

KARSTEN DONAT

Der Beitrag bestandsbetreuender Tierärzte in der
Bekämpfung von Infektionskrankheiten auf Herdenebene
am Beispiel der Paratuberkulose des Rindes



HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Bestandsbetreuung
im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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

1. Auflage 2017

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

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Veterinärmedizin

Klinikum Veterinärmedizin

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere
mit Tierärztlicher Ambulanz

**Der Beitrag bestandsbetreuender Tierärzte in der
Bekämpfung von Infektionskrankheiten auf Herdenebene
am Beispiel der Paratuberkulose des Rindes**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Bestandsbetreuung
im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. vet. Karsten Donat

Gießen 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

- 1 Einleitung
 - 1.1 Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Rind aus heutiger Sicht
 - 1.2 Beratung zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten im Rahmen der tierärztlichen Bestandsbetreuung
 - 1.3 Besonderheiten der Paratuberkulose in Bezug auf die Bekämpfung im Rinderbestand
 - 1.4 Ansätze zur Bekämpfung der Paratuberkulose auf internationaler und nationaler Ebene
 - 1.5 Verfahren zur Diagnostik der Paratuberkulose auf Bestandesebene
 - 1.6 Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit
 - 1.7 Einflussnahme bestandsbetreuender Tierärzte auf die Bekämpfung der Paratuberkulose
 - 1.8 Fragestellungen
2. Zusammenstellung der Publikationen
 - 2.1 Anwendung von Umgebungskotproben zur Diagnostik der Paratuberkulose auf Bestandesebene
 - 2.1.1 Donat K, Schau U, Soschinka A (2011): Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mit Hilfe von Umgebungskotproben. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 10–17 (Studie 1)
 - 2.1.2 Donat K, Kube J, Dressel J, Einax E, Pfeffer M, Failing K (2015): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. Epidemiol Infect 143, 975–985 (Studie 2)

- 2.1.3 Klawonn W, Einax E, Pützschel R, Schmidt M, Donat K (2016): Johne's disease: Reliability of environmental sampling to characterize MAP-infection in beef cow-calf herds. *Epidemiol Infect* 144: 2392-2400 (Studie 3)
- 2.1.4 Donat K, Hahn N, Eisenberg T, Schlez K, Köhler H, Wolter W, Lenz M, Noll I, Pützschel R, Failing K, Zschöck M (2016): Within-herd prevalence threshold for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* positive dairy herds using boot swabs or liquid manure samples. *Epidemiol Infect* 144: 413–424 (Studie 4)
- 2.2 Eignung serologischer Untersuchungsverfahren zur Beurteilung der Paratuberkulosesituation einer Rinderherde
- 2.2.1 Donat K, Schau U, Soschinka A, Köhler H (2011): Untersuchungen zur Herdenprävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderbeständen mit Hilfe serologischer Testverfahren: Möglichkeiten, Grenzen und Kosten. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 125: 361-370 (Studie 5)
- 2.2.2 Donat K, Schlotter K, Erhardt G, Brandt HR (2014): Prevalence and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. *Vet Rec* 174: 119 (Studie 6)
- 2.3 Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit und die Wirtschaftlichkeit in Milchviehherden
- 2.3.1 Donat K, Soschinka A, Erhardt G, Brandt HR (2014): Paratuberculosis: Decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* depends on within-herd prevalence. *Animal* 8: 852–858 (Studie 7)
- 2.3.2 Donat K, Erhardt G, Soschinka A, Brandt HR (2014): Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* shedding in German Holstein cows. *Vet Rec* 174: 408 (Studie 8)
- 2.4 Einflüsse auf den Erfolg der Paratuberkulosebekämpfung
- 2.4.1 Donat K, Schmidt M, Köhler H, Sauter-Louis C (2016): Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *J Dairy Sci* 99: 3744-3752 (Studie 9)

