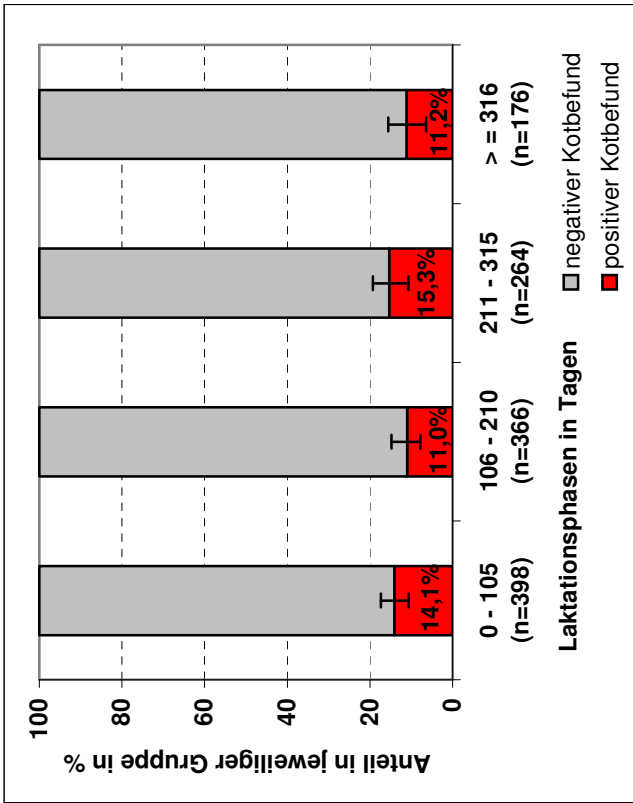


Abb. 27: Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit von der Laktationsphase im **Bestand B**

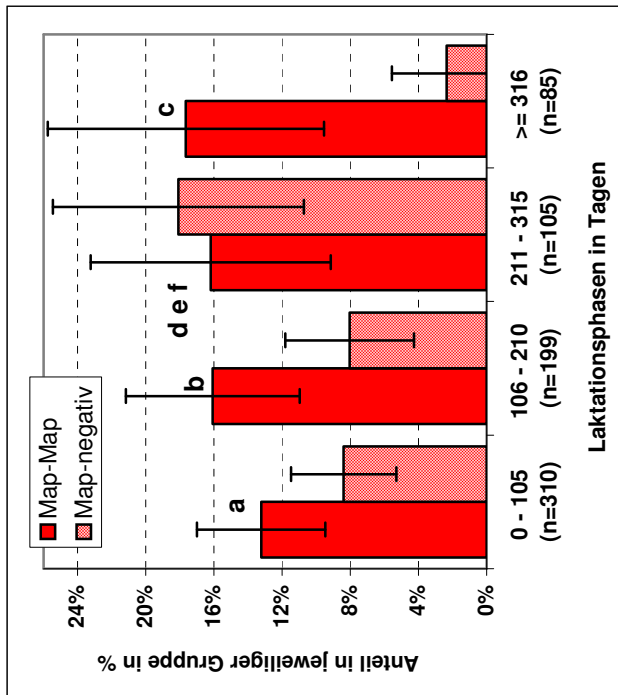


Abb. 28: Doppelt und einfach positive Kotergebnisse nach Laktationsphasen im Bestand A

Legende:

Symbole a-f: p-Werte des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

- a** 1. Phase: Vergleich der Gruppen Map-Map und Map-negativ p=0,035 *
- b** 2. Phase: Vergleich der Gruppen Map-Map und Map-negativ p=0,010 *
- c** 4. Phase Vergleich der Gruppen Map-Map und Map-negativ p=0,000 *
- d** Vergleich der Gruppe Map-negativ in 1. und 3. Phase p=0,006 *
- e** Vergleich der Gruppe Map-negativ in der 2. und 3. Phase p=0,008 *
- f** Vergleich der Gruppe Map-negativ in der 3. und 4. Phase p=0,000 *

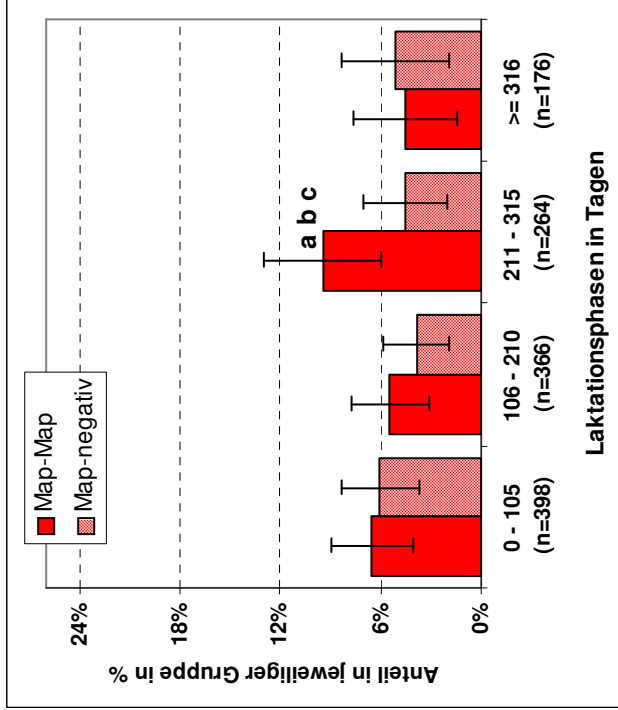


Abb. 29: Doppelt und einfach positive Kotergebnisse nach Laktationsphasen im Bestand B

Legende:

Symbole a-c: p-Werte des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

- a** 3. Phase: Vergleich der Gruppen Map-Map und Map-negativ p=0,019 *
- b** Vergleich der Gruppe Map-Map in der 2. und 3. Phase p=0,039 *
- c** Vergleich der Gruppe Map-Map in der 3. und 4. Phase p=0,038 *

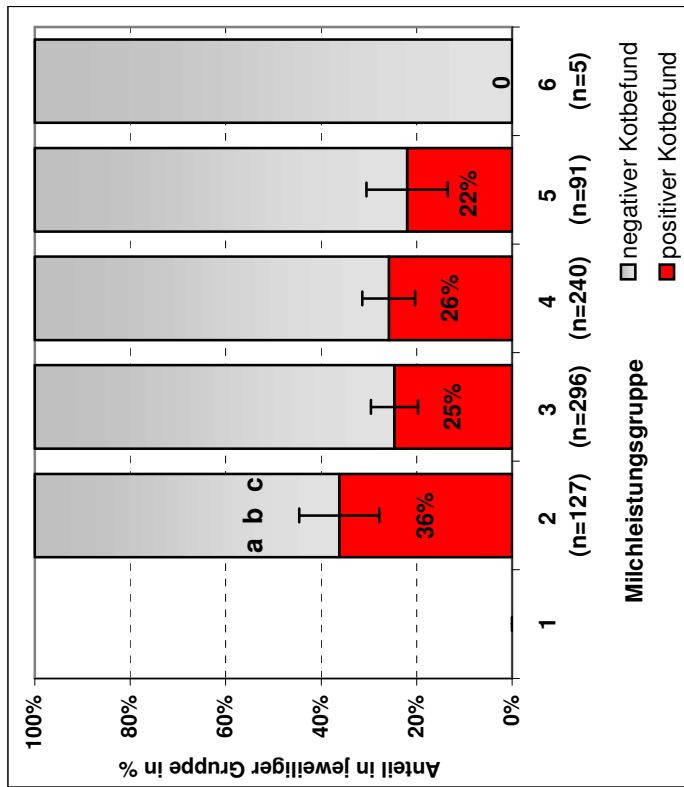


Abb. 30: Ergebnisse der Kotkultivierung nach Tagesmilchleistung im **Bestand A**

Legende:

Symbole a-d: p-Werte des Fisher's exakt Test:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

a Vergleich der 2. und 3. Gruppe p=0,011 *

b Vergleich der 2. und 4. Gruppe p=0,026 *

c Vergleich der 2. und 5. Gruppe p=0,017 *

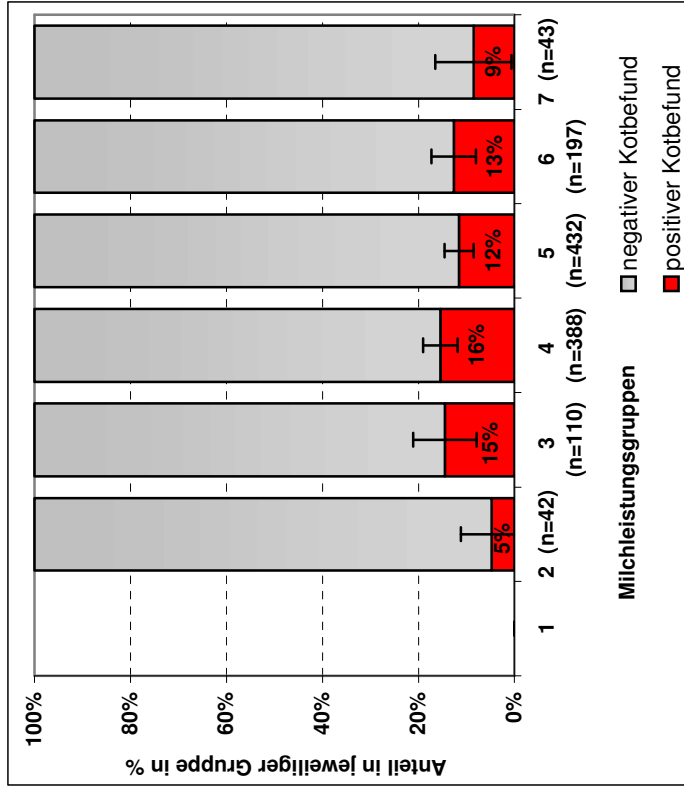


Abb. 31: Ergebnisse der Kotkultivierung nach Tagesmilchleistung im **Bestand B**

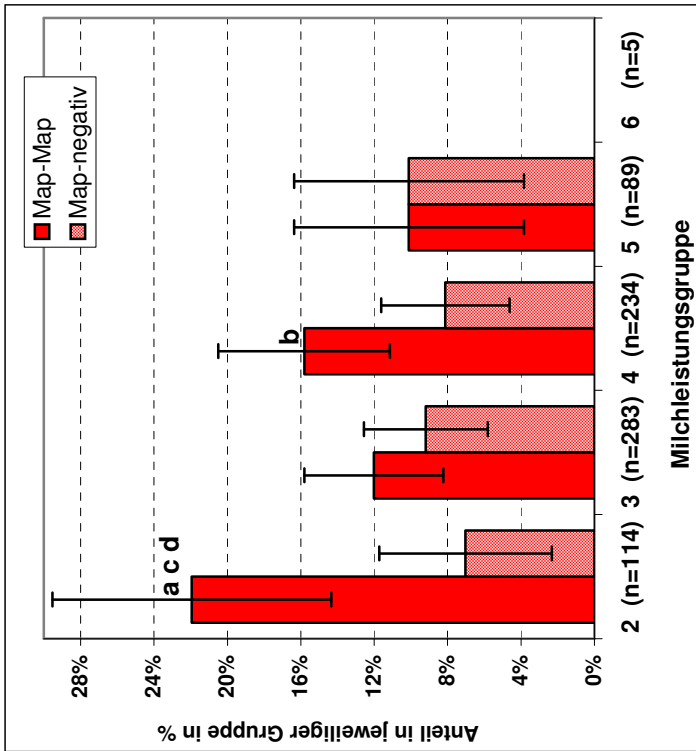


Abb. 32: Doppelt und einfach positive Kotbefunde nach Tagesmilchleistung im Bestand A

Legende:

Symbole a-d: p-Werte des Fisher's exakt Test:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

- a** Gruppe 2: Vergleich der Gruppen Map-Map - Map-negativ p= 0,010 *
- b** Gruppe 4: Vergleich der Gruppen Map-Map - Map-negativ p= 0,007 *
- c** Vergleich der Map-Map-Gruppen zw. 2. und 3. Gruppe p= 0,010 *
- d** Vergleich der Map-Map-Gruppen zw. 2. und 5. Gruppe p= 0,019 *

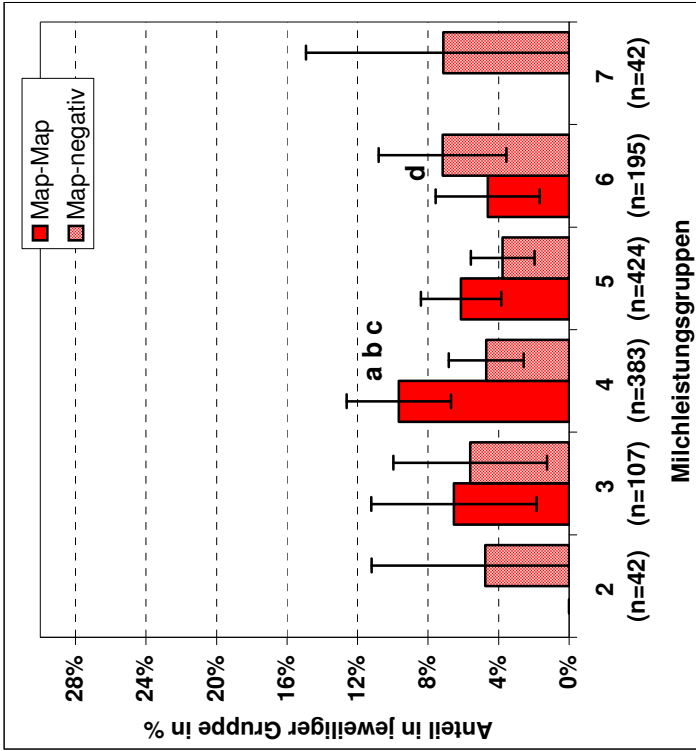


Abb. 33: Doppelt und einfach positive Kotbefunde nach Tagesmilchleistung im Bestand B

Legende:

Symbole a-d: p-Werte des Fisher's exakt Test:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

- a** Gruppe 4: Vergleich der Gruppen Map-Map - Map-negativ p=0,006 *
- b** Vergleich der Map-Map-Gruppe zw. 4. und 5. Gruppe p= 0,041 *
- c** Vergleich der Map-Map-Gruppe zw. 4. und 6. Gruppe p= 0,022 *
- d** Vergleich der Map-negativ-Gruppe zw. 5. und 6. Gruppe p= 0,05 *

4.5 Einflussfaktoren auf die serologische Diagnostik der Paratuberkulose

4.5.1 Tierspezifische Einflussfaktoren

Die Häufigkeiten blut- und milchserologischer Befunde wurden nach den Klassen der tierspezifischen Parameter tabellarisch erfasst (Tabellen 78 bis 95, Anhang 9.1). Die Befundhäufigkeiten in den Klassen eines Einflussfaktors wurden bei infizierten Tieren und negativen Tieren mit dem Pearson's Chi Quadrat Test global verglichen. Dabei zeigte ein signifikantes Testergebnis Unterschiede der Befundhäufigkeiten in den verschiedenen Klassen an. Für den **Svanovir-ELISA** wurden gegenüber dem **Pourquier-ELISA** häufiger signifikante Unterschiede der Befundhäufigkeiten sowohl bei infizierten als auch bei Paratuberkulose unverdächtigen Tieren ermittelt (Tab. 61). Eine Beeinflussung der Sensitivität und der Spezifität wurde nach der Bildung der Befundgruppen positiv/nicht-positiv bzw. negativ/nicht-negativ mit dem Fisher's exakt Test nachgewiesen.

Tab. 61: Ergebnisse des Pearson's Chi-Quadrat Test für Svanovir- und Pourquier-ELISA und 7 tierspezifische Parameter

Einflussfaktor	Anzahl vergleichener Klassen	Infektionsstatus	Probenart	p-Werte des Pearson's Chi-Quadrat Test	
				Svanovir ELISA	Pourquier ELISA
Alter	6	Infiziert	Blut	4,069e-11 *	0,0002 *
	5	Infiziert	Milch	1,219e-06 *	0,001 *
	6	Negativ	Blut	< 2,2e-16 *	0,356
	5	Negativ	Milch	1,201e-05 *	0,069
Laktationsphase	4	Infiziert	Blut	0,231	0,598
		Infiziert	Milch	0,018*	0,139
		Negativ	Blut	0,825	0,466
		Negativ	Milch	0,002 *	0,0005 *
Milchleistung	7	Infiziert	Blut	1,258e-07 *	0,0003 *
		Infiziert	Milch	0,002 *	0,015 *
		Negativ	Blut	1,198e-07 *	0,650
		Negativ	Milch	1,858-e05 *	0,038 *
Milcheiweißgehalt	2	Infiziert	Milch	0,00047 *	0,058
		Negativ	Milch	0,0002*	0,654
Milchlaktosegehalt	2	Infiziert	Milch	0,075	0,0008 *
		Negativ	Milch	0,446	0,351
Milchharnstoffgehalt	4	Infiziert	Milch	0,179	0,029 *
		Negativ	Milch	0,414	0,982
Milchzellgehalt	5	Infiziert	Milch	0,0005 *	0,005 *
		Negativ	Milch	0,0001*	0,060

Legende: * - signifikantes Testergebnis bei der Anwendung des Pearson's Chi-Quadrat Test

4.5.1.1 Alter

Einfluss des Alters auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren

Beim Vergleich der **Blut-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere in 6 Altersgruppen, war eine Zunahme positiver Befunde mit steigendem Alter bei beiden Testverfahren nachweisbar (Tab. 78). Ein globaler Vergleich (Pearson's Chi-Quadrat Test) belegte, dass die Häufigkeiten der Blut-ELISA-Befunde in den Altersklassen signifikant verschieden waren (Tab. 61).

Bei der weiterführenden Untersuchung der Befundgruppen positiv und nicht-positiv (Abb. 34 und 35) wurde für den **Svanovir-Blut-ELISA** zwischen den Altersklassen der 1,4–2 und der 2–3 Jahre alten Tiere eine signifikante Zunahme der positiven Befunde ermittelt.

Der Vergleich der Positivraten bei 2–3 Jahre und 3–4 Jahre alten Tiere ergab zudem für **beide Blut-ELISA-Tests** einen signifikanten Anstieg positiver Befunde bei der älteren Tiergruppe.

Bis zu einem Alter von 6 Jahren war ein Anstieg positiver und für den **Svanovir** auch fraglicher **Milch-ELISA-Befunde** bei infizierten Tieren feststellbar (Tab. 78). Die globale Analyse der milchserologischen Befunde zeigte, dass bei beiden ELISA-Tests die Befundhäufigkeiten in den Altersgruppen signifikant verschieden waren (Tab. 61).

In den weiterführenden Untersuchungen (Fisher's exakt Test) wurde belegt, dass bei beiden Tests der Anteil der positiven milchserologischen Befunde bei infizierten Tieren zwischen den Altersklassen der 2–3 Jahre und der 3–4 Jahre alten Tiere signifikant erhöht war (Abb. 36 und Abb. 37).

Die Sensitivitäten des Svanovir-Blut und Milch-ELISA sowie des Pourquoier-Milch-ELISA nahmen stetig bis zu einem Alter von 6 Jahren zu.

Einfluss des Alters auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren

Die Befundhäufigkeiten bei negativen Tieren in unterschiedlichen Altersklassen unterschieden sich für den **Pourquier-Blut-** und **Milch-ELISA** nicht, somit konnte ein Einfluss des Alters auf die Spezifitäten des **Pourquier-ELISA** ausgeschlossen werden (Tab. 61).

Die Untersuchung Paratuberkulose negativer Tiere mit dem **Svanovir-Blut-** und **Milch-ELISA** zeigte, dass der Anteil negativer Befunde mit zunehmendem Alter der Tiere stetig abnahm und die Anteile fraglicher und positiver Befunde anstiegen (Tab. 80 und 81). Beim globalen Vergleich unterschieden sich die Svanovir-Befundhäufigkeiten in verschiedenen Altersgruppen signifikant (Tab. 61).

Die höchste Spezifität des **Svanovir-Blut-ELISA** wurde in der Altersgruppe der 1,4–2jährigen Tiere ermittelt, demgegenüber war ein signifikanter Spezifitätsabfall in der Gruppe der 2–3jährigen Tiere feststellbar (Abb. 38). Auch die Spezifitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** für 2–3 und 3–4jährige Tiere sowie für die die 3–4 und der 5–6 Jahre alten Tiere waren signifikant verschieden. Für den **Svanovir-Milch-ELISA** war ein Abfall der Spezifitäten zwischen den Altersgruppen der 2–3 und der 3–4jährigen sowie zwischen den Altersgruppen der 4–5 und der 5–6jährigen Tiere nachweisbar (Abb. 39).

Während ein Einfluss des Alters auf die Spezifität des Pourquoier-ELISA ausgeschlossen werden konnte, wurde eine signifikante Abnahme der Spezifität des Svanovir-ELISA für Blut und Milch ermittelt.

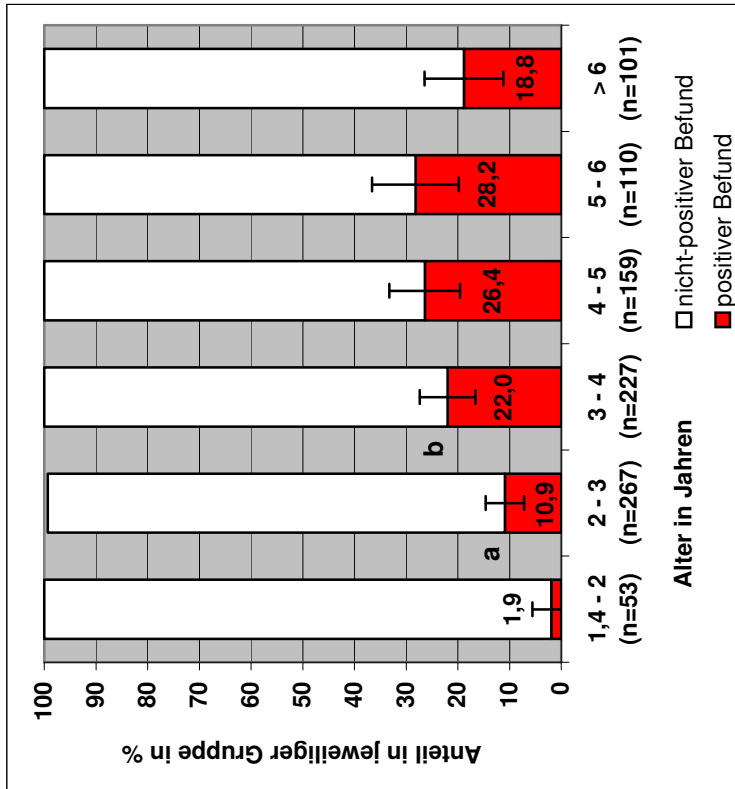


Abb. 34: Sensitivitäten des Svanovir-Blut-ELISA für 6 Altersgruppen

Legende:

Symbole a – b: Vergleich mit dem Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs. - versus

a – Sensitivität 1,4 – 2 Jahre vs. 2 – 3 Jahre p = 0,039 *

b – Sensitivität 2 – 3 Jahre vs. 3 – 4 Jahre p = 0,0008 *

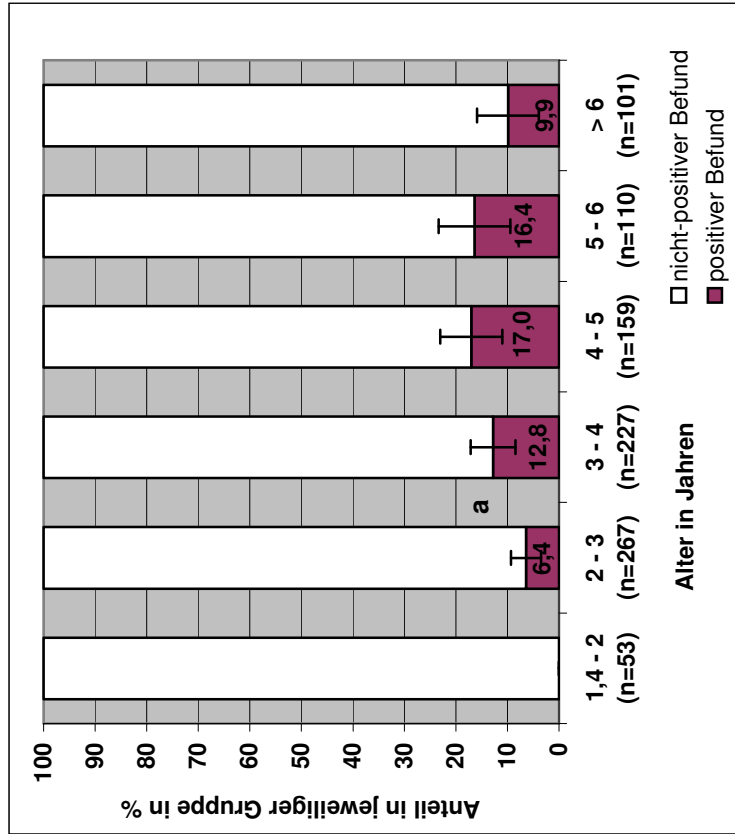


Abb. 35: Sensitivitäten des Pourquier-Blut-ELISA für 6 Altersgruppen

Legende:

Symbol a: Vergleich mit dem Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs. - versus

a – Sensitivität 2 – 3 Jahre vs. 3 – 4 Jahre p = 0,019 *

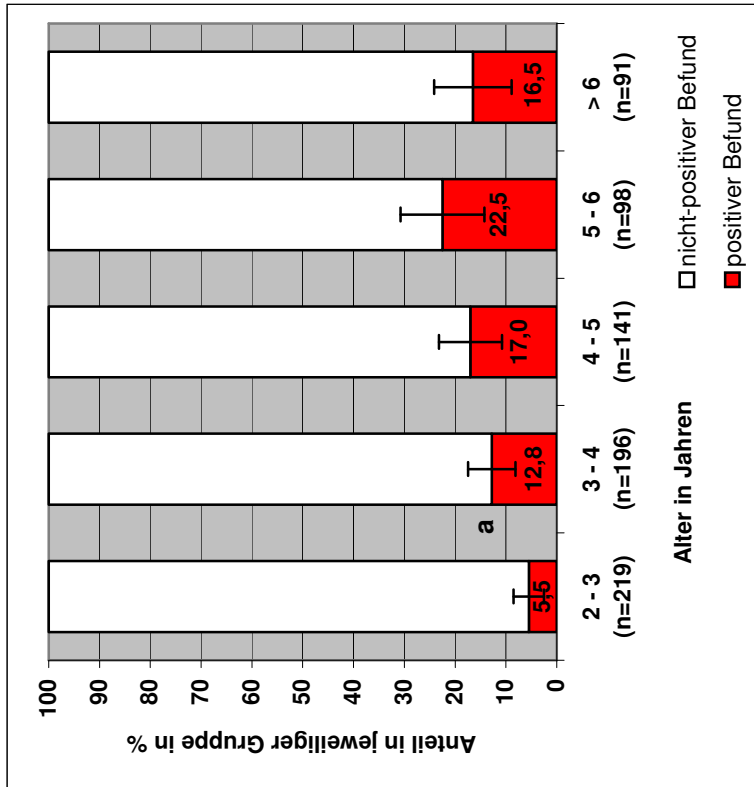


Abb. 36: Sensitivitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 5 Altersgruppen

Legende:

Symbol a: Vergleich mit dem Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

a – Sensitivität 2 – 3 Jahre vs. 3 – 4 Jahre p = 0,015 *

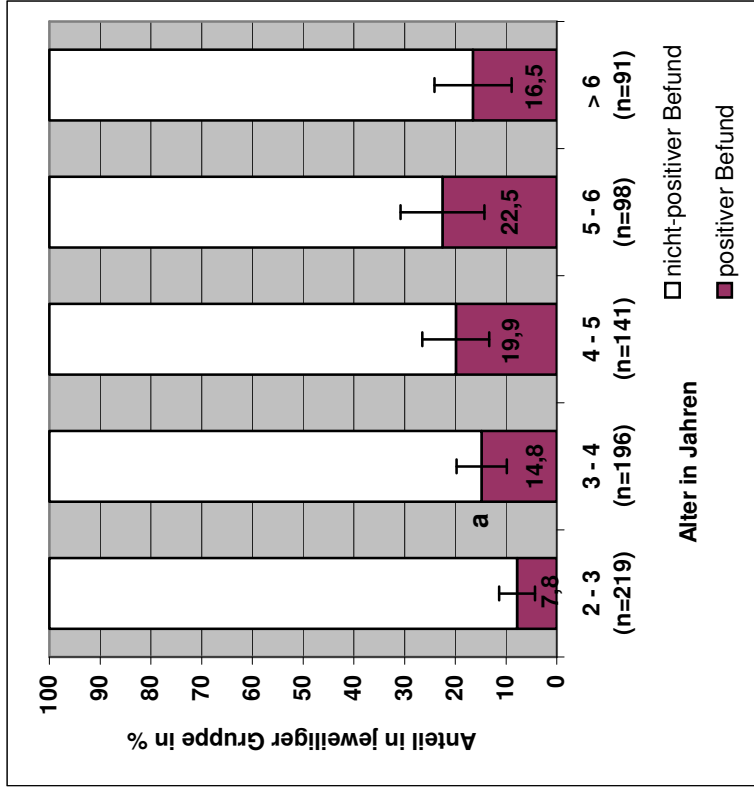


Abb. 37: Sensitivitäten des Pourquier-Milch-ELISA für 5 Altersgruppen

Legende:

Symbol a: Vergleich mit dem Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

a – Sensitivität 2 – 3 Jahre vs. 3 – 4 Jahre p = 0,028 *

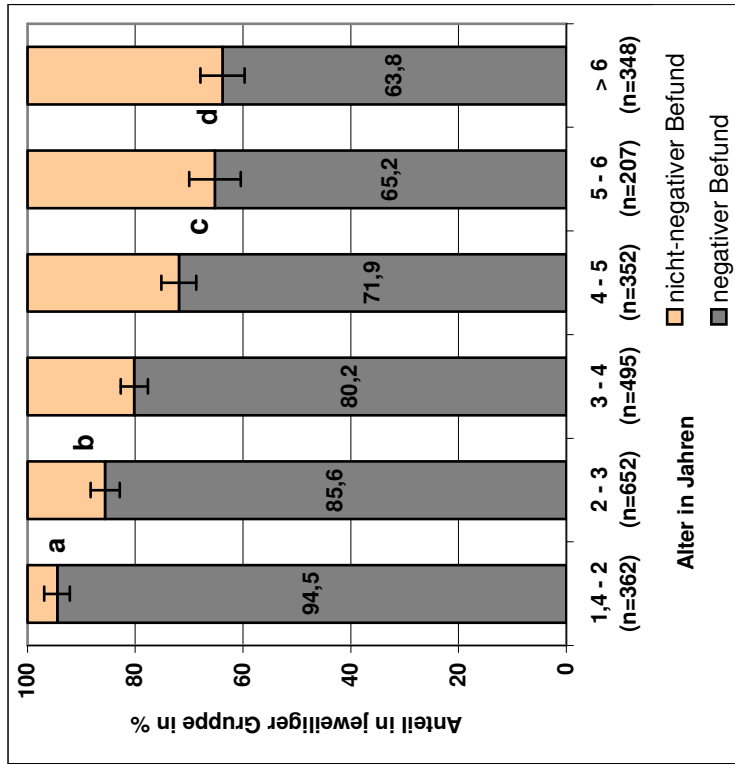


Abb. 38: Spezifitäten des Svanovir-Blut-ELISA für 6 Altersgruppen

Legende:

Symbole a – e: Vergleich mit dem Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

- a** – Spezifität 1,4 – 2 Jahre vs. 2 – 3 Jahre p = 0,000 *
- b** – Spezifität 2 – 3 Jahre vs. 3 – 4 Jahre p = 0,004 *
- c** – Spezifität 3 – 4 Jahre vs. 5 – 6 Jahre p = 0,032 *
- d** – Spezifität 3 – 4 Jahre vs. > 6 Jahre p = 0,000 *

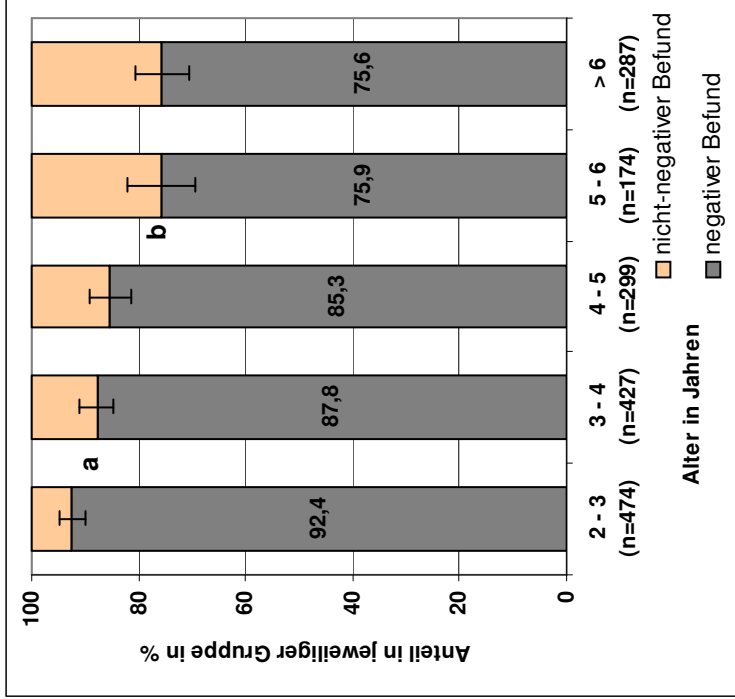


Abb. 39: Spezifitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 5 Altersgruppen

Legende:

Symbole a – e: Vergleich mit dem Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

- a** – Spezifität 2 – 3 Jahre vs. 3 – 4 Jahre p = 0,024 *
- b** – Spezifität 4 – 5 Jahre vs. 5 – 6 Jahre p = 0,013 *

4.5.1.2 Laktationsphase

Einfluss der Laktationsphase auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren

Bei beiden Testverfahren unterschieden sich die Häufigkeiten blutserologischer Befunde bei infizierten Tieren in verschiedenen Laktationsphasen nicht (Tab. 61). **Ein Einfluss der Laktationsphase auf die Sensitivität der Blut-ELISA-Tests wurde somit ausgeschlossen.** Auch die Sensitivität des **Pourquier-Milch-ELISA** wurde nicht vom Laktationsstadium der Tiere beeinflusst.

Für den **Svanovir-Milch-ELISA** wurden **signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Laktationsphasen berechnet** (Tab. 61 und Abb. 40). Eine signifikante Zunahme der Sensitivität des **Svanovir-Milch-ELISA** erfolgte zwischen 2. und 3. Laktationsphase. Die höchste Sensitivität des **Svanovir-Milch-ELISA** wurde für die 3. Laktationsphase ermittelt, es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied gegenüber der 4. Laktationsphase.

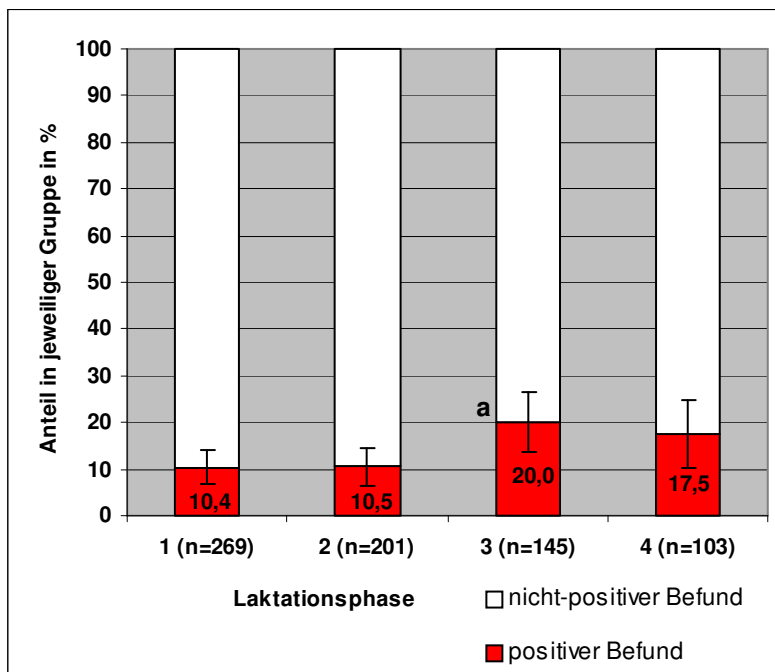


Abb. 40: Sensitivitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** für 4 Laktationsphasen

Legende:

Symbol a: Vergleich mit dem Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

a – Sensitivität 2. Phase vs. 3. Phase $p = 0,019^*$

Einfluss der Laktationsphase auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren

Der Anteil der negativen Blut-ELISA-Befunde bei nicht-infizierten Tieren, die in verschiedenen Laktationsphasen untersucht wurden unterschied sich nicht signifikant (Tab. 61). **Die Laktationsphase hatte keinen Einfluss auf die Spezifität der blutserologischen Tests.**

Für beide **Milch-ELISA-Tests** wurden signifikante Unterschiede der Befunde in den einzelnen Laktationsphasen errechnet (Tab. 61). Die höchste Spezifität des **Pourquier-Milch-ELISA** wurde in der 1. Laktationsphase (99,6 %) ermittelt. Ein signifikanter Spezifitätsabfall des **Pourquier-Milch-ELISA** wurde lediglich zwischen der 1. (99,6 %) und der 4. Laktationsphase (97,7 %) nachgewiesen (Fisher's exakt Test: $p=0,05$).