- 2.4.1 Donat K (2016): The Thuringian bovine paratuberculosis control programme – results and experiences. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129: DOI 10.2376/0005-9366-129-15129 (Studie 10)
- 3. Übergreifende Diskussion
 - 3.1 Anwendung von Umgebungskotproben zur Diagnostik der Paratuberkulose auf Bestandsebene
 - 3.2 Eignung serologischer Untersuchungsverfahren zur Beurteilung der Paratuberkulosesituation einer Rinderherde
 - 3.3 Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit und die Wirtschaftlichkeit in Milchviehherden
 - 3.4 Einflüsse auf den Erfolg der Paratuberkulosebekämpfung
 - 3.5 Ausblick
- 4 Zusammenfassung
- 5 Summary
- 6 Literaturverzeichnis
- 7 Art und Anteil des eigenen Anteils an der wissenschaftlichen Arbeit
- 8 Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BpT	Bundesverband praktizierender Tierärzte
BoVH1	Bovines Herpesvirus 1
BVDV	Virus der Bovinen Virusdiarrhoe
bzw.	beziehungsweise
CumInz	kumulative Inzidenz
ct-Wert	Anzahl der Zyklen einer real time Polymerase-Kettenreaktion bis zum Erreichen des Schwellenwerts für die Signalerkennung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assays
ESBL	Beta-Laktamase mit erweitertem Spektrum
EU	Europäische Union
EAEVE	European Association of Establishments for Veterinary Education
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium
IHP	Intraherdenprävalenz
IS	Insertionssequenz
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
O.I.E.	Weltorganisation für Tiergesundheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
TMSFG	Thüringer Ministerium für Soziales, Familie und Gesundheit
TMASGFF	Thüringer Ministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie
u. a.	unter anderem
u. ä.	und ähnliche, und ähnliches
USDA	United States Department of Agriculture
WHP _{app}	apparent within-herd prevalence, scheinbare Intraherdenprävalenz
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Rind aus heutiger Sicht

Gegenwärtig vollziehen sich tiefgreifende Veränderungen in der Nutztierpraxis. Landwirtschaftliche Familienbetriebe mit verschiedenen Produktionsrichtungen und mehreren kleineren Produktionseinheiten waren die dominierende Betriebsform bis zur zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts und sind es in vielen Gegenden noch heute. Durch diese Diversifikation der Produktionszweige innerhalb eines Betriebes sind umfassende Kenntnisse zu Tierkrankheiten und zu Strategien des Tiergesundheitsmanagements bei diesen in der Regel nicht vorhanden und die notwendigen Einzel-tier- und Notfallbehandlungen werden von den betreuenden Tierärzten durchgeführt. Neben der kurativen Praxis bieten Tierärzte häufig auch Serviceleistungen wie die künstliche Besamung, Enthornen und ähnliches an. Wirtschaftliche Erfordernisse, soziopolitische Veränderungen und technologische Fortschritte führten in den letzten Jahrzehnten vor allem in den entwickelten Ländern zu einem Übergang zu landwirtschaftlichen Unternehmen (CONSTABLE, 2016). Dadurch nahm die Zahl der Rinderbestände erheblich ab und die Herdengröße zu. Dieser Prozess vollzieht sich weltweit in gleicher Richtung, auch wenn er durch unterschiedliche Ausgangssituationen modifiziert wird: Während in Neuseeland von 1996 bis 2013 die mittlere Herdengröße von ca. 200 auf über 400 Milchkühe anstieg, veränderte sich deren Mittelwert in Deutschland von ca. 30 auf 40 Kühe (BARKEMA et al., 2015). Durch die wachsende Intensität des Produktionszweiges ändern sich in der Milchproduktion die Anforderungen an die Arbeit des Tierarztes* (MANSFELD & GRUNERT, 1990).