Die Spezifitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** waren in den ersten beiden Laktationsphasen erhöht gegenüber der 3. und der 4. Laktationsphase (Abb. 41). Eine signifikante Abnahme der Spezifität war zwischen 1. und 4. sowie 2. und 4. Laktationsphase nachweisbar.

Die Spezifitäten beider Milch-ELISA-Tests waren somit in den höheren Laktationsphasen vermindert.

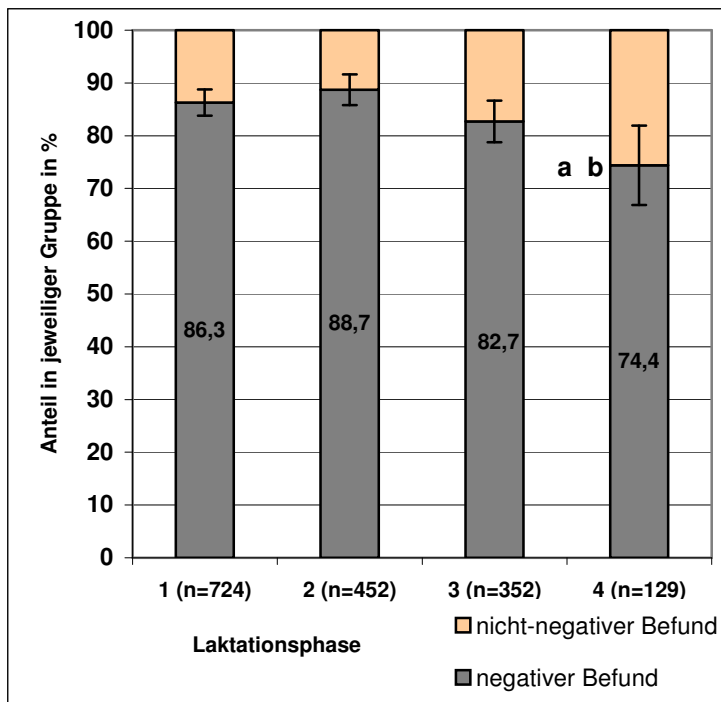


Abb. 41: Spezifitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** für 4 Laktationsphasen

Legende:

Symbole a – b: p-Werte des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

vs.- versus

a – Spezifität 1. Phase vs. 4. Phase $p = 0,006$ *

b – Spezifität 2. Phase vs. 4. Phase $p = 0,003$ *

4.5.1.3 Tagesmilchleistung

Einfluss der Tagesmilchleistung auf die Sensitivität ELISA-Testverfahren

Es wurde belegt, dass die Verteilung der Untersuchungsbefunde beider ELISA-Tests für Blut und Milch in den 7 Milchleistungsgruppen signifikant verschieden war (Tab. 61).

Die Sensitivität des **Svanovir-** und des **Pourquier-Blut-ELISA** war für die 2. Milchleistungsgruppe gegenüber der 1. Milchleistungsgruppe signifikant erhöht (Abb. 42 und 43). In den Milchleistungsgruppen 5, 6 und 7 mit einer Tagesmilchleistung > 35 kg war der Anteil der positiven blutserologischen Befunde geringer gegenüber den Milchleistungsgruppen 2, 3 und 4. Ein signifikanter Abfall der Sensitivität wurde für den **Svanovir-Blut-ELISA** zwischen der 4. und 5. Gruppe ermittelt.

Bei beiden Testverfahren war die Sensitivität der blutserologischen Tests bei verringerten Milchleistungen erhöht.

Für den **Svanovir-Milch-ELISA** wurden am häufigsten positive milchserologische Befunde in den Milchleistungsgruppen 1 und 2 erfasst (Abb. 44). Ein signifikanter Unterschied der Sensitivität des **Svanovir-Milch-ELISA** wurde zwischen den Gruppen 2 und 3 festgestellt. Eine signifikante Reduktion der Sensitivität des **Svanovir-** und des **Pourquier-Milch-ELISA** war zudem zwischen 4. und 5. Milchleistungsgruppe nachweisbar (Abb. 44 und 45).

Die Sensitivität der milchserologischen Testverfahren war bei höheren Milchleistungsgruppen reduziert gegenüber den Milchleistungsgruppen mit einer Tagesmilchleistung < 35 kg.

Einfluss der Tagesmilchleistung auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren

Die aktuelle Tagesmilchleistung beeinflusste die Spezifität des **Pourquier-Blut-ELISA** nicht. Für den **Svanovir-Blut-ELISA** wurden Unterschiede der Befundhäufigkeiten in den einzelnen Milchleistungsgruppen nachgewiesen (Tab. 61).

Beim Vergleich positiver und nicht-positiver Befunde waren jedoch keine signifikanten Unterschiede der Spezifitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** zwischen den Milchleistungsgruppen feststellbar (Abb. 46). **Die Spezifität der blutserologischen Tests wurde somit nicht signifikant von der Tagesmilchleistung am Untersuchungstag beeinflusst.**

Für beide **Milch-ELISA-Tests** wurden signifikante Unterschiede der Befundhäufigkeiten in den einzelnen Milchleistungsgruppen der negativen Tiere ermittelt (Tab. 61).

Die Spezifität des **Pourquier-Milch-ELISA** war jedoch beim Vergleich der Anteile negativer und nicht-negativer Befunde zwischen den einzelnen Milchleistungsgruppen nicht signifikant verschieden (Fisher`s exakt Test).

Die Spezifität des **Svanovir-Milch-ELISA** stieg mit zunehmender Tagesmilchleistung der Tiere (Abb. 47). Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen 2. und 3. Milchleistungsgruppe ermittelt. **Die Spezifität des Svanovir-Milch-ELISA war bei einer Tagesmilchmenge über 25 kg erhöht.**

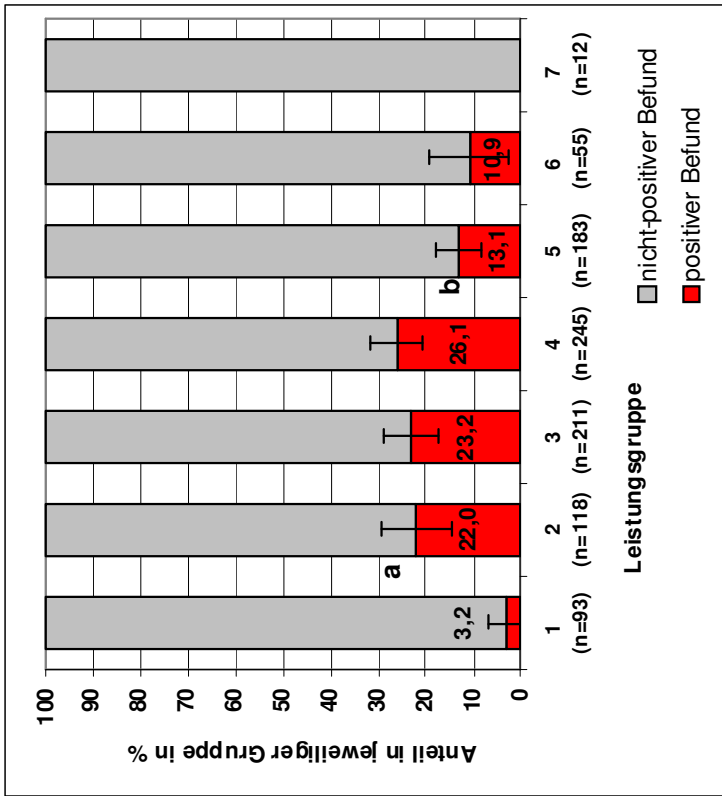


Abb. 42: Sensitivitäten des Svanovir-Blut-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen

Legende:

Symbole a – b: p-Werte des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs.- versus

a – Sensitivität 1. Gruppe vs. 2. Gruppe p = 0,00004 *

b – Sensitivität 4. Gruppe vs. 5. Gruppe p = 0,001 *

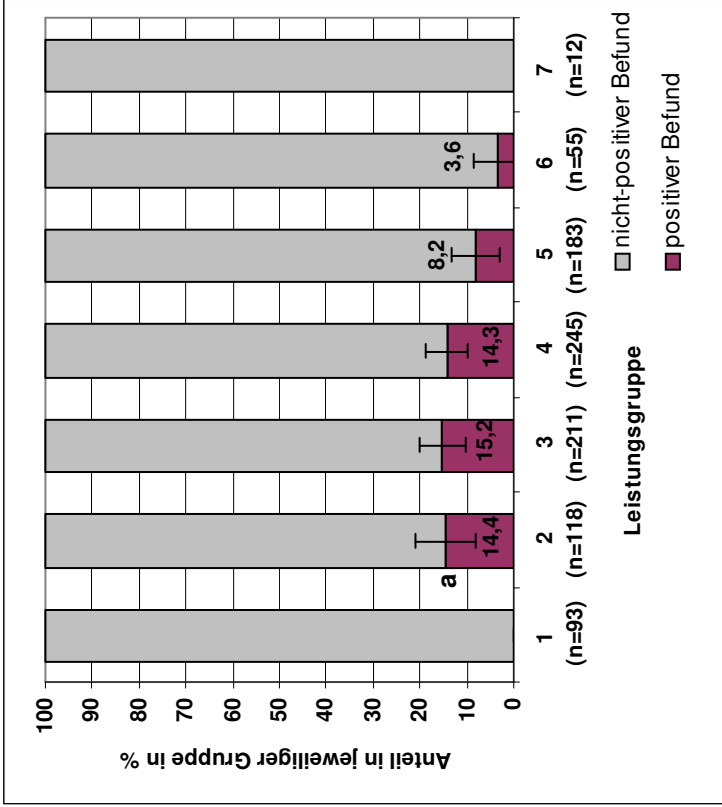


Abb. 43: Sensitivitäten des Pourquier-Blut-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen

Legende:

Symbol a: p-Wert des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs.- versus

a – Sensitivität 1. Gruppe vs. 2. Gruppe p = 0,00004 *

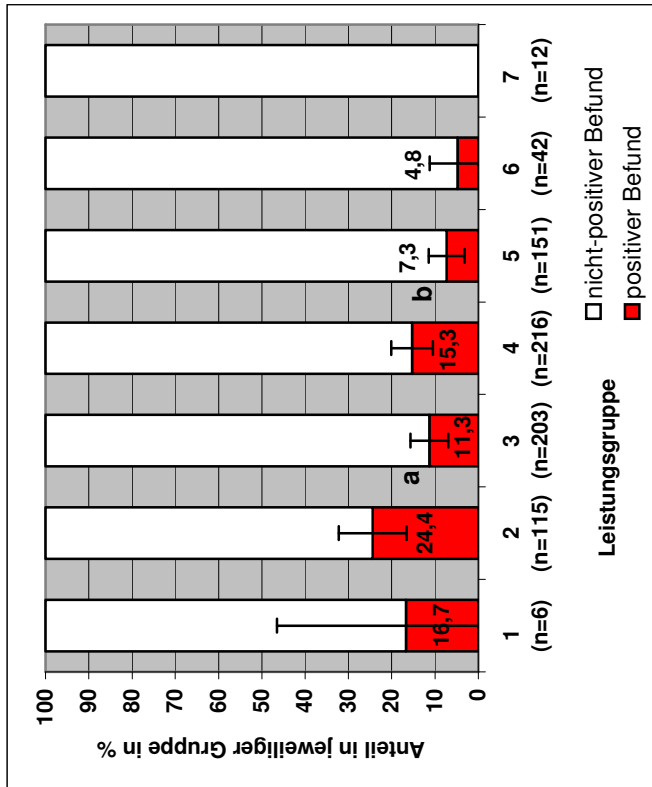


Abb. 44: Sensitivitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen

Legende:

Symbole a – b: p-Werte des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs.- versus

a – Sensitivität 2. Gruppe vs. 3. Gruppe p = 0,004 *

b – Sensitivität 4. Gruppe vs. 5. Gruppe p = 0,022 *

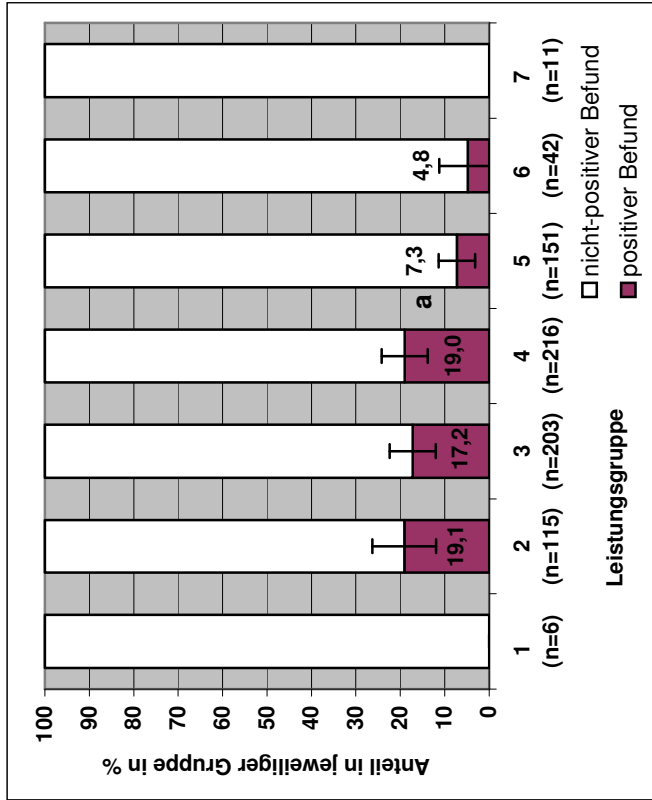


Abb. 45: Sensitivitäten des Pourquier-Milch-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen

Legende:

Symbol a: p-Wert des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs.- versus

a – Sensitivität 4. Gruppe vs. 5. Gruppe p = 0,001 *

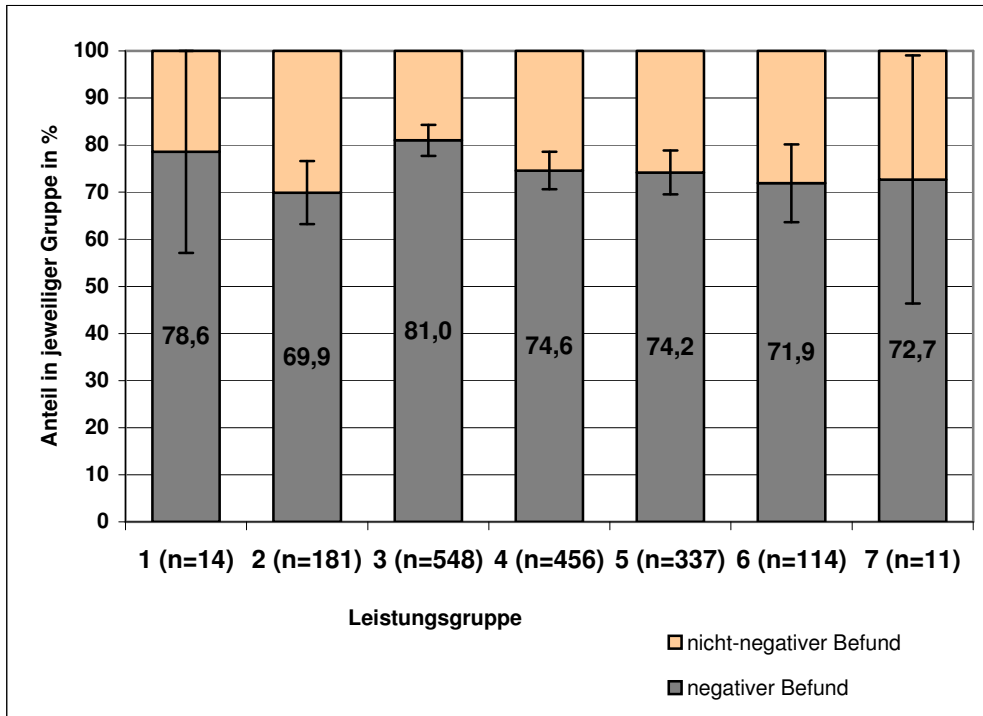


Abb. 46: Spezifitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** für 7 Milchleistungsgruppen

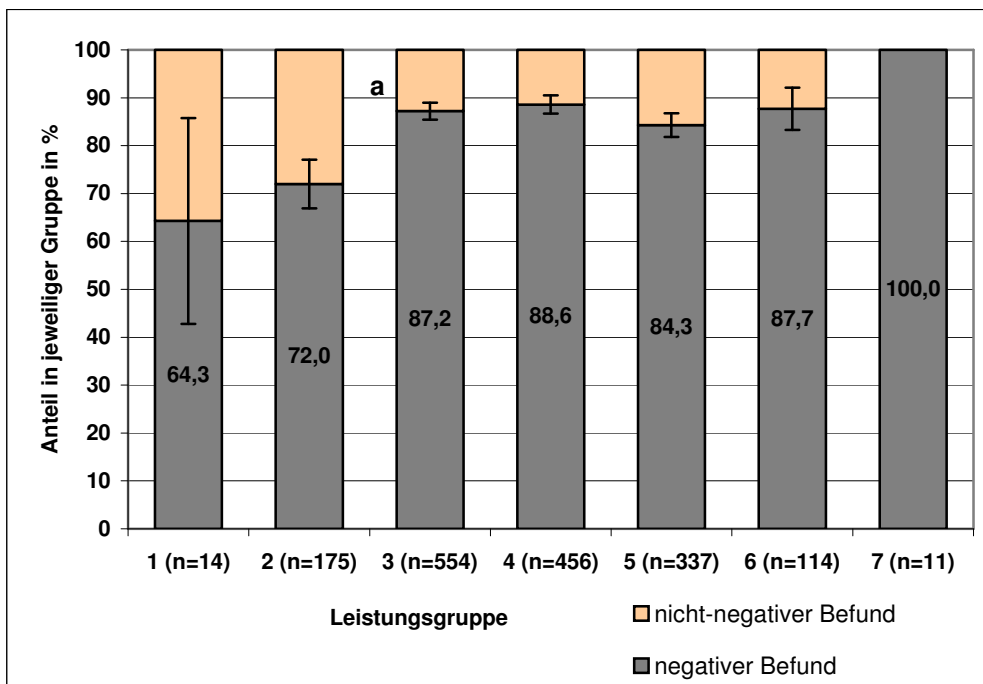


Abb. 47: Spezifitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** für 7 Milchleistungsgruppen

Legende:

Symbol a: p-Wert des Fisher's exakt Test

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test vs.- versus

a – Spezifität 2. Gruppe vs. 3. Gruppe p = 0,0002 **

4.5.1.4 Milchparameter

Einfluss des Milcheiweiß- und Milchlaktosegehaltes auf die Sensitivität der Milch-ELISA-Testverfahren

Bei einem hohen Eiweißgehalt der Rohmilch (> 3,7 %) bei infizierten Tieren wurden für beide ELISA-Verfahren häufiger fragliche und positive Untersuchungsbefunde ermittelt (Tab. 90), jedoch nur die Befundhäufigkeiten des **Svanovir-Milch-ELISA** unterschieden sich in den beiden Milcheiweißklassen signifikant (Tab. 61). Die Anteile positiver und nicht-positiver **Svanovir-Milch-ELISA-Befunde** in beiden Milcheiweißklassen wurden verglichen (Abb. 48). **Bei einem Eiweißgehalt (> 3,7 %) war die Sensitivität des Svanovir-Milch-ELISA signifikant höher.**

Ein Einfluss des Milchlaktosegehaltes auf die Sensitivität des **Svanovir-Milch-ELISA** wurde ausgeschlossen (Tab. 61). Für den **Pourquier-Milch-ELISA** wurden signifikante Unterschiede zwischen den Befundhäufigkeiten in den Milchlaktoseklassen nachgewiesen.

Ein signifikant höherer Anteil positiver Pourquier-Milch-ELISA-Befunde wurde bei Milchlaktosegehalten ≤ 4,9 % erfasst (Abb. 49).

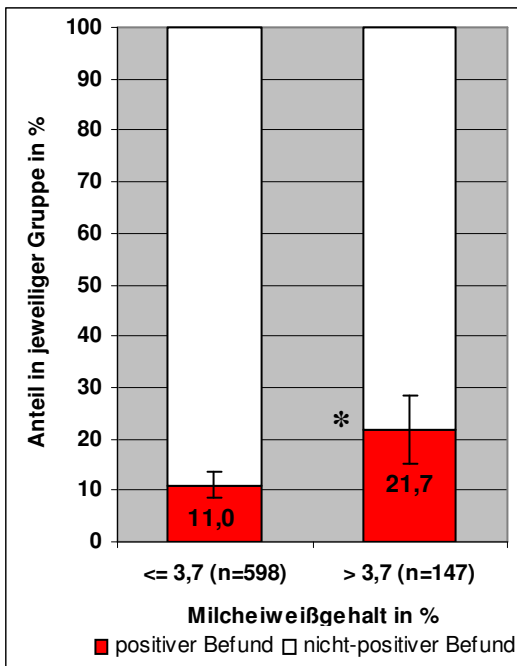


Abb. 48: Sensitivität des **Svanovir-Milch-ELISA** nach Milcheiweißgehalt

Legende:

* signifikant höherer Anteil positiver Befunde
Fisher's exakt Test: p=0,001*

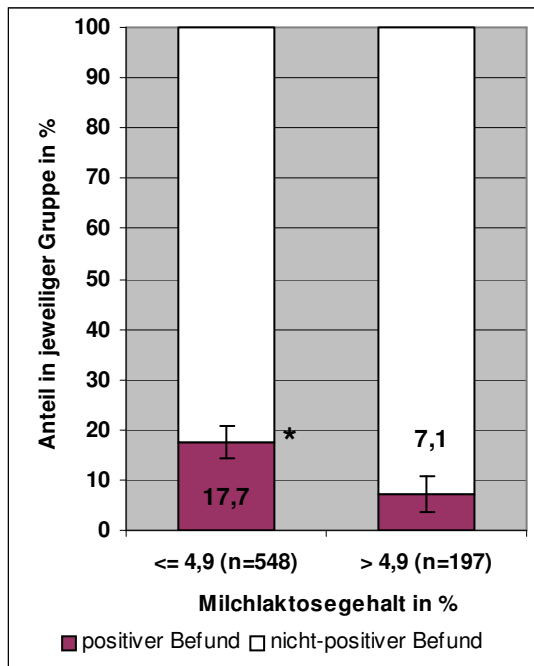


Abb. 49: Sensitivität des **Pourquier-Milch-ELISA** nach Milchlaktosegehalt

Legende:

* signifikant höherer Anteil positiver Befunde
Fisher's exakt Test: p=0,006*

Einfluss des Milcheiweiß- und Milchlaktosegehaltes auf die Spezifität der Milch-ELISA-Testverfahren

Bei der Untersuchung mit dem **Svanovir-Milch-ELISA** unterschieden sich die Anteile der 3 Befundgruppen in den beiden Milcheiweißgehaltsklassen signifikant (Tab. 61).

Bei Milcheiweißgehalten $\leq 3,7\%$ wies der Svanovir-Milch-ELISA eine signifikant höhere Spezifität auf (Abb. 50). Ein Einfluss des Milcheiweißgehaltes auf die Spezifität des **Pourquier-Milch-ELISA** wurde ausgeschlossen (Tab. 61).

Bei beiden ELISA-Testverfahren unterschieden sich die Befundhäufigkeiten in den Milchlaktosegehaltsklassen (Tab. 91) bei nicht-infizierten Tieren nicht signifikant (Tab. 61). **Ein Einfluss des Milchlaktosegehaltes auf die Spezifitäten der milchserologischen Testverfahren war nicht nachweisbar.**

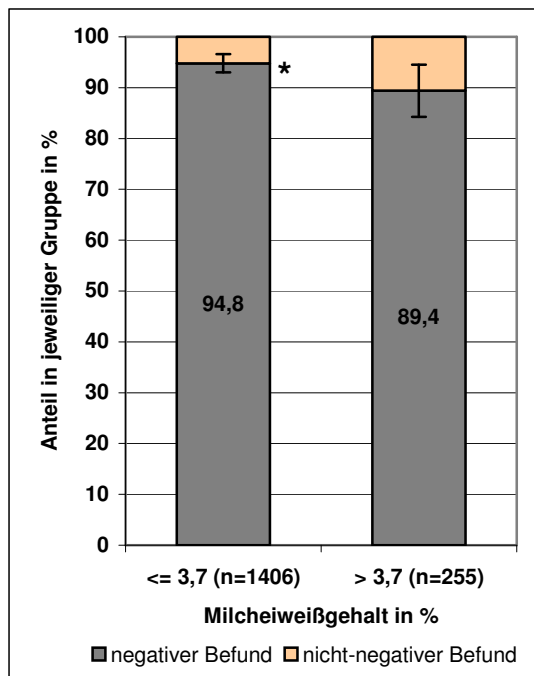


Abb. 50: Spezifität des **Svanovir-Milch-ELISA** nach Milcheiweißgehalt

Legende:

* signifikant höherer Anteil negativer Befunde

Fisher's exakt Test: $p=0,002^*$

Einfluss des Harnstoffgehaltes der Milch auf die Sensitivität und Spezifität der Milch-ELISA-Testverfahren

Die Untersuchung blutserologischer Befunde kotpositiver Tiere in 4 Milchharnstoffgehaltsklassen ergab folgende Ergebnisse: Die Befunde des **Svanovir-Milch-ELISA** unterschieden sich in den Milchharnstoffklassen nicht signifikant (Tab. 61). Für den **Pourquier-Milch-ELISA** waren signifikante Unterschiede bei der Verteilung der Befunde in den einzelnen Milchharnstoffklassen zu verzeichnen (Tab. 61). Die Häufigkeiten positiver **Pourquier-Milch-ELISA-Befunde** unterschieden sich zwischen den Milchharnstoffklassen 1 und 2 (Fisher's exakt Test: $p=0,006$) sowie 1 und 3 (Fisher's exakt Test: $p=0,042$) signifikant. Die Sensitivität des **Pourquier-Milch-ELISA** war bei einem Milchharnstoffgehalt ≤ 150 mg/l erhöht (Tab. 92). Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl (7 Fälle) wurde die 4. Milchharnstoffklasse nicht in die statistischen Auswertungen einbezogen.

Ein Einfluss des Milchharnstoffgehaltes (Tab. 93) auf die Spezifität der Milchtestverfahren wurde sicher ausgeschlossen (Tab. 61).

Einfluss des Zellgehaltes der Milch auf die Sensitivität und Spezifität der Milch-ELISA-Testverfahren

Die Anteile fraglicher und positiver ELISA-Befunde nahmen bei infizierten Tieren mit steigendem Milchzellgehalt bei beiden Testverfahren stetig zu (Tab. 94). Es wurden signifikante Unterschiede der Untersuchungsbefunde in den einzelnen Milchzellgehaltsklassen ermittelt (Tab. 61). Für den **Svanovir-Milch-ELISA** wurde eine signifikante Zunahme der seropositiven Befunde zwischen den Milchzellgehaltsklassen 1 und 3 (Fisher's exakt Test: $p=0,002$), 1 und 4 (Fisher's exakt Test: $p=0,004$) und 1 und 5 (Fisher's exakt Test: $p=0,02$) ermittelt. Bei der Untersuchung des **Pourquier-Milch-ELISA** waren signifikante Unterschiede zwischen den Milchzellgehaltsklassen 1 und 3 (Fisher's exakt Test: $p=0,03$), 1 und 4 (Fisher's exakt Test: $p=0,003$) und 2 und 4 (Fisher's exakt Test: $p=0,009$) nachweisbar.

Der Anteil negativer milchserologischer Befunde blieb bei der Untersuchung kotnegativer Tiere mit dem **Pourquier-Milch-ELISA** unverändert (Tab. 61 und 95). Für den **Svanovir-Milch-ELISA** wurde eine **stetige Abnahme der Testspezifität mit steigendem Milchzellgehalt** ermittelt, signifikante Unterschiede der Häufigkeiten negativer und nicht-negativer Befunde wurden zwischen den Milchzellgehaltsklassen 1 und 4 (Fisher's exakt Test: $p=0,005$) und 2 und 4 (Fisher's exakt Test: $p=0,01$) berechnet.

4.6 Multinomiale logistische Regressionen

Die berechneten Größen (Regressionskoeffizient, Standardfehler, RRR) der multinomialen logistischen Regressionen wurden in den Tabellen 105 bis 114 im Anhang 9.4 zusammengefasst.

4.6.1 Multinomiale logistische Regression der Kotbefunde

Die multinomiale logistische Regression zur Beeinflussung der Ergebnisse der Kotkultivierung durch tiereigene Faktoren ergab, dass die Ausbildung eines doppelt positiven Kotbefundes nicht signifikant durch die untersuchten Faktoren beeinflusst wurde (Tab. 105). Das relative Risiko eines einfach positiven Kotbefundes bei infizierten Tieren war jedoch in der 3. Laktationsphase gegenüber der 2. Laktationsphase signifikant um den Faktor 2,52 (Tab. 106) erhöht.

4.6.2 Multinomiale logistische Regression der ELISA-Untersuchungen

Multinomiale logistische Regression der Untersuchungen mit dem Svanovir-Blut-ELISA

Das relative Risiko eines fraglichen serologischen Befundes bei der Untersuchung mit dem Svanovir-Blut-ELISA war in der Altersgruppe der 5 bis 6 Jahre alten Tiere signifikant um den Faktor 3 gegenüber der Referenzgruppe erhöht (Tab. 107). Das Alter hatte den größten Einfluss auf die Ausbildung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem Svanovir-Blut-ELISA.

In der Altersgruppe der 2–3jährigen Tiere war die Wahrscheinlichkeit eines positiven serologischen Befundes um den Faktor 0,38 verringert (Tab. 108). Hingegen dazu stieg das Risiko eines seropositiven Befundes signifikant um den Faktor 5,37, wenn zeitgleich bei infizierten Tieren ein doppelt positiver Kotbefund nachgewiesen wurde.

Multinomiale logistische Regression der Untersuchungen mit dem Svanovir-Milch-ELISA

Das Risiko eines fraglichen oder positiven Svanovir-Milch-ELISA-Befundes war bei 2–3jährigen Tieren signifikant reduziert gegenüber dem Risiko bei 3–4jährigen Tieren (Tab. 109 und 110). Dagegen war das Risiko, einen fraglichen oder positiven serologischen Milchbefund aufzuweisen bei 5 bis 6jährigen Tieren signifikant höher.

Bei Tieren mit doppelt positivem Kotbefund stieg die Wahrscheinlichkeit eines fraglichen oder positiven Svanovir-Milch-ELISA-Befundes signifikant um die Faktoren 3,45 und 5,89 an. Tiere des Betriebes B wiesen ein um den Faktor 3,34 signifikant höheres Risiko eines positiven milchserologischen Befundes auf. Dagegen wurde ein verringertes Risiko eines positiven Svanovir-Milch-ELISA-Befundes bei hohen Tagesmilchleistungen von $> 45 \leq 55$ kg ermittelt.

Multinomiale logistische Regression der Untersuchungen mit dem Pourquoier-Blut-ELISA

Bei der multinomialen logistischen Regression der Pourquoier-Blut-ELISA Befunde wurden für die Ausbildung eines fraglichen Befundes bei infizierten Tieren keine signifikanten,

tiereigenen Einflüsse ermittelt (Tab. 111). Dagegen war das Risiko eines positiven Pourquier-Blut-ELISA-Befundes bei Tieren mit doppelt positivem Kotbefund signifikant um den Faktor 18,04 erhöht (Tab. 112).

Multinomiale logistische Regression der Untersuchungen mit dem Pourquier-Milch-ELISA

Die Ausbildung eines fraglichen Pourquier-Milch-ELISA-Befundes wurde durch keinen der untersuchten Faktoren signifikant beeinflusst (Tab. 113). Das Risiko eines positiven Pourquier-Milch-ELISA-Befundes war bei hohen Tagesmilchleistungen zwischen > 35 und 55 kg verringert (Tab. 114). Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Pourquier-Milch-ELISA-Befundes stieg bei einfacher Ausscheidung signifikant um den Faktor 2,83 und bei doppelter Map-Ausscheidung signifikant um den Faktor 14,59 (Tab. 114).

Ergebnisse der Wiederholungsuntersuchungen bei identischen Tieren

4.7 Verlauf der koprologischen Befunde in zwei Paratuberkulose Beständen

Die Zusammensetzung der untersuchten Bestände war im Verlauf der Untersuchungen nicht konstant, ein Teil der Rinder verblieb jedoch in den Beständen und wurde mehrfach in Folge koprologisch untersucht (bei 2. bis 5. Bestandsuntersuchung identische Methode für die Kotkultur).

4.7.1 Verlauf der Kotbefunde bei mehrfach untersuchten Tieren aus dem Bestand A und Einfluss der Wiederholung auf die Testsensitivität

Im Bestand A wurden im Untersuchungszeitraum insgesamt 521 Einzeltiere beprobt, davon wurden 227 Tiere 3mal in Folge untersucht (Tab. 62).

An insgesamt 4 Untersuchungen, im Abstand von etwa einem halben Jahr, nahmen 162 Tiere teil. Innerhalb von 3 Bestandsuntersuchungen wurden 89 von 227 Tieren als Map-Ausscheider identifiziert. Mit einer **dreifachen kulturellen Untersuchung** des Kotes wurden **77,5 % der 89 kotpositiven Tiere** sicher als Map-Ausscheider erkannt (Tab. 63).

Bei 22,5 % der mehrfach untersuchten Tiere des Bestandes A war eine 4. Kotuntersuchung zur Ermittlung der Map-Ausscheidung notwendig.

Tab. 62: Kotbefunde bei mehrfacher Untersuchung von Einzeltieren – **Bestand A**

1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Anzahl der Tiere
1	1	1	1	8
1	1	1	n. d.	7
1	1	0	1	2
1	0	1	1	3
0	1	1	1	5
0	1	1	n. d.	4
0	1	1	0	1
0	1	0	1	3
0	0	1	1	11
1	0	0	1	2
1	0	0	n. d.	2
0	1	0	0	1
0	0	1	n. d.	12
0	0	1	0	8
0	0	0	1	20
0	0	0	n. d.	40
0	0	0	0	98

Legende:

0 – Kotprobe negativ oder kontaminiert

227

1 – Kotprobe Map positiv

n. d. – nicht durchgeführt

Tab. 63: Sensitivitäten der Kotkultur für 89 Tiere des **Bestandes A** über 3 Untersuchungen

	Untersuchung		
	1	2	3
n = 89 kotpositive Tiere (mit 4. Untersuchung)			
Anzahl kotpositiver Tiere von n pro Einzeluntersuchung	24	31	59
Sensitivität der Einzeluntersuchung	26,9 %	34,8 %	66,3 %
Sensitivität kumulativ	26,9 %	42,6 %	77,5 %

4.7.2 Verlauf der Kotbefunde bei mehrfach untersuchten Tieren aus dem Bestand B und Einfluss der Wiederholung auf die Testsensitivität

Im Bestand B wurden 284 Tiere 3mal in Folge, im Abstand von jeweils 5–7 Monaten, koprologisch untersucht (Tab. 64). Bei 135 Tieren erfolgte die kulturelle Untersuchung einer vierten Kotprobe.

Tab. 64: Kotbefunde bei mehrfacher Untersuchung von Einzeltieren – **Bestand B**

1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Anzahl der Tiere
1	1	1	n. d.	4
0	1	1	n. d.	8
1	0	0	0	1
0	1	0	n. d.	6
0	1	0	1	1
0	1	0	0	2
0	0	1	n. d.	17
0	0	1	1	2
0	0	1	0	2
0	0	0	1	8
0	0	0	n. d.	114
0	0	0	0	119

Legende:

0 – Kotprobe negativ oder kontaminiert

284

1 – Kotprobe Map positiv

n. d. – nicht durchgeführt

Tab. 65: Sensitivitäten der Kotkultur für 51 Tiere des **Bestandes B** über 3 Untersuchungen

n = 51 kotpositive Tiere (mit 4. Untersuchung)	Untersuchung		
	1	2	3
Anzahl kotpositiver Tiere von n pro Einzeluntersuchung	5	21	33
Sensitivität der Einzeluntersuchung	9,8 %	41,2 %	64,7 %
Sensitivität kumulativ	9,8 %	43,1 %	84,3 %

Im Verlauf der Untersuchungen erwiesen sich 51 Tiere als kotpositiv, wobei 43 infizierte Tiere mit der Untersuchung von 3 Kotproben in Folge sicher als Map-Ausscheider erkannt wurden. Der Erregernachweis erfolgte bei 8 Tieren erst mit einer 4. Kotuntersuchung. Die Sensitivitäten der Einzeluntersuchungen nahmen stetig zu, die kumulative Sensitivität aus 3 Einzeluntersuchungen für **51 infizierte Tiere** des **Bestandes B** betrug **84,3 %** (Tab. 65).

4.8 Mehrfache Wiederholung serologischer Untersuchungen von Einzeltieren – Einflüsse auf Sensitivitäten und Spezifitäten der ELISA-Verfahren

Kotpositive Tiere wurden mehrfach in Folge serologisch untersucht (serologische Befunde aus 1.–5. Bestandsuntersuchung, Kotbefunde aus 2.–5. Bestandsuntersuchung). Auf die Auswertung der individuell sehr verschiedenen Verläufe der serologischen Befunde bei infizierten Einzeltieren und die simultane Analyse der Kotausscheidung musste aufgrund der großen Vielfalt in dieser Arbeit verzichtet werden. Für 93 kotpositive Tiere des Bestandes A wurden, z. B. 18 verschiedene Verläufe der Svanovir-Blut-Befunde über 3 Untersuchungen ermittelt (u. a. folgende Verläufe: 3fach negativ, 3fach fraglich, negativ-positiv-negativ, fraglich-positiv-negativ). Dabei wurde auch die Kotausscheidung zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und war nur bei wenigen Tieren bei 3 von 3 Untersuchungen nachweisbar. Der individuelle Verlauf der serologischen Befunde und die Detektion der Kotausscheidung zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wurde für 2 Tiere des Bestandes A stellvertretend dargestellt (Abb. 51).

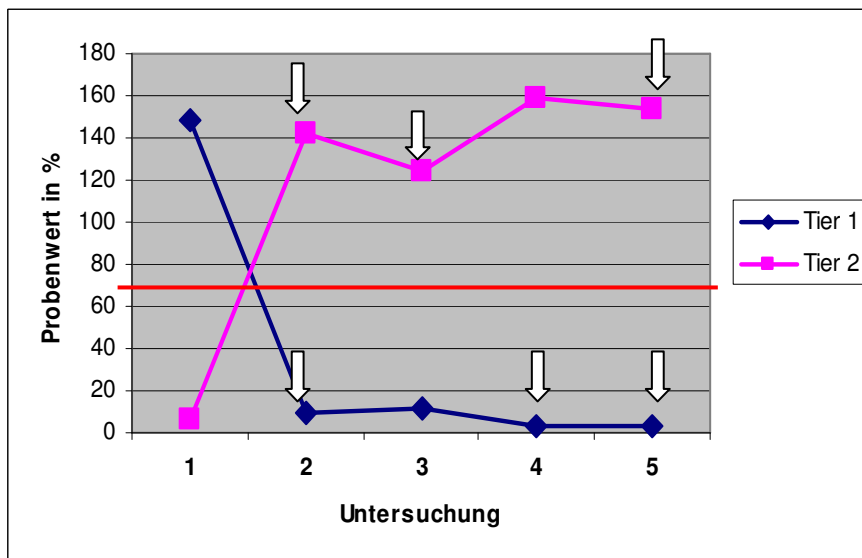


Abb. 51 Verläufe der Pourquier-Blut-ELISA-Befunde und der Kotausscheidung bei 2 Tieren aus dem Bestand A

Legende:



- Ermittlung eines positiven Kotbefundes



- Grenze zwischen fraglichem und positivem Bereich; Probenwert: $\geq 70\%$ = positiver Pourquier-ELISA-Befund

Um den Einfluss der Wiederholungen serologischer Untersuchungen auf die Sensitivitäten und Spezifitäten der angewandten ELISA-Testverfahren zu prüfen wurden die Testergebnisse von Tieren ausgewertet, die mindestens an drei Untersuchungen in Folge teilnahmen. Die Sensitivitäten und Spezifitäten der Einzeluntersuchungen wurden berechnet, sowie die kumulativen Sensitivitäten und Spezifitäten der Testverfahren aus der Zusammenfassung der Befunde der 3 Untersuchungen. Die Ergebnisse der Einzeltiere wurden für die Bestände getrennt dargestellt (Tabellen 96 bis 103, Anhang 9.2).

4.8.1 Einfluss der Wiederholung blutserologischer Untersuchungen auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren

Das Blutserum 93 kotpositiver Tiere (1.–5. Bestandsuntersuchung) des **Bestandes A** wurde 3mal in Folge mit dem **Svanovir-ELISA** untersucht. Bei 30,1 % der teilnehmenden Tiere wurde im Rahmen der Untersuchungen mindestens ein positiver serologischer Befund erhoben (Tab. 66). Die kumulative Sensitivität war gegenüber den Testsensitivitäten der 1. und 2. Untersuchung signifikant höher.

Tab. 66: Sensitivitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand A**

Svanovir Blut A (n=93)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	14	10	21	28
Sensitivität	15,1 %	10,8 %	22,6 %	30,1 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	7,8- 22,3 %	4,5- 17,1 %	14,1- 31,1 %	20,8- 39,4 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,023 *	p= 0,002 *	p= 0,318	

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Im **Bestand B** wurde das Blutserum von 52 infizierten Tieren 3malig untersucht und 21,2 % der 3fach untersuchten Tiere wiesen mindestens einen seropositiven Befund innerhalb von 3 Untersuchungen auf (Tab. 67). Die Sensitivität der 2. Untersuchung war signifikant geringer als die kumulative Sensitivität. Die Sensitivitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** unterschieden sich bei 3maliger Untersuchung identischer Tiere für die **Bestände A** und **B** (30,1 % und 21,2 %) nicht signifikant (Fisher's exakt Test: p=0,329).

Tab. 67: Sensitivitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand B**

Svanovir Blut B (n=52)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	5	3	7	11
Sensitivität	9,6 %	5,8 %	13,5 %	21,2 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	1,6- 17,4 %	0- 12,1 %	4,2- 22,7 %	10,1- 32,3 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,173	p= 0,041 *	p= 0,437	

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Das Blutserum infizierter Tiere des Bestandes A wurde 3mal in Folge mit dem Pourquier-ELISA getestet (Tab. 68). Die Testsensitivitäten der Einzeluntersuchungen unterschieden sich nicht von der kumulativen Sensitivität.

Tab. 68: Sensitivitäten des **Pourquier-Blut-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand A**

Pourquier Blut A (n=93)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	5	5	10	11
Sensitivität	5,4 %	5,4 %	10,8 %	11,8 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	0,8- 10,0 %	0,8- 10,0 %	4,5- 17,1 %	5,3- 18,4 %
<u>Fisher`s exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,189	p= 0,189	p= 0,999	

Im Bestand B wurden 52 kotpositive Tiere ebenfalls 3mal in Folge mit dem Pourquier-Blut-ELISA untersucht (Tab. 69). Während der ersten Untersuchung wurde kein infiziertes, kotpositives Tier durch den ELISA-Test identifiziert. Durch die 3fache Wiederholung des Tests wurde keine signifikante Steigerung der Sensitivität erzielt (Fisher`s exakt Test: $p=0,056$).

Die kumulativen **Sensitivitäten des Pourquier-Blut-ELISA** waren für die **Bestände A und B** (11,8 % und 9,6 %) nicht signifikant verschieden (Fisher`s exakt Test: $p=0,787$).

Tab. 69: Sensitivitäten des **Pourquier-Blut-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand B**

Pourquier Blut B (n=52)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	0	2	4	5
Sensitivität	0 %	3,9 %	7,7 %	9,6 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	-	0- 9,1 %	0,5- 14,4 %	1,6- 17,6 %
<u>Fisher`s exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,06	p= 0,437	p= 1	

4.8.2 Einfluss der Wiederholung milchserologischer Untersuchungen auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren

Für die 3malige Testung des Milchserums 76 kotpositiver Tiere des Bestandes A wurde eine kumulative Sensitivität des Svanovir-ELISA von 25 % errechnet (Tab. 70). Die kumulative Sensitivität unterschied sich signifikant von der Sensitivität der 1. Untersuchung.

Tab. 70: Sensitivitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand A**

Svanovir Milch A (n=76)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	8	9	14	19
Sensitivität	10,5 %	11,8 %	18,4 %	25,0 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	3,6- 17,4 %	4,6- 19,1 %	9,7- 27,1 %	15,3- 34,7 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,032 *	p= 0,058	p= 0,432	

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Im Bestand B wurde eine kumulative Sensitivität des Svanovir-Milch-ELISA bei mehrfacher Untersuchung kotpositiver Tiere von 15,2 % berechnet (Tab. 71). Die kumulative Sensitivität unterschied sich nicht signifikant von den Sensitivitäten, die bei 3 Einzeluntersuchungen ermittelt wurden.

Tab. 71: Sensitivitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand B**

Svanovir Milch B (n=46)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	1	3	5	7
Sensitivität	2,2 %	6,5 %	10,9 %	15,2 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	0,2- 6,4 %	0- 13,7 %	1,9- 19,9 %	4,8- 25,6 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,058	p= 0,315	p= 0,758	

Die kumulativen **Sensitivitäten in den Beständen A und B** unterschieden sich für den **Svanovir-Milch-ELISA** (25,0 % und 15,2 %, Fisher's exakt Test: p=0,256) sowie für den **Pourquier-Milch-ELISA** (23,7 % und 13,0 %, Fisher's exakt Test: p=0,168) nicht signifikant (Tabellen 72 und 73). Die Pourquier-Milch-ELISA-Sensitivitäten der ersten Untersuchungen

waren in beiden Beständen signifikant geringer als die kumulativen Sensitivitäten aus 3 Untersuchungen.

Tab. 72: Sensitivitäten des **Pourquier-Milch-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand A**

Pourquier Milch A (n=76)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	7	9	15	18
Sensitivität	9,2 %	11,8 %	19,7 %	23,7 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	2,7- 15,7 %	4,6- 19,1 %	10,8- 28,7 %	14,1- 33,2 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,027 *	p= 0,088	p= 0,694	

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Tab. 73: Sensitivitäten des **Pourquier-Milch-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand B**

Pourquier Milch B (n=46)	Untersuchung			Sensitivität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl positiver Befunde	0	3	4	6
Sensitivität	0 %	6,5 %	8,7 %	13,0 %
95%-Konfidenzintervall der Sensitivität	-	0- 13,7 %	0,6- 16,8 %	3,3- 22,8 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Sensitivität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Sensitivität	p= 0,026 *	p= 0,485	p= 0,739	

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

4.8.3 Einfluss der Wiederholung blutserologischer Untersuchungen auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren

Kotnegative, Paratuberkulose unverdächtige Tiere (n=404) aus dem Bestand C wurden 3mal in Folge blutserologisch untersucht. Die Spezifitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** der Einzeluntersuchungen unterschieden sich signifikant von der kumulativen Spezifität. Ein durchgehend negatives serologisches Testergebnis wiesen 242 von 404 Tieren auf (Tab. 74). Bei 162 Tieren wurde im Rahmen der 3 Untersuchungen mindestens ein nicht-negativer Befund erhoben. Die Spezifität des Svanovir-Blut-ELISA wurde durch mehrmaliges Untersuchen signifikant reduziert.

Tab. 74: Spezifitäten des **Svanovir-Blut-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand C**

Svanovir Blut C (n=404)	Untersuchung			Spezifität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl negativer Befunde	333	296	320	242
Spezifität	82,4 %	73,3 %	79,2 %	59,9 %
95%-Konfidenzintervall der Spezifität	78,7- 86,1 %	69,0- 77,6 %	75,3- 83,2 %	55,1- 64,7 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Spezifität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Spezifität	p= 1,694e-12*	p= 0,0001*	p= 3,161e-9*	

Legende:

* - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Die Spezifitäten des **Pourquier-Blut-ELISA**, die über 3 Einzeluntersuchungen ermittelt wurden, unterschieden sich nicht signifikant von der insgesamt ermittelten Spezifität des Pourquier-ELISA (Tab. 75). Die Spezifität des Pourquier-ELISA wurde durch die Wiederholung blutserologischer Tests nicht signifikant reduziert.

Tab. 75: Spezifitäten des **Pourquier-Blut-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand C**

Pourquier Blut C (n=404)	Untersuchung			Spezifität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl negativer Befunde	401	399	403	397
Spezifität	99,3 %	98,8 %	99,8 %	98,3 %
95%-Konfidenzintervall der Spezifität	98,4- 100 %	97,7- 99,8 %	99,3- 100 %	97,0- 99,5 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Spezifität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Spezifität	p= 0,340	p= 0,773	p= 0,069	

Die kumulativen **Spezifitäten des Svanovir- und Pourquier-Blut-ELISA** (59,9 % und 98,3 %) unterschieden sich signifikant (Fisher's exakt Test $p=0,124e-47$ *).

4.8.4 Einfluss der Wiederholung milchserologischer Untersuchungen auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren

Das Milchserum Paratuberkulose unverdächtigter Tiere des Bestandes C wurde 3mal in Folge serologisch untersucht. Bei 94 Tieren wurde innerhalb der 3 Untersuchungen mindestens ein nicht-negativer Befund erhoben (Tab. 76). Die Spezifitäten des **Svanovir-ELISA**

der 3 Einzeluntersuchungen waren signifikant erhöht gegenüber der kumulativen Spezifität aus 3 Untersuchungen.

Tab. 76: Spezifitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand C**

Svanovir Milch C (n=285)	Untersuchung			Spezifität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl negativer Befunde	231	250	252	191
Spezifität	81,1 %	87,7 %	88,4 %	67,0 %
95%-Konfidenzintervall der Spezifität	76,5- 85,6 %	83,9- 91,5 %	84,7- 92,1 %	61,6- 72,5 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Spezifität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Spezifität	p= 0,0002*	p= 3,932e-9*	p= 8,565e-10*	

Legende: * - signifikantes Testergebnis bei Anwendung des Fisher's exakt Test

Innerhalb von 3 **Pourquier-Milch-ELISA-Untersuchungen** wiesen 4 von 285 Tieren nicht-negative Befunde auf (Tab. 77). Die ermittelte Gesamtspezifität von 98,6 % unterschied sich nicht signifikant von den Spezifitäten der Einzeluntersuchungen.

Tab. 77: Spezifitäten des **Pourquier-Milch-ELISA** bei wiederholten Untersuchungen im **Bestand C**

Pourquier Milch C (n=285)	Untersuchung			Spezifität kumulativ
	1	2	3	
Anzahl negativer Befunde	283	283	283	281
Spezifität	99,2 %	99,2 %	99,2 %	98,6 %
95%-Konfidenzintervall der Spezifität	98,3- 100 %	98,3- 100 %	98,3- 100 %	97,2- 99,9 %
<u>Fisher's exakt Test:</u> Spezifität der Einzeluntersuchung vs. kumulative Spezifität	p= 0,686			

Die kumulative **Spezifität des Pourquier-Milch-ELISA** (98,6 %) war gegenüber der **Spezifität des Svanovir-Milch-ELISA** (67 %) bei mehrfacher Untersuchung einer ausgewählten Tiergruppe signifikant höher (Fisher's exakt Test: p=4,676e-47).

5. DISKUSSION

5.1 Paratuberkuloseprävalenzen in den Beständen A und B

Im Rahmen eines „Paratuberkulose Projektes“ erfolgte der kulturelle Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 2 von 3 untersuchten Thüringer Milchviehherden (Bestand A und B), ein dritter Bestand (C) erwies sich als „Paratuberkulose unverdächtig“.

Die **Paratuberkuloseprävalenz des Bestandes A** wurde zuvor auf der Basis serologischer und kultureller Untersuchungen als hoch eingeschätzt worden. In den eigenen Untersuchungen schieden **30,3 %** der Einzeltiere des Bestandes A Map mit dem Kot aus, so dass die Ergebnisse der Voruntersuchungen bestätigt wurden. Im Rahmen der blutserologischen Untersuchungen wurden **16 %** von 1.534 untersuchten Blutproben des Bestandes A als positiv bei der Anwendung des Svanovir-Blut-ELISA bewertet, dieser war als sensitivster serologischer Test eingestuft worden. Die ermittelte Seroprävalenz bei der Zusammenfassung von 5 Gesamtbestandsuntersuchungen lag damit unterhalb der mittels kotkultureller Untersuchungen ermittelten Prävalenz.

Eine mittlere Paratuberkuloseprävalenz wurde bei serologischen Voruntersuchungen im Bestand B festgestellt. In diesem Bestand erfolgte während der eigenen Untersuchungen häufiger als zuvor erwartet der Nachweis kotpositiver Tiere. Als Map-Ausscheider wurden **20,3 %** der 792 untersuchten Einzeltiere erkannt, somit war die **Paratuberkuloseprävalenz des Bestandes B** nach den Ergebnissen des Projektes ebenso als hoch anzusehen.

Im Bestand B wurden bei der Untersuchung von 1.948 Blutproben mit dem Svanovir-ELISA **9,9 %** der Proben positiv bewertet, so dass auch im Bestand B die ermittelte Paratuberkuloseprävalenz bei der Anwendung der kulturellen Diagnostik deutlich höher als die ermittelte Seroprävalenz war.

Da sowohl die Sensitivitäten der kulturellen Anzucht als auch der serologischen Testverfahren begrenzt sind, handelt es sich bei den ermittelten Nachweisraten lediglich um „**scheinbare Prävalenzen**“. Die vorliegenden Ergebnisse belegen jedoch, dass bei der alleinigen Anwendung von ELISA-Testverfahren die „scheinbaren Paratuberkuloseprävalenzen“ in beiden Herden geringer waren als die Prävalenzen, die mittels Kotkultivierung ermittelt wurden. In anderen Studien wurde zuvor ebenfalls gezeigt, dass Fehleinschätzungen der Herdenprävalenzen bei der ausschließlichen Anwendung serologischer Testverfahren möglich sind. Als Ursache wurde dabei die geringe Sensitivität der ELISA-Tests in subklinisch infizierten Herden angesehen (Collins et al. 1991, Bech-Nielsen et al. 1992, Whitlock et al. 2000, Dargatz et al. 2001, Sweeney et al. 2006). Schätzungen der „wahren Herdenprävalenzen“ und der Prävalenzen in einzelnen Ländern sind derzeit aufgrund des Mangels an geeigneten Testsystemen nicht möglich (Nielsen und Toft 2008), daneben sind einzelne Untersuchungen aufgrund unterschiedlicher Studienabläufe und der Anwendung diverser Testverfahren nicht miteinander vergleichbar.

5.2 Entwicklung der Kotbefunde in den Beständen A und B

In den Beständen A und B waren im Verlauf von 4 Gesamtbestandsuntersuchungen, unterschiedliche Entwicklungen der Kotbefunde zu beobachten. Im **Bestand A** wurde eine Zunahme des Anteils doppelt positiver als auch einfach positiver Kotbefunde ermittelt. Der

prozentuale Anteil kotpositiver Tiere stieg von 12,5 % bei der 2. Bestandsuntersuchung auf 26,7 % bei der 5. Bestandsuntersuchung an. Die Zunahme des prozentualen Anteils erkannter Ausscheider, sowie der Anstieg des Anteils starker Ausscheider ist auf unzureichende Merzungen infizierter Tiere, sowie auf mangelhafte Managementmaßnahmen zurückzuführen. Aus wirtschaftlichen Gründen verblieben erkannte Ausscheider weiterhin im Bestand. So befanden sich Einzeltiere noch bis zu 3 Jahre nach ihrer Erkennung in der Herde. Auch das Abkalbmanagement im Bestand A war unzureichend. Erkannte Ausscheider kalbten nicht räumlich getrennt, sondern gemeinsam mit anderen Tieren in Anbindehaltung ab. Die Kälber wurden nur tagsüber sofort nach der Geburt von der Mutter getrennt. Die Zunahme des Anteils kotpositiver Tiere im Bestand A spricht somit dafür, dass sich die Infektionskrankheit im Untersuchungszeitraum weiter ausbreiten konnte.

Im **Bestand B** schwankte der prozentuale Anteil der ermittelten Ausscheider zwischen den einzelnen Untersuchungen zwischen 8,1 % und 14,1 %. Auch die Anzahl der stark ausscheidenden Einzeltiere variierte zwischen den Gesamtbestandsuntersuchungen signifikant. Dies war mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Folge der regelmäßigen Merzungen von Ausscheidertieren. Mit guten Managementmaßnahmen, wie z. B. separaten Abkalbebuchten und der sofortigen Trennung von Muttertier und Kalb *post partum* versuchte der Bestand B, die von der Thüringer Tierseuchenkasse geforderte „Paratuberkulosefreie Jungtieraufzucht“ umzusetzen. Dennoch schieden im Untersuchungszeitraum nachrückende Jungtiere bereits im Alter zwischen 2 und 3 Jahren Map mit dem Kot aus und erhöhten somit wiederum den prozentualen Anteil der ermittelten Ausscheider. Die vorliegenden Erkenntnisse belegen somit, dass in den vorangegangenen Jahren vermehrt die Infektion von Jungtieren stattfand. In den Jahren 2000 bis 2003 wurden im Bestand B überwiegend serologische Untersuchungen durchgeführt. Nach den Ergebnissen des Projektes, wurde dabei ein unzureichender Anteil infizierter Tiere erkannt und gemerzt, so dass sich die Infektionskrankheit Paratuberkulose weiter im Bestand ausbreiten konnte.

5.3 Wiederholung kotkultureller Untersuchungen

Die mehrfache Wiederholung kotkultureller Untersuchungen zum Nachweis von Map wird häufig, aufgrund der langen Kultivierungszeiten und der hohen Kosten, als zu aufwändig angesehen. Für Teilnehmer am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens“ übernimmt die TSK momentan einen beträchtlichen Teil der Untersuchungskosten (10 von 16 € für die Untersuchung einer Kotprobe). Trotz der höheren finanziellen Aufwendungen für die kotkulturelle Diagnostik, gegenüber den Kosten für die serologische Diagnostik (2 bis 4 €/Probe), zeigten die Ergebnisse des Projektes, dass die Aussagekraft kotkultureller Untersuchungen besonders bei der Durchführung von Wiederholungsuntersuchungen sehr hoch ist. Ein wichtiger Vorteil ist dabei die hohe Spezifität der kulturell-molekularbiologischen Paratuberkulosedagnostik von 100 % (Chiodini et al. 1984, Sockett et al. 1992a, b). Die Sensitivität der Methode wurde auf maximal 50 % geschätzt (Mc Nab et al. 1991), sie wird zusätzlich durch tiereigene und methodische Faktoren eingeschränkt. Zu den tiereigenen Einflussfaktoren zählen die unregelmäßige Ausscheidung des Erregers bei subklinisch infizierten Tieren und die Ausscheidung geringer Erregermengen in frühen Erkrankungsphasen (Whitlock et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Befunde von ausgewählten Tieren aus den Beständen A und B, die mindestens 3mal in Folge koprologisch untersucht wurden ausgewertet. Durch die kumulative Auswertung der Untersuchungsbefunde erhöhte sich der Anteil erkannter Ausscheider signifikant. Auch in einer anderen Studie wurde nachgewiesen, dass die Anzahl identifizierter Ausscheider und somit die Sensitivität der Methode mit jeder Wiederholungsuntersuchung zunimmt (Whitlock et al. 2000), in dieser Untersuchung wurde die kumulative Anzahl kotpositiver Tiere aus einer ursprünglichen Kohorte von 954 Tieren erfasst, wobei sich 210 Tiere der Kohorte innerhalb von 8 Untersuchungen als kotpositiv erwiesen. Die Sensitivität der kulturellen Map-Anzüchtung aus Kot konnte somit in dieser Studie von 38 % bei der ersten Untersuchung auf 82 % bei der 4. Untersuchung und 100 % bei der 8. Untersuchung gesteigert werden. Auch in einer weiteren Studie mit 16 infizierten Tieren, die 3mal in Folge untersucht wurden, erfolgte eine Sensitivitätssteigerung des kotkulturellen Erregernachweises von 43,8 % bei der ersten auf 68,8 % und 100 % bei der 2. und 3. Untersuchung (Huda und Jensen 2003). Die eigenen Ergebnisse belegen in Übereinstimmung mit der Literatur, dass bei ausgewählten Tiergruppen bereits die einfache und zweifache Wiederholung der Kotuntersuchungen die Sensitivität der Kotkultivierung in beiden Beständen signifikant steigerte.

5.4 Methodische Einflüsse auf die kotkulturelle Paratuberkulosedagnostik

Die Untersuchungen zu den methodischen Einflussfaktoren auf die kotkulturelle Diagnostik zeigten, dass Einflüsse von der Lagerung, von der Dekontaminationsmethode und der Anzahl der eingesetzten Kulturröhrchen ausgingen. Auch die Art des Nährbodens beeinflusst den Erfolg der kulturellen Anzüchtung (Merkal und Curran 1974, Kalis et al. 1999, Nielsen et al. 2004), dies wurde jedoch im vorliegenden Projekt nicht untersucht.

5.4.1 Einfluss der Lagerung der Kotproben auf die Vitalität von Map

Zwei ursprünglich positive Kotproben (Nr. 9 und Nr. 17), die im Rahmen des Dekontaminationsversuches wiederholt untersucht wurden, zeigten beim Vergleich von 6 Dekontaminationsmethoden kein Koloniewachstum. Es ist davon auszugehen, dass eine Inaktivierung von Map durch die Lagerung der Kotproben bei -20°C über 8 Monate statt fand. Trotz der hohen Tenazität des Erregers wurde belegt, dass die Anzahl lebensfähiger Keime bei einer längeren Tiefkühlung von Kotproben signifikant reduziert wird (Richards und Thoen 1977, Richards 1981). Bei einer 3wöchigen Lagerung von Kotproben bei -20°C wurde die Erregerzahl zudem stärker als bei einer Lagerung bei -70°C reduziert (Khare et al. 2008). Es wurde geschlussfolgert, dass eine kurzzeitige Lagerung von Kotproben bei -20°C vermieden werden sollte, da die Vitalität des Erregers dabei signifikant reduziert wird. In die Untersuchungen wurde allerdings nur eine geringe Stichprobenanzahl (11 Kotproben) einbezogen. Aus diesem Grund sollten die Untersuchungen von Khare et al. (2008) zur Bestätigung der Ergebnisse mit einer größeren Stichprobenanzahl wiederholt werden. Aufgrund der mehrfach beschriebenen und in 2 Fällen auch in dem vorliegenden Projekt belegten negativen Effekte der Tiefkühlung auf die Lebensfähigkeit von Map, sollten Kotproben vor allem vor der Primärkultivierung nicht für längere Zeit tiefgekühlt gelagert werden. Besonders bei schwach erregerhaltigen Proben könnte die Reduktion der Erreger-

zahlen die erfolgreiche Map-Anzucht verhindern und so ein falsch negatives Ergebnis daraus resultieren.

5.4.2 Einfluss der Dekontamination auf das Wachstum von Myzeten

Kontaminationen der Kotkulturen mit Myzeten traten häufig bei Proben des Bestandes C auf. Die Problematik der Verpilzung von Kotkulturröhrchen wurde zuvor untersucht, durchschnittlich sind in Abhängigkeit von der lokalen Flora 10–21,6 % der Kotkulturen kontaminiert (Johansen et al. 2006, Turcotte et al. 1986). Hefen und Schimmelpilze sind als Kontaminanten in Silagen mit Konzentrationen von bis zu 9×10^8 KBE/g Silage zu finden und werden von Rindern mit dem Futter aufgenommen (Reyes-Velázquez et al. 2008). Hefen und Myzelien der Schimmelpilze werden verdaut, Sporen passieren ohne Verlust ihrer Lebensfähigkeit den Verdauungstrakt der Tiere (Gedek 2002). Pilzsporen können sich daher in großer Anzahl in rektal entnommenen Kotproben befinden und werden bei der Tiefkühlagerung der Kotproben nicht inaktiviert. Bei optimalen Wachstumsbedingungen erfolgt das Auskeimen der Sporen und die Bildung von Myzelien während der Kotkultivierung. In den eigenen Untersuchungen konnte eine nachträgliche Kontamination der Kotproben sicher ausgeschlossen werden, da die Proben sofort nach der Gewinnung in sterile, verschließbare Kotbecher aufgenommen wurden.

Einfluss der HPC-Dekontamination, der Temperatur- und Lichtverhältnisse während der Kultivierung auf das Myzetenwachstum

Nach der Öffnung der Kotbecher im Labor erfolgte sofort die Dekontamination der Kotproben. Die Dekontamination mit 0,75 %igem HPC über 96 h reduzierte die Anzahl kontaminierter Proben gegenüber einer 24stündigen HPC-Dekontamination signifikant. Dennoch wiesen 10 von 32 Kotproben und 31 % der Kulturröhrchen bei einer 4tägigen HPC-Einwirkzeit Kontaminationen, z. B. mit *Penicillium* oder *Cephalosporium ssp.* auf. HPC wirkt als quartäre Ammoniumverbindung in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration und der Schimmelpilzspezies fungizid oder fungistatisch (Bodenschatz 1997). Eine Ursache der begrenzten Wirksamkeit des HPC gegenüber Pilzkontaminationen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Unempfindlichkeit von Pilzsporen gegenüber der Chemikalie.

Die optimale, wachstumsfördernde Temperatur liegt bei der Mehrzahl der Mikromyzeten zwischen 20 und 25 °C (Gedek 2002). Dies entsprach den Raumtemperaturen während der Dekontaminationsphase im Labor. Es ist denkbar, dass während der HPC-Dekontamination bei Raumtemperatur vermehrt Sporen auskeimten und eine Inaktivierung der Myzeten stattfand. Aufgrund des häufigeren Auskeimens der Sporen, bei einer Verlängerung der Dekontaminationszeit, konnten somit bei der 96stündigen HPC-Einwirkzeit signifikant mehr Myzeten abgetötet und die Sporenkonzentration gesenkt werden. Dies würde die reduzierte Kontaminationsrate bei einer 96stündigen Einwirkzeit erklären. Da jedoch ein Teil der Sporen in den Proben überlebte und mit dem Inokulum auf den Nährboden verimpft wurde, fand auch bei länger dekontaminierten Proben ein Pilzwachstum in der Kultur statt.

Die HPC-Konzentration ist, nach dem Verimpfen des Inokulums, in den Kotkulturröhrchen nur noch sehr gering und mit zunehmender Kultivierungszeit zerfällt verbliebenes HPC vollständig, dies ermöglicht, vermutlich v. a. in den späteren Kultivierungswochen, das

Wachstum von Pilzen. So war zwischen der 8. und 16. Kultivierungswoche gegenüber der 1. bis 8. Kultivierungswoche bei allen Dekontaminationsmethoden ein stärkeres Pilzwachstum zu beobachten. Das Pilzwachstum setzte auch in einer anderen Studie mitunter erst im 4. Inkubationsmonat ein. Diese Ergebnisse sprechen ebenso für das verzögerte Auskeimen von Pilzsporen in der Kotkultur, als Folge des zunehmenden Abbaus des Dekontaminationsmittels (Turcotte et al. 1986).

Weiterhin ist bekannt, dass der Einfluss von Licht die Bildung von Sporen und Fruchtkörpern bei höheren Pilzen fördert. Insbesondere der Wechsel zwischen UV-A-Strahlung und absoluter Dunkelheit soll die Ausbildung von Konidien bei einigen Mikromyzeten stimulieren (Gedek 2002). Es ist denkbar, dass durch das regelmäßige Ablesen der Kulturröhrchen bei Tageslicht in 2wöchigen Abständen eine zusätzliche Stimulation des Pilzwachstums stattfand.

Einfluss von antimikrobiellen Zusätzen auf das Myzetenwachstum

Dem kommerziellen Nährboden waren zwei Antibiotika und ein Antimykotikum zugesetzt. Die antibiotischen Wirkstoffe verhinderten erfolgreich das Wachstum von Bakterien z. B. durch auskeimende bakterielle Endosporen in der Kotkultur. Zur Bekämpfung der Kontaminationen mit Pilzen wurde der Einsatz des schwer löslichen Wirkstoffes Amphotericin B empfohlen (Merkal und Richards 1972). Amphotericin B reduzierte als Antimykotikum das Wachstum von Pilzen in den durchgeführten Untersuchungen nicht signifikant. Aufgrund der langen Kultivierungszeiten bei der Anzucht von Map ist der Einsatz antimykotisch wirksamer Substanzen in der Kotkultur offenbar wenig effizient (Johansen et al. 2006). Ein schneller Abbau der zugesetzten Wirkstoffe ist wahrscheinlich, währenddessen überleben die Pilzsporen und keimen zu einem späteren Zeitpunkt aus. In den eigenen Untersuchungen erbrachte der Zusatz einer hochkonzentrierten Amphotericin B-Lösung zum Inokulum (Dekontaminationsmethode f) keine gesteigerte Inaktivierung der Myzeten, da insgesamt 39 % der eingesetzten Röhrchen in der 16. Kultivierungswoche Pilzkontaminationen aufwiesen. Mögliche Gründe dafür sind die begrenzte Stabilität, die Unwirksamkeit des Amphotericin B gegenüber den Pilzsporen sowie Resistenzen der Myzeten. In Bioassays mit 0,8 µg Amphotericin B/ml Kulturmedium und 37°C wurde eine Halbwertszeit des Wirkstoffes von 24 h detektiert (Cheung et al. 1975). Die begrenzte Stabilität des Amphotericin B, vor allem bei höheren Temperaturen, scheint die Hauptursache für seine eingeschränkte Wirksamkeit bei der kotkulturellen Anzüchtung von Map zu sein. Die Resistenzlage des Breitspektrumantimykotikums Amphotericin B wird allgemein als günstig eingeschätzt. Primäre als auch sekundäre Resistenzen gegenüber dem Wirkstoff, der an das Ergosterol in den Zellmembranen der Pilze bindet, sind jedoch bekannt (Morschhäuser 2003).

Auch andere Antimykotika wurden bei der Kultivierung von Map zur Reduktion von Pilzkontaminationen erfolgreich eingesetzt, z. B. Natamycin (Johansen et al. 2006). Amphotericin B und Natamycin zählen zu einer Stoffgruppe mit identischem Wirkungsmechanismus, deshalb könnten, wie beim Einsatz von Amphotericin B, Resistenzen bei Pilzen vorliegen. Ein direkter Vergleich der Wirksamkeit von Natamycin und Amphotericin B wurde in den Untersuchungen von Johansen et al. (2006) nicht vorgenommen. Ein deutlicher Vorteil des Natamycins gegenüber der Verwendung von Amphotericin B, ist jedoch die hohe Stabilität des Wirkstoffes (Pedersen 1992).

Die häufigen Kontaminationen bei der Anwendung der Doppelinkubationsmethode (Shin 1989), bei der zunächst das Auskeimen und anschließend die Inaktivierung der Kontaminanten mit einer antibiotisch-antimykotisch wirksamen Lösung erfolgen soll, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Verbleiben von Sporen in der Suspension und die unzureichende Stabilität der Wirkstoffe zurück zu führen. Bei dieser Methode wird eine Zentrifugation der Proben eingesetzt. Durch die Zentrifugation wird die Sporenkonzentration des Inokulums vermutlich zusätzlich erhöht. Die Erhöhung der Kontaminationsraten, nach einer Zentrifugation im Rahmen des Dekontaminationsverfahrens, wurde zuvor auch in anderen Studien nachgewiesen (Whitlock und Rosenberger 1990, Kim et al. 1989, Stabel 1997a).

Um zukünftig die Qualität der Kotkultivierung zu optimieren, sollte die Verwendung weiterer Antimykotika und auch die Anwendung von Mischungen verschiedener Antimykotika untersucht werden. Dabei sollte getestet werden, in welcher Anwendungsform, im Agar oder als Lösung, die Wirkstoffe am längsten stabil vorliegen, um über einen möglichst langen Zeitraum Pilzkontaminationen während der 16wöchigen Kotkultivierung zu inhibieren. Um die Kosten der Kotkultivierung, durch den Einsatz zusätzlicher Hemmstoffe, nicht generell zu erhöhen könnten spezielle Antimykotikamischungen auch gezielt ausschließlich bei „Problembeständen“ eingesetzt werden.

5.4.3 Einfluss der Dekontamination auf das Wachstum von Map

Die optimale Dekontaminationsmethode, bei der Untersuchung von Kotproben auf das Vorkommen von Map, sollte effektiv gegen die unerwünschte Begleitflora wirken und dabei den geringsten inhibitorischen Effekt auf das Wachstum des Erregers ausüben (Gwozdz et al. 2000). Vermutlich wird durch jede Aufarbeitungsmethode die Anzahl lebender Paratuberkuloseerreger reduziert (Reddacliff et al. 2003). Bei einer zu geringen Dekontamination besteht das Risiko, dass insbesondere Hefen und Pilze den Nährboden bewachsen. Eine zu starke Dekontamination birgt die Gefahr, Map zu inaktivieren und falsch negative Ergebnisse zu erzeugen (Stabel 1997a).

In der 4. Kultivierungswoche des Dekontaminationsversuches war die Anzahl der Kotkulturröhrchen, die ein Map-Wachstum aufwiesen bei den verglichenen Dekontaminationsmethoden a, b, c, e und f gegenüber der Methode d signifikant erhöht. Jedoch unterschied sich die Anzahl bewachsener Kulturröhrchen zwischen den verschiedenen Dekontaminationsmethoden bereits ab der 6. Kultivierungswoche nicht mehr signifikant. Das anfänglich verzögerte Wachstum weist auf eine Schädigung des Bakteriums durch die verlängerte HPC-Einwirkzeit hin. In anderen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass HPC Map schädigen kann und das Wachstum des Erregers somit hemmt (Mokresh et al. 1989, Reddacliff et al. 2003, Stich et al. 2004), so wurde eine Reduktion der Map-Keimzahl in Kotproben um 2 log-Stufen (Stich et al. 2004) und 2,7 log-Stufen (Reddacliff et al. 2003) ermittelt. Als Ursachen dafür benannten die Autoren die Bindung des Erregers an Kotbestandteile und die schädigende Wirkung des HPC. Daneben wurde nachgewiesen, dass die Höhe der HPC-Konzentration das Ausmaß der Map-Schädigung beeinflusst (Johansen et al. 2006). Beim Vergleich verschiedener HPC-Konzentrationen bei einer Einwirkzeit von 24 h, verzögerte eine HPC-Konzentration von 32,22 mg/ml das Map-Wachstum, bei höheren Konzentrationen erfolgte eine Schädigung des Erregers. In den eigenen

Untersuchungen wurde zur Dekontamination eine 0,75 %ige HPC-Lösung eingesetzt, das entsprach einer Konzentration von 7,5 mg/ml, es handelte sich also nach den Angaben vorheriger Untersuchungen um eine nicht Map-schädigende HPC-Konzentration.