Damit bewegt sich auch in Deutschland die kurative Praxis langsam von der Einzel-tierbehandlung weg, hin zu einer Bestandsbetreuung (GEHRING, 2016). Wesentlich ist, dass eine immer größer werdende Zahl der Betriebe Fremdarbeitskräfte beschäftigt (BARKEMA et al., 2015). Das führt dazu, dass der Tierarzt lernen muss, mit zunehmend weniger qualifizierten Arbeitskräften umzugehen. Gleichzeitig trifft er auf gut ausgebildete Herdenmanager, die über detaillierte Kenntnisse zur Tiergesundheit und zu Tierkrankheiten verfügen. Sie sind damit weniger abhängig von tierärztlichen Leistungsangeboten bezüglich Einzeltierbehandlungen und Routineleistungen, sondern führen diese oftmals selbst durch. Die Rolle des Tierarztes wird immer häufiger die eines Beraters und Problemlösers (CONSTABLE, 2016).

* In dieser Arbeit wird die Berufsbezeichnung „Tierarzt“ in gleicher Weise für weibliche und männliche Angehörige des tierärztlichen Berufes verwendet.

Die Entwicklung von der kurativen Praxis im bäuerlichen Familienbetrieb hin zu der spezialisierten Bestandsbetreuung im landwirtschaftlichen Unternehmen vollzog und vollzieht sich in allen Regionen Deutschlands, bedingt durch strukturelle Unterschiede in der Rinderhaltung (MERLE et al., 2012), unterschiedlich schnell. Während in den ostdeutschen Großbetrieben die integrierte Bestandsbetreuung schon in den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts entwickelt wurde (BPT, 2009), eine ganze Generation an Rinderpraktikern geprägt hat und heute noch prägt, nimmt diese Entwicklung in den west- und norddeutschen Regionen gegenwärtig auf Grund der stark wachsenden Rinderbestände an Geschwindigkeit zu. In süddeutschen Regionen mit traditionell kleineren Beständen ist die Rinderpraxis dagegen noch immer stark von der Einzeltierbehandlung geprägt und damit der Umsatz aus Beratungsleistungen geringer. So ergab eine Umfrage unter 256 Rinderpraktikern in Deutschland, dass in Beständen bis zu 100 Rindern ein Umsatzanteil von 10 % mit Betreuungs- und Beratungsleistungen gemäß Betreuungsvertrag erbracht werden, während dies in Beständen mit über 1200 Tieren 85 % ausmacht (DEINER, 2016).

Entsprechend den vom Bundesverband der praktizierenden Tierärzte herausgegebenen Leitlinien ist die tierärztliche Bestandsbetreuung die „regelmäßige, planmäßige, systematische und konsequente Anwendung tierärztlichen Wissens und Könnens nach dem Stand der Wissenschaft mit dem Ziel, Tierbesitzern bei der Schaffung, Verbesserung und Erhaltung der Tiergesundheit und der Optimierung der Tierleistung zu unterstützen“ (BpT, 2009). Ziel der Bestandsbetreuung ist ein ganzheitliches und nachhaltiges Tiergesundheits- und Hygienemanagement, das neben der Prävention von Krankheiten das Wohlbefinden der Tiere und die Produktion sicherer Lebensmittel anstrebt. Durch die Erarbeitung und Durchführung herdenbezogener prophylaktischer Maßnahmen und die Entwicklung und ständige Kontrolle betriebsspezifischer Managementprogramme kann der betreuende Tierarzt den „Berufskrankheiten“ der Hochleistungskühe schneller und besser entgegenreten (DE KRUIF et al., 2007). Dieser Aspekt der „Arbeit mit gesunden Tieren“ (GEHRING, 2016) prägt wesentlich das Berufsverständnis des Tierarztes als Berater und Betreuer: Es ist nicht mehr das Heilen von Krankheiten, was im Mittelpunkt des tierärztlichen Handelns steht, sondern die Optimierung des Bestandsmanagements, die zur Verhinderung von Krankheiten beiträgt. Diese Arbeit erfordert eine grundsätzlich andere Herangehensweise, da es darum geht, die Ursachen von Erkrankungen zu identifizieren und