Während in der Studie von Johansen et al. (2006) gezeigt wurde, dass die HPC-Konzentration das Map-Wachstum maßgeblich beeinflusst, wurde in den eigenen Untersuchungen nachgewiesen, dass auch eine verlängerte HPC-Einwirkzeit das Wachstum des Erregers verzögerte.

Im Dekontaminationsversuch wurde bei 2 Methoden (e und f) eine Zentrifugation der Proben angewendet. Die Map-Nachweisrate war dabei gegenüber den Sedimentationsmethoden nicht erhöht, dies wurde jedoch hingegen der eigenen Ergebnisse zuvor beschrieben (Kim et al. 1989, Stabel 1997a, Reddacliff et al. 2003).

Während der Dekontamination wirken viele Faktoren gleichzeitig, so z. B. die Art der eingesetzten Desinfektionsmittel, Antimykotika, Antibiotika, die Höhe der jeweiligen Konzentrationen der Chemikalien, die jeweiligen Einwirkzeiten und die Anwendung von Sedimentations- oder Zentrifugationsverfahren. In vielen Studien wurden diese Faktoren ausschließlich in unterschiedlichen Kombinationen untersucht, um möglichst schnell die effektivste Dekontaminationsmethode zu ermitteln. Um den tatsächlichen Einfluss jedes Faktors zu beurteilen, sollten zukünftig weitere Studien durchgeführt werden, in denen Einflussgrößen unabhängig voneinander untersucht werden.

5.4.4 Einfluss der Anzahl eingesetzter Kulturröhrchen auf die Ergebnisse der Kotkultivierung und Auswertung der Map-Wachstumszeiten

Die Abhängigkeit der Sensitivität der Kotkultivierung von der Anzahl verwendeter Kulturröhrchen pro Kotprobe wurde bisher nur in wenigen Studien betrachtet. In den eigenen Untersuchungen wurden im Projektzeitraum je 2 HEYM-Kulturröhrchen für die Bebrütung einer aufgearbeiteten Kotprobe eingesetzt. Hingegen dazu erfolgte in einem zusätzlichen Dekontaminationsversuch die Verwendung von jeweils 3 Kulturröhrchen. Durch den Einsatz des 3. Röhrchens erhöhte sich die sichere Map-Nachweisrate von durchschnittlich 73 % auf 88 %. Die eigenen Berechnungen ähneln den Ergebnissen einer anderen Untersuchung in der 4 Kulturröhrchen pro Kotprobe eingesetzt wurden (Crossley et al. 2005). Die Sensitivitätsverluste betragen in der verglichenen Studie 6 % beim Einsatz von nur 3 Kulturröhrchen und 12 % beim Einsatz von nur 2 Kulturröhrchen. Die Tatsache, dass bei einer überwiegend geringen Erregerausscheidung mit < 10 KBE/Kulturröhrchen in subklinisch infizierten Herden eine Vielzahl der Röhrchen kein Wachstum aufweist, unterstützt die Ansicht, dass der Einsatz von 4 HEYM-Röhrchen mit Mykobactin J pro Kotprobe notwendig ist, um die Map-Nachweisrate nicht zu reduzieren (Whitlock und Rosenberger 1990, Whipple et al. 1991, Crossley et al. 2005). Es ist davon auszugehen, dass im Rahmen der Untersuchungen mit nur 2 HEYM-Röhrchen ein Teil der subklinisch infizierten Tiere, die den Erreger nur schwach ausschieden, nicht identifiziert wurde. Erst die Wiederholung der Kotuntersuchungen ermöglichte zum Teil die Erkennung dieser Tiere. Andererseits ist es aus wirtschaftlichen Gründen, vor allem bei Gesamtbestandsuntersuchungen großer Herden, notwendig lediglich 1 bis 2 Kulturröhrchen pro Kotprobe zu verwenden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass auf diese Weise vor allem starke Ausscheider detektiert werden und ein Großteil der schwachen Ausscheider zunächst unentdeckt bleibt und möglicherweise erst Monate bis

Jahre später als Ausscheider identifiziert wird. Das bedeutet, dass die Bekämpfung und Sanierung der Erkrankung insgesamt länger andauert.

Bei der Auswertung der Map-Wachstumszeiten wurde in der 2. Kultivierungswoche nur bei wenigen Kulturen ein Koloniewachstum beobachtet. Folglich könnte das Ablesen der Kulturröhrchen in der 2. Kultivierungswoche eingespart werden. In einer anderen Studie erschienen 97 % aller Kolonien in den ersten 12 Kultivierungswochen (Whitlock et al. 1989), dieses Ergebnis wurde in den durchgeführten Untersuchungen bestätigt. Die 16wöchige Kultivierungszeit sollte dennoch vor allem bei länger untersuchten Herden, die regelmäßig infizierte Tiere merzen, nicht verkürzt werden (Kalis et al. 1999). Dies würde die Sensitivität der Kotkultivierung unter Umständen reduzieren, da die Erkennung schwach ausscheidender Tiere, bei denen Kolonien häufig erst spät erscheinen, verringert wäre.

5.5 Tierspezifische Einflüsse auf die kotkulturelle Paratuberkulosedagnostik

5.5.1 Alter

In den Untersuchungen zum Alterseinfluss auf die Kotausscheidung sollten folgende Fragen beantwortet werden: 1) In welchem Lebensalter ist die Wahrscheinlichkeit Map im Kot subklinisch infizierter Tiere zu detektieren am höchsten? und 2) Nimmt die Ausscheidungsintensität mit steigendem Lebensalter zu?

Im **Bestand A** war die Wahrscheinlichkeit Map in Kotproben kulturell zu detektieren bei infizierten Tieren, die mindestens ein Alter von 4 Jahren aufwiesen signifikant höher, zusätzlich nahm der Anteil starker Ausscheider im Bestand A mit steigendem Lebensalter zu. Dies entspricht den Ergebnissen einer anderen Untersuchung, in der der Anteil identifizierter Ausscheider ab einem Alter von 4 Jahren ebenfalls wie in den eigenen Untersuchungen um etwa 10 % anstieg (Kalis et al. 1999).

Im **Bestand B** unterschieden sich die Anteile ausscheidender Tiere zwischen den Altersgruppen nicht signifikant. Die unterschiedlichen Anteile ausscheidender Tiere in den verschiedenen Altersklassen in den Beständen A und B, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf betriebsspezifische Managementmaßnahmen zurück zu führen. Im Bestand B wurden identifizierte Ausscheider regelmäßig gemerzt. Eine Erhöhung des Anteils ausscheidender Tiere mit zunehmendem Lebensalter wurde somit durch die frühzeitige Erkennung und Merzung der Tiere verhindert.

Hingegen dazu verblieben im **Bestand A** kotpositive Tiere häufig noch lange Zeit im Bestand und der Anteil der Ausscheider, besonders der stark ausscheidenden Tiere, stieg mit zunehmendem Lebensalter. Die Beobachtung, dass eine fast lineare Zunahme der Häufigkeiten kotpositiver Tiere zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr erfolgt, konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden (Nielsen und Toft 2006), jedoch waren bestandsspezifische Unterschiede der Häufigkeiten der Map-Ausscheider in verschiedenen Altersgruppen nachweisbar.

In der Altersgruppe der 2–3jährigen Tiere des **Bestandes B** wurde ein signifikant höherer Anteil starker Ausscheider ermittelt. Möglicherweise erfolgte die stärkere Ausscheidung in diesem Lebensalter in Folge von Stress, welcher durch die Umstallung der Tiere, die erste Abkalbung und die neuen Belastungen während der 1. Laktation erzeugt wurde. Die Annahme, dass Stress sowie suboptimale Umweltbedingungen zu einer Verstärkung

(Whittington und Sergeant 2001) und optimale Haltungs- und Umweltbedingungen zu einer Abschwächung der Map-Ausscheidung beitragen, ist bisher noch nicht wissenschaftlich belegt worden und sollte untersucht werden.

Im **Bestand A** schieden bereits 15 % der 1,4 bis 2 Jahre alten Tiere und 20 % der 2 bis 3 Jahre alten Tiere den Erreger mit dem Kot aus. Im **Bestand B** wurden 13 % der 2 bis 3jährigen Tiere als Map-Ausscheider erkannt. Folglich erwies sich in beiden Beständen die koprologische Untersuchung junger Tiere als effektiv. Ähnliche Untersuchungsbefunde, die belegen, dass bereits Jungtiere Map in nachweisbaren Mengen mit dem Kot ausscheiden wurden zuvor publiziert, dabei waren 5,9 % der 13 bis 14 Monate alten Färsen kotpositiv (Kalis et al. 1999).

In der jüngsten Altersgruppe der 1,4 bis 2 Jahre alten Tiere war in den eigenen Untersuchungen der Anteil kontaminierter Kotproben signifikant erhöht. Ein möglicher Grund dafür ist, dass häufig qualitativ minderwertige Silagen an Jungtiere verfüttert werden. Bei der Entnahme von Kotproben bei Färsen, sollte daher die aktuelle Silagequalität beachtet werden. Wenn sichtbare Verderbnisprozesse vorliegen, ist vorläufig von einer Kotprobenentnahme abzuraten.

Die Wahrscheinlichkeit eines vermehrten Map-Nachweises bei höherem Lebensalter wurde nur in einem Bestand nachgewiesen. Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist eine gezielte Untersuchung von älteren Tieren nicht empfehlenswert, da so möglicherweise das wahre Infektionsgeschehen in einem Bestand nicht widerspiegelt wird. Daneben sollte angestrebt werden, infizierte Tiere möglichst frühzeitig zu identifizieren.

5.5.2 Laktationsphase

Zur Ermittlung eines optimalen Kotprobenentnahmezeitpunktes mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eines positiven Map-Nachweises bei infizierten Tieren wurde die Häufigkeit der Map-Ausscheidung in 4 Laktationsphasen verglichen. Der Einfluss der Laktationsphase auf die Map-Ausscheidung wurde zuvor kaum untersucht, wobei bislang vor allem die Ausscheidung um den geburtnahen Zeitraum betrachtet wurde. Die Angaben von Stabel und Goff (2004), dass um die Abkalbung keine verstärkte Map-Ausscheidung stattfindet, konnten in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Im **Bestand A** erfolgte der Erregernachweis signifikant häufiger im letzten Laktationsdrittel, dabei war vor allem der Anteil schwacher bis mittelstarker Ausscheider erhöht. Auch im **Bestand B** wurde in der 3. Laktationsphase die höchste Map-Ausscheidungshäufigkeit ermittelt, es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede gegenüber den anderen Laktationsphasen nachweisbar. Zusammenfassend wurde ermittelt, dass in der 3. Laktationsphase das Risiko eines einfach positiven Kotbefundes gegenüber der 2. Laktationsphase signifikant höher war. In der 4. Laktationsphase wurde für den **Bestand A** zusätzlich ein signifikant höherer Anteil starker Ausscheider (17,7 %) gegenüber dem Anteil schwacher Ausscheider (2,3 %) ermittelt. Ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit ermittelten Tavornpanich et al. (2006), die eine Zunahme positiver Befunde ab dem 200. Laktationstag bei Tieren, die sich mindestens in der 3. Laktation befanden nachwiesen. Zu den Ursachen für die signifikant höhere Map-Nachweisrate in der 3. Laktationsphase, können derzeit keine gesicherten Angaben gemacht werden. Die Zunahme positiver Kotbefunde könnte infolge des höheren Alters der Tiere, mit fortschreitender Laktation, auftreten. Möglicherweise sind auch hormonelle und immunologische Veränderungen im

Rahmen einer neuen Gravidität die Ursache der vermehrten Map-Ausscheidung ab dem 211. Laktationstag. Es war jedoch nicht bekannt, ob die untersuchten Tiere tatsächlich zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt trächtig waren. In der 3. und 4. Laktationsphase wäre die Trächtigkeit bei frühestmöglicher Besamung, etwa 70 Tage *post partum*, bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Zu den immunologischen Veränderungen während der Gravidität der Rinder wurde bisher wenig publiziert. Die Akkumulation von Makrophagen im uterinen Endometrium während der Gravidität wurde bei Schafen beschrieben (Tekin und Hansen 2004). Es ist auch bekannt, dass sich während der Trächtigkeit $\gamma\delta$ -T-Zellen im uterinen Epithel anreichern (Majewski et al. 2001) und dass zunehmend eine Inhibition der Lymphozytenproliferation durch den Einfluss des Hormons Progesteron stattfindet (Majewski und Hansen 2002). Möglicherweise erfolgt durch den erhöhten Bedarf und die Akkumulation von Makrophagen sowie $\gamma\delta$ -T-Zellen im Uterusgewebe eine Verminderung der zellulären Abwehr im Darmbereich bei graviden Tieren. Somit wäre eine vermehrte Freisetzung von Map in das Darmlumen und auch ein häufigerer Nachweis des Bakteriums im Kot, im Verlauf der Laktation bei gleichzeitiger Trächtigkeit, zu erklären. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann die Entnahme von Kotproben im letzten Laktationsdrittel empfohlen werden, jedoch bestehen bestandsspezifische Unterschiede. Für den sicheren Nachweis der vermehrten Map-Ausscheidung gegen Ende der Laktation sollten weitere Bestände und höhere Stichprobenzahlen untersucht werden.

5.5.3 Tagesmilchleistung

In der Mehrzahl der veröffentlichten Studien, zum Zusammenhang zwischen der Milchleistung und einer Paratuberkuloseinfektion, wurde der Einfluss der Erkrankung auf die Gesamtlaktationsleistung untersucht. In den eigenen Untersuchungen wurde jedoch betrachtet, ob die aktuelle Tagesmilchleistung eines Tieres am Untersuchungstag auf eine Paratuberkuloseinfektion und die aktuelle Map-Ausscheidungsintensität hinweist.

Im **Bestand A** war der prozentuale Anteil der Map-Ausscheider bei verminderten Tagesmilchleistungen (5–15 kg) signifikant erhöht, während im **Bestand B** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anteilen kotpositiver Tiere in den einzelnen Milchleistungsgruppen zu ermitteln waren. Bei einer verminderten Milchleistung im Bestand A war zudem der Anteil der starken Ausscheider signifikant größer. Auffällig war der geringe Anteil positiver Kotbefunde bei sehr hohen Milchleistungen > 55 kg. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass die Map-Ausscheidung mit einer reduzierten Milchleistung einhergehen kann und bestätigen damit die Ergebnisse vorheriger Studien (Raizman et al. 2007, Beaudreau et al. 2007). In einer Untersuchung wurde ebenso ein Zusammenhang der aktuellen Tagesmilchleistung von der Map-Ausscheidungsintensität nachgewiesen, bei schwachen, mittleren und starken Ausscheidern wurde dabei eine um 1,4 kg, 5,2 kg und 7,5 kg reduzierte Tagesmilchleistung gegenüber kotnegativen, aber möglicherweise infizierten Tieren der identischen Herde ermittelt (Raizman et al. 2007). Mit hoher Wahrscheinlichkeit befanden sich aktuell stark ausscheidende Tiere in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien und die Leistungsfähigkeit der Tiere war in Folge der Erkrankung vermindert. Da sich im Bestand A stets eine höhere Anzahl starker Ausscheider befand, waren nur in dieser Herde signifikante Zusammenhänge erkennbar.

Die geringere Map-Ausscheidung bei hohen Tagesmilchleistungen wurde bisher nicht beschrieben, sie spricht jedoch für den aktuell besseren Gesundheitszustand infizierter

Tiere. Erniedrigte Milchleistungen bei Einzeltieren in infizierten Beständen könnten daher Indiz für eine aktuell verstärkte Ausscheidung von Map sein. Auffällige Tiere mit abfallender Milchleistung, die keine weiteren Erkrankungen aufweisen, sollten koprologisch untersucht werden.

5.6 Kotkultur als „Goldstandardverfahren“

In der vorliegenden Studie wurde der kulturelle Erregernachweis aus Kot als „Goldstandardverfahren“ zur Validierung der ELISA-Testverfahren angewendet. Dies geschah unter der Kenntnis der Tatsache, dass die Eignung der kotkulturellen Anzucht als Referenzmethode zuvor kritisiert wurde. Nach Nielsen und Toft (2006) führt die begrenzte Sensitivität der Methode zur Unterschätzung der Sensitivitäten anderer Testverfahren, da infizierte Tiere die möglicherweise bereits serologisch positiv reagieren und kotnegativ getestet wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen werden. In den eigenen Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass die Sensitivität der Kotkultivierung durch eine geeignete Methodik und Testwiederholungen signifikant erhöht werden kann.

Für die Spezifität der kotkulturellen Untersuchung mit anschließender Speziesbestätigung mittels IS900-PCR wird ein Wert von 100 % angenommen (Chiodini et al. 1984, Sockett et al. 1992a, Whitlock et al. 2000, Berghaus et al. 2006b), dies wurde jedoch in den vergangenen Jahren verstärkt in Frage gestellt, da angenommen wurde, dass eine passive Erregerausscheidung durch nicht-infizierte Tiere möglich ist (Sweeney et al. 1992a, Whittington und Sergeant 2001, Begg et al. 2005). Damit würden falsch positive Kotbefunde bei nicht-infizierten Tieren ermittelt werden. Es wurde vermutet, dass der Erreger oral aus der Umwelt aufgenommen und wieder passiv ausgeschieden wird, ohne sich dabei in der Darmwand anzusiedeln. In Infektionsversuchen wurde das sogenannte „Passagieren“ des Erregers ausschließlich experimentell bei Jungtieren erzeugt (Sweeney et al. 1992a, McDonald et al. 1999, Begg et al. 2005). In experimentellen Studien, in denen eine passive Erregerausscheidung ermittelt wurde, war die eingesetzte Erregerdosis stets sehr hoch, so wurden häufig Infektionsdosen zwischen 5×10^6 KBE und 3×10^7 KBE in Challengeversuchen zur Infektion von Jungtieren verwendet (Hines II. et al. 2007). Bisher wurde jedoch in keiner Studie untersucht, welche Erregermengen aus der Umwelt aufgenommen werden müssen, um bei adulten Tieren eine passive Erregerausscheidung hervor zu rufen. Aus diesem Grund wurden nachfolgend theoretische Überlegungen zu möglichen Wegen der Erregeraufnahme und zur passiven Ausscheidung bei nicht-infizierten Tieren diskutiert.

Nach den Angaben von Crossley et al. (2005) sind in 2 g Kot eines starken Map-Ausscheiders mindestens 50 KBE enthalten. Bei der 10fachen Ausscheidungsintensität (500 KBE/2 g Kot) würden bei einer hypothetischen Tageskotmenge von 30 kg von einem stark ausscheidenden Tier insgesamt $7,5 \times 10^6$ KBE freigesetzt werden. Dies entspricht etwa den Erregerdosen, die in Infektionsversuchen von Jungtieren, mit dem Nachweis passiver Ausscheidung, eingesetzt werden. Möglicherweise erfolgt tatsächlich häufiger die Aufnahme geringer Erregermengen von nicht-infizierten Tieren aus der Umwelt, z. B. über kontaminiertes Tränkwasser, jedoch erscheint die Aufnahme von sehr hohen Erregerdosen, die normalerweise mit der gesamten Tageskotmenge eines infizierten Tieres ausgeschieden werden, nicht möglich. Gegen die Aufnahme hoher Erregermengen spricht weiterhin, dass nach der Kottausscheidung in der Umwelt sofort eine Erregerverdünnung erfolgt. Darüber hinaus würde nach der oralen Aufnahme sofort eine Verteilung der Bakterien im gut durchmischten

Vormageninhalt stattfinden und eine Verdünnung der Keimkonzentrationen im Gastrointestinaltrakt der Tiere eintreten. Rinder fressen zudem selektiver als lange Zeit vermutet und würden somit keine großen Mengen kotverunreinigten Futters oder Wassers aufnehmen (Sulzer 1989). Bei intensiven Haltungsbedingungen, wie in den untersuchten Beständen, erfolgt kein Weidegang der adulten Tiere, so dass auch eine Aufnahme von kontaminiertem Weidegras nicht erfolgen konnte. Die Tiere der Bestände A und B nahmen siliertes Futter über saubere und erhöhte Futtertische auf, die frei von Kotverschmutzungen waren. Auch die Tränken wurden täglich gereinigt und die tägliche Entmistung senkte ebenfalls die Erregerdichte in den Liegeboxen und Laufgängen. Eine Anreicherung des Erregers in der Umwelt, so vor allem in den Bereichen, in denen die Tiere häufig koten, z. B. in den Laufgängen oder Vorwartehöfen, findet möglicherweise dennoch statt, der orale Kontakt mit diesen Flächen ist jedoch gering.

Es ist denkbar, dass lebende Erreger mit der Gülledüngung auf Felder aufgebracht werden und aufgrund ihrer hohen Tenazität lange Zeit, möglicherweise sogar auf Pflanzen, überleben. Es konnte jedoch bewiesen werden, dass Map während des Silierprozesses maximal 14 Tage lebensfähig bleibt. In der Regel dauert der Silierprozess von Maissilage, die überwiegend in der Milchrinderfütterung eingesetzt wird, mindestens 6 Wochen an. Es ist daher höchstunwahrscheinlich, dass lebende Paratuberkuloseerreger mit vollständig siliertem Futter und in nachweisbaren Mengen aufgenommen werden.

Das „Passagieren“ des Bakteriums müsste auch sehr regelmäßig erfolgen, damit überhaupt bei einer 1–2x jährlich durchgeführten Kotuntersuchung eine realistische Chance eines Map-Nachweises besteht. Damit erscheint das Vorhandensein nachweisbarer Keimzahlen in Kotproben zwischen 1 und 3 g, die von nicht-infizierten Tieren entnommen wurden, höchstunwahrscheinlich. Die Kotkultivierung ist daher trotz ihrer limitierten Sensitivität, aufgrund der sehr guten Spezifität, als *in vivo* Referenzmethode für die Bewertung der serologischen Testmethoden geeignet.

5.7 Serologische Untersuchungen in den Beständen A, B und C

Die Vorteile der serologischen Nachweisverfahren, wie die geringeren Kosten gegenüber der Kotkultur, die leichte Anwendung und die kurze Dauer bis zum Erhalt von Untersuchungsergebnissen, waren Motivation für die Entwicklung diverser kommerziell erhältlicher Paratuberkulose-ELISA-Testsysteme zum Nachweis von Map-Antikörpern in Blut- und Milchserum. Zu den pathogenetischen Vorgängen, die zur Map-Antikörperbildung führen gibt es derzeit noch keine gesicherten Angaben. Auch ein eindeutiger Zusammenhang bzw. eine Korrelation zwischen der Kotausscheidung und dem Eintreten der Antikörperbildung konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen von Wiederholungsuntersuchungen an identischen, sicher infizierten Tieren wurde beobachtet, dass der Verlauf der Antikörperreaktionen sehr verschieden sein kann und nicht zwingend Map-Antikörper gegen die in den Testverfahren eingesetzten Antigene gebildet wurden. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint die Antikörperbildung im Verlauf der Erkrankung individuell verschieden und vermehrt in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zu erfolgen, dies stellt die Aussagekraft serologischer Untersuchungsmethoden vor allem zur frühzeitigen Identifikation infizierter Tiere in Frage.

5.7.1 Sensitivitäten der untersuchten ELISA-Testverfahren

Die Berechnung der Sensitivitäten zweier ELISA-Tests erfolgte anhand der Untersuchungsergebnisse von 319 kotpositiven Tieren, die als sicher infiziert angesehen wurden. Die berechneten Sensitivitäten waren, mit Werten unterhalb von 20 %, sehr gering. Die in anderen Studien zuvor berechneten Sensitivitäten unterschiedlicher Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren variieren sehr stark. Ein direkter Vergleich der eigenen Untersuchungsergebnisse mit den Ergebnissen weiterer Studien ist nicht möglich, da sich die Stichprobenzahlen, die Goldstandardverfahren, die Umweltbedingungen, die Paratuberkuloseprävalenzen sowie die Antigenpräparationen der ELISA-Testsysteme stark unterscheiden. Es ist dabei vor allem ungeklärt, wie immunogen die jeweils verwendeten Antigene *intra vitam* tatsächlich wirken.

LAM, das Antigen des **Svanovir-ELISA**, wird als hochimmunogen eingestuft (Sibley et al. 1988). Möglicherweise ist LAM als Zellwandbestandteil der Mykobakterien für die Stimulation der Antikörperbildung auch leichter verfügbar als die protoplasmatischen Antigene, die intrazellulär im Bakterium liegen. Dafür sprechen die geringen Sensitivitäten des **Pourquier-ELISA**, bei welchem ein protoplasmatisches Map-Antigen eingesetzt wird.

Weiterhin wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsstadium und der Ausprägung der Antikörperbildung belegt und bei klinisch erkrankten Tieren war häufig eine deutliche Antikörperbildung nachweisbar (Milner et al. 1990, Sockett et al. 1992b, Sweeney et al. 1995, van Maanen et al. 1999, Dargatz et al. 2001). In Validierungsstudien der Testhersteller werden zumeist Proben klinisch erkrankter Tiere aus hochprävalenten Herden einbezogen, daraus ergeben sich häufig sehr gute Sensitivitäten der serologischen Testverfahren. Hingegen dazu wurden in den eigenen Untersuchungen 2 Paratuberkulose-ELISA-Verfahren in subklinisch infizierten Herden angewendet. Bei subklinisch infizierten Tieren, die Map bereits mit dem Kot ausscheiden, ist häufig keine Antikörperantwort im Blut- und Milchserum detektierbar (Collins et al. 1991, Bech-Nielsen et al. 1992). Zusätzlich waren in

den eigenen Untersuchungen tierspezifische Einflüsse auf die Sensitivitäten der ELISA-Tests nachweisbar.

Einfluss der untersuchten Population

Bei einer nach Beständen getrennten Berechnung der Nachweisraten, war die Sensitivität aller ELISA-Tests im **Bestand A** stets höher als im **Bestand B**, für den **Pourquier-Milch-ELISA** wurde eine signifikant höhere Sensitivität für den **Bestand A** berechnet. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt erklären: das Erkrankungsgeschehen im **Bestand A** war weiter fortgeschritten. Gegenüber dem **Bestand B** befand sich stets eine größere Anzahl an Ausscheidern in der Herde A, darunter vor allem starke Ausscheider in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines seropositiven Befundes. Daneben wurden im **Bestand A** weniger Managementmaßnahmen umgesetzt. In vorangegangenen Studien wurde ebenso gezeigt, dass die Sensitivitäten eines Testverfahrens von den untersuchten Populationen beeinflusst werden und den Vergleich serologischer Untersuchungsergebnisse zwischen einzelnen Beständen limitieren (Sweeney et al. 2006). In den eigenen Untersuchungen konnte somit auch bestätigt werden, dass die schnelle Entfernung starker Ausscheider aus infizierten Herden einen großen Einfluss auf die Testsensitivitäten hat und so die Nachweisraten bei Folgeuntersuchungen gesenkt werden können (Whitlock et al. 2000, Sweeney et al. 2006).

Einfluss der aktuellen Intensität der Map-Kotausscheidung

Eine signifikant höhere Sensitivität aller ELISA-Testverfahren war bei aktuell starker Map-Ausscheidung infizierter Tiere nachweisbar. Nach den Angaben von Nielsen et al. (2002) ist die Antikörperproduktion bei kotpositiven Tieren generell gegenüber kotnegativen Tieren deutlich erhöht. In den eigenen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine signifikante Abstufung der Häufigkeiten positiver Nachweise zwischen schwach und stark ausscheidenden Tieren besteht. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten anderer Studien, mit signifikanten Unterschieden der Testsensitivitäten bei schwachen und starken Ausscheidern, überein (Whitlock et al. 2000, Dargatz et al. 2001, van Schaik et al. 2003, Sweeney et al. 2006, van Weering et al. 2007).

Über die Ursachen der verstärkten Antikörperbildung bei erhöhter Map-Ausscheidung gibt es keine gesicherten Angaben und es kann nur darüber spekuliert werden. Die Theorie von Coussens (2001), dass bei starkem Zerfall von Makrophagen in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien auch mehr mykobakterielle Antigene freigesetzt werden und ein vermehrter Kontakt mit T- und B-Zellen stattfindet, worauf eine verstärkte Antikörperbildung erfolgt, ist eine mögliche Erklärung. Für diese Hypothese sprechen vor allem die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit dem **Pourquier-Milch-ELISA**, denn die Befunde für stark, schwach und aktuell nicht ausscheidende Tiere unterschieden sich jeweils signifikant. Der Nachweis von Antikörpern mittels eines protoplasmatischen Antigens schien mit dem Ausscheidungsstatus der Tiere zu korrelieren.

Einfluss des Alters

Eine signifikante Zunahme positiver Befunde wurde bei beiden ELISA-Testverfahren mit steigendem Lebensalter nachgewiesen, die höchsten Testsensitivitäten wurden bei 4 bis 6 Jahre alten Tieren ermittelt. Das Alter erwies sich als stärkster Einflussfaktor auf die Ausbildung eines fraglichen oder positiven serologischen **Svanovir**-Befundes bei infizierten Tieren. Die Ursache dafür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das fortgeschrittene Stadium der Erkrankung in einem höheren Lebensalter. Eine Altersabhängigkeit der serologischen Befunde war auch in anderen Studien nachweisbar, in denen in Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungsergebnissen häufiger positive ELISA-Befunde bei älteren, infizierten Tieren detektiert wurden (van Schaik et al. 2003, Nielsen und Toft 2006).

Hingegen der eigenen Ergebnisse war in einer Untersuchung die Wahrscheinlichkeit eines milchserologisch positiven Befundes im Alter zwischen 2,5 und 4,5 Jahren am höchsten und es wurde empfohlen, Tiere < 4 Jahre monatlich milchserologisch zu untersuchen, die Nachweisrate wurde somit um 19 % erhöht (Nielsen und Ersbøll 2006). Gleichzeitig wurde in dieser Studie ermittelt, dass auch die höchste Wahrscheinlichkeit der Map-Ausscheidung über den Kot im Alter zwischen 2,5 und 5,5 Jahren bestand. Damit ist die Wiederholung serologischer Untersuchungen bei jungen Tieren in Frage gestellt, denn die Kosten für die Ermittlung von Reagenten steigen und entsprechen letztlich den Kosten für die spezifischere koprologische Untersuchung. Zudem wurden ebenfalls ab einem Alter von 2,5 Jahren mit hoher Wahrscheinlichkeit infizierte Tiere bei der Untersuchung des Kotes identifiziert.

Bei infizierten Tieren, die das 6. Lebensjahr überschritten, waren die ELISA-Testsensitivitäten gegenüber den 5 bis 6 Jahre alten Tiere vermindert. Dies ist vermutlich, auf das Ausmerzen älterer, stärker ausscheidender Tiere, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines serologisch positiven Befundes, zurück zu führen. Dass es sich bei den > 6 Jahre alten Rindern um Tiere in weit fortgeschritten, klinischen Erkrankungsstadien handelte und wie zuvor beschrieben infolgedessen ein Abfall der IgG-Serumtitler auftrat, konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden (Coussens 2001).

Einfluss der Laktationsphase

Ein Einfluss der Laktationsphase auf die blutserologischen Befunde wurde ausgeschlossen, jedoch war in der 3. Laktationsphase (211. bis 315. Laktationstag) bei der Untersuchung mit dem **Svanovir-Milch-ELISA** eine signifikante Zunahme positiver Befunde zu verzeichnen. Die milchserologischen Befunde des **Pourquier-ELISA** unterschieden sich zwischen den Laktationsphasen nicht signifikant, allerdings wurde ebenso in der 3. Laktationsphase die höchste Nachweisrate ermittelt. In den eigenen Untersuchungen wurde die Spanne der Laktationsphasen (~100 Tage/Phase) weit gefasst, um jeweils eine ausreichend große Stichprobenzahl für die Berechnungen zu erhalten. Eine mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten positiver Befunde bei infizierten Tieren im letzten Laktationsdrittel ist die physiologische Abnahme der Milchleistung in diesem Laktationsstadium, wodurch eine Konzentrierung der Map-Antikörper in der Milch verursacht wird (Caffin et al. 1983). Andererseits wurde für beide Bestände in der 3. Laktationsphase die stärkste Map-Ausscheidung über den Kot ermittelt. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass bei einer verstärkten Map-Ausscheidung mit doppelt positiven Kotbefunden die Antikörperraten bei allen

Testverfahren signifikant höher waren, daher könnte der vermehrte Antikörpernachweis in der 3. Laktationsphase auch in Folge einer verstärkten Kotausscheidung auftreten.

In zwei milchserologischen Untersuchungen nahm in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen die Häufigkeit positiver ELISA-Befunde bei kotpositiven Tieren zu, wenn diese in fortgeschrittenen Laktationsstadien untersucht wurden (Berghaus et al. 2006a, van Schaik et al. 2003). Hingegen der eigenen Ergebnisse wurden in anderen Studien erhöhte Map-Antikörperkonzentrationen nicht nur gegen Ende, sondern auch zu Beginn der Laktation nachgewiesen (Nielsen et al. 2002, Lombard et al. 2006a). Die bisherigen Untersuchungen sprechen dafür, eine milchserologische Untersuchung vorzugsweise gegen Ende der Laktation, z. B. beim Trockenstellen der Tiere durchzuführen (Berghaus et al. 2006a).

Einfluss der Tagesmilchleistung

In wenigen Studien zum Zusammenhang der Milchleistung und der Paratuberkulosedagnostik wurden bisher Tagesmilchleistungen betrachtet. In der Mehrzahl der Studien wurden die Zusammenhänge zwischen serologischen Befunden und der Gesamtlaktationsleistung analysiert (Mc Nab et al. 1991, Nordlund et al. 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeiten seropositiver Befunde bei infizierten Tieren mit Tagesmilchleistungen zwischen 5 und 35 kg erhöht waren, und dass eine signifikante Reduktion positiver Milch-ELISA-Befunde bei höheren Tagesmilchleistungen erfolgte. Dieses Ergebnis entspricht der Beobachtung, dass die Wahrscheinlichkeit eines positiven Milch-ELISA-Befundes bei Tieren mit einer überdurchschnittlichen Milchleistung abnimmt (Lombard et al. 2006a). Möglicherweise befinden sich Tiere mit höheren Tagesmilchleistungen im Anfangsstadium der Erkrankung, sie sind leistungsfähiger und die humoralen Abwehrmechanismen wurden noch nicht so stark aktiviert wie bei Tieren in fortgeschrittenen Infektionsstadien. Diese Annahme wird von der Tatsache unterstützt, dass die Map-Ausscheidung bei infizierten Tieren mit hohen Milchleistungen vermindert war. Andererseits ist es auch denkbar, dass infolge der höheren Milchleistung eine „Verdünnung“ erfolgte und Antikörper aufgrund der geringen Konzentration nicht mehr nachweisbar waren.

Eine mögliche Erklärung für die höhere Nachweisrate bei geringen Tagesmilchleistungen ist die Konzentration von Antikörpern bei einer reduzierten Milchbildung. Eine verminderte Milchleistung wurde bei Tieren in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ermittelt (Benedictus et al. 1987, Wilson et al. 1993, Nordlund et al. 1996, Losinger 2005, Beaudeau et al. 2007), so dass es sich bei den serologischen Reagenten mit verminderten Milchleistungen vermutlich um Tiere in fortgeschrittenen Infektionsstadien handelt. In Verdachtsfällen, z. B. bei einer reduzierten Milchleistung eines abmagernden Tieres, das keine weiteren Erkrankungen aufweist, könnte die milchserologische Untersuchung somit schnell, erste Hinweise auf das Vorliegen einer Paratuberkuloseinfektion geben.

5.7.2 Spezifitäten der untersuchten ELISA-Testverfahren

ELISA-Spezifitätsberechnungen werden häufig anhand der Ergebnisse mehrfach kotnegativ getesteter Tiere aus infizierten Beständen durchgeführt (Whitlock et al. 2000), bei diesem Vorgehen werden jedoch möglicherweise unentdeckte, infizierte Tiere in die Berechnungen einbezogen. Die Testergebnisse, die für Spezifitätskalkulationen verwendet werden, sollten

von Tieren aus mehrfach untersuchten, „Paratuberkulose unverdächtigen“ Herden stammen (Collins und Sockett 1993, Sockett et al. 1992a). Weiterhin sollten in validen Studien mehr als 400 Tiere aus verschiedenen Herden untersucht werden (Collins 2006), da aus anderen Studien bekannt ist, dass herden- und gebietsspezifische Variationen der ELISA-Spezifitäten auftreten (Osterstock et al. 2007).

Die Spezifitäten der ELISA-Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit anhand der Befunde aus einem unverdächtigen Bestand (C) berechnet, daher wurden herdenspezifische Variationen der Testspezifitäten nicht beachtet, jedoch wurde eine hohe Stichprobenzahl, 2.416 Blut- und 1.661 Milchproben von 807 Einzeltieren, in die Berechnungen einbezogen. Für den **Pourquier-ELISA** wurden hohe Spezifitäten ermittelt, diese waren signifikant höher als die begrenzten Spezifitäten des **Svanovir-ELISA**.

Die Vorabsorption mit einem *M. phlei*-Extrakt bei der Anwendung des **Pourquier-ELISA** erwies sich, wie auch zuvor berichtet wurde, als effektiv zur Eliminierung unspezifischer Antikörper (Köhler et al. 2008). Für 0,7 % der Blutproben und 0,6 % der Milchproben des Bestandes C wurden dennoch falsch positive Untersuchungsbefunde mit dem Pourquier-ELISA ermittelt. Da der Hersteller keine weiteren Angaben zur Struktur der protoplasmatischen Antigene des Tests macht, kann auch nicht geklärt werden, ob es sich möglicherweise um Kreuzreaktionen handelte, die eventuell durch atypische Mykobakterien verursacht wurden, oder ob andere unspezifische Bindungen die falsch positiven Reaktionen bedingten.

Die große Anzahl der falsch positiven Reaktionen bei der Anwendung des **Svanovir-ELISA**, mit dem Antigen LAM, wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit durch kreuzreagierende Antikörper verursacht. Die kreuzreagierenden Antikörper wurden dabei vermutlich aufgrund eines Kontaktes mit atypischen Mykobakterien gebildet, welche ebenfalls das Antigen LAM in ihrer Zellwand aufweisen. Das Vorhandensein atypischer Mykobakterien im Bestand C konnte durch die mehrfache Isolation, z. B. von *M. avium* subsp. *avium* und *M. terrae* nachgewiesen werden. Das entspricht den Ergebnissen anderer Studien, in denen ebenso das regelmäßige Vorkommen atypischer Mykobakterien in Rinderbeständen beschrieben und eine 9,4fach höhere Wahrscheinlichkeit für den Nachweis in serologisch positiven Herden ermittelt wurde (Norby et al. 2007, Roussel et al. 2007). Auch die Ergebnisse einer Vakzinierungsstudie unterstützen die eigenen Annahmen, dabei wurden Paratuberkulose freie Kälber mit Suspensionen atypischer Mykobakterien geimpft und mit zwei Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren untersucht (Osterstock et al. 2007). In dieser Studie unterschied sich wie in den eigenen Untersuchungen die Anzahl der falsch positiven Reaktionen zwischen den zwei betrachteten ELISA-Verfahren. Bei einem Test wurden lediglich bei 2 von 15 Kälbern falsch positive ELISA-Befunde ermittelt, während bei der Anwendung eines anderen ELISA-Testsystems 9 von 15 Kälbern nach der *intradermalen* Injektion von *M. avium*-, *M. intracellulare*-, *M. scrofulaceum*- oder *M. terrae*-Suspensionen seropositiv reagierten. Ähnliche Ergebnisse waren bei der oralen Verabreichung atypischer Mykobakterien an Kälber zu ermitteln, dabei waren nicht nur falsch positive serologische Reaktionen, sondern auch falsch positive Reaktionen bei der Applikation von bovinem PPD feststellbar (Jørgensen 1981).

Die eigenen Spezifitätserhebungen stellen besonders die Verwendung des nicht Map-spezifischen Zellwandantigens LAM in Paratuberkulose-ELISA-Testsystemen in Frage. In der Zusammenfassung der serologischen Untersuchungsbefunde fiel auf, dass sich die prozentualen Anteile der positiven **Svanovir- Blut- und Milch-ELISA-Befunde** (~10 % und

~6 %) zwischen dem **Paratuberkulosebestand B** und dem unverdächtigen **Bestand C** nicht unterschieden. Eine alleinige Anwendung des Svanovir-ELISA hätte aufgrund des hohen Anteils falsch positiver ELISA-Reaktionen zu einer Fehleinschätzung des **Bestandes C** geführt.

In den vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Spezifitätsunterschiede der ELISA-Tests methodische Ursachen haben, so war nachweisbar, dass die ELISA-Spezifität bei der Durchführung einer Vorabsorption und der Verwendung eines protoplasmatischen Antigens signifikant höher war. Zusätzlich wurden tierspezifische Einflüsse auf die Spezifitäten der ELISA-Tests untersucht. Dabei wurde das Alter, die Laktationsphase und die Tagesmilchleistung als Einflussfaktor identifiziert.

Einfluss des Alters

Ein Spezifitätsabfall des **Svanovir-Blut-** und **Svanovir-Milch-ELISA** mit jedem Lebensjahr der Tiere bis auf 63,8 % bei über 6 Jahre alten Tieren konnte festgestellt werden. In anderen Studien wurden stets die Veränderungen der Sensitivitäten mit dem Lebensalter nachgewiesen und so weit bekannt wurde nie zuvor der Einfluss des Alters auf die ELISA-Testspezifitäten untersucht (Berghaus et al. 2006a, Nielsen und Toft 2006).

Nach den eigenen Ergebnissen, scheint der Anteil der unspezifischen LAM-Antikörper im Blut- und Milchserum mit zunehmendem Alter der Tiere zu steigen. Währenddessen Antikörper gegen das spezifischere, protoplasmatische Antigen des **Pourquier-ELISA** nicht vermehrt zu finden waren und somit auch keine Auswirkungen auf die Testspezifitäten bestehen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes mit atypischen Mykobakterien mit zunehmendem Lebensalter steigt.

Einfluss der Laktationsphase und der Tagesmilchleistung

Weiterhin waren die Spezifitäten des **Svanovir-Milch-ELISA** in der 3. und 4. Laktationsphase vermindert. Die Spezifitäten des **Pourquier-Milch-ELISA** unterschieden sich zwischen 1. und 4. Laktationsphase signifikant. Ein Einfluss der Laktationsphase auf die Spezifität der Blut-ELISA-Tests war hingegen dazu nicht feststellbar. Der Abfall der Testspezifitäten könnte durch die sinkende Milchleistung der Tiere mit zunehmender Laktationslänge und einer Konzentrierung unspezifischer Antikörper in der Milch bedingt sein. Dafür spricht auch der Anstieg der Spezifität des **Svanovir-Milch-ELISA** mit steigender Tagesmilchleistung. Mit zunehmender Tagesmilchmenge ist das Auftreten eines „Verdünnungseffektes“ denkbar, vorhandene Antikörper liegen bei einer höheren Milchmenge geringer konzentriert in den Milchproben vor. Die Spezifität des **Pourquier-Milch-ELISA** wurde nicht von der aktuellen Tagesmilchleistung beeinflusst.

In der Literatur wurden bisher keine ähnlichen Ergebnisse, die für einen Spezifitätsabfall der milchserologischen Testverfahren in Abhängigkeit von der Laktationsphase und der Milchleistung der Tiere sprechen, veröffentlicht.

5.7.3 Einfluss der Milchparameter auf die milchserologischen Untersuchungsbefunde

Der Zusammenhang der Milchparameter und der milchserologischen Befunde wurde betrachtet, um methodische Einflüsse auf die ELISA-Testverfahren, die vom Milchserum ausgehen könnten zu ermitteln. Die Milchparameter sollten stets im Zusammenhang mit der aktuellen Laktationsnummer, dem Laktationsstadium sowie der Tagesmilchleistung betrachtet werden. Die Milchparameter unterliegen vielfachen Einflüssen und beeinflussen sich gegenseitig, so dass die Entstehung zufälliger Signifikanzen möglich war. In der Literatur waren keine vergleichbaren Untersuchungen zu finden, so dass zu den Ursachen der signifikanten Unterschiede lediglich Hypothesen aufgestellt werden konnten.

Einfluss des Milcheiweißgehaltes

Bei beiden milchserologischen Testverfahren wurden häufiger positive und fragliche Befunde bei hohen Milcheiweißgehalten ermittelt. Ein signifikant höhere Positivrate wurde bei Milcheiweißgehalten > 3,7 % für den **Svanovir-Milch-ELISA** festgestellt.

Ob tatsächlich ein höherer Gehalt an spezifischen Antikörpern in der eiweißreicheren Milch vorhanden war, konnte nicht geklärt werden. Gleichzeitig war eine reduzierte Spezifität des **Svanovir-Milch-ELISA** bei hohen Milcheiweißgehalten nachweisbar. Die Reduktion der Spezifität weist darauf hin, dass bei steigendem Milcheiweißgehalt häufiger unspezifische Bindungen stattfanden.

Der Milcheiweißgehalt wird vom Energie- sowie vom Rohproteingehalt des Futters beeinflusst und ist mit der Milchleistung korreliert, mit abnehmender Milchleistung nimmt der Milcheiweißgehalt zu (Lüpping 1989). Möglicherweise ist daher bei einem hohen Milcheiweißgehalt, infolge einer reduzierten Milchmenge, auch die Konzentration spezifischer und unspezifischer Antikörper erhöht. Daneben können unspezifische Bindungen der höher konzentrierten Milchproteine nicht ausgeschlossen werden.

Einfluss des Milchlaktosegehaltes

Der Laktosegehalt der Rohmilch wird fast ausschließlich durch pathogene Einflüsse verändert, so ist die Laktosesynthese bei Erkrankungen der Milchdrüse gestört und der Milchlaktosegehalt reduziert (Haasmann und Schulz 1994). Für den **Pourquier-Milch-ELISA** wurde bei Milchlaktosegehalten $\leq 4,9$ % eine signifikante Erhöhung der seropositiven Befunde ermittelt. Ein Einfluss auf die Testspezifitäten wurde nicht erfasst, so dass methodische Einflüsse der Milchlaktose auf die Milch-ELISA-Testergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

Über den Zusammenhang des Milchlaktosegehaltes und die Erhöhung positiver Milchbefunde kann somit derzeit nur spekuliert werden. Es ist möglich, dass infizierte Tiere in fortgeschrittenen Infektionsstadien und mit messbaren Antikörpertitern häufiger subklinische Eutererkrankungen aufweisen, welche mit erniedrigten Laktosegehalten einhergehen. Denkbar ist auch, dass bei Tieren in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien mit humoraler Immunantwort, aufgrund einer Malabsorption ein Energiedefizit entsteht und auch die Laktosesynthese im Euter beeinträchtigt wird.

Einfluss des Milchwahnstoffgehaltes

Der Milchwahnstoffgehalt ist ein Indikator für das Nährstoffverhältnis des aufgenommenen Futters (Kirchgeßner 1997). Der Zusammenhang des Milchwahnstoffgehaltes und der milchserologischen Befunde wurde für 4 Hahnstoffklassen analysiert. Methodische Einflüsse des Hahnstoffs auf die serologischen Testverfahren konnten ausgeschlossen werden, da die Testspezifitäten nicht beeinflusst wurden. Für den **Pourquier-Milch-ELISA** wurden signifikant erhöhte Positivraten bei infizierten Tieren mit erniedrigten Milchwahnstoffgehalten ≤ 150 mg/l ermittelt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass infizierte, serologisch positive Tiere in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien infolge einer Malabsorption einen Rohproteinmangel aufweisen, der auch reduzierte Milchwahnstoffgehalte bedingt.

Einfluss des Milchzellgehaltes

Durch die vorherige Zentrifugation der Milch setzten sich die Milchzellen am Boden der Zentrifugenröhrchen als Zellpellet ab und nur das gewonnene Milchserum wurde für die Untersuchung mit den Milch-ELISA-Tests verwendet. Ein unmittelbarer, methodischer Einfluss der Milchzellen auf die ELISA-Testsysteme kann daher ausgeschlossen werden. Dennoch wurde bei infizierten Tieren eine signifikante Zunahme der seropositiven Befunde bei **beiden ELISA-Testverfahren** mit steigendem Milchzellgehalt ermittelt. Mc Nab et al. (1991) konnten zuvor eine signifikante Zunahme des Milchzellzahlgehaltes bei blutserologisch positiven Tieren belegen. Für den **Svanovir-ELISA** wurde in den vorliegenden Untersuchungen zudem eine Reduktion der Testspezifität ab Milchzellgehalten > 100.000 Zellen/ml festgestellt.

Die Anzahl somatischer Zellen pro ml Milch gibt Hinweise auf entzündliche Veränderungen der Milchdrüse, bereits ab 100.000 Zellen/ml Milch beginnt die normale zelluläre Abwehr in eine entzündliche Reaktion überzugehen (DVG 2002). Es konnte belegt werden, dass auch die IgG1-Konzentration in infizierten Eutervierteln erhöht ist (Caffin et al. 1983). Somit ist bei der Erhöhung der Zellzahl, infolge von Euterinfektionen, eine gleichzeitig erhöhte Konzentration von Antikörpern in der Milch sehr wahrscheinlich, wodurch möglicherweise in den eigenen Untersuchungen die die Testsensitivitäten und -spezifitäten der serologischen Verfahren beeinflusst wurden.

Ob eine Paratuberkuloseinfektion unmittelbar die Eutergesundheit beeinflusst bzw. eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Euterinfektionen verursachen kann, wurde häufig diskutiert, jedoch bislang nicht ausreichend und systematisch untersucht, auch zu den pathogenetischen Vorgängen gibt es bisher keine Hypothesen und Belege.

In den eigenen Untersuchungen konnte in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen lediglich gezeigt werden, dass bei Tieren mit einer erhöhten Milchzellzahl die Wahrscheinlichkeit eines positiven serologischen Befundes steigt (Mc Nab et al. 1991, Tiwari et al. 2002).

5.7.4 Wiederholung serologischer Untersuchungen

Beeinflussung der Sensitivitäten der serologischen Testverfahren durch Testwiederholungen

Mit der Wiederholung serologischer Tests an identischen Tieren sollte die Frage beantwortet werden, ob die Aussagekraft und die Sensitivität der ELISA-Verfahren durch die Testwiederholungen im Abstand von jeweils etwa einem halben Jahr gesteigert wird. Für alle ELISA-Verfahren wurde eine Zunahme der Sensitivität bei Testwiederholung ermittelt, die nur für den **Pourquier-Blut-ELISA** nicht signifikant war. Die höchste Sensitivität bei Testwiederholungen wurde mit dem **Svanovir-Blut-ELISA** im **Bestand A** mit 30,1 % erreicht. Die im Zeitraum von 1,5 Jahren ermittelte Sensitivität war dennoch gering, da von 93 Tieren, die in diesem Zeitraum mittels Kotkultur als Ausscheider ermittelt wurden, nur 28 Tiere innerhalb von 3 Untersuchungen mindestens einen seropositiven Befund aufwiesen. Bei der alleinigen Anwendung des serologischen Tests wäre somit die Erkennung von 65 Map-Ausscheidern nicht erfolgt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Studie mit 282 kotpositiven Tieren ermittelt, dabei wiesen 13,5 % der Tiere einen positiven Befund bei einer einmaligen ELISA-Untersuchung auf, während bei einer 5maligen Untersuchung insgesamt lediglich 38,3 % der kotpositiven Tiere serologisch positiv reagierten (Sweeney et al. 2006). Die eigenen Ergebnisse stimmten mit den Beobachtungen in anderen Studien überein, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass der überwiegende Teil infizierter und leicht ausscheidender Tiere über einen langen Zeitraum seronegativ bleibt oder die Serumwerte variieren (Dargatz et al. 2001, Barrington et al. 2003, Sweeney et al. 2006). Bei der täglichen, blutserologischen Untersuchung von 3 subklinisch infizierten Tieren über einen langen Zeitraum, waren starke Variationen der Serum-ELISA-Werte zu beobachten (Barrington et al. 2003). Auch in den eigenen Untersuchungen wurden Schwankungen der Antikörperreaktionen bei Einzeltieren festgestellt, bereits positiv getestete Tiere reagierten bei Folgeuntersuchungen häufig negativ. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine intermittierende Antikörperbildung (Coussens 2001) und die begrenzte Halbwertszeit der Immunglobuline im Blutserum. Es ist bekannt, dass die IgG1-Halbwertszeit im Serum lediglich etwa 21 Tage beträgt (Turner 1991). Somit scheint es möglich, dass auch nach einer Serokonversion zeitweise keine Antikörper gegen Map-Antigene im Serum subklinisch infizierter Tiere vorhanden sind und deshalb Variationen der Ergebnisse bei wiederholten ELISA-Untersuchungen identischer Tiere entstehen (van Schaik et al. 2003, Nielsen et al. 2002). Es stellt sich damit auch die Frage, wie häufig serologische Untersuchungen wiederholt werden müssen, um die Aussagekraft der ELISA-Verfahren zu erhöhen und um infizierte Tiere sicher zu identifizieren. Dies konnte in den durchgeführten Untersuchungen nicht beantwortet werden, es war jedoch sicher feststellbar, dass die 3fache serologische Untersuchung in halbjährlichen Abständen die Map-Nachweisraten nur unzureichend erhöhte.

Beeinflussung der Spezifitäten der serologischen Testverfahren durch Testwiederholungen

Die Spezifität des **Svanovir-Blut-** und **Svanovir-Milch-ELISA** wurde bei der mehrmaligen Untersuchung identischer Tiere des unverdächtigen Bestandes C signifikant reduziert, fast 40 % der Tiere des negativen Bestandes wiesen innerhalb von 3 **Svanovir-Blut-ELISA**-Untersuchungen falsch positive Reaktionen auf. Für diese unspezifischen Reaktionen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Kontakt mit atypischen Mykobakterien verantwortlich, die die

Bildung von Anti-LAM-Antikörpern verursachen können (Jørgensen 1981, Osterstock et al. 2007). Im Verlauf der Zeit wird ein Kontakt mit atypischen Mykobakterien, die vermutlich ubiquitär im Bestand C vorkommen immer wahrscheinlicher. Auffällig war dabei, dass weniger häufig Kreuzreaktionen im Milchserum gegenüber dem Blutserum auftraten. Dies lässt einen selektiven Übergang von Antikörpern aus dem Blut- in das Milchserum vermuten. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen entsprechen den Erhebungen in einer anderen Studie, dabei wurde auch ein Abfall der Testspezifität von 98,1 % auf 92,2 % nach Wiederholungsuntersuchungen bei der Anwendung eines kommerziell erhältlichen Paratuberkulose-ELISA-Tests ermittelt (Sweeney et al. 2006).

Die Spezifität des **Pourquier-Blut-** und **Pourquier-Milch-ELISA** wurde durch Testwiederholungen lediglich geringfügig und nicht signifikant reduziert. Dies bestätigt die Annahme, dass die protoplasmatischen Antigene des **Pourquier-ELISA** gegenüber dem LAM des **Svanovir-ELISA** spezifischere Antigene darstellen. Daneben zeigt die unveränderte Spezifität des Pourquier-ELISA bei Testwiederholungen, dass bei der *M. phlei*-Präabsorption eine effektive Bindung unspezifischer Antikörper erfolgt, die möglicherweise vermehrt im Verlauf des Lebens der Tiere gebildet werden.

5.7.5 Übereinstimmungen der Ergebnisse zweier ELISA-Testverfahren

Die Untersuchungsbefunde für **Pourquier-** und **Svanovir-ELISA** stimmten für Blut- und Milchserum bei kotpositiven und kotnegativen, Paratuberkulose unverdächtigen Tieren zwischen beiden Testverfahren nur unzureichend überein. Auch in einer anderen Untersuchung, in der ebenfalls eine Kappastatistik genutzt wurde, um die Übereinstimmungen der Untersuchungsbefunde für drei Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren zu charakterisieren, waren nur geringe Übereinstimmungen der Testergebnisse feststellbar (Mc Kenna et al. 2006a). Die geringen Übereinstimmungen der Testergebnisse, sind vor allem auf die Abweichungen der positiven Befunde der einzelnen Testsysteme zurück zu führen. Eine Vielzahl verschiedener Antikörper kann infolge einer Map-Infektion gebildet werden (Sugden et al. 1997). Die Testsysteme mit diversen Antigenpräparationen detektieren unterschiedliche Antikörperpopulationen und dennoch wurde durch ihren gleichzeitigen Einsatz die Map-Nachweisrate in der vorliegenden Studie nicht ausreichend erhöht. Die Kombination verschiedener ELISA-Testverfahren führte somit, wie in anderen Untersuchungen zuvor, nicht zu einer vermehrten Identifikation infizierter Tiere (Mc Kenna et al. 2006a).

In wenigen Studien wurde bisher ein identischer Test für die Untersuchung von paarigen Blut- und Milchproben, zum Vergleich der Untersuchungsbefunde, verwendet. Die blut- und milchserologischen Befunde stimmten in den eigenen Untersuchungen mit dem **Svanovir-ELISA** nur mäßig überein. Dabei waren die Differenzen vor allem durch die hohen Anteile fraglicher und positiver Blutbefunde bedingt, wobei die zugehörigen Milchproben als negativ beurteilt wurden.

Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wurden in anderen Studien gute Übereinstimmungen der blut- und milchserologischen **Svanovir-ELISA-Befunde** beschrieben (Winterhoff 2000, Geisbauer et al. 2007). Die guten Übereinstimmungen sind jedoch als kritisch zu bewerten, da diese allein mit der Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman begründet wurden. Die Berechnung dieser Koeffizienten ist jedoch an bestimmte Bedingungen geknüpft, beide Variablen müssen aus einer normalverteilten

Grundgesamtheit stammen und in einer linearen Abhängigkeit zueinander stehen (Weiß 2008). Daneben wurden die Berechnungen mit den Ergebnissen der Verlaufsuntersuchungen von lediglich 10 infizierten Tieren durchgeführt (Winterhoff 2000). Hingegen dazu wurden in den eigenen Untersuchungen insgesamt 895 paarige Blut- und Milchproben untersucht. Alle Berechnungen wurden an definierten Gruppen: kotpositive Tiere aus zwei Paratuberkulosebeständen und kotnegative Tiere aus einem Paratuberkulose unverdächtigen Bestand vorgenommen. Wie die Differenzen der blut- und milchserologischen **Svanovir-Befunde** bei den durchgeführten Untersuchungen entstanden bleibt ungeklärt, auffällig war jedoch, dass sowohl bei kotpositiven als auch bei kotnegativen Tieren mit fraglichen und positiven Blutproben die zeitgleich entnommenen Milchproben einen negativen Befund aufwiesen. Für die Tiere aus der negativen Population kann daher behauptet werden, dass häufiger Kreuzreaktionen bei der Untersuchung von Blutserum auftraten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erhebungen einer anderen Studie überein (van Weering et al. 2007), in der ebenfalls häufiger unspezifische Reaktionen im Blutserum und weniger in der Milch detektiert werden konnten. Eine mögliche Erklärung dafür sind die deutlichen Konzentrationsunterschiede der Hauptimmunglobuline IgG1 und IgG2 zwischen Blut- und Milchserum, während die IgG1/2-Konzentration im Serum der Haussäugetiere zwischen 6-27 mg/ml liegt, variiert die IgG1/2-Konzentration in der Milch zwischen 0,2-0,8 mg/ml (Gürtler und Schweigert 2000). Immunglobuline gelangen durch passive Diffusion und aktiven Transport aus dem Blut ins Euter oder werden von lokalen Immunzellen im Euter synthetisiert (Östensson und Lun 2008). Durch das Vorhandensein und die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Alveolarzellen der Milchdrüse findet ein selektiver Transfer von IgG1 aus dem Blut durch das Alveolarepithel ins Alveolarlumen statt (Östensson und Lun 2008). Aufgrund der stets höheren Antikörperkonzentrationen im Blutserum der Tiere sind damit unspezifische Bindungen bei der Testung von Blutserum wahrscheinlicher. Dagegen spricht jedoch, dass die Blutserumproben gegenüber den Milchserumproben zuvor 10fach stärker mit Pufferlösungen verdünnt wurden.

Gute Übereinstimmungen der Befunde wurden wie bei van Weering et al. (2007) für die Untersuchungsergebnisse von Blut- und Milchproben mit dem **Pourquier-ELISA** ermittelt. Dabei fiel lediglich die etwas geringere Spezifität des Tests für Milchserum auf. Dennoch könnte nach den vorliegenden Ergebnissen die Untersuchung von Blutserum mit dem Pourquier-ELISA durch die Untersuchung von leichter zugänglichem Milchserum ersetzt werden.

5.8 Empfehlungen zur Untersuchung und Bekämpfung der Paratuberkulose in mittleren bis großen subklinisch infizierten Herden

Ein Ziel des Paratuberkulose Projektes in 3 Thüringer Milchviehherden war die Ermittlung geeigneter diagnostischer Verfahren zur Bekämpfung der Paratuberkulose in subklinisch infizierten Beständen. Die Untersuchungsergebnisse der Studie zeigen, dass die derzeit verfügbaren direkten und indirekten *intra vitam* Nachweisverfahren eine begrenzte Aussagekraft aufweisen. Die Ergebnisse des Projektes belegen die Notwendigkeit, Gesamtbestände zur Beurteilung des Infektionsgeschehens zu untersuchen, da möglicherweise bereits ein großer Anteil infizierter Jungtiere Map mit dem Kot ausscheidet. Derzeit kann ausschließlich die **kulturelle Kotuntersuchung** mit anschließender molekularbiologischer Speziesidentifi-

zierung zur Diagnostik der Paratuberkulose empfohlen werden. Während die Spezifität der Methode 100 % beträgt, ist die Sensitivität der Kotkultur limitiert. In den durchgeführten Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Sensitivität der Kotkultur durch Wiederholungsuntersuchungen signifikant erhöht werden kann. Die koprologische Untersuchung aller Tiere einer Herde sollte in halbjährlichen Abständen erfolgen. Auch die kotkulturelle Untersuchung von Jungtieren ist effektiv. Die Untersuchung von Altersgruppen ist nicht zu empfehlen, da es ein wichtiges Ziel sein sollte, infizierte Tiere frühzeitig zu erkennen, um diese möglichst vor einer weiteren Besamung aus dem Bestand zu entfernen. Das methodische Vorgehen hat einen besonders großen Einfluss auf den Erfolg der kotkulturellen Anzucht von Map. Die Kotproben sollten möglichst sofort aufgearbeitet werden, eine längere Tiefkühlagerung ist zu vermeiden. Daneben erhöhen geeignete Dekontaminationsmethoden und eine möglichst hohe Kulturröhrchenanzahl die Wahrscheinlichkeit eines Map-Nachweises.

Die Sensitivitäten der untersuchten Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren sind unzureichend. Auch die mehrfache Wiederholung serologischer Untersuchungen erhöht die Positivrate nicht ausreichend, reduziert aber stark die Spezifität des **Svanovir-ELISA**. Aufgrund der hohen Rate falsch positiver Ergebnisse können der Svanovir-ELISA sowie andere LAM-Paratuberkulose-ELISA-Tests zur Diagnostik der Paratuberkulose nicht empfohlen werden. Der **Pourquier-ELISA** weist auch bei der Wiederholung serologischer Untersuchungen eine gute Spezifität auf. Die Sensitivität des Pourquier-ELISA ist jedoch bei der Untersuchung subklinisch erkrankter Herden stark limitiert. Die Anwendung des **Pourquier-ELISA** als Herden-Screening-Test ist dennoch, aufgrund seiner hohen Spezifität, möglich. Jedoch können dabei infolge der geringen Testsensitivität falsch negative Ergebnisse und aufgrund der nicht 100 %igen Testspezifität auch falsch positive Ergebnisse ermittelt werden. Die sichere Klassifizierung eines Bestandes als „Paratuberkulose negativ“ ist bei der alleinigen Anwendung serologischer Tests nicht möglich.

Neben einer effizienten Diagnostik ist die Umsetzung von Management- und Hygienemaßnahmen, die in den Paratuberkuloseleitlinien beschrieben sind, essentiell für die Bekämpfung der Erkrankung in infizierten Herden. Dabei ist vor allem der Schutz von Jungtieren vor einer Infektion ein wichtiger Schwerpunkt. Die Untersuchungsergebnisse des Bestandes B belegen, dass nach den wirtschaftlichen Möglichkeiten eines Bestandes, die schnellstmögliche Merzung erkannter Ausscheider eine wichtige Maßnahme zur Senkung des Infektionsdrucks ist. Identifizierte Map-Ausscheider sollten nicht mehr in der Zucht eingesetzt und nach Möglichkeit separat aufgestellt werden. Nicht zuletzt ist die Aufklärung der Landwirte zu dieser nicht offensichtlichen Infektionskrankheit, die jedoch langfristig den Gesundheitszustand und die Leistung ihrer Herde beeinflusst, eine wichtige und grundsätzliche Maßnahme.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ermittlung von Einflussfaktoren auf die *intra vitam* Diagnostik der Paratuberkulose

Die *intra vitam* Diagnostik der Paratuberkulose ist heute mit direkten und indirekten Nachweisverfahren möglich. Die kulturelle Anzuchtung des Krankheitserregers *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) aus dem Kot infizierter Tiere mit anschließender molekularbiologischer Speziesbestätigung wird derzeit als hochspezifische *intra vitam* Goldstandardmethode bei der Validierung serologischer Paratuberkulose-Nachweisverfahren angewendet.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Gegenüberstellung und Bewertung der Befunde der kulturellen Anzucht von Map aus Rinderkot sowie der Untersuchungsergebnisse zweier blut- und milchserologischer Paratuberkulose-Testverfahren aus 3 Thüringer Milchviehbetrieben. Methoden- als auch tierspezifische Faktoren, die möglicherweise die Ergebnisse der einzelnen Testverfahren beeinflussten, wurden untersucht.

Ein Einfluss der folgenden methodischen Faktoren auf die Kultivierung des Erregers aus dem Kot wurde nachgewiesen: die Lagerung der Kotproben, die Hexadecylpyridiniumchlorid-Einwirkzeit sowie die Anzahl eingesetzter Kulturröhrchen pro Kotprobe. Besonders die Erhöhung der Anzahl der Kotkulturröhrchen ermöglichte eine Steigerung der Sensitivität der kulturellen Anzucht von Map aus Rinderkot. Währenddessen in einem Bestand tierspezifische Einflüsse auf den kulturellen Map-Nachweis nicht zu ermitteln waren, wurden im Vergleichsbestand Einflüsse des Alters sowie der Laktationsphase auf die Map-Kotausscheidung und den Erfolg der Anzucht nachgewiesen. Die Map-Nachweisrate war dabei ab einem Alter von 4 Jahren und in der 3. Laktationsphase signifikant höher. Daneben wurde der Erreger in diesem Bestand auch signifikant häufiger bei Tieren mit reduzierter Milchleistung detektiert. Durch die Wiederholung kotkultureller Untersuchungen konnte der Anteil ermittelter Ausscheider in zwei Paratuberkulosebeständen signifikant gesteigert werden, somit wurde auch die Sensitivität der Methode mit jeder Wiederholungsuntersuchung erhöht.

Die Sensitivität zweier Paratuberkulose-Blut- und Milch-ELISA-Testverfahren (Svanovir- und Pourquier-ELISA) zum Nachweis von Antikörpern erwies sich bei der Untersuchung subklinisch infizierter Tiere als unzureichend. Ein Einfluss der untersuchten Tierpopulation, der aktuellen Stärke der Map-Kotausscheidung sowie des Alters auf die Sensitivitäten der blut- und milchserologischen Tests war nachweisbar. Eine stetige Zunahme seropositiver Befunde wurde bei infizierten Tieren mit steigendem Alter beobachtet. Der Anteil positiver Befunde war bei aktuell starker Map-Ausscheidung signifikant höher. Für den Svanovir- und Pourquier-Blut-/Milch-ELISA waren die Testsensitivitäten bei infizierten Tieren mit Milchleistungen zwischen 5 und 35 kg am Untersuchungstag am höchsten. Daneben war die Sensitivität des Svanovir-Milch-ELISA in der 3. Laktationsphase signifikant erhöht.

Die Testspezifität wurde anhand der Untersuchungsergebnisse aus einem Paratuberkulose unverdächtigen Bestand berechnet. Für den Pourquier-ELISA wurden gute Spezifitäten, die nicht durch tiereigene Faktoren beeinflusst wurden, ermittelt. Die Testspezifitäten des Svanovir-ELISA erwiesen sich als unzureichend und wurden mit zunehmendem Lebensalter der Tiere weiter signifikant reduziert. Die Spezifitäten des Svanovir-Milch-ELISA waren bei Tagesmilchmengen unter 25 kg und in der 3. und 4. Laktationsphase vermindert. Methodische Einflüsse der Milchinhaltsstoffe auf die milchserologischen Untersuchungsverfahren konnten nicht sicher ausgeschlossen werden, mit hoher Wahrscheinlichkeit sind

die ermittelten Signifikanzen jedoch sekundär bedingt und auf veränderte Milchmengen und Laktationsstadien zurück zu führen.

Bei der Wiederholung serologischer Untersuchungen erhöhten sich die Sensitivitäten beider ELISA-Testverfahren nur unzureichend, die Spezifität des Svanovir-ELISA wurde jedoch signifikant reduziert. Auch die Übereinstimmungen der Befunde beider ELISA-Testverfahren erwiesen sich als gering. Nur für den Pourquoier-ELISA wurden bei der Untersuchung von zeitgleich entnommenem Blut- und Milchserum identischer Tiere gute Übereinstimmungen ermittelt.

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Studie kann geschlussfolgert werden, dass zur *intra vitam* Einzeltierdiagnostik der Paratuberkulose derzeit ausschließlich die Kultivierung von Map aus Kot, unter standardisierten Bedingungen, empfohlen werden kann. Der Nachweis des Erregers im Kot infizierter Tiere wird dabei besonders durch methoden- und bestandsspezifische Faktoren beeinflusst, optimale Probenentnahmezeitpunkte wurden nicht ermittelt. Auch die Untersuchung junger Tiere erbrachte in den vorliegenden Untersuchungen hohe Nachweisraten und ist deshalb ebenso wie die häufige Wiederholung der koprologischen Untersuchungen zu empfehlen. Als wichtigste tierspezifische Einflussfaktoren auf die serologischen Testverfahren sind die aktuelle Stärke der Map-Kotausscheidung und das Alter der Tiere hervor zu heben. Die Anwendung des Svanovir-ELISA ist aufgrund unzureichender Testspezifitäten zur Paratuberkulosedagnostik nicht empfehlenswert. Die geringen Sensitivitäten des Pourquoier-ELISA limitieren die Aussagekraft des Testverfahrens sehr stark, jedoch kann der Test aufgrund seiner guten Spezifität für Screening-Untersuchungen in großen Herden angewendet werden. Dabei ist die Untersuchung von Milchproben gleichwertig gegenüber blutserologischen Untersuchungen.

7. SUMMARY

Detection of factors influencing the *intra vitam* diagnosis of paratuberculosis

The diagnosis of paratuberculosis is possible via direct and indirect verification procedures. Today cultivation of faeces for the detection of the causative agent *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) and its molecular confirmation is the most recommended, highly specific *intra vitam* goldstandard method for the validation of serological paratuberculosis tests.

In the present thesis results of faecal cultivation and diagnostic findings of two blood and milk ELISA tests were compared and evaluated. Faeces, blood and milk samples were collected in 3 Thuringian dairy farms. Methodical effects and influences emanated from the animals that potentially affected the diagnostic techniques were analyzed.

An impact of the following methodical factors on the faecal cultivation of Map was observed: storage of faecal samples, length of Hexadecylpyridiniumchlorid decontamination and number of culture slants used per faecal sample. Especially a higher number of culture slants increased the sensitivity of Map-cultivation. In one of the examined paratuberculosis herds influences on faecal culture results caused by the tested animals were not detectable, while impacts of the age and lactation stage on the cultivation of Map were determined in the other herd. Verification of Map in infected animals was significantly higher in animals older than 4 years and during the 3rd lactation stage. Additionally, shedding of Map was detected more frequently in animals with reduced milk yields (< 25 kg). The repetition of faecal culture raised the number of detected shedders and the sensitivity of the method significantly.

The sensitivity of two blood and milk ELISA tests (Svanovir- and Pourquier-ELISA) proved to be insufficient in subclinically infected animals. The examined cattle population, the intensity of faecal shedding as well as the age of the animals influenced sensitivities of both serological tests. A continuing raise of seropositive test results was noticed with increasing age of infected animals. The proportion of positive serological test results was significantly higher in animals that were heavily shedding Map and for animals with daily milk yields between 5 and 35 kg. Moreover, an increase of the Svanovir milk ELISA sensitivity was detected for animals tested during the 3rd lactation stage.

The diagnostic findings in a paratuberculosis nonsuspicious herd were used for the calculation of the ELISA specificity. For the Pourquier-ELISA sufficient specificities were calculated that were not significantly influenced by the animals properties. Test specificities of the Svanovir-ELISA turned out to be deficient and were additionally reduced by an increasing age of the examined cattle. Furthermore, the specificity of the Svanovir milk ELISA decreased when the daily milk yield of the tested animals was lower than 25 kg or when samples were taken during the 3rd or 4th lactation period. Methodical effects on the serological milk tests caused by the milk ingredients were possible and could not be excluded, though the probability that the calculated statistical significances occurred secondary due to changing milk yields and lactation stages was most likely. Repetition of serological tests adduced an unsatisfactory raise of all ELISA test sensitivities but caused a significant reduction of the Svanovir blood and milk ELISA specificities. The agreement of the test results for the two paratuberculosis ELISA tests was not sufficient. Using the Pourquier-ELISA, excellent agreement of the test results was determined for blood and milk samples that were taken simultaneously from identical animals.