abzustellen. Wenn dies gelingt, hat das unstrittig zur Folge, dass weniger kranke Tiere zu therapieren sind und der Umsatz aus den Einzeltierbehandlungen zurückgeht. Gleichwohl erscheint es ein weitaus lohnenderes Ziel zu sein, gemeinsam mit dem Tierhalter um einen hohen Gesundheitsstatus des Tierbestandes zu ringen. Der Landwirt muss diesen Nutzen der Investition in tierärztliche Leistung verstehen und darf den Tierarzt nicht als negativen Kostenfaktor sehen. Gleichzeitig muss der Tierarzt in der Lage sein, dies dem Landwirt zu erklären und damit seine Leistung zu verkaufen und den ökonomischen Wert seiner tierärztlichen Intervention zu rechtfertigen (KREHER, 2016; BOUCHARD, 2016). Auf europäischer Ebene wird in der Liste der sogenannten Ersttags-Kompetenzen der EAEVE unter anderem gefordert, dass approbierte Tierärztinnen und Tierärzte sich des wirtschaftlichen Umfelds bewusst sein sollen, in dem sie arbeiten (EAEVE, 2016; DOHERR, 2016).

Eine entsprechende Vergütung dieser Beratungsleistung sollte selbstverständlich sein, muss also eingefordert und bezahlt werden. Dazu haben sich Betreuungsverträge bewährt. Sehr oft sind diese mit einer Betreuungspauschale verbunden, welche die Vergütung für die Beratungsleistungen enthalten sollte. Nach DEINER (2016) hatten ca. 70 % der befragten Rinderpraktiker Betreuungsverträge abgeschlossen. Die Mehrzahl der Tierärzte (ca. 60 %) hatte in letzter Zeit keine Verschlechterung der Zahlungsmoral festgestellt, wohl aber die Tatsache, dass die landwirtschaftliche Klientel den ökonomischen Druck an die Tierärzte weitergibt. Davor können Betreuungsverträge mit vereinbarten Pauschalen schützen. Auch eine Bezahlung auf Stundenbasis kann ein angemessenes Einkommen sichern. Gegenwärtig kann für Bestandsbetreuungs- und Beratungsleistungen von einem durchschnittlichen Bruttoumsatz von 80 Euro/Stunde ausgegangen werden, was der mittleren Entlohnung für eine Arbeitsstunde in der Rinderpraxis entspricht (KREHER, 2016).

In der Bestandsbetreuung sind Tierärzte auf die Zusammenarbeit mit anderen Berufsgruppen angewiesen, die beratend in Landwirtschaftsbetrieben agieren. In den Ersttags-Kompetenzen der EAEVE ist aufgeführt, dass Tierärzte in der Lage sein müssen, bei der Erbringung von Dienstleistungen effektiv als Mitglied eines multidisziplinären Teams zu arbeiten (EAEVE, 2016). Andere Mitglieder solcher Teams können betriebswirtschaftliche oder technische Berater sein, beispielsweise für Fütterung, Melktechnik oder Zuchtwahl. Mit der Bearbeitung dieser Problemkreise tritt der tierärztliche Bestandsbetreuer jedoch auch in Konkurrenz zu diesen Berufsgruppen

(GEHRING, 2016). In Deutschland erleben Rinderpraktiker den stärksten Wettbewerb mit Besamungstechnikern der Besamungsorganisationen und Fütterungsberatern (DEINER, 2016). Während diese anderen Berater häufig hochspezialisiertes Wissen über ihr Fachgebiet mitbringen hat nur der Tierarzt eine spezifische Ausbildung in Physiologie, Immunologie, Pharmakologie und Mikrobiologie. Diese einzigartigen Fähigkeiten sollten genutzt werden, um strategisches Tiergesundheitsmanagement als Dienstleistung anzubieten und in den Betrieben zu implementieren (RUEGG, 2016). Wesentliche Gründe dafür, dass es Tierärzten noch nicht in ausreichendem Maße gelingt, sich in Tiergesundheitsprogrammen zu engagieren sind – abgesehen von einem Mangel an Nachfrage einerseits und finanziellen Anreizen andererseits – die fehlenden ökonomischen Kenntnisse und das daraus resultierende Unvermögen, die entstehenden Kosten der vorgeschlagenen Maßnahmen zu begründen. Das geht teilweise einher mit einem fehlenden Wollen mancher Tierärzte, proaktiv mit anderen Beratungs- und Serviceanbietern im Sinne einer Problemlösung zusammenzuarbeiten (MEE, 2007). Hinzu kommt, dass betriebswirtschaftlich orientierte Milchviehberater die Tierärzte zwar respektieren, jedoch sich selbst als die Treuhänder der Ausgaben für Tiergesundheit des jeweiligen Betriebes sehen. In ihrer Wahrnehmung beraten sie selbst den Tierhalter umfassend und berücksichtigen dabei den Einfluss der Tiergesundheit auf Leistung, Ernährung und Reproduktion in hohem Maße. Die Aufgabe des Tierarztes sehen sie dagegen lediglich in der Behandlung kranker Tiere und in der Bereitstellung von Tierarzneimitteln, nicht jedoch als Schlüsselfigur für die Wirtschaftlichkeit des Betriebes (BATES et al., 2016). Der bestandsbetreuende Tierarzt muss folglich sowohl dem Landwirt als auch seinen Beratern vermitteln, dass er über die Kernkompetenzen zur Lösung tiergesundheitlicher Probleme verfügt. Nur auf diese Weise kann Vertrauen in die tierärztliche Beratungstätigkeit ausgebaut und gestärkt werden.

Für eine erfolgreiche Tätigkeit in landwirtschaftlichen Unternehmen ist es daher erforderlich, dem in der Nutztierpraxis tätigen Tierarzt im Studium und in der postgradualen Weiterbildung ergänzend zu den klinischen Fähigkeiten und Fertigkeiten Wissen und Können in folgenden Bereichen zu vermitteln (CONSTABLE, 2016):

- Produktionssysteme einschließlich der landwirtschaftlichen Betriebsökonomik, Technologie der Tierproduktion und Globalisierung

- Strategisches Tiergesundheitsmanagement durch Behandlung, Metaphylaxe und Prophylaxe
- Lebensmittelsicherheit, Biosicherheit und Bioterrorismus
- Ernährung für Hochleistungskühe
- Klinische Epidemiologie
- Öffentliche Gesundheit, Zoonosen, Umweltsicherheit, Abfallmanagement
- Methoden der Forschung einschließlich guter veterinärmedizinischer Praxis, guter Laborpraxis, Studiendesign und Biostatistik
- Risikobewertung und Risikomanagement einschließlich HACCP-Konzepten

Diese Kompetenzen finden sich in ähnlicher Weise in der Liste der Ersttags-Kompetenzen der EAEVE. Hier ist gefordert, dass Tierärzte mit Studienabschluss in der Lage sein sollten, in Übereinstimmung mit den gesellschaftliche akzeptierten Standards für Tiergesundheit, Tierwohl und öffentliche Gesundheit zu Präventionsprogrammen bei der jeweiligen Tierart zu beraten und diese zu implementieren (EVEAE, 2016). Um den hier genannten Lehrzielen künftig gerecht zu werden, könnte das Studium der Veterinärmedizin durch Relevanzbestimmungen und Reduktion sowie durch hochschulübergreifende Kooperation optimiert werden (SCHAPER et al., 2016).

Andere heute notwendige Fähigkeiten beziehen sich auf nichttechnische, weiche Kompetenzen in Bezug auf Grundeinstellungen und Motivation sowie Persönlichkeitseigenschaften, die zur Menschenführung und Mitarbeitermotivation befähigen (CONSTABLE, 2016). Dazu gehören ganz wesentlich eine professionelle Kommunikation mit Betriebsleitern und deren Angestellten sowie die Etablierung herdenspezifischer Protokolle, um eine gleichbleibende Durchführung der im Rahmen der Bestandsbetreuung für die Sicherung der Tiergesundheit vereinbarten Maßnahmen zu gewährleisten (BARKEMA et al., 2015; EVEAE, 2016). Der Erfolg der Bestandsbetreuung hängt wesentlich davon ab, dass Tierarzt und Landwirt im Beratungsgespräch eine Kommunikationsebene, eine gemeinsame Sprache finden. Dafür ist es notwendig, dass der Landwirt grundlegende biologisch-medizinische Zusammenhänge versteht und verständlich vermittelt bekommt. Der Tierarzt soll in der Lage sein, mit seinen Klienten, der Öffentlichkeit, Berufskollegen und verantwortlichen Behörden

effektiv und unter Verwendung einer für sein Gegenüber angemessenen Sprache zu kommunizieren (EAEVE, 2016)