In conclusion the present study revealed that only faecal culture under standardized conditions can be recommended for the *intra vitam* diagnosis of paratuberculosis in individual animals. Detection of Map in faeces of infected animals is mainly affected by methodical and herd specific factors, an ideal point of time for faecal sampling was not determined. The examination of faeces of young animals proved to be effective and can be advised as well as the repeated testing of faecal samples. The most important factors that influenced serological test results were the intensity of faecal shedding and the age of the examined animals. Because of the low test specificity the application of the Svanovir-ELISA for the diagnosis of paratuberculosis was evaluated to be unsuitable. The low sensitivity of the Pourquier-ELISA limited the test validity heavily, but as a result of its sufficient specificity, the test can be recommended for screening surveys in large dairy herds. For this purpose the examination of milk samples is adequate to the analysis of blood samples.

8. LITERATURVERZEICHNIS*

* Zeitschriftentitelabkürzungen gemäß:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/citmatch_help.html#JournalLists

ABBAS, B., H.P. RIEMANN u. B. LONNERDAL (1983):

Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne`s disease) in cattle. Am. J. Vet. Res. 44, 2229-2236

ADAMS, J., D. FOLLETT, H. HAMILTON u. CZUPRYNSKI, C.J. (1993):

Effects of administration of anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies on *Mycobacterium paratuberculosis* infection in intragastrically challenged mice. Immunol. Lett. 35, 183-189

ADAMS, J.L. u CZUPRYNSKI, C.J. (1994):

Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF-alpha, IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. Microb. Patholog. 16, 401-411

ALTMAN, D.G. (1998):

Some common problems in medical research. Practical statistics for medical research, 8th edn. Chapman & Hall, London, Weinheim, New York, 403-409

ANTOGNOLI, M.C., H.L. HIRST, F.B. GARRY u. M.D. SALMAN (2007):

Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. Zoonoses Public Health. 54, 152-159

ARGENTE, G. (1991):

Efficiency of vaccination and other control measures estimated by fecal culturing in a regional program. Proc. 3rd Int. Colloq. Paratuberculosis, 495-498

AVID-METHODENSAMMLUNG: *Mycobacterium paratuberculosis* (2007):

<http://www.dvg.net/index.php?id=234>

AYELE, W.Y., M. BARTOS, P. SVASTOVA u. I. PAVLIK (2004):

Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. Vet. Microbiol. 103, 209-217

AYELE, W.Y., P. SVASTOVA, P. ROUBAL, M. BARTOS u. I. PAVLIK (2005):

Mycobacterium avium Subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow`s milk in the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1210-1214

BANG, B. (1906):

Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde.
Berliner Tierärztliche Wochenschrift 42, 759-763

BANG, B. u. C.W. ANDERSEN (1913):

Einige Untersuchungen über komplementbindende Antistoffe bei experimenteller und spontaner Tuberkulose sowie paratuberkulöser Darmentzündung des Rindes.
Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. 69, 517-538

BANNANTINE, J.P., J.F. HUNTLEY, E. MILTNER, J.R. STABEL u. L.E. BERMUDEZ (2003):
The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology*. 149, 2061-2069

BANNANTINE, J.P. u. PAUSTIAN, M.L. (2006):
Identification of diagnostic proteins in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by a whole genome analysis approach. *Methods Mol. Biol.* 345, 185-196

BANNANTINE, J.P., M.L. PAUSTIAN, W.R. WATERS, J.R. STABEL, M.V. PALMER, L. LI u. V. KAPUR (2008a):
Profiling bovine antibody responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection by using protein arrays. *Infect. Immun.* 76, 739-749

BANNANTINE, J.P. u. STABEL, J.R. (2000):
HspX is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Vet. Microbiol.* 76, 343-358

BANNANTINE, J.P., W.R. WATERS, J.R. STABEL, M.V. PALMER, L. LI, V. KAPUR u. M.L. PAUSTIAN (2008b):
Development and use of a partial *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* protein array. *Proteomics*. 8, 463-474

BARRINGTON, G.M., J.M. GAY, I.S. ERIKS, W.C. DAVIS, J.F. EVERMANN, C. EMERSON, J. L. O'ROURKE, M.J. HAMILTON u. D.S. BRADWAY (2003):
Temporal patterns of diagnostic results in serial samples from cattle with advanced *paratuberculosis* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 195-200

BASSEY, E.O. u. COLLINS, M.T. (1997):
Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected cattle. *Infect. Immun.* 65, 4869-4872

BAUERFEIND, R., S. BENAZZI, R. WEISS, T. SCHLIESSER, H. WILLEMS u. G. BALJER (1996):
Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1617-1621

BAUMGARTNER, W. u. KHOL, J.L. (2008):
Paratuberculosis-potentials and limits of control programs. *Proc. XXV. Jubilee World Buiatrics Congress*, 7-10

BEARD, P.M., M.J. DANIELS, D. HENDERSON, A. PIRIE, K.RUDGE, D. BUXTON, S. RHIND, A. GREIG, M.R. HUTCHINGS, I. MCKENDRICK, K. STEVENSON u. J.M. SHARP (2001):
Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521

BEAUDEAU, F., M. BELLiard, A. JOLY u. H. SEEGERs (2007):
Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Vet. Res.* 38, 625-634

- BECH-NIELSEN, S., J.B. JORGENSEN, P. AHRENS u. N.C. FELD (1992):
Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis in dairy cows.
J. Clin. Microbiol. 30, 613-618
- BEGG, D. J., R. O'BRIEN, C.G. MACKINTOSH u. J.F. GRIFFIN (2005):
Experimental infection model for Johne`s disease in sheep. Infect. Immun. 73, 5603-5611
- BENDIXEN, P.H. (1978):
Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review.
Nord. Vet. Med. 30, 163-168
- BENEDICTUS, R., A.A. DIJKHUIZEN u. J. STELWAGEN (1987):
Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet. Rec. 121, 142-146
- BENEDICTUS, R., A. MITCHELL, M. LINDE-WIDMANN, R. SWEENEY, T. FYOCK, Y.H. SCHUKKEN u. R.H. WHITLOCK (2008):
Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. Prev. Vet. Med. 83, 215-227
- BERGHAUS, R.D., T.B. FARVER, R.J. ANDERSON, J.M. ADASKA u. I.A. GARDNER (2006a):
Use of age and milk production data to improve the ability of enzyme-linked immunosorbent assay test results to predict *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* fecal culture status.
J. Vet. Diagn. Invest. 18, 233-242
- BERGHAUS, R.D., T.B. FARVER, R.J. ANDERSON, C.C. JARAVATA u. I.A. GARDNER (2006b):
Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. J. Dairy Sci. 89, 963-970
- BERG JÖRGENSEN, J. u. JENSEN, P.T. (1978):
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. Acta. Vet. Scand. 19, 310-312
- BILLMAN-JACOB, H., M. CARRIGAN, F. COCKRAM, L.A. CORNER, I.J. GILL, J.F. HILL, T. JESSEP, A.R. MILNER u. P.R. WOOD (1992):
A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne`s disease in cattle. Aust. Vet. J. 69, 25-28
- BMVEL (2005):
Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen.
(Paratuberkuloseleitlinien). BAnz. vom 10.02.2005, 2165
- BÖGLI-STUBER, K., C. KOHLER, G. SEITERT, B. GLANEMANN, M.C. ANTOGNOLI, M.D. SALMAN, M.M. WITTENBRINK, M. WITTEW, T. WASSENER, T. JEMMI u. B. BISSIG-CHOISAT (2005):
Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. J. Appl. Microbiol. 99, 587-597
- BODENSCHATZ, W. (1997):
Desinfektion Lfg. 12, 6/97. Desinfektion – Rechtsvorschriften und Materialien.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-Lübeck-Ulm

- BOELAERT, F., K. WALRAVENS, P. BIRONT, J.P. VERMEERSCH, D. BERKVENNS u. J. GODFROID (2000):
Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* 77, 269-281
- BOSSHARD, C., R. STEPHAN u. T. TASARA (2006):
Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Prot.* 69, 1662-1667
- BRADY, C., D. O'GRADY, F. O'MEARA, J. EGAN u. H. BASSETT (2008):
Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows in herds affected by Johne's disease. *Vet. Rec.* 162, 147-152
- BRENNAN, P.J. u. NIKAIDO, H. (1995):
The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29-63
- BREUKINK, H.J., G.H. WENTINK, G. BENEDICTUS, J. HAAGSMA, E.T.B. DINKLA, J.J. SNOEP, A.M.G. FLAMAND, T. JORNA, J.W.B. VAN DER GIESSEN u. DE VRIES (1990):
Tussenrapport van de Coördinatie Werkgroep "Vaccinatie ziekte von Johne" (samenvatting). *Tijd. Diergeneeskunde.* 115, 599-601
- BUERGELT, C.D. u. DUNCAN, J.R. (1978):
Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 478-480
- BUERGELT, C.D., C. HALL, K. MCENTEE u. J.R. DUNCAN (1978):
Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207
- BULL, T.J., S.C. GILBERT, S. SRIDHAR, R. LINEDALE, N. DIERKES, K. SIDI-BOUMEDINE u. J. HERMON-TAYLOR (2007):
A novel multi-antigen virally vectored vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS ONE*, 2, e1129
- BULL, T.J., E.J. MC MINN, K. SIDI-BOUMEDINE, A. SKULL, D. DURKIN, P. NEILD, G. RHODES, R. PICKUP u. J. HERMON-TAYLOR (2003):
Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Chron's disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2915-2923
- CAFFIN, J.P., B. POUTREL u. P. RAINARD (1983):
Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G1 concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 66, 2161-2166
- CALLIHAN, D.R. (1986):
Growth and effects of antifungal agents on *Mycobacterium paratuberculosis* using BACTEC system. *Proc. 3rd Northeast Reg. Meet. Paratuberculosis*, 36
- CHACON, O., L.E. BERMUDEZ u. R.G. BALETTA (2004) :
Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 329-363

- CHALLANS, J.A., K. STEVENSON, H.W. REID u. J.M. SHARP (1994):
A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical specimens. *Vet. Rec.* 134, 95-96
- CHANDLER, R.L. (1961):
Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. III. Liver and spleen infections of vaccinated and unvaccinated Swiss white mice. *J. Comp. Pathol.* 71, 135-139
- CHEUNG, S.C., G. MEDOFF, D. SCHLESSINGER u. G.S. KOBAYASHI (1975):
Stability of amphotericin B in fungal culture media.
Antimicrob. Agents Chemother. 8, 426-428
- CHEVILLE, N.F., J. HOSTETTER, B.V. THOMSEN, F. SIMUTIS, Y. VANLOUBBEECK, E. STEADHAM (2001):
Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in macrophages.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 108, 236-243
- CHI, J., J.A. VAN LEEUWEN, A. WEERSINK u. G.P. KEEFE (2002):
Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leucosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*.
Prev. Vet. Med. 55, 137-153
- CHIODINI, R.J. (1996):
Immunology: resistance to paratuberculosis.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 313-343
- CHIODINI, R.J., u. HERMON-TAYLOR, J. (1993):
The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 629-631
- CHIODINI, R.J., H.J. VAN KRUININGEN u. R.S. MERKAL (1984):
Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects.
Cornell. Vet. 74, 218-262
- CHIODINI, R.J. u. ROSSITER, C.A. (1996):
Paratuberculosis: a potential zoonosis? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 457-467
- CLARK, M.A., B.H. HIRST u. M. A. JEPSON (1998):
M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M-cells. *Infect. Immun.* 66, 1237-1243
- CLARKE, C.J. (1997):
The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species.
J. Comp. Pathol. 116, 217-261
- COHEN, J. (1960):
A coefficient of agreement for nominal scales.
Educational and Psychological Measurement 20, 37-46
- COLLINS, M.T. (1994):
Clinical approach to control of bovine paratuberculosis.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 204, 208-210

- COLLINS, M.T. (1996):
Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 357-371
- COLLINS, M.T. (2006):
Proper estimation of sensitivity and specificity. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1373
- COLLINS, M.T., K.B. KENEFICK, D.C. SOCKETT, R.S. LAMBRECHT, J. MC DONALD u. J.B. JØRGENSEN (1990):
Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2514-2519
- COLLINS, M.T. und SOCKETT, D.C. (1993):
Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 1456-1463
- COLLINS, M.T., D.C. SOCKETT, S. RIDGE u. J.C. COX (1991):
Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne`s disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272-276
- COLLINS, D.M., D.M. STEPHENS, G.W. DE LISLE, A. MASTERS, R.J. EVANS u. P. KLUVER (1993):
Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 36, 289-299
- COLLINS, M.T., S.J. WELLS, K.R. PETRINI, J.E. COLLINS, R.D. SCHULTZ u. R.H. WHITLOCK (2005):
Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 685-692
- COUSINS, D.V., R.J. EVANS u. B.R. FRANCIS (1995):
Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 72, 458-462
- COUSINS, D.V., S.N. WILLIAMS, A. HOPE u. G.J. EAMENS (2000):
DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust. Vet. J.* 78, 184-190
- COUSSENS, P.M. (2001):
Mycobacterium paratuberculosis and the bovine immune system. *Anim. Health Res. Rev.* 2, 141-161
- COUSSENS, P.M. (2004):
Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72, 3089-3096
- CROSSLEY, B.M., F.J. ZAGMUTT-VERGARA, T.L. FYOCK, R.H. WHITLOCK u. I.A. GARDNER (2005):
Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet. Microbiol.* 107, 257-263

DARGATZ, D.A., B.A. BYRUM, L.K. BARBER, R.W. SWEENEY, R.H. WHITLOCK, W.P. SHULAW, R.H. JACOBSON u. J.R. STABEL (2001):
Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle.
J. Am Vet. Med. Assoc. 218, 1163-1166

DE JUAN, L., A. MATEOS, L. DOMÍNGUEZ, J.M. SHARP u. K. STEVENSON (2005):
Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. Vet. Microbiol. 106, 249-257

DE LISLE, G.W., M.C. CANNON, G.F. YATES u. D.M. COLLINS (2006):
Use of polymerase chain reaction to subtype *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, an increasingly important pathogen from farmed deer in New Zealand.
N. Z. Vet. J. 54, 195-197

DE LISLE, G.W., P. SEGUIN, B.S. SAMAGH, A.H. CORNER u. J.R. DUNCAN (1980):
Bovine paratuberculosis. I. A herd study using complement fixation and intradermal tests.
Can. J. Comp. Med. 44, 177-182

DHAND, N.K., J. EPPLESTON, R.J. WHITTINGTON u. J.A. TORIBIO (2007):
Risk factors for ovine Johne`s disease in infected sheep flocks in Australia.
Prev. Vet. Med. 82, 51-71

DOHMANN, K., B. STROMMENGER, K. STEVENSON, L. DE JUAN, J. STRATMANN, V. KAPUR, T.J. BULL u. G. F. GERLACH (2003):
Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* type I and type II isolates. J. Clin. Microbiol. 41, 5215-5223

DONAGHY, J.A., M.T. ROWE, J.L. RADEMAKER, P. HAMMER, L. HERMAN, V. DE JONGHE, B. BLANCHARD, K. DUHEM u. E. VINDEL (2008):
An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces.
Food Microbiol. 25, 128-135

DUFOUR, B., R. POUILLOT u. B. DURAND (2004):
A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds.
Vet. Res. 35, 69-81

DVG (2002):
Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. 4. Auflage
DVG, Gießen

EAMENS, G.J., R.J. WHITTINGTON, I.B. MARSH, M.J. TURNER, V. SAUNDERS, P.D. KEMSLEY u. D. RAYWARD (2000):
Comperative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne`s disease. Vet. Microbiol. 77, 357-367

EAMENS, G.J., R.J. WHITTINGTON, M.J. TURNER, S.L. AUSTIN, S.A. FELL u. I.B. MARSH (2007):
Evaluation of radiometric faecal culture and direct PCR on pooled faeces for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. Vet. Microbiol. 125, 22-35

- ELLINGSON, J. L., C. A. BOLIN u J. R. STABEL (1998):
Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell Probes* 12, 133-142
- ELSCHNER, M. (2003):
Information zur Paratuberkulosebekämpfung in Thüringen.
<http://www.thueringertierseuchenkasse.de>
- ENGLUND, S., A. BALLAGI-PORDÁNY, G. BÖLSKE u. K.E. JOHANSSON (1999):
Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 163-171
- ENGLUND, S., G. BOLSKE u. K.E. JOHANSSON (2002):
An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium sp.* other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 267-271
- ERUME, J., J. SPERGSEER u. R. ROSENGARTEN (2001):
Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *Afr. Health Sci.* 1, 83-89
- FERREIRA, R., L.S. FONSECA u. W. LILENBAUM (2002):
Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 173-175
- FLYNN, J.L., J. CHAN, K.J. TRIEBOLD, D.K. DALTON, T.A. STEWART u. B.R. BLOOM (1993):
An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 178, 2249-2254
- GASTEINER, J., M. AWAD-MASALMEH u. W. BAUMGARTNER (2000):
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet. Microbiol.* 77, 339-349
- GAY, J. M. u. SHERMAN, D. M. (1992):
Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.* 87, 1133-1139
- GEDEK, B. (2002):
Allgemeine Mykologie.
In: ROLLE, M. u. MAYR, A. : *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.*
Enke Verlag, Stuttgart, 589-608
- GEISBAUER, E., J.L. KHOL, M. WASSERTHEURER, J. DAMOSER, E. OSERREICHER, M. DÜNSER, S. REVILLA-FERNÁNDEZ u. W. BAUMGARTNER (2007):
Longterm investigation in an Austrian dairy herd with low prevalence of paratuberculosis detection of antibodies in blood and milk. *Vet. Q.* 29, 138-148
- GEUE, L., H. KÖHLER, W. KLAWONN, K. DRÄGER, R.G. HESS u. F.J. CONRATHS (2007):
Untersuchungen zur Eignung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Tankmilchproben aus Rheinland-Pfalz. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 120, 67-78

GIESE, S.B. u. AHRENS, P. (2000):

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.* 77, 291-297

GLAWISCHNIG, W., M. AWAD-MASALMEH, D. KHASCHABI u. M. SCHÖNBAUER (2004):
Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 117, 136-139

GONZÁLES, J., M.V. GEIJO, C. GARCÍA-PARIENTE, A. VERNA, J.M. CORPA, L.E. REYES, M.C. FERRERAS, R.A. JUSTE, J.F. GARCÍA MARÍN u. V. PÉREZ (2005) :
Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 133, 184-196

GRANT, I.R., H.J. BALL u. M.T. ROWE (1998):

Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 166-170

GRANT, I.R., C.M. POPE, L.M. O'RIORDAN, H.J. BALL u. M.T. ROWE (2000):

Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet. Microbiol.* 77, 369-378

GREEN, E.P., M.L. TIZARD, M.T. MOSS, J. THOMPSON, D.J. WINTERBOURNE, J.J. MCFADDEN u. J. HERMON-TAYLOR (1989):

Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063-9073

GREINER, M. (2003):

Kapitel 3: Evaluierung diagnostischer Tests.

Serodiagnostische Tests. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 43

GREWAL, S.K., S. RAJEEV, S. SREEVATSAN u. F.J. Jr. MICHEL (2006):

Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 565-574

GÜRTLER, H. U. SCHWEIGERT, F.J. (2000):

Physiologie der Laktation.

In: ENGELHARDT, W.v. u. BREVES, G. Physiologie der Haustiere.

Enke Verlag, Stuttgart, 572-587

GUMBER, S., G. EAMENS u. R.J. WHITTINGTON (2006):

Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.* 115, 91-101

GWOZDZ, J.M., K.G. THOMPSON, B.W. MANKTELOW, A. MURRAY u. D.M. WEST (2000):

Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78, 560-566

HAASMANN, S. u. SCHULZ, J. (1994):

Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes. In: WENDT, K., H. BOSTEDT, H. MIELKE u. H.W. FUCHS: Euter- und Gesäugekrankheiten. Gustav-Fischer-Verlag, Jena-Stuttgart, 275-277

- HALGARD, C. (1983):
Adverse effects of vaccination against paratuberculosis: tuberculin sensitization and nodule formation.
Comm. Europ. Commun., Agriculture Report Eur. 9000 EN, 145-154
- HAMMER, P., C. KIESNER, H.G. WALTE, K. KNAPPSTEIN u. P. TEUFEL (2003):
Heat resistance of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 54, 275-303
- HARDIN, L.E. u. THORNE, J.G. (1996):
Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 209, 120-122
- HARTMANN, P. u. PLUM, G. (1999):
Immunological defense mechanisms in tuberculosis and MAC-infection.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 34, 147-152
- HENDRICK, S.H., T.E. DUFFIELD, D.E. KELTON, K.E. LESLIE, K.D. LISSEMORE u. M. ARCHAMBAULT (2005):
Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 226, 424-428
- HERMANN, L. (1998):
Mycobacterium paratuberculosis and milk. IFST 98, 19-28
- HERMON-TAYLOR, J. (2009):
Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis*, Crohn's disease and the Doomsday scenario. Gut Pathog. 1, 15
- HERROLD, R.D. (1931):
Egg Yolk Agar Medium for the Growth of Tubercle Bacilli. J. Inf. Dis. 48, 236-241
- HIETALA, S.K. (1992):
The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. Vet. Med. 87, 1122-1132
- HINES, S.A., C.D. BUERGELT, J.H. WILSON u. E.L. BLISS (1987):
Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 681-683
- HINES II., M.E., J.R. STABEL, R.W. SWEENEY, F. GRIFFIN, A.M. TALAAT, D. BAKKER, G. BENEDICTUS, W.C. DAVIS, G.W. DE LISLE, I.A. GARDNER, R.A. JUSTE, V. KAPUR, A. KOETS, J. MC NAIR, G. PRUITT u. R.H. WHITLOCK (2007):
Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. Vet. Microbiol. 122, 197-222
- HOLMSTRÖM, A. u. STENLUND, S. (2005):
Control of paratuberculosis in live cattle and semen imported to Sweden 1995-2004.
Proc. 8th Int. Col. Parat., Copenhagen, Denmark, 74
- HOSTETTER, J., E. STEADHAM, J. HAYNES, T. BAILEY u. N. CHEVILLE (2003):
Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 26, 269-283

HUDA, A. u. JENSEN, H.E. (2003):

Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. J. Comp. Pathol. 129, 259-267

HUDA, A., G. JUNGERSEN, A.B. CHRISTOFFERSEN u. P. LIND (2003):

Diagnosis of bovine paratuberculosis by interferon-gamma (IFN-gamma) test. Acta. Vet. Scand. 44, 281

HUDA, A., G. JUNGERSEN u. P. LIND (2004):

Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 104, 43-53

HUNTER, S.W. u. BRENNAN, P.J. (1990):

Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem. 265, 9272-9279

HUNTER, S.W., H. GAYLORD u. P.J. BRENNAN (1986):

Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. J. Biol. Chem. 261, 12345-12351

HUTCHINSON, L.J. (1996)

Economic impact of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. 12, 373-381

HUTH, F.-W. (1995):

Analyse der Laktationskurve.

In: Die Laktation des Rindes. Analyse, Einfluß, Korrektur. Verlag Eugen Ulmer, 9-31

JALIER, V. u. NIKAIDO, H. (1994):

Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol. Lett. 123, 11-18

JARK, U., I. RINGENA, B. FRANZ, G.F. GERLACH, M. BEYERBACH u. B. FRANZ (1997):

Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. Vet. Microbiol. 57, 189-198

JØRGENSEN, J. B. (1977):

Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord. Vet. Med. 29, 267-270

JØRGENSEN, J. B. (1981):

Pathogenicity and immunogenicity of atypical mycobacteria for calves: a short summary. Rev. Infect. Dis. 3, 979-980

JØRGENSEN, J. B. (1982):

An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta. Vet. Scand. 23, 325-335

JØRGENSEN, J. B. (1983):

The diagnosis of clinical paratuberculosis in bovines.

Commission of the European Communities, Agriculture Report Eur 9000, 1-8

- JOHANSEN, K.A., E.E. HUGEN, u. J.B. PAYEUR (2006):
Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the presence of Hexadecylpyridinium Chloride, Natamycin, and Vancomycin. J. Food Prot. 69, 878-883
- JOHNE, H. A. u. FROTHINGHAM, L. (1895):
Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind.
Dtsch. Z. Tiermed. Vergl. Path. 21, 438-454
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.J., J.B. KANEENE, D.J. SPRECHER, J.C. GARDINER u. J.W. Lloyd (2000):
The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. Prev. Vet. Med. 46, 171-181
- JONES, R.L. (1989):
Review of the economic impact of Johne's disease in the United States.
In: MILNER, A.R. und WOOD, P.R. Johne's Disease. Current Trends in Research, Diagnosis and Management. Commonw. Sci. Ind. Res. Organ., Melbourne, Victoria, Australia
- JUDGE, J., I. KYRIAZAKIS, A. GREIG, D.J. ALLCROFT u. M.R. HUTCHINGS (2005):
Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? Appl. Environ. Microbiol. 71, 6033-6038
- JUDGE, J., I. KYRIAZAKIS, A. GREIG, R.S. DAVIDSON u. M.R. HUTCHINGS (2006):
Routes of intraspecies transmission *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. Appl. Environ. Microbiol. 72, 398-403
- JUNGERSEN, G., A. HUDA, J.J. HANSEN u. P. LIND (2002):
Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 453-460
- JUSTE, R.A., J.F. GARCIA MARIN, B. PERIS, C.S. SÁEZ DE OCÁRIZ, J.J. BADIOLA (1994):
Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Comp. Pathol. 110, 185-194
- KABELITZ, D., A. GLATZEL u. D. WESCH (2000):
Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes.
Int. Arch. Allergy. Immunol. 122, 1-7
- KALIS, C.H., G. BENEDICTUS u. H.J. VAN WEERING (1992):
Experiences with the use of an experimental vaccine in the control of paratuberculosis in The Netherlands. Proc. 3rd Int. Colloq. Paratuberculosis, 484-492
- KALIS, C.H., M.T. COLLINS, J.W. HESSELINK u. H.W. BARKEMA (2003):
Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay.
Vet. Microbiol. 97, 73-86
- KALIS, C.H., J.W. HESSELINK, E.W. RUSSCHEN, H.W. BARKEMA, M.T. COLLINS u. I.J. VISSER (1999):
Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. J. Vet. Diagn. Invest. 11, 345-351

- KALIS, C.H., J.W. HESSELINK, H.W. BARKEMA u. M.T. COLLINS (2001):
Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 62, 270-274
- KATAYAMA, N., C. TANAKA, T. FUJITA, Y. SAITOU, S. SUZUKI u. E. ONOUCHI (2000):
Effect of ensilage on inactivation of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.
Grass Sci. 46, 282-288
- KATAYAMA, N., C. TANAKA, T. FUJITA, T. SUZUKI, S. WATANABE u. S. SUZUKI (2001):
Effect of silage fermentation and ammonia treatment on activity of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Grass Sci.* 47, 296-299
- KHARE, S., L.G. ADAMS, J. OSTERSTOCK, A. ROUSSEL u. L. DAVID (2008):
Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1561-1562
- KHARE, S., T.A. FICHT, R.L. SANTOS, J. ROMANO, A.R. FICHT, S. ZHANG, I.R. GRANT, M. LIBAL, D. HUNTER u. L.G. ADAMS (2004):
Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1075-1081
- KHOL, J.L., J. DAMOSER, M. DÜNSER u. W. BAUMGARTNER (2007):
Paratuberculosis, a notifiable disease in Austria – current status, compulsory measures and first experiences. *Prev. Vet. Med.* 82, 302-307
- KHOO, K.H., A. DELL, H.R. MORRIS, P.J. BRENNAN u. D. CHATTERJEE (1995):
Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J. Biol. Chem.* 270, 12380-12389
- KIM, Y.G., S. BECH-NIELSEN, J.C. GORDON, R.D. SLEMONS u. E. SPANGLER (1988):
Fecal culture of *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle using a centrifugation specimen processing step. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* 84, 203-205
- KIM, Y.G., S. BECH-NIELSEN, J.C. GORDON, R.D. SLEMONS u. E. SPANGLER (1989):
Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1110-1113
- KIRCHGESSNER, M. (1997):
Ernährung und Milchmenge sowie Milchzusammensetzung.
Tierernährung. 10. neubearbeitete Auflage. Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis.
DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main, 317-328
- KLAUSEN, J., A. HUDA, L. EKEROTH u. P. AHRENS (2003):
Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle.
Prev. Vet. Med. 58, 171-178
- KLAWONN, W., K. CUSSLER, K.G. DRÄGER, H. GYRA, H. KÖHLER, K. ZIMMER u. R.G. HESS (2002):
The importance of allergic skin test with Johnin, antibody ELISA, cultural fecal test as well as vaccination for the sanitation of three chronically paratuberculosis-infected dairy herds in Rhineland-Palatinate. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 109, 510-516

- KÖHLER, H., B. BURKERT, I. PAVLIK, R. DILLER, L. GEUE, F.J. CONRATHS u. G. MARTIN (2008):
Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine serum.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 121, 203-210
- KÖHLER, H., H. GYRA, K. ZIMMER, K.G. DRÄGER, B. BURKERT, B. LEMSER, D. HAUSLEITHNER, K. KUBLER, W. KLAWONN u. R.G. HESS (2001):
Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections.
J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 48, 185-195
- KÖHLER, H., L. GEUE u. F. CONRATHS (2003):
Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland.
Amtstierärztl. Dienst u. Lebensmittelüberw., 1 /2003, 40-44
- KÖHLER, H. u. GIERKE, F. (2006):
Ist die Flüssigkultur die Methode der Wahl für die Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Kotproben von Rindern? Abstractband zur 3. Arbeitstagung des NRL für Tuberkulose und des NRL für Paratuberkulose, Jena
- KÖRMENDY, B. (1988):
Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta. Vet. Hung. 36, 177-183
- KÖRMENDY, B. (1990):
Paratuberculosis in a cattle herd: comparison of allergic, serologic and faecal microscopic tests. Acta. Microbiol. Hung. 37, 219-222
- KÖRMENDY, B. (1994):
The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds.
Vet. Microbiol. 41, 117-125
- KOBAYASHI, S., T. TSUTSUI, T. YAMAMOTO u. A. NISHIGUCHI (2007):
Epidemiologic indicators associated with within-farm spread of Johne`s disease in dairy farms in Japan. J. Vet. Med. Sci. 69, 1255-1258
- KOETS, A.P., P. ADUGNA, L.L. JANSS, H.J. VAN WEERING, C.H. KALIS, G.H. WENTIK, V.P. RUTTEN u. Y.H. SCHUKKEN (2000):
Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. J. Dairy Sci. 83, 2702-2708
- KRUIP, T.A., J. MUSKENS, H.J. VAN ROERMUND, D. BAKKER u. N. STOCKHOFE-ZURWIJEDEN (2003):
Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. Theriogenology. 59, 1651-1660
- KÜHNEL, M.P., R. GOETHE, A. HABERMANN, E. MÜLLER, M. ROHDE, G. GRIFFITHS u. P. VALENTIN-WEIGAND (2001):
Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria.
Cell. Microbiol. 3, 551-566

- LAMBRECHT, R. S., J. F. CARRIERE u. M. T. COLLINS (1988):
A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 910-916
- LANDSVERK, T. (1981):
Peyer's patches and the follicle-associated epithelium in diarrheic calves. Pathomorphology, morphometry and acid phosphatase histochemistry. Acta. Vet. Scand. 22, 459-471
- LARSEN, A. B., R. S. MERKAL u. R.C. CUTLIP (1975):
Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*.
Am. J. Vet. Res. 36, 255-257
- LARSEN, A. B., R. S. MERKAL u. T. H. VARDAMAN (1956):
Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 17, 549-551
- LARSEN, A.B. u. MOON, H.W. (1972):
Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens.
Am. J. Vet. Res. 33, 1231-1235
- LARSEN, A.B., A.I. MOYLE u. E.M. HIMES (1978):
Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. Am. J. Vet. Res. 39, 65-69
- LARSEN, A.B., O.H. STALHEIM, D.E. HUGHES, L.H. APPELL, W.D. RICHARDS u. E.M. HIMES (1981):
Mycobacterium paratuberculosis in the semen and genital organs of a semen-donor bull.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 179, 169-171
- LEI, L., B.L. PLATTNER u. J.M. HOSTETTER (2008):
Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a killed-bacterium vaccine induce distinct subcutaneous granulomas, with unique cellular and cytokine profiles.
Clin. Vaccine. Immunol. 15, 783-793
- LEPPER, A.W. u. WILKS, C.R. (1988):
Intracellular iron storage and the pathogenesis of paratuberculosis. Comparative studies with other mycobacterial, parasitic or infectious conditions of veterinary importance.
J. Comp. Pathol. 98, 31-53
- LEPPER, A.W., C.R. WILKS, M. KOTIW, J.T. WHITEHEAD u. K.S. SWART (1989):
Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. Aust. Vet. J. 66, 50-55
- LEROY, B., S. VIART, N. TRINCHERO, V. ROUPIE, M. GOVAERTS, J.J. LETESSON, K. HUYGEN u. R. WATTIEZ (2008):
Use of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific coding sequences for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. Vet. Microbiol. 2008 [Epub]
- LI, L., J.P. BANNANTINE, Q. ZHANG, A. AMONSIN, B.J. MAY, D. ALT, N. BANERJI, S. KANJILAL u. V. KAPUR (2005):
The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.
Proc. Natl. Acad. USA. 102, 12344-12349

- LIEBLER, E.M., M. PAAR u. J.F. POHLENZ (1991):
M cells in the rectum of calves. Res. Vet. Sci. 51, 107-114
- LOMBARD, J.E., T.M. BYREM, B.A. WAGNER u. B.J. MC CLUSKEY (2006a) :
Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle.
J. Vet. Diagn. Invest. 18, 448-458
- LOMBARD, J.E., B.A. WAGNER, R.L. SMITH, B.J. MC CLUSKEY, B.N. HARRIS, J.B. PAYEUR, F.B. GARRY u. M.D. SALMAN (2006b):
Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations.
J. Dairy Sci. 89, 4163-4171
- LOSINGER, W.C. (2005):
Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. J. Dairy Res. 72, 425-432
- LOVELL, R.M., M. LEVI u. J. FRANCIS (1944):
Studies on the survival of Johne's bacilli. J. comp. Pathol. 54, 120-129
- LÜPPING, W. (1989):
Milchuntersuchungen – ein Parameter zur Beurteilung der wiederkäuergerechten Fütterung?
Collegium veterinarium XX, 36-39
- LUGTON, I. (1999):
Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. Immunol. Cell Biol. 77, 364-372
- MACHAKOVA, M., P. SVASTOVA, J. LAMKA, I. PARMOVA, V. LISKA, J. SMOLIK, O.A. FISHER u. I. PAVLIK (2004):
Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001).
Vet. Microbiol. 101, 225-234
- MACKAY, C.R. u. HEIN, W.R. (1989):
A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. Int. Immunol. 1, 540-545
- MACKAY, C.R. u. HEIN, W.R. (1991):
Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system.
Immunol. Today 12, 30-34
- MACKINTOSH, C.G., G.W. DE LISLE, D.M. COLLINS u. J.F. GRIFFIN (2003):
Mycobacterial diseases of deer. N. Z. Vet. J. 52, 163-174
- MACKINTOSH, C.G., R.E. LABES, B.R. THOMPSON, R.G. CLARK, G.W. DE LISLE, P.D. JOHNSTONE u. J.F. GRIFFIN (2008):
Efficacy, immune responses and side-effects of vaccines against Johne's disease in young red deer (*Cervus elaphus*) experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. N. Z. Vet. J. 56, 1-9

- MAJEWSKI, A.C. und HANSEN, P.J. (2002):
Progesteron promotes survival of xenogeneic transplants in the sheep uterus.
Horm. Res. 58, 128-135
- MAJEWSKI, A.C., S. TEKIN u. P.J. HANSEN (2001):
Local versus systemic control of numbers of endometrial T-cells during pregnancy in sheep.
Immunology 102, 317-322
- MANNING, E. J. u. M. T. COLLINS (2001):
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis.
Rev. Sci. Tech. 20, 133-150
- MC DONALD, W.L., S.E. RIDGE, A.F. HOPE u. R.J. CONDRON (1999):
Evaluation of diagnostic tests for Johne`s disease in young cattle. Aust. Vet. J. 77, 113-119
- MC FADDEN, J.J., P.D. BUTCHER, J. THOMPSON, R. CHIODINI u. J. HERMON-TAYLOR (1987):
The use of DNA probes identifying restriction
- MC KENNA, S.L., H.W. BARKEMA, G.P. KEEFE u. D.C. SOCKETT (2006a):
Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. Vet. Microbiol. 114, 285-291
- MC KENNA, S.L., G.P. KEEFE, A. TIWARI, J. VAN LEEUWEN u. H.W. BARKEMA (2006b):
Johne`s disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. Can. Vet. J. 47, 1089-1099
- MC NAB, W.B., A.H. MEEK, S.W. MARTIN u. J.R. DUNCAN (1991):
Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. Can. J. Vet. Res. 55, 356-361
- MC QUEEN, D.S u. RUSSELL, E.G. (1979):
Culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine foetuses. Aust. Vet. J. 55, 203-204
- MERKAL, R. S. (1973):
Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163, 1100-1102
- MERKAL, R. S. (1984):
Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 184, 939-943
- MERKAL, R. S. u. CURRAN, B. J. (1974):
Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Appl. Microbiol. 28, 276-279
- MERKAL, R.S., K.E. KOPECKY, A.B. LARSEN u. J.R. THURSTON (1964):
Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Am. J. Vet. Res. 25, 1290-1294
- MERKAL, R. S., A.B. LARSEN u. G.D. BOOTH (1975):
Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 36, 837-838