Die sich vollziehende Entwicklung zu einer stark von Beratung und Bestandsbetreuung geprägten Rinderpraxis ist nicht nur dem zweifellos höheren Beratungsbedarf der landwirtschaftlichen Klientel geschuldet, sondern entspricht in gleicher Weise den notwendigen Veränderungen der beruflichen Strukturen in der Nutztierpraxis. Im Vergleich zu anderen Berufsgruppen ist die berufliche Belastung der Tierärzte in Deutschland deutlich höher. Wichtige Einflussfaktoren sind die Arbeitszeit, Verlust an Arbeitsfreude, Unverträglichkeit von Familie und Beruf sowie die Unzufriedenheit mit der Arbeitsvergütung (GEUENICH, 2011). Dabei hängt die Erschöpfung am stärksten mit der Arbeitsbelastung zusammen (MASTENBROEK et al., 2014). Planbare Arbeitszeiten in der Beratungs- und Betreuungspraxis können dazu beitragen, diese ungünstige Situation zu verbessern. Die Eröffnung neuer, interessanter Arbeitsgebiete trägt dazu bei, die Arbeitsfreude in der Rinderpraxis zu verbessern oder wieder zu erlangen.

Die durchschnittliche Arbeitszeit der Rinderpraktiker und der Gemischtpraktiker mit hohem Rinderanteil liegt mit 51,5 Stunden je Woche (DEINER, 2016) deutlich höher als die der Normalpopulation mit 41,5 Stunden und die der Tierärzte im Allgemeinen mit 45 Stunden. Damit besteht alleine durch den Faktor Arbeitszeit ein enormes Stress- und Gesundheitsrisiko. Diese Zusammenhänge waren in einer Befragung von 2642 Tierärzten in Deutschland hochsignifikant. Zwischen Arbeitszeit und Verdienst bzw. Zufriedenheit mit dem Verdienst wurde jedoch kein Zusammenhang nachgewiesen (GEUENICH, 2011). Planbare Arbeitszeiten, wie sie in der Bestandsbetreuung möglich sind, können insofern wesentlich dazu beitragen, das Stress- und Gesundheitsrisiko der in der Rinderpraxis tätigen Tierärzte zu senken.

Insgesamt gesehen ist in den letzten Jahren deutlich geworden, dass in der Rinderpraxis Tierärzte ohne Beratungstätigkeit in der Bestandsbetreuung an Klientel und Umsatz verlieren werden. Die Fleischbeschau und die amtliche Tätigkeit in der Tierseuchenbekämpfung ergänzen zwar die Nutztierpraxis (DEINER, 2016), sind aber durch die Konzentrationsprozesse der Schlachtbetriebe, den Rückgang der Hauschlachtungen und den Fortschritt in der Tierseuchenbekämpfung rückläufig (GEHRING, 2016). Es ist folglich ein existenzielles Erfordernis, neue Arbeitsgebiete

zu erkennen und zu erschließen. Beispielsweise erfordert die Zucht mit genomischer Selektion auf Gesundheitsmerkmale die Erfassung korrekter Daten zum Phänotyp, was das Auftreten von Erkrankungen einzelner Individuen einschließt. Durch die immer stärkere Nutzung automatisierter Systeme, z. B. Kälbertränkautomaten, Aktivitätsmessung der Kühe mit Bewegungsmeldern oder Datenerfassung im Melkprozess werden immer mehr Daten generiert. Deren Nutzung für die Erstellung von Aktionslisten für die Tiergesundheitskontrolle ist erst am Beginn der Umsetzung (BARKEMA et al., 2015). Durch gewissenhafte Auswertung von Management- und Gesundheitsdaten sollten Tierarzt und Landwirt zu bedarfsorientierten Managemententscheidungen kommen (MANSFELD et al., 2012). Obwohl die Integration der Tierärzte in produktionstechnische Belange und die Etablierung eines tierärztlich-landwirtschaftlichen Informationssystems bereits vor mehr als drei Jahrzehnten angeregt worden (MANSFELD & GRUNERT, 1990), liegen solche Arbeitsaufgaben wie die Datenauswertung zur Tiergesundheit gegenwärtig weitestgehend in der Hand von Zuchtorganisationen und Kontrollverbänden und werden von diesen an die Herdenmanager herangetragen. Dieses tierärztliche Kompetenzfeld kann im Rahmen der Bestandsbetreuung übernommen werden, wenn dafür die erforderlichen Kenntnisse und Fertigkeiten vorliegen. Eine ähnliche Verschiebung von Tätigkeitsfeldern zu landwirtschaftlichen Organisationen deutet sich für die Diagnostik und Bekämpfung von Infektionskrankheiten im Rinderbestand an, wie sie im Kapitel 1.2 betrachtet wird.

1.2 Beratung zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten im Rahmen der tierärztlichen Bestandsbetreuung

Entsprechend den „Leitlinien für die Durchführung einer Tierärztlichen Bestandsbetreuung in Rinderbeständen“ soll sich diese grundsätzlich umfassend auf alle Belange der Tiergesundheit und Tierleistung beziehen. Für die Milchviehhaltung sind die Kontrollbereiche Reproduktion, Eutergesundheit, Milchqualität, Infektionskrankheiten und Parasitosen, Stoffwechselgesundheit, Gliedmaßengesundheit und Jungviehaufzucht definiert. Dabei werden für den Kontrollbereich „Infektionskrankheiten und Parasitosen“ in erster Linie strategische Impfprogramme bzw. Parasitenbekämpfungen und Quarantänemaßnahmen in Abhängigkeit vom jeweiligen Bedarf benannt.

Die für Mutterkuhherden relevanten Themen sind Betriebsdatenanalyse, Hygiene, Fütterung, Endo- und Ektoparasiten, Klauengesundheit, Impfstrategien und Kälbergesundheit (BPT, 2011).

In der Vergangenheit war neben der kurativen Praxis und der Apotheke die Tierseuchenbekämpfung eine der Hauptsäulen der Rinderpraxis (GEHRING, 2016). Heute rangiert nach Umsatzanteilen der Rinderpraxis das Arbeitsgebiet Infektionskrankheiten in konventionellen Milchviehbetrieben nach Fruchtbarkeitsbehandlungen und Stoffwechselerkrankungen an dritter und in Nebenerwerbsbetrieben an erster Stelle (DEINER, 2016). Es liegt nahe, dass hierunter auch die Leistungen aus der amtlichen Tätigkeit in der Tierseuchenüberwachung subsummiert sind. In der Bekämpfung anzeigepflichtiger Tierseuchen ist der betreuende Tierarzt in der Regel der erste Ansprechpartner für den Landwirt und gleichzeitig Vertrauensperson, auch wenn die rechtliche Zuständigkeit für die Umsetzung der Bekämpfungsvorschriften bei der zuständigen Veterinärbehörde liegt. Hier kommt dem Rinderpraktiker eine wichtige Funktion als Berater zu. Mit der Probennahme für die Tierseuchendiagnostik ist in vielen Betrieben die betreuende Tierarztpraxis betraut. In gleicher Weise gehört seit über 100 Jahren der Tuberkulin-Hauttest zu den Standardtätigkeiten in der Rinderpraxis und wird für die Diagnostik der Rindertuberkulose genutzt (PUCKEN et al., 2015).