MERKAL, R. S., A.B. LARSEN u. K.E. KOPECKY (1968):
Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle.
Am. J. Vet. Res. 29, 1533-1538

MERKAL, R.S., P.A.S. LYLE u. D.L. WHIPPLE (1982):
Decontamination, media, and culture methods for *Mycobacterium paratuberculosis*.
Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc. 86, 519-522

MERKAL, R.S. u. RICHARDS, W.D. (1972):
Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of mycobacteria.
Appl. Microbiol. 24, 205-207

MERKAL, R.S., D.L. WHIPPLE, J.M. SACKS u. G.R. SNYDER (1987):
Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in
the United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 676-680

MEYLAN, M., D.M. RINGS, W.P. SHULAW, J.J. KOWALSKI, S. BECH-NIELSEN u. G.F.
HOFFSIS (1996):
Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine
colostrum under experimental conditions simulating pasteurization.
Am. J. Vet. Res. 57, 1580-1585

MILNER, A.R., W.N. MACK, K.J. KOATES, J. HILL, I. GILL u. P. SHELDRIK (1990):
The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from
a field trial in cattle. Vet. Microbiol. 25, 193-198

MIYAMOTO, Y., T. MUKAI, F. TAKESHITA, N. NAKATA, Y. MAEDA, M. KAI u. M. MAKINO
(2004):
Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding
gene. FEMS Microbiol. Lett. 236, 227-234

MÖBIUS, P., H. HOTZEL, A. RASSBACH u. H. KÖHLER (2008):
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. 126, 324-333

MOKRESH, A.H., C.J. CZUPRYNSKI u. D.G. BUTLER (1989):
A rabbit model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infection.
Infect. Immun. 57, 3798-3807

MOLINA, J.M., A. ANGUIANO u. O. FERRER (1996):
Study of immune response of goats vaccinated with a live strain of *Mycobacterium*
paratuberculosis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 19, 9-15

MOLONEY, B.J. u. WHITTINGTON, R.J. (2008):
Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of
prevalence in exposed susceptible cattle. Aust. Vet. J. 86, 117-123

MOMOTANI, E., D.L. WHIPPLE, A.B. THIERMANN u. N.F. CHEVILLE (1988):
Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into
domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet. Pathol. 25, 131-137

- MOREIRA, A.R., F. PAOLICCHI, C. MORSELLA, M. ZUMARRAGA, A. CATALDI, B. FABIANA, A. ALICIA, O. PIET, D. VAN SOOLINGEN u. R.M. ISABEL (1999):
Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet. Microbiol.* 70, 251-259
- MORSCHHÄUSER, J. (2003):
Wie „entkommen“ Pilze der Therapie? Resistenzen und Resistenzmechanismen. *Pharm. Unserer Zeit* 2, 124-128
- MOSS, M.T., E.P. GREEN, M.L. TIZARD, Z.P. MALIK u. L. HERMON-TAYLOR (1991):
Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridization of the insertion element IS900. *Gut.* 32, 395-398
- MOTIWALA, A.S., A. AMONSIN, M. STROTHER, E.J. MANNING, V. KAPUR u. S. SREEVATSAN (2004):
Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1703-1712
- MUSKENS, J., H.W. BARKEMA, E. RUSSCHEN, K. VAN MAANEN, Y.H. SCHUKKEN u. D. BAKKER (2000):
Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 77, 253-261
- MUSKENS, J., F. VAN ZIJDERFELD, A. EGER u. D. BAKKER (2002):
Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 86, 269-278
- NEDROW, A.J., J. GAVALCHIN, M.C. SMITH, S.M. STEHMANN, J.K. MAUL, S.P. MC DONOUGH u. M.L. THONEY (2007):
Antibody and skin-test responses of sheep vaccinated against Johne's Disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 109-112
- NEELSEN, F. (1885):
Ein zweifelloser Fall von congenitaler Tuberkulose. *Fortschr. Med.* 3, 198-202
- NIELSEN, S.S. (2003):
Possibilities for intervention against paratuberculosis in Danish dairy herds. *Acta. Vet. Scand.* 44, 289-290
- NIELSEN, S.S. (2007):
Danish Control Program for Bovine Paratuberculosis. *Proc. 9th Int. Col. Parat.*, Tsukuba, Japan, 184
- NIELSEN, S.S., Y.T. GRÖHN u. C. ENEVOLDSEN (2002):
Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2795-2802
- NIELSEN, S.S. u. ERSBØLL, A.K. (2006):
Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *J. Dairy. Sci* 89, 4557-4566

- NIELSEN, S.S., B. KOLMOS u. A.B. CHRISTOFFERSEN (2004):
Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. J. Appl. Microbiol. 96, 149-153
- NIELSEN, S.S., S.M. THAMSBORG, H. HOUE u. V. BITSCH (2000):
Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. Prev. Vet. Med. 44, 1-7
- NIELSEN, S.S. u. TOFT, N. (2006):
Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. J. Dairy Sci. 89, 569-579
- NIELSEN, S.S. u. TOFT, N. (2008):
A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. Prev. Vet. Med. [Epub]
- NORBY, B., G.T. FOSGATE, E.J. MANNING, M.T. COLLINS u. A.J. ROUSSEL (2007):
Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. Vet. Microbiol. 124, 153-159
- NORDLUND, K.V., W.J. GOODGER, J. PELLETIER u. M.T. COLLINS (1996):
Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 1872-1876
- ÖSTENSSON, K. u. LUN, S. (2008):
Transfer of immunoglobulins through the mammary endothelium and epithelium and in the local lymph node of cows during the initial response after intramammary challenge with *E. coli* endotoxin. Acta. Vet. Scand. 50, 26
- O'BRIEN, C., C.G. MACKINTOSH, D. BAKKER, M. KOPECNA, I. PAVLIK u. J.F. GRIFFIN (2006):
Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the red deer (*Cervus elaphus*). Infect. Immun. 74, 3530-3537
- OSTERSTOCK, J.B., G.T. FOSGATE, B. NORBY, E.J. MANNING, M.T. COLLINS u. A.J. ROUSSEL (2007):
Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230, 896-901
- OTT, S.L., S.J. WELLS u. B.A. WAGNER (1999):
Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev. Vet. Med. 40, 179-192
- PALMER, M.V., W.C. STOFFREGEN, J.G. CARPENTER u. J.R. STABEL (2005):
Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. J. Wildl. Dis. 41, 629-635
- PAOLICCHII, F.A., M.J. ZURMARRAGA, A. GIOFFRE, P. ZAMORANO, C. MORSELLA, A. VERNA, A. CATALDI, A. ALITO u. M. ROMANO (2003):
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. 50, 20-26

PAVLIK, I., J. BARTL, L. DVORSKA, P. SVASTOVA, R. DU MAINE, M. MACHACKOVA, W. YAYO AYELE u. A. HORVATHOVA (2000):

Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998.

Vet. Microbiol. 77, 231-251

PEARSON, J.K.L. u. MC CLELLAND, T.G. (1955):

Uterine infection and congenital Johne's disease in cattle. Vet. Rec. 67, 615-616

PEDERSEN, J.C. (1992):

Natamycin as a Fungicide in Agar Media. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1064-1066

PERRY, G.H., H. VIVANCO, I. HOLMES, J. M. GWOZDZ u. J. BOURNE (2006):

No evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in *in vitro* produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows.

Theriogenology. 66, 1267-1273

PILLAI, S.R. u. JAYARAO, B.M. (2002):

Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. J. Dairy. Sci. 85, 1052-1057

POUPART, P., M. COENE, H. VAN HEUVERSWYN u. C. COCITO (1993):

Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. J. Clin. Microbiol. 31, 1601-1605

RAIZMAN, E.A, J. FETROW, S.J. WELLS, S.M. GODDEN, M.J. OAKES u. G. VAZQUEZ (2007):

The association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms.

Prev. Vet. Med. 78, 1

RAIZMAN, E.A., S.J. WELLS, P.A. JORDAN, G.D. DELGUIDICE u. R.R. BEY (2005):

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. Can. J. Vet. Res. 69, 32-38

RANKIN, J.D. (1961a):

The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. III. Calves maintained in an infectious environment. J. Comp. Pathol. 71, 10-15

RANKIN, J.D. (1961b):

The non-specificity of a complement fixation test used in the diagnosis of Johne's disease in cattle. Res. Vet. Sci. 2, 89-95

REDDACLIFF, L.A., A. VADALI u. R.J. WHITTINGTON (2003) :

The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. Vet. Microbiol. 95, 271-282

REYES-VELÁZQUEZ, W.P., V.H. ISAÍAS ESPINOZA, F. ROJO, C. JIMÉNEZ-PLASENCIA, E. DE LUCAS PALACIOS, J. HERNÁNDEZ-GÓBORA u. A. RAMÍREZ-ALVAREZ (2008) :

Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico.

Rev. Iberoam. Micol. 25, 182-185

RICHARDS, W.D. u. THOEN, C.O. (1977):

Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces.
J. Clin. Microbiol. 6, 392-395

RICHARDS, W.D. (1981):

Effects of physical and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*.
J. Clin. Microbiol. 14, 587-588

RISTOW, P., C.D. MARASSI, A.B. RODRIGUES, W.M. OELEMANN, F. ROCHA, A.S. SANTOS, E.C. CARVALHO, C.B. CARVALHO, R. FERREIRA, L.S. FONSECA u. W. LILENBAUM (2007):

Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. Vet. J. 174, 432-434

ROBBE-AUSTERMANN, S., A.C. KRULL u. J.R. STABEL (2006):

Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis.

J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 53, 213-217

ROHDE, R.F. u. SHULAW, W.P. (1990):

Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 1482-1483

ROSENBERGER, G. (1978):

Infektionskrankheiten des Verdauungsapparates.

In: ROSENBERGER, G. Krankheiten des Rindes, 2. Auflage.

Verlag Parey Berlin, Hamburg, 756-760

ROUPIE, V., B. LEROY, V. ROSSEELS, V. PIERSOEL, I. NOËL-GEORIS, M. ROMANO, M. GOVAERTS, J.J. LETESSON, R. WATTIEZ u. K. HUYGEN (2008a):

Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding MAP0586c and MAP4308c of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* secretome.

Vaccine. 26, 4783-4794

ROUPIE, V., V. ROSSEELS, V. PIERSOEL, D.K. ZINNIEL, R.G. BARLETTA u. K. HUYGEN (2008b):

Genetic resistance of mice to *Mycobacterium paratuberculosis* is influenced by Slc11a1 at the early but not at the late stage of infection. Infect. Immunol. 76, 2099-2105

ROUSSEL, A.J., G.T. FOSGATE, E.J. MANNING u. M.T. COLLINS (2007):

Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230, 890-895

RUNNELS, R.A. (1955):

Case 17-paratuberculosis in a pig. J. Am. Vet. Med. Assoc. 127, 523-524

RUSSELL, D.G. (1998):

What does inhibition of phagosome-lysosome fusion really mean?

Trends in Microbiol. 6, 212-214

SALGADO, M., J. KRUIZE u. M.T. COLLINS (2007):

Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 99-102

- SAMBROOK, J., F. FRITSCH u. T. MANIATIS (1989):
Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York
- SAXEGAARD, F. (1990):
Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Comp. Pathol. 102, 149-156
- SCHLESINGER, L.S. (1993):
Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. J. Immunol. 150, 2920-2930
- SCHLESINGER, L.S. u. HORWITZ, M.A. (1991):
Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. J. Immunol. 147, 1983-1994
- SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD, K. FAILING u. M. BÜLTE (2008):
New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2751-2758
- SCOTT, P.R., C.J. CLARKE u. T.J. KING (1995):
Serum protein concentrations in clinical cases of ovine paratuberculosis (Johne`s disease). Vet. Rec. 137, 173
- SCOTT, H.M., G.T. FOSGATE, M.C. LIBAL, L.W. SNEED, E. EROL, A.B. ANGULO u. E.R. JORDAN (2007a):
Field testing of an enhanced direct-fecal polymerase chain reaction procedure, bacterial culture of feces, and a serum enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in adult dairy cattle. Am. J. Vet. Res. 68, 236-245
- SCOTT, H.M., O. SORENSEN, J.T. WU, E.Y. CHOW u. K. MANNINEN (2007b):
Seroprevalence of and agroecological risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and neospora caninum infection among adult beef cattle in cow-calf herds in Alberta, Canada. Can. Vet. J. 48, 397-406
- SECOTT, T.E., T.L. LIN u. C.C. WU (2002):
Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Infect. Immun. 70, 2670-2675
- SECOTT, T.E., T.L. LIN u. C.C. WU (2004):
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. Infect. Immun. 72, 3724-3732
- SEITZ, S.E., L.E. HEIDER, W.D. HEUSTON, S. BECH-NIELSEN, D.M. RINGS u. L. SPANGLER (1989):
Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 194, 1423-1426

SELBITZ, H.-J. (2002):

Bakterielle Krankheiten der Tiere. Mykobakterium.

In: ROLLE, M. u MAYR, A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart, 562-563

SHERMAN, D.M., J.M. GAY, D.S. BOULEY u. G.H. NELSON (1990):

Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 51, 461-465

SHIN (1989):

Report of the committee on Johne`s disease. Proc. 93rd U.S. Anim. Health Assoc., 381

SHIN, S.J., D. CHO u. M.T. COLLINS (2008):

Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Clin. Vaccine. Immunol. 15, 1277-1281

SIBLEY, L.D., S.W. HUNTER, P.J. BRENNAN u. J.L. KRAHENBUHL (1988):

Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. Infect. Immun. 56, 1232-1236

SIGURETHARDÓTTIR, O.G., C.M. PRESS u. O EVENSEN (2001):

Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. Vet. Pathol. 38, 184-189

SIGURETHARDÓTTIR, O.G., M. VALHEIM u. C.M. PRESS (2004):

Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. Adv. Drug Deliv. Rev. 56, 819-834

SIMUTIS, F.J., D.E. JONES u. J.M. HOSTETTER (2007):

Failure of antigen-stimulated gammadelta T cells and CD4+ T cells from sensitized cattle to upregulate nitric oxide and mycobactericidal activity of autologous *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 116, 1-12

SMITHWICK, R.W., M.R. JR BIGBIE, R.B. FERGUSON, M.A. KARLIX u. C.K. WALLIS (1995):

Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 33, 2763-2764

SOCKETT, D.C., D.J. CARR u. M.T. COLLINS (1992a):

Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle.

Can. J. Vet. Res. 56, 148-153

SOCKETT, D.C., T.A. CONRAD, C.B. THOMAS u. M.T. COLLINS (1992b):

Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis.

J. Clin. Microbiol. 30, 1134-1139

SPANGLER, A., L.E. HEIDER, S. BECH-NIELSEN u. C.R. DORN (1991):

Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. Am. J. Vet. Res. 52, 1197-1200

SPEER, C.A., M.C. SCOTT, J.P. BANNANTINE, W.R. WATERS, Y. MORI, R.H. WHITLOCK u. S. EDA (2006):

A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. Clin. Vaccine. Immunol. 13, 535-540

STABEL, J.R. (1996)

Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. J. Vet. Diagn. Invest. 8, 345-350

STABEL, J.R. (1997a):

An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 375-380

STABEL, J.R. u. BANNANTINE, J.P. (2005):

Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. J. Clin. Microbiol. 43, 4744-4750

STABEL, J.R., T.L. BOSWORTH, T.A. KIRKBRIDE, R.L. FORDE u. R.H. WHITLOCK (2004):

A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. 16, 22-30

STABEL, J.R. u. GOFF, J.P. (2004):

Efficacy of immunologic assays for the detection of Johne's disease in dairy cows fed additional energy during the periparturient period. J. Vet. Diagn. Invest. 16, 412-420

STABEL, J.R., K. KIMURA u. S. ROBBE-AUSTERMANN (2007):

Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 43-51

STABEL, J. R., E. M. STEADHAM u. C. A. BOLIN (1997b):

Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl. Environ. Microbiol. 64, 4975-4977

STEPHAN, R. (2007):

Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Verbr. Lebensm. 2, 222-227

STERNBERG, S. u. LARSSON, B. (2005):

Screening the Swedish sheep population for paratuberculosis. Proc. 8th Int. Col. Parat., Copenhagen, Denmark, 76

STEVENSON, K., V. M. HUGHES, L. DE JUAN, N. F. INGLIS, F. WRIGHT u. J. M. SHARP (2002):

Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 40, 1798-1804

STICH, R.W., B. BYRUM, B. LOVE, N. THEUS, L. BARBER u. W.P. SHULAW (2004):

Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. J. Microbiol. Methods. 56, 267-275

- STRATMANN, J., K. DOHMANN, J. HEINZMANN u. G.F. GERLACH (2006):
Peptide aMptD-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk milk samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5150-5158
- STRATMANN, J., B. STROMMENGER, K. STEVENSON u. G.F. GERLACH (2002):
Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4244-4250
- STREETER, R.N., G.F. HOFFSIS, S. BECH-NIELSEN, W.P. SHULAW u. D.M. RINGS (1995):
Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1322-1324
- STROMMENGER, B., K. STEVENSON u. G.F. GERLACH (2001):
Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 196, 31-37
- SUGDEN, E.A., A.H. CORNER, B.S. SAMAGH, B.W. BROOKS, C. TURCOTTE, K.H. NIELSEN, R.B. STEWART u. J.R. DUNCAN (1989):
Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 50, 850-854
- SUGDEN, E.A., K. STILWELL u. A. MICHAELIDES (1997):
A comparison of lipoarabinomannan with other antigens used in absorbed enzyme immunoassays for the serological detection of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 413-417
- SULZER, B. (1989):
Futtermverhalten von Kühen auf einer Bergweide. ETH Zürich, Dipl.
- SWEENEY, R. W. (1996):
Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 305-312
- SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK, C.L. BUCKLEY u. P. SPENCER (1995):
Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 488-493
- SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK, C.L. BUCKLEY, P. SPENCER, A.E. ROSENBERGER u. L.J. HUTCHINSON (1994):
Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am. J. Vet. Res.* 55, 905-909
- SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK, A.N. HAMIR u. S.A. HERR (1992a):
Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312-1314
- SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK, S. MC ADAMS u. T. FYOCK (2006):
Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 2-6

- SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK u. A.E. ROSENBERGER (1992b):
Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin. Microbiol. 30, 166-171
- SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK u. A.E. ROSENBERGER (1992c):
Mycobacterium paratuberculosis isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. Am. J. Vet. Res. 53, 477-480
- TADDEI, S., C. ROBBI, C. CESENA, I. ROSSI, E. SCHIANO, N. ARRIGONI, G. VICENZONI u. S. CAVIRANI (2004):
Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. J. Vet. Diagn. Invest. 16, 503-508
- TAVORNPANICH, S., I.A. GARDNER, T.E. CARPENTER, W.O. JOHNSON u. R.J. ANDERSON (2006):
Evaluation of cost-effectiveness of targeted sampling methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy herds. Am. J. Vet. Res. 67, 821-828
- TAYLOR, A.W. (1953):
The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. J. Comp. Pathol. 63, 368-373
- TAYLOR, T.K., C.R. WILKS u. D.S. MCQUEEN (1981):
Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne`s disease. Vet. Rec. 109, 532-533
- TESSEMA, M.Z., A.P. KOETS, V.P. RUTTEN u. E. GRUYS (2001):
How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? Vet. Q. 23, 153-162
- TIWARI, A., J.A. VAN LEEUWEN, I.R. DOHOO u. G.P. KEEFE (2002):
Effects of seropositivity for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on risk of culling in Maritime Canadian dairy cattle. Proc. 54th Annu. Conv. Can. Vet. Med. Assoc., 264
- TIWARI, A., J.A. VAN LEEUWEN, I.R. DOHOO, H. STRYHN u. G.P. KEEFE (2003):
Effects of seropositivity for bovine Leukemia virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on calving to conception interval in maritime Canadian dairy cattle. Proc. Soc. Vet. Epidemiol. Prev. Vet. Med., 243-252
- TEKIN, S. u. HANSEN, P.J. (2004):
Regulation of numbers of macrophages in the endometrium of the sheep by systemic effects of pregnancy, local presence of the conceptus, and progesterone. Am. J. Reprod. Immunol. 51, 56-62
- THOREL, M.F., M. KRICHEVSKY u. V.V. LEVY-FREBAULT (1990):
Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium silvaticum* subsp. *nov.*. Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 254-260

- TURCOTTE, C., B.W. BROOKS, W.M. DION u. R. MARENGER (1986):
Bacterial and fungal contaminants interfering with the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis*. Amer. Assn. Vet. Lab. Diagn. 29th Annu. Proc., 49-58
- TURNER, M. (1991):
Immunglobuline, die Antigene erkennen.
In: ROITT, I.M, J. BROSTOFF u. D.K. MALE: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 2. neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, 55
- TWORT, F.W. u. INGRAM, G.L.Y. (1912):
A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic for pseudotuberculous enteritis of bovines. Proc. Roy. Soc. London 84, 517-543
- VALENTIN-WEIGAND, P. (2002):
Pathogenesis and immune reactions of paratuberculosis.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 507-509
- VAN DER GIESSEN, J.W., R.M. HARING, E. VAUCLARE, A. EGER, J. HAAGSMA u. B.A. VAN DER ZEIJST (1992):
Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program.
J. Clin. Microbiol. 30, 1216-1219
- VAN KRUININGEN, H.J., R.J. CHIODINI, W.R. THAYER, J.A. COUTU, R.S. MERKAL u. P.L. RUNNELS (1986):
Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Chron's disease. A preliminary report. Dig. Dis. Sci. 31, 1351-1360
- VAN MAANEN, K., C. KOSTER u. B. VAN VEEN (1999):
Validation report: *Mycobacterium paratuberculosis* antibody detecting ELISAs.
Institute Pourquier, Final version 9th September 1999
- VANNUFFEL, P., P. GILOT, B. LIMBOURG, B. NAERHUYZEN, C. DIETRICH, M. COENE, L. MACHTELINCKX u. C. COCITO (1994):
Development of a species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. J. Clin. Microbiol. 32, 1211-1216
- VAN ROERMUND, H.J., D. BAKKER, P.T. WILLEMSSEN u. M.C. de Jong (2007):
Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves.
Vet. Microbiol. 122, 270-279
- VAN SCHAİK, G., C.R. ROSSITER, S.M. STEHMANN, S.J. SHIN u. Y.H. SCHUKKEN (2003):
Longitudinal study to investigate variation in results of repeated ELISA and culture of fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercial dairy herds.
Am J. Vet. Res. 64, 479-484
- VAN ULSEN, F.W. (1970):
Paratuberculosis in a pygmy ass, *Equus asinus*. Tijdschr. Diergeneesk. 95, 446-448

VAN WEERING, H., G. VAN SCHAİK, A. VAN DER MEULEN, M. WAAL, P. FRANKEN u. K. VAN MAANEN (2007):

Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Vet. Microbiol.* 125, 49-58

VARY, P.H., P.R. ANDERSEN, E. GREEN, J. HERMON-TAYLOR u. J.J. MC FADDEN (1990):

Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne`s disease. *J. Clin. Microbiol.* 28, 933-937

VISKE, D., B. LARSSON, A. ENGVALL u. G. BÖLSKE (1996):

Paratuberculosis in Sweden. *The Paratuberculosis Newsletter* 8-2, 29

VISUVANATHAN, S., M. MOSS, J.L. STANFORD, J. HERMON-TAYLOR u. J.J. MC FADDEN (1989):

Simple enzymic method for isolation of DNA from diverse bacteria. *J. Microbiol. Methods* 10, 59-64

VOGEL, O. (1977):

Paratuberkulose bei einem Hund. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 90, 419-421

WATERS, W.R., J.M. MILLER, M.V. PALMER, J.R. STABEL, D.E. JONES, K.A.

KOISTINEN, E.M. STEADHAM, M.J. HAMILTON, W.C. DAVIS u. J.P. BANNANTINE (2003):

Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves.

Infect. Immun. 71, 5130-5138

WEISS, C. (2008):

Basiswissen Medizinische Statistik. 4. Auflage.

Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 177-184, 243, 245

WENTINK, G.H., J.H. BONGERS, A.A. ZEEUWEN u. F.H. JAARTSVELD (1994):

Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl. Veterinärmed. B.* 41, 517-522

WELLS, S.J. u. WAGNER, B.A. (2000):

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. 216, 1450-1457

WHAN, L., H. J. BALL, I.R. GRANT u. M.T. ROWE (2005):

Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7107-7112

WHIPPLE, D.L., D.R. CALLIHAN u. J.L. JARNAGIN (1991):

Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 368-373

WHIPPLE, D.L., P.A. KAPKE u. P.R. ANDERSEN (1992):

Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 23-27

- WHITLOCK, R.H. u. BUERGELT, C. (1996):
Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology).
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 345-356
- WHITLOCK, R.H., L.J. HUTCHINSON u. R.S. MERKAL (1985):
Prevalence and economic consideration of Johne´s disease in the Northeastern U.S.
Proc. 89th Annu. Meeting U.S. Anim. Health Assoc., 484-490
- WHITLOCK, R.H. u. ROSENBERGER, A.E. (1990):
Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis*: a recommended procedure.
Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc. 94, 280-285
- WHITLOCK, R.H., A.E.ROSENBERGER u. P.A. SPENCER (1989):
Laboratory culture techniques for Johne´s disease: a critical evaluation of contamination and incubation times. Proc. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc. 93, 382-386
- WHITLOCK, R.H., S.J. WELLS, R.W. SWEENEY u. J. VAN TIEM (2000):
ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne´s disease): sensitivity and specificity of each method. Vet. Microbiol. 77, 387-398
- WHITTINGTON, R.J., D.J. MARSHALL, P.J. NICHOLLS, I.B. MARSH u. L.A. REDDACLIFF (2004):
Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment.
Appl. Environ. Microbiol. 70, 2989-3004
- WHITTINGTON, R.J., I. MARSH, M.J. TURNER, S. MCALLISTER, E. CHOY, G.J. EAMENS, D.J. MARSHALL u. S. OTTAWAY (1998):
Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. J. Clin. Microbiol. 36, 701-707
- WHITTINGTON, R.J. u. SERGEANT, E.S. (2001):
Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. Aust. Vet. J. 79, 267-278
- WHITTINGTON, R.J. u. WINDSOR, P.A. (2007):
In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. Vet. J. 2007, [Epub]
- WILKS, C.R., T.K. TAYLOR, E.G. RUSSELL u. T.R. THOMAS (1981):
Isolation of mycobacteria inducing cross-reactions in the complement fixation test for Johne`s disease. Res. Vet. Sci. 30, 323-327
- WILSON, D.J., C. ROSSITER, H.R. HAN u. P.M. SEARS (1993):
Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows.
Am. J. Vet. Res. 54, 1851-1857
- WINAU, F., S.H.E. KAUFMANN u. U.E. SCHAIBLE (2004):
Apoptosis paves the detour path for CD8T cell activation against intracellular bacteria.
Cell. Microb. 6, 599-607

WINDSOR, P.A. u. EPPLESTON, J. (2006):

Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund`s complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. N. Z. Vet. J. 54, 237-241

WINTERHOFF, C. (2000):

Paratuberkulose-Diagnostik in Milch: Erreger- und Antikörpernachweis mittels PCR und ELISA. Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

YOKOMIZO, Y., M. KISHIMA, Y. MORI u. K. NISHIMORI (1991):

Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. J. Vet. Med. Sci. 53, 577-584

YOKOMIZO, Y., R.S. MERKAL u. P.A. LYLE (1983):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmatic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 44, 2205-2207

YOKOMIZO, Y., H. YUGI u. R.S. MERKAL (1985):

A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. Nippon. Juigaku. Zasshi. 47, 111-119

ZIEHL, F.H.P. (1882):

Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch. Med. Wschr. 8, 451

ZUR LAGE, S., R. GOETHE, A. DARJI, P. VALENTIN-WEIGAND u. S. WEISS (2003):

Activation of macrophages and interference with CD4+-T-cell stimulation by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium*.

Immunol. 108, 62-69

9. ANHANG

9.1 Blut- und Milch-ELISA-Befunde nach den Klassen der tierspezifischen Parameter

Legende für die Tabellen

n – Anzahl der Proben SV – Svanovir-ELISA PO – Pourquier-ELISA

Alter

Tab. 78: **Blut-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere in 6 Altersgruppen

Alter in Jahren	n	Blut-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1,4 – 2	53	88,7	100,0	9,4	-	1,9	-
2 – 3	267	80,9	93,2	8,2	0,4	10,9	6,4
3 – 4	227	65,6	86,8	12,4	0,4	22,0	12,8
4 – 5	159	56,0	79,9	17,6	3,1	26,4	17,0
5 – 6	110	46,4	82,7	25,4	0,9	28,2	16,4
> 6	101	63,4	87,1	17,8	3,0	18,8	9,9

Tab. 79: **Milch-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere in 5 Altersgruppen

Alter in Jahren	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
2 – 3	219	89,0	91,3	5,5	0,9	5,5	7,8
3 – 4	196	71,4	83,7	15,8	1,5	12,8	14,8
4 – 5	141	63,8	76,6	19,2	3,5	17,0	19,9
5 – 6	98	50,0	75,5	27,5	2,0	22,5	22,5
> 6	91	67,0	76,9	16,5	6,6	16,5	16,5

Tab. 80: **Blut-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere in 6 Altersgruppen

Alter in Jahren	n	Blut-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1,4 – 2	362	94,5	98,9	3,9	0,8	1,6	0,3
2 – 3	652	85,6	99,5	6,9	0,2	7,5	0,3
3 – 4	495	80,2	99,4	10,9	0,2	8,9	0,4
4 – 5	352	71,9	98,9	17,3	-	10,8	1,1
5 – 6	207	65,2	99,5	20,3	-	14,5	0,5
> 6	348	63,8	99,4	17,2	0,3	19,0	0,3

Tab. 81: **Milch-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere in **5 Altersgruppen**

Alter in Jahren	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
2 – 3	474	92,4	100,0	4,9	-	2,7	-
3 – 4	427	87,8	98,8	6,6	0,7	5,6	0,5
4 – 5	299	85,3	98,0	9,4	0,7	5,3	1,3
5 – 6	174	75,9	99,4	14,9	-	9,2	0,6
> 6	287	75,6	99,0	13,6	-	10,8	1,0

LaktationsphaseTab. 82: **Blut-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere in **4 Laktationsphasen**

Laktationsphase	n	Blut-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	298	68,8	86,2	12,4	2,4	18,8	11,4
2	222	63,1	87,4	14,8	0,5	22,1	12,1
3	164	59,1	84,8	16,5	1,2	24,4	14,0
4	124	62,9	87,9	20,2	0,8	16,9	11,3

Tab. 83: **Milch-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere in **4 Laktationsphasen**

Laktationsphase	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	269	75,8	82,9	13,8	1,9	10,4	15,2
2	201	74,6	84,6	14,9	1,5	10,5	13,9
3	145	65,5	81,4	14,5	2,1	20,0	16,5
4	103	61,2	78,6	21,3	6,8	17,5	14,6

Tab. 84: **Blut-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere in **4 Laktationsphasen**

Laktationsphase	n	Blut-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	727	75,2	99,5	13,8	0,1	11,0	0,4
2	453	77,4	99,3	11,3	-	11,3	0,7
3	369	75,3	99,5	13,3	-	11,4	0,5
4	164	79,3	99,4	12,2	0,6	8,5	-

Tab. 85: **Milch-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere in **4 Laktationsphasen**

Laktationsphase	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	724	86,3	99,6	8,2	-	5,5	0,4
2	452	88,7	98,9	6,9	0,4	4,4	0,7
3	352	82,7	98,9	10,5	-	6,8	1,1
4	129	74,4	97,7	13,2	2,3	12,4	-

TagesmilchleistungTab. 86: **Blut-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere in **7 Milchleistungsgruppen**

Milchleistungsgruppe	n	Blut-ELISA-Befunde (in %)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	93	90,3	100,0	6,5	-	3,2	-
2	118	58,5	83,9	19,5	1,7	22,0	14,4
3	211	64,5	84,8	12,3	-	23,2	15,2
4	245	57,6	82,9	16,3	2,8	26,1	14,3
5	183	71,0	91,3	15,9	0,5	13,1	8,2
6	55	80,0	94,6	9,1	1,8	10,9	3,6
7	12	100,0	100,0	-	-	-	-

Tab. 87: **Milch-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere in **7 Milchleistungsgruppen**

Milchleistungsgruppe	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	6	66,7	100,0	16,6	-	16,7	-
2	115	60,0	76,5	15,6	4,4	24,4	19,1
3	203	73,4	80,3	15,3	2,5	11,3	17,2
4	216	67,1	78,7	17,6	2,3	15,3	19,0
5	151	79,5	91,4	13,2	1,3	7,3	7,3
6	42	85,7	95,2	9,5	-	4,8	4,8
7	12	100,0	91,7	-	8,3	-	-

Tab. 88: **Blut-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere in 7 Milchleistungsgruppen

Milchleistungsgruppe	n	Blut-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	14	78,6	99,1	7,1	0,5	14,3	0,4
2	181	69,6	99,5	18,2	0,5	12,1	-
3	548	81,0	99,8	9,3	-	9,7	0,2
4	456	74,6	99,1	13,8	0,2	11,6	0,7
5	331	74,2	99,1	13,6	-	12,2	0,9
6	114	71,9	99,1	20,2	-	7,9	0,9
7	11	72,7	100,0	-	-	27,3	-

Tab. 89: **Milch-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere in 7 Milchleistungsgruppen

Milchleistungsgruppe	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1	14	64,3	100,0	14,3	-	21,4	-
2	175	72,0	97,7	14,3	0,6	13,7	1,7
3	554	87,2	99,3	7,9	0,5	4,9	0,2
4	456	88,6	99,3	7,0	0,2	4,39	0,5
5	337	84,3	99,4	10,1	-	5,6	0,6
6	114	87,7	99,1	6,2	-	6,1	0,9
7	11	100,0	90,9	-	-	-	9,1

MilchparameterTab. 90: **Milch-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere für je 2 Milcheiweiß- und Milchlaktoseklassen

	Klassen	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
			negativ		fraglich		positiv	
			SV	PO	SV	PO	SV	PO
Milcheiweißgehalt in %	≤ 3,7 %	598	74,8	84,0	14,2	1,8	11,0	14,2
	> 3,7 %	147	59,9	77,5	18,4	4,8	21,7	17,7
Milchlaktosegehalt in %	≤ 4,9 %	548	69,7	79,6	15,7	2,7	14,6	17,7
	> 4,9 %	197	77,7	91,4	13,2	1,5	9,1	7,1

Tab. 91: **Milch-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere für je 2 **Milcheiweiß-** und **Milchlaktoseklassen**

	Klassen	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
			negativ		fraglich		positiv	
			SV	PO	SV	PO	SV	PO
Milcheiweiß- gehalt in %	≤ 3,7 %	1406	86,8	99,3	8,0	0,1	5,2	0,6
	> 3,7 %	255	77,3	97,6	12,1	1,6	10,6	0,8
Milchlaktose- gehalt in %	≤ 4,9 %	1307	84,8	99,2	8,9	0,3	6,3	0,5
	> 4,9 %	354	87,3	98,6	7,9	0,3	4,8	1,1

Tab. 92: **Milch-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere für 4 **Milchharnstoffklassen**

Milchharnstoff-	gehalt in mg/l	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
			negativ		fraglich		positiv	
			SV	PO	SV	PO	SV	PO
1. ≤ 150	469	69,3	79,1	16,4	3,0	14,3	17,9	
2. 151 – 250	142	78,2	89,4	14,1	2,1	7,7	8,5	
3. 251 – 350	127	74,0	88,9	11,8	0,8	14,2	10,3	
4. > 350	7	71,4	71,4	-	-	28,6	28,6	

Tab. 93: **Milch-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere für 4 **Milchharnstoffklassen**

Milchharnstoff-	gehalt in mg/l	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
			negativ		fraglich		positiv	
			SV	PO	SV	PO	SV	PO
1. ≤ 150	188	81,5	98,9	11,1	0,5	7,4	0,6	
2. 151 – 250	917	84,8	99,1	8,6	0,3	6,5	0,6	
3. 251 – 350	528	87,1	99,0	8,0	0,2	4,9	0,8	
4. > 350	27	92,6	100,0	7,4	-	-	-	

Tab. 94: **Milch-ELISA-Befunde** kotpositiver Tiere nach **Milchzellgehalt**

Milchzellgehalt (x 10 ³ Zellen / ml)	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1. ≤ 50	202	83,7	88,1	9,4	2,0	6,9	9,9
2. > 50 ≤ 100	159	74,8	86,8	14,5	1,9	10,7	11,3
3. > 100 ≤ 500	282	66,0	80,1	17,7	2,5	16,3	17,4
4. > 500 ≤ 1000	56	60,7	66,1	17,9	7,1	21,4	26,8
5. > 1000	46	58,7	80,4	21,7	-	19,6	19,6

Tab. 95: **Milch-ELISA-Befunde** kotnegativer Tiere nach **Milchzellgehalt**

Milchzellgehalt (x 10 ³ Zellen / ml)	n	Milch-ELISA-Befunde (in % von n)					
		negativ		fraglich		positiv	
		SV	PO	SV	PO	SV	PO
1. ≤ 50	651	90,8	99,5	5,4	0,3	3,8	0,2
2. > 50 ≤ 100	347	85,0	99,4	11,0	-	4,0	0,6
3. > 100 ≤ 500	519	80,9	98,5	10,0	0,6	9,1	0,9
4. > 500 ≤ 1000	76	75,0	100,0	13,2	-	11,8	-
5. > 1000	67	79,1	97,0	13,4	-	7,5	3,0

9.2 Mehrfache Wiederholung serologischer Untersuchungen von Einzeltieren

Legende für die Tab. 96 – 103:

0 – ELISA-Befund der Blutprobe nicht-positiv

1 – ELISA-Befund der Blutprobe positiv

Tab. 96: Svanovir-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A

Untersuchung			n (Tiere)
1.	2.	3.	
1	1	1	4
1	0	1	4
0	1	1	5
1	0	0	6
0	1	0	1
0	0	1	8
0	0	0	65
			93

Tab. 97: Svanovir-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B

Untersuchung			n (Tiere)
1.	2.	3.	
1	1	1	1
0	1	1	1
1	0	0	4
0	1	0	1
0	0	1	5
0	0	0	40
			52

Tab. 98: Pourquoi-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A

Untersuchung			
1.	2.	3.	n (Tiere)
1	1	1	4
0	1	1	1
0	1	0	1
0	0	1	5
0	0	0	82
			93

Tab. 99: Pourquoi-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B

Untersuchung			
1.	2.	3.	n (Tiere)
0	1	1	1
0	1	0	1
0	0	1	3
0	0	0	47
			52

Tab. 100: Svanovir-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A

Untersuchung			
1.	2.	3.	n (Tiere)
1	1	1	4
1	0	1	1
0	1	1	3
1	0	0	3
0	1	0	2
0	0	1	6
0	0	0	57
			76

Tab. 101: Svanovir-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B

Untersuchung			
1.	2.	3.	n (Tiere)
0	1	1	2
1	0	0	1
0	1	0	1
0	0	1	3
0	0	0	39
			46

Tab.102: Pourquoi-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A

Untersuchung			n (Tiere)
1.	2.	3.	
1	1	1	5
0	1	1	3
1	0	0	2
0	1	0	1
0	0	1	7
0	0	0	58
			76

Tab.103: Pourquoi-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B

Untersuchung			n (Tiere)
1.	2.	3.	
0	1	1	1
0	1	0	2
0	0	1	3
0	0	0	40
			46

9.3 Untersuchungsbefunde des Dekontaminationsversuches

Tab. 104: Befunde für 32 Kotproben des Dekontaminationsversuches

Nr. der Kotprobe	Dekontaminationsmethode											
	a		b		c		d		e		f	
1	+	P	+		+		+		+		+	
2	+	P	-	P	+	P	-		-		-	
3	-		+		+		-	P	+		+	P
4	+		+		+		+		+	P	+	P
5	+		+		+		+		+		+	
6	+	P	+	P	+	P	+	P	+		-	
7	+	P	+	P	+	P	+		+	P	+	P
8	+		+		+		+		+	P	+	
9	-	P	-	P	-	P	-		-	P	-	P
10	+		+		+		+		+		+	
11	+	P	-		-		-		+		+	P
12	+		+	P	+		+		+	P	+	
13	+		+	P	+		-	P	-	P	-	
14	+	P	+		+	P	+		+	P	+	
15	+		+		+		+		+	P	+	
16	+	P	+		+	P	+		+		+	P
17	-	P	-	P	-		-	P	-		-	
18	-	P	-	P	+		+		+		+	P
19	+	P	+		+		+		+		+	
20	+	P	+	P	+		+		+		+	
21	+	P	+	P	+		+		+	P	+	
22	+		+		+		+	P	+		+	
23	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
24	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
25	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
26	-	P	-	P	-	P	-		-		-	P
27	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
28	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
29	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
30	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
31	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P
32	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	-	

Legende: - Kotbefund negativ, + Kotbefund positiv, Map-Koloniewachstum, P Pilzkontamination

9.4 Ergebnisse der multinomialen logistischen Regressionen

Legende für die Tabellen 105 bis 114:

RRR – Relative Risikoreduktion * - Ergebnis signifikant SV – Svanovir-ELISA PO – Pourquoi-ELISA

Tab.105: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines doppelt positiven Kotbefundes

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	n.a.	n.a	n.a.	n.a.	n.a.
731- 1095 d	-0,05	0,305	0,95	0,52	1,73
1461 - 1825 d	0,53	0,327	1,71	0,9	3,24
1826- 2190 d	0,53	0,349	1,69	0,85	3,35
> 2190 d	0,2	0,379	1,22	0,58	2,57
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	0,29	0,269	1,34	0,79	2,27
3: 211 – 315 d	0,56	0,33	1,75	0,91	3,34
4: > = 316 d	-0,35	0,396	0,7	0,32	1,52
Betrieb					
Betrieb B	0,23	0,294	1,26	0,71	2,23
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-14,35	0	0	0	0
> 5 kg < = 15 kg	0,38	0,423	1,46	0,64	3,34
> 15 kg < = 25 kg	-0,46	0,302	0,63	0,35	1,14
> 35 kg < = 45 kg	-0,62	0,308	0,54	0,29	0,98
> 45 kg < = 55 kg	-0,75	0,527	0,47	0,17	1,32
> 55 kg	-13,18	0	0	0	0

Tab.106: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines einfach positiven Kotbefundes

Einflussfaktor	Regressionskoeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	n.a.	n.a	n.a.	n.a.	n.a.
731- 1095 d	-0,3	0,339	0,74	0,38	1,44
1461 - 1825 d	0,39	0,355	1,48	0,74	2,96
1826- 2190 d	0,19	0,395	1,21	0,56	2,62
> 2190 d	0,1	0,412	1,11	0,49	2,49
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	0,43	0,305	1,54	0,84	2,8
3: 211 – 315 d	0,92	0,366	2,52 *	1,23	5,16
4: > = 316 d	-0,46	0,472	0,63	0,25	1,6
Betrieb					
Betrieb B	0,21	0,328	1,24	0,65	2,35
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	0,54	1,087	1,71	0,2	14,42
> 5 kg < = 15 kg	0,11	0,514	1,12	0,41	3,07
> 15 kg < = 25 kg	-0,02	0,342	0,98	0,5	1,91
> 35 kg < = 45 kg	-0,27	0,350	0,76	0,39	1,52
> 45 kg < = 55 kg	0,34	0,514	1,41	0,51	3,85
> 55 kg	1,22	1,223	3,38	0,31	37,09

Tab.107: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **SV-Blut-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	0	0	1	1	1
731- 1095 d	-0,38	0,419	0,68	0,3	1,55
1461 - 1825 d	0,66	0,398	1,94	0,89	4,23
1826- 2190 d	1,1	0,418	3 *	1,32	6,81
> 2190 d	0,6	0,457	1,83	0,75	4,48
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	-0,15	0,343	0,86	0,44	1,69
3: 211 – 315 d	0,11	0,406	1,11	0,5	2,47
4: > = 316 d	0,35	0,479	1,42	0,55	3,63
Betrieb					
Betrieb B	-0,07	0,356	0,93	0,46	1,87
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-13,97	n.a.	0	0	0
> 5 kg < = 15 kg	-0,8	0,57	0,45	0,15	1,38
> 15 kg < = 25 kg	-0,36	0,384	0,69	0,33	1,48
> 35 kg < = 45 kg	0,38	0,361	1,46	0,72	2,96
> 45 kg < = 55 kg	-0,42	0,663	0,65	0,18	2,4
> 55 kg	-13,75	n.a.	0	0	0
Kotbefund					
Einfach positiv	-0,4	0,364	0,67	0,33	1,36
Doppelt positiv	0,51	0,299	1,66	0,92	2,99

Tab. 108: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **SV-Blut-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
731- 1095 d	-0,97	0,369	0,38 *	0,18	0,78
1461 - 1825 d	0,26	0,343	1,3	0,66	2,54
1826- 2190 d	0,41	0,376	1,5	0,72	3,14
> 2190 d	-0,2	0,429	0,82	0,35	1,89
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	-0,04	0,315	0,96	0,52	1,79
3: 211 – 315 d	-0,13	0,363	0,88	0,43	1,79
4: > = 316 d	-0,22	0,451	0,8	0,33	1,94
Betrieb					
Betrieb B	-0,16	0,334	0,85	0,44	1,64
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-14,02	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 5 kg < = 15 kg	-0,5	0,468	0,61	0,24	1,52
> 15 kg < = 25 kg	-0,11	0,331	0,89	0,47	1,71
> 35 kg < = 45 kg	-0,56	0,371	0,57	0,28	1,18
> 45 kg < = 55 kg	-0,89	0,615	0,41	0,12	1,37
> 55 kg	-14,45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kotbefund					
Einfach positiv	0,36	0,353	1,44	0,72	2,87
Doppelt positiv	1,68	0,296	5,37 *	3,01	9,59

Tab.109: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **SV-Milch-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
731- 1095 d	-1,52	0,526	0,22 *	0,08	0,61
1461 - 1825 d	0,65	0,4	1,92	0,88	4,2
1826- 2190 d	0,93	0,429	2,53 *	1,09	5,86
> 2190 d	-0,18	0,516	0,84	0,3	2,29
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	0,71	0,39	2,03	0,94	4,36
3: 211 – 315 d	-0,05	0,476	0,95	0,37	2,43
4: > = 316 d	0,88	0,486	2,4	0,93	6,22
Betrieb					
Betrieb B	0,55	0,405	1,73	0,78	3,84
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-12,53	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 5 kg < = 15 kg	0,04	0,547	1,04	0,36	3,05
> 15 kg < = 25 kg	0,44	0,391	1,56	0,72	3,35
> 35 kg < = 45 kg	-0,47	0,437	0,62	0,26	1,47
> 45 kg < = 55 kg	-1,68	0,88	0,19	0,03	1,04
> 55 kg	-20,01	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kotbefund					
Einfach positiv	0,48	0,392	1,61	0,75	3,48
Doppelt positiv	1,24	0,35	3,45 *	1,74	6,85

Tab.110: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **SV-Milch-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
731- 1095 d	-1,28	0,499	0,28 *	0,1	0,74
1461 - 1825 d	0,48	0,466	1,61	0,65	4,02
1826- 2190 d	1,06	0,486	2,88 *	1,11	7,46
> 2190 d	0,28	0,531	1,33	0,47	3,76
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	0,76	0,423	2,13	0,93	4,88
3: 211 – 315 d	0,67	0,457	1,96	0,8	4,79
4: > = 316 d	-0,23	0,646	0,79	0,22	2,82
Betrieb					
Betrieb B	1,21	0,451	3,34 *	1,38	8,09
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-13,84	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 5 kg < = 15 kg	0,37	0,569	1,45	0,48	4,41
> 15 kg < = 25 kg	0,09	0,438	1,1	0,46	2,59
> 35 kg < = 45 kg	-0,79	0,473	0,45	0,18	1,14
> 45 kg < = 55 kg	-2,06	0,905	0,13*	0,02	0,75
> 55 kg	-19,44	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kotbefund					
Einfach positiv	0,18	0,491	1,2	0,46	3,14
Doppelt positiv	1,77	0,394	5,89 *	2,72	12,74

Tab.111: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **PO-Blut-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
731- 1095 d	0,25	1,47	1,28	0,07	22,81
1461 - 1825 d	1,87	1,154	6,51	0,68	62,58
1826- 2190 d	-47,71	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 2190 d	1,65	1,208	5,23	0,49	55,74
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	1,85	1,125	6,39	0,7	55,97
3: 211 – 315 d	1,78	1,386	5,94	0,39	89,89
4: > = 316 d	-33,75	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Betrieb					
Betrieb B	-1,61	1,28	0,2	0,02	2,46
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-22,12	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 5 kg < = 15 kg	-0,9	1,289	0,4	0,03	5,07
> 15 kg < = 25 kg	-55,23	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 35 kg < = 45 kg	-1,46	1,142	0,23	0,02	2,17
> 45 kg < = 55 kg	0,39	1,671	1,48	0,06	39,18
> 55 kg	-9,18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kotbefund					
Einfach positiv	-0,43	0,989	0,65	0,09	4,54
Doppelt positiv	0,54	0,806	1,71	0,35	8,33

Tab.112: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **PO-Blut-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	0	0	1	1	1
731- 1095 d	-0,4	0,434	0,67	0,29	1,56
1461 - 1825 d	0,49	0,417	1,63	0,72	3,68
1826- 2190 d	0,24	0,447	1,27	0,53	3,04
> 2190 d	-0,31	0,56	0,74	0,25	2,21
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	0,25	0,379	1,28	0,61	2,7
3: 211 – 315 d	0,02	0,431	1,02	0,44	2,37
4: > = 316 d	-0,09	0,53	0,92	0,32	2,59
Betrieb					
Betrieb B	0,1	0,396	1,1	0,51	2,4
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-31,79	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 5 kg < = 15 kg	-0,35	0,565	0,7	0,23	2,12
> 15 kg < = 25 kg	0,29	0,392	1,33	0,62	2,88
> 35 kg < = 45 kg	-0,39	0,434	0,67	0,29	1,58
> 45 kg < = 55 kg	-1,21	0,882	0,3	0,05	1,68
> 55 kg	-32,96	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kotbefund					
Einfach positiv	0,63	0,624	1,88	0,55	6,38
Doppelt positiv	2,89	0,486	18,04 *	6,96	46,73

Tab.113: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **PO-Milch-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	0	0	1	1	1
731- 1095 d	0,2	1,112	1,23	0,14	10,84
1461 - 1825 d	1,24	0,951	3,45	0,54	22,24
1826- 2190 d	0,42	1,062	1,53	0,19	12,25
> 2190 d	1,05	1,083	2,85	0,34	23,83
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	0,27	0,843	1,31	0,25	6,86
3: 211 – 315 d	0,14	0,979	1,15	0,17	7,85
4: > = 316 d	0,86	1,042	2,37	0,31	18,28
Betrieb					
Betrieb B	-0,69	0,965	0,5	0,08	3,32
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-49,18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 5 kg < = 15 kg	-0,79	1,292	0,45	0,04	5,72
> 15 kg < = 25 kg	0,17	0,829	1,18	0,23	6,01
> 35 kg < = 45 kg	-0,11	0,936	0,9	0,14	5,61
> 45 kg < = 55 kg	-12,93	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 55 kg	3,17	1,712	23,76	0,83	680,86
Kotbefund					
Einfach positiv	0,69	0,823	2	0,4	10,01
Doppelt positiv	1,17	0,764	3,22	0,72	14,4

Tab.114: Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem **PO-Milch-ELISA**

Einflussfaktor	Koeffizient	Standardfehler	RRR	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Alter					
521- 730 d	0	0	1	1	1
731- 1095 d	-0,58	0,442	0,56	0,23	1,32
1461 - 1825 d	0,54	0,433	1,72	0,74	4,02
1826- 2190 d	0,53	0,454	1,7	0,7	4,14
> 2190 d	0,41	0,496	1,51	0,57	4,0
Laktationsphase					
1: 0 –105 d	0,67	0,383	1,96	0,92	4,14
3: 211 – 315 d	0,28	0,423	1,32	0,58	3,02
4: > = 316 d	0,05	0,536	1,06	0,37	3,02
Betrieb					
Betrieb B	0,38	0,422	1,46	0,64	3,34
Tagesmilchmenge					
< = 5 kg	-66,84	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
> 5 kg < = 15 kg	-0,04	0,521	0,96	0,35	2,63
> 15 kg < = 25 kg	0,38	0,382	1,47	0,7	3,1
> 35 kg < = 45 kg	-1,09	0,478	0,34 *	0,13	0,86
> 45 kg < = 55 kg	-2,66	1,144	0,07 *	0,01	0,66
> 55 kg	-52,42	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kotbefund					
Einfach positiv	1,04	0,505	2,83 *	1,05	7,62
Doppelt positiv	2,68	0,435	14,59 *	6,23	34,19

9.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Weltweites Vorkommen der Paratuberkulose (OIE 2008)	25
Abb. 2	Paratuberkulose-Meldungen in Deutschland aus dem TSN – Zeitraum: 1.1.1995 – 1.12.2008	26
Abb. 3	Anzahl der untersuchten Tiere je Untersuchungszeitpunkt im Bestand A	41
Abb. 4	Anzahl der untersuchten Tiere je Untersuchungszeitpunkt im Bestand B	42
Abb. 5	Anzahl der untersuchten Tiere je Untersuchungszeitpunkt im Bestand C	43
Abb. 8	Fotographische Dokumentation der amplifizierten Insertionssequenz IS900	55
Abb. 9	Übersicht zum Versuchsablauf der 6 verglichenen Methoden zur Dekontamination von Kotproben für die Anzucht von <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	61
Abb. 10	Übersicht über die prozentualen Anteile der verschiedenen Kotkulturergebnisse in den Beständen A, B und C	67
Abb. 11	Anzahl untersuchter Tiere und prozentualer Anteil <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> kulturpositiver Tiere zu 4 Untersuchungszeitpunkten im Bestand A	68
Abb. 12	Anzahl untersuchter Tiere und prozentualer Anteil <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> kulturpositiver Tiere zu 4 Untersuchungszeitpunkten im Bestand B	69
Abb. 13	Vergleich der prozentualen Anteile doppelt positiver Kotbefunde in den Beständen A und B nach Untersuchungszeitpunkt	71
Abb. 14	Vergleich der prozentualen Anteile einfach positiver Kotbefunde in den Beständen A und B nach Untersuchungszeitpunkt	71
Abb. 15	Vergleich der prozentualen Anteile doppelt negativer Kotbefunde Gruppe in Beständen A und B nach Untersuchungszeitpunkt	72
Abb. 16	Sensitivitäten 4 verschiedener ELISA-Verfahren in Abhängigkeit von der Intensität der Map-Ausscheidung zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt	78
Abb. 17	Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren bei starken Ausscheidern im Bestand A [n(Blut)= 122; n(Milch)=113] und im Bestand B [n(Blut)= 81; n(Milch)=54]	81
Abb. 18	Anzahl <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> bewachsener Kulturröhrchen zu 4 Zeitpunkten – Vergleich 6 verschiedener Dekontaminationsmethoden	86
Abb. 19	Anzahl mit <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> bewachsener HEYM-Röhrchen für 6 Dekontaminationsmethoden	88
Abb. 20	Anzahl kontaminierter HEYM-Röhrchen für 32 Kotproben und 6 Dekontaminationsmethoden	88
Abb. 21	Zusammenfassung der Ergebnisse der Kotkultivierungen für die Bestände A und B in Abhängigkeit vom Alter der Tiere	90
Abb. 22	Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere im Bestand A	93
Abb. 23	Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere im Bestand B	93
Abb. 24	Einfach und doppelt positive Kotbefunde nach Altersgruppen im Bestand A	94

Abb. 25	Einfach und doppelt positive Kotbefunde nach Altersgruppen im Bestand B	94
Abb. 26	Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit von der Laktationsphase im Bestand A	95
Abb. 27	Ergebnisse der Kotkultivierung in Abhängigkeit von der Laktationsphase im Bestand B	95
Abb. 28	Doppelt und einfach positive Kotergebnisse nach Laktationsphasen im Bestand A	96
Abb. 29	Doppelt und einfach positive Kotergebnisse nach Laktationsphasen im Bestand B	96
Abb. 30	Ergebnisse der Kotkultivierung nach Tagesmilchleistung im Bestand A	97
Abb. 31	Ergebnisse der Kotkultivierung nach Tagesmilchleistung im Bestand B	97
Abb. 32	Doppelt und einfach positive Kotbefunde nach Tagesmilchleistung im Bestand A	98
Abb. 33	Doppelt und einfach positive Kotbefunde nach Tagesmilchleistung im Bestand B	98
Abb. 34	Sensitivitäten des Svanovir-Blut-ELISA für 6 Altersgruppen	101
Abb. 35	Sensitivitäten des Pourquier-Blut-ELISA für 6 Altersgruppen	101
Abb. 36	Sensitivitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 5 Altersgruppen	102
Abb. 37	Sensitivitäten des Pourquier-Milch-ELISA für 5 Altersgruppen	102
Abb. 38	Spezifitäten des Svanovir-Blut-ELISA für 6 Altersgruppen	103
Abb. 39	Spezifitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 5 Altersgruppen	103
Abb. 40	Sensitivitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 4 Laktationsphasen	104
Abb. 41	Spezifitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 4 Laktationsphasen	105
Abb. 42	Sensitivitäten des Svanovir-Blut-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen	107
Abb. 43	Sensitivitäten des Pourquier-Blut-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen	107
Abb. 44	Sensitivitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen	108
Abb. 45	Sensitivitäten des Pourquier-Milch-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen	108
Abb. 46	Spezifitäten des Svanovir-Blut-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen	109
Abb. 47	Spezifitäten des Svanovir-Milch-ELISA für 7 Milchleistungsgruppen	109
Abb. 48	Sensitivität des Svanovir-Milch-ELISA nach Milcheiweißgehalt	110
Abb. 49	Sensitivität des Svanovir-Milch-ELISA nach Milchlaktosegehalt	110
Abb. 50	Spezifität des Svanovir-Milch-ELISA nach Milcheiweißgehalt	111
Abb. 51	Verläufe der Pourquier-Blut-ELISA-Befunde und der Kotausscheidung bei 2 Tieren aus dem Bestand A	117

9.6 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Ausgewählte Studien zum Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> in Milch und Kolostrum	21
Tab. 2	Ausgewählte Studien zum Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> in männlichen Geschlechtsorganen und im Sperma	21
Tab. 3	Ausgewählte Studien zur Untersuchung des Einflusses der Erkrankung auf die Milchleistung infizierter Tiere	27

Tab. 4	ELISA-Antigene, ermittelte Sensitivitäten und Spezifitäten in beispielhaft ausgewählten Paratuberkulose-Blut-ELISA-Untersuchungen	35
Tab. 5	Vergleich der Sensitivitäten von Paratuberkulose-Blut-ELISA-Testverfahren für jeweils 2 Tiergruppen in 3 ausgewählten Studien	36
Tab. 6	Tierzahlen, Milchleistungen und Untersuchungsbefunde der 3 untersuchten Milchviehbeständen	44
Tab. 7	Svanovir-ELISA Auswertung von Blutserumproben	47
Tab. 8	Svanovir-ELISA Auswertung von Milchserumproben	47
Tab. 9	Pourquier-ELISA Auswertung von Blutserumproben	48
Tab. 10	Pourquier-ELISA Auswertung von Milchserumproben	49
Tab. 11	Mastermix für die IS900-PCR zum Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	52
Tab. 12	Sequenzen der Primer der IS900-PCR nach Englund et al. (1999)	52
Tab. 13	Mastermix für die Duplex-PCR zum Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i> und <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>hominissuis</i>	52
Tab. 14	Sequenzen der Primer der Duplex-PCR	52
Tab. 15	Positiv- und Negativkontrollen für die PCR	53
Tab. 16	Programmablauf der IS900-PCR im Thermozykler	53
Tab. 17	Programmablauf der Duplex-PCR im Thermozykler	53
Tab. 18	Auswertung der Ergebnisse der PCR und der Gelelektrophorese	54
Tab. 19	Verdünnung und optische Dichte der <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> Suspension zum Spiken der Kotproben Nr. 21 und 22	56
Tab. 20	Dekontaminationsmethoden a – f	56
Tab. 21	Kategorien zur Beurteilung von Koloniezahlen im Dekontaminationsversuch	57
Tab. 22	Kotbefundgruppen für die statistische Auswertung	60
Tab. 23	Einteilung der Altersgruppen für die statistische Auswertung	61
Tab. 24	Einteilung der Laktationsphasen	61
Tab. 25	Einteilung der Milchleistungsgruppen	62
Tab. 26	Milchharnstoffklassen	62
Tab. 27	Milchzellklassen	62
Tab. 28	Vierfeldertafel	63
Tab. 29	Kontingenztafel zur Darstellung der Übereinstimmung der serologischen Befunde zweier ELISA-Testverfahren	64
Tab. 30	Bewertung des Kappawertes nach Cohen (Altmann 1998)	64
Tab. 31	Merkmale der Referenzgruppen	65
Tab. 32	Übersicht zu den Befunden der kulturellen Kotuntersuchungen in 3 Milchviehbeständen	66
Tab. 33	Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen im Bestand A (n=1.232)	67
Tab. 34	Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen im Bestand B (n=1.564)	68
Tab. 35	Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen im Bestand C (n=1.911)	69
Tab. 36	Anzahl der eindeutig auswertbaren Kotbefunde aus 4 Untersuchungen in den Beständen A und B (n=2.059)	70
Tab. 37	Erstnachweis von <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> Koloniewachstum nach Kultivierungswochen in den Beständen A und B	73

Tab. 38a	Zusammenfassung der Untersuchungsbefunde des Svanovir-ELISA für Blut- und Milchproben aus 3 Thüringer Milchviehherden	74
Tab. 38b	Zusammenfassung der Untersuchungsbefunde des Pourquoier-ELISA für Blut- und Milchproben aus 3 Thüringer Milchviehherden	74
Tab. 39a	Positive Blut-ELISA-Untersuchungsbefunde bei aktuell kotpositiven Tieren aus 4 Bestandsuntersuchungen	75
Tab. 39b	Positive Milch-ELISA-Untersuchungsbefunde bei aktuell kotpositiven Tieren aus 4 Bestandsuntersuchungen	75
Tab. 40	Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren	76
Tab. 41	Vergleich der Sensitivitäten für 4 ELISA-Testverfahren: p-Werte des zweiseitigen Fisher's exakt Test	76
Tab. 42	Nach Beständen getrennt berechnete Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren	77
Tab. 43	Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand – Svanovir-Blut	79
Tab. 44	Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand – Svanovir-Milch	79
Tab. 45	Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand – Pourquoier-Blut	80
Tab. 46	Sensitivitäten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausscheidung und vom Bestand – Pourquoier-Milch	80
Tab. 47	Untersuchung der Sensitivitäten der ELISA-Testverfahren bei starken Map-Ausscheidern in den Beständen A und B mit dem Fisher's exakt Test	81
Tab. 48	Spezifitäten der ELISA-Testverfahren	82
Tab. 49	Untersuchung der Spezifitäten der ELISA-Testverfahren zweier Tiergruppen des Bestandes C mit dem Fisher's exakt Test	82
Tab. 50	Vergleich der Ergebnisse des Svanovir-Blut- und des Pourquoier-Blut-ELISA für kotpositive Tiere bei der Untersuchung der gleichen Blutprobe	83
Tab. 51	Vergleich der Ergebnisse des Svanovir-Blut- und des Pourquoier-Blut-ELISA für kotnegative Tiere bei der Untersuchung der gleichen Blutprobe	83
Tab. 52	Vergleich der Ergebnisse des Svanovir-Milch- und des Pourquoier-Milch-ELISA für kotpositive Tiere bei der Untersuchung der gleichen Milchprobe	84
Tab. 53	Vergleich der Ergebnisse des Svanovir-Milch- und des Pourquoier-Milch-ELISA für kotnegative Tiere bei der Untersuchung der gleichen Milchprobe	84
Tab. 54	Vergleich der Ergebnisse des Svanovir-Blut- und des Svanovir-Milch-ELISA bei kotpositiven Tieren und einem identischen Probennahmezeitpunkt	84
Tab. 55	Vergleich der Ergebnisse des Svanovir-Blut- und des Svanovir-Milch-ELISA bei kotnegativen Tieren und einem identischen Probennahmezeitpunkt	85
Tab. 56	Vergleich der Ergebnisse des Pourquoier-Blut- und des Pourquoier-Milch-ELISA bei kotpositiven Tieren und einem identischen Probennahmezeitpunkt	85
Tab. 57	Vergleich der Ergebnisse des Pourquoier-Blut- und des Pourquoier-Milch-ELISA bei kotnegativen Tieren und einem identischen Probennahmezeitpunkt	85
Tab. 58	Koloniekategorien für 14 Kotproben – Vergleich von 6 Dekontaminationsmethoden in der 16. Kultivierungswoche	87
Tab. 59	Prozentualer Anteil der Kulturröhrchen mit Pilzkontaminationen zu 3 verschiedenen Untersuchungszeitpunkten	89

Tab. 60	Vergleich der Anzahl kontaminierter Kulturröhrchen bis zur 8. Woche und zusätzlich kontaminierter Kulturröhrchen ab der 8. Woche mittels Fisher´s exakt Test	89
Tab. 61	Ergebnisse des Pearson´s Chi-Quadrat Test für Svanovir- und Pourquier-ELISA und 7 tierspezifische Parameter	99
Tab. 62	Kotbefunde bei mehrfacher Untersuchung von Einzeltieren – Bestand A	115
Tab. 63	Sensitivitäten der Kotkultur für 89 Tiere des Bestandes A über 3 Untersuchungen	115
Tab. 64	Kotbefunde bei mehrfacher Untersuchung von Einzeltieren – Bestand B	116
Tab. 65	Sensitivitäten der Kotkultur für 51 Tiere des Bestandes B über 4 Untersuchungen	116
Tab. 66	Sensitivitäten des Svanovir-Blut-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand A	118
Tab. 67	Sensitivitäten des Svanovir-Blut-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand B	118
Tab. 68	Sensitivitäten des Pourquier-Blut-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand A	119
Tab. 69	Sensitivitäten des Pourquier-Blut-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand B	119
Tab. 70	Sensitivitäten des Svanovir-Milch-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand A	120
Tab. 71	Sensitivitäten des Svanovir-Milch-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand B	120
Tab. 72	Sensitivitäten des Pourquier-Milch-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand A	121
Tab. 73	Sensitivitäten des Pourquier-Milch-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand B	121
Tab. 74	Spezifitäten des Svanovir-Blut-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand C	122
Tab. 75	Spezifitäten des Pourquier-Blut-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand C	122
Tab. 76	Spezifitäten des Svanovir-Milch-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand C	123
Tab. 77	Spezifitäten des Pourquier-Milch-ELISA bei wiederholten Untersuchungen im Bestand C	123
Tab. 78	Blut-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere in 6 Altersgruppen	183
Tab. 79	Milch-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere in 5 Altersgruppen	183
Tab. 80	Blut-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere in 6 Altersgruppen	183
Tab. 81	Milch-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere in 5 Altersgruppen	184
Tab. 82	Blut-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere in 4 Laktationsphasen	184
Tab. 83	Milch-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere in 4 Laktationsphasen	184
Tab. 84	Blut-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere in 4 Laktationsphasen	184
Tab. 85	Milch-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere in 4 Laktationsphasen	185
Tab. 86	Blut-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere in 7 Milchleistungsgruppen	185
Tab. 87	Milch-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere in 7 Milchleistungsgruppen	185
Tab. 88	Blut-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere in 7 Milchleistungsgruppen	186

Tab. 89	Milch-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere in 7 Milchleistungsgruppen	186
Tab. 90	Milch-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere für je 2 Milcheiweiß- und Milchlaktoseklassen	186
Tab. 91	Milch-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere für je 2 Milcheiweiß- und Milchlaktoseklassen	187
Tab. 92	Milch-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere für 4 Milchharnstoffklassen	187
Tab. 93	Milch-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere für 4 Milchharnstoffklassen	187
Tab. 94	Milch-ELISA-Befunde kotpositiver Tiere nach Milchzellgehalt	187
Tab. 95	Milch-ELISA-Befunde kotnegativer Tiere nach Milchzellgehalt	188
Tab. 96	Svanovir-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A	188
Tab. 97	Svanovir-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B	188
Tab. 98	Pourquier-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A	189
Tab. 99	Pourquier-Blut-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B	189
Tab. 100	Svanovir-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A	189
Tab. 101	Svanovir-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B	189
Tab. 102	Pourquier-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand A	190
Tab. 103	Pourquier-Milch-ELISA Ergebnisse für 3fach in Folge untersuchte Tiere im Bestand B	190
Tab. 104	Befunde für 32 Kotproben des Dekontaminationsversuches	191
Tab. 105	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines doppelt positiven Kotbefundes	192
Tab. 106	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines einfach positiven Kotbefundes	192
Tab. 107	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem SV-Blut-ELISA	193
Tab. 108	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit SV-Blut-ELISA	193
Tab. 109	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit SV-Milch-ELISA	194
Tab. 110	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit SV-Milch-ELISA	194
Tab. 111	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem PO-Blut-ELISA	195
Tab. 112	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem PO-Blut-ELISA	195
Tab. 113	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines fraglichen ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem PO-Milch-ELISA	196
Tab. 114	Multinomiale logistische Regression für die Ermittlung eines positiven ELISA-Befundes bei der Untersuchung mit dem PO-Milch-ELISA	196

10. Publikationsverzeichnis

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin wurden Teile dieser Arbeit bereits vorab veröffentlicht:

GIERKE, F. u. KÖHLER, H. (2006):

Einflussfaktoren auf die Sensitivität der Anzüchtung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rinderkot auf HEYM mit Mycobactin J.
3. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, 11.-12.10.2006, Jena

GIERKE, F. (2007):

Eignung der Serologie als Bestandsmonitoring – Paratuberkulose.
Seminar Paratuberkulose der Thüringer Tierseuchenkasse, 19.01.2007, Jena.

GIERKE, F. (2007):

Einflussfaktoren auf die *intra vitam* Diagnostik der Paratuberkulose.
2. Doktoranden-Symposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, 8.6.2007, Berlin

GIERKE, F. u. KÖHLER, H. (2007):

Faecal shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by cattle with sub-clinical paratuberculosis is influenced by individual host factors.
13th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, Leipzig, 3.8.2007

GIERKE, F., M. ZILLER u. H. KÖHLER (2007):

Can the detection rate of faecal shedders of MAP be increased by optimising the time point of faecal sampling?
9th International Colloquium on paratuberculosis, 29.10.-2.11.2007, Tsukuba, Japan

GIERKE, F. (2008):

Paratuberkulose - Eignung serologischer Testsysteme zur Untersuchung von Blut- und Milchproben. Eröffnung des neuen Standorts der Thüringer Tierseuchenkasse, 3.7.2008, Jena

GIERKE, F., M. ZILLER u. H. KÖHLER (2008):

Field study of the diagnostic performance of two serological tests for bovine paratuberculosis in serum and milk. 25th World Buiatrics Congress, 6.-11.7.2008, Budapest

GIERKE, F. u. KÖHLER, H. (2008):

Abschlußbericht zum Paratuberkulose Projekt der Thüringer Tierseuchenkasse und des Friedrich-Loeffler-Instituts Jena, September 2008

GIERKE, F. u. H. KÖHLER (2009):

Die Tücken der Paratuberkulosedagnostik - Erfahrungen zu kulturellen, blut- und milchserologischen Untersuchungen in drei Milchviehherden.
7. Stendaler Symposium, 11.-13.3.2009, Stendal

GIERKE, F., M. ZILLER u. H. KÖHLER (2009):

Multinomial regression analysis of individual host factors and paratuberculosis test results.
10th International Colloquium on Paratuberculosis, 9.-14.8.2009, Minneapolis, USA

GIERKE, F. u. H. KÖHLER (2009):

Tenazität, Ausscheidung und Übertragungswege des Paratuberkuloseerregers – Konsequenzen für die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen.
Praktischer Tierarzt 90: 12, 1169-1178

11. Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Frau Dr. Heike Köhler und Frau PD Dr. Dr. Petra Reinhold für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas sowie für die engagierte Betreuung der Arbeit am Friedrich-Loeffler-Institut Jena. Frau PD Dr. Dr. Petra Reinhold danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zu vertreten.

Ich danke Frau Dr. Heike Köhler ganz herzlich für die hervorragende fachliche Unterstützung, für das vermittelte Wissen, für ihre ständige Hilfsbereitschaft, die vielen kreativen Gespräche und Diskussionen, die Möglichkeit an zahlreichen Tagungen und Kongressen teilzunehmen und für die langjährige Förderung meiner beruflichen und persönlichen Entwicklung.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mykobakterien des Friedrich-Loeffler-Instituts Jena. Vielen herzlichen Dank für die freundliche Aufnahme, das nette Arbeitsklima und nicht zuletzt für die herausragende Einsatzbereitschaft bei der Untersuchung der Proben während des gesamten Untersuchungszeitraums. Ein ganz besonderer Dank an Renate Putsche, Beate Burkert, Uta Möller, Sandy Werner und Danny Michel.

Desweiteren danke ich besonders Herrn Dr. Mario Ziller für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei allen statistischen Fragen.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. Kerstin Müller ganz herzlich für die fachliche Beratung und die langjährige Unterstützung meiner Arbeit.

Allen beteiligten Milchviehbeständen danke ich herzlich für die gute Kooperation. Ohne Ihr Entgegenkommen bei der Entnahme von Proben, wäre das Projekt nicht umsetzbar gewesen. Vielen Dank für die Möglichkeit, Proben und Informationen zu den Herden sowie Einzeltierdaten zu gewinnen und die besten Wünsche für die Zukunft.

Bei meinen Eltern, meinem Bruder Robert und meinem Freund Markus bedanke ich mich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung, den Rückhalt und das Verständnis zu jeder Zeit.

12. Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 14.06.2010

Franziska Gierke