In der Tierseuchenbekämpfung kommt dem bestandsbetreuenden Tierarzt eine zentrale Rolle bei der Befundinterpretation und der Ableitung der erforderlichen Maßnahmen im Bestand zu. Diese beruht auf seiner Kenntnis der Immunitätslage und Besonderheiten im Bestand. Wie sich bei der Bekämpfung der Bovinen Herpesvirusinfektion 1 (BoHV1) und der Bovinen Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVDV) gezeigt hat, geht es dabei nicht nur um die Auswahl des richtigen Impfstoffes und die Durchführung der Impfung, sondern um die Berücksichtigung der bestandsspezifischen Besonderheiten im Bekämpfungsverfahren. Dies war in vielen Beständen ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Bekämpfungsmaßnahmen.

Neben der amtlichen Tierseuchenbekämpfung werden Maßnahmen zur Kontrolle von Infektionen mit fakultativ pathogenen Erregern immer wichtiger, da mit zunehmender Bestandsgröße und Produktionsintensität das Kompensationsvermögen der Tiere abnimmt. So wurden bei Milchrindern verlustreiche Bestandserkrankungen bei-

spielsweise mit *Mycoplasma bovis* (POTHMANN et al., 2015) oder Chlamydien (REINHOLD et al., 2011; MÜLLER et al., 2013) festgestellt. Andere Erreger wie z. B. *Coxiella burnetii*, können über Jahre im Bestand persistieren und Verluste verursachen (SAEGERMAN et al., 2015). Sie können beim Stallpersonal (BRIGGS et al., 2016) oder nach aerogener Verbreitung (NUSINOVICI et al., 2016) zoonotisches Potential entwickeln. Die Erkennung solcher Infektionsgeschehen und deren adäquate Bearbeitung sind ein wesentliches Aufgabengebiet der Bestandsbetreuung.

Zu den Aufgaben der Bestandsbetreuung gehört zunehmend das Monitoring von Erregern mit multiplen Resistenzen, wie beispielsweise methicillinresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (SCHLOTTER et al., 2013; 2014) oder ESBL-produzierende *Escherichia coli* (SCHMID et al., 2013). Im Mittelpunkt stehen hier die Erkennung problematischer Resistenzsituationen im Tierbestand und die fachgerechte Anwendung von antimikrobiell wirksamen Stoffen.

Grundsätzlich wird eine korrekte Diagnose auf Herdenebene benötigt, um Empfehlungen für eine zielführende Bekämpfungs- oder Präventionsstrategie im Bestand zu geben. Dabei ist es wichtig zu verstehen, dass eine Herde mehr ist als eine Summe ihrer Individuen, sondern ein komplexes System aus Umwelt, Management, Fütterung und anderen Faktoren (MORE & O'GRADY, 2016). Bezüglich der Bekämpfung der BVDV-Infektion konnte beispielsweise mit Hilfe einer epidemiologischen Risikofaktorenanalyse gezeigt werden, dass die Länge eines BVDV-Geschehens in einer Herde von herdenspezifischen Faktoren abhängig ist (BRÜTZKE, 2010; HÖFIG, 2015). Neben Faktoren wie Herdengröße und Nutzungsrichtung, die nicht beeinflusst werden können, waren dies auch solche Faktoren, auf die beratend Einfluss genommen werden kann, wie z. B. Personen- und Tierverkehr innerhalb der Herde, Trennung von Kälbern und Muttertieren oder Aufstallung der Saugkälber. Es ist Aufgabe des Bestandsbetreuers, diese Faktoren innerhalb einer Herde zu erkennen und den Tierhalter entsprechend zu beraten. Hier wird deutlich, dass die tierärztliche Bestandsbetreuung ihre höchste Wirksamkeit erreicht, wenn der Landwirt und sein betreuender Tierarzt eng mit dem Tiergesundheitsdienst, anderen Beratern, den Veterinärbehörden und anderen Organisationen zusammenarbeiten (BPT, 2011).

In zunehmendem Maße werden Tank- oder Einzelmilchproben, die im Rahmen der Milchgüteüberwachung oder der Milchleistungsprüfung von den Landeskontrollver-

bänden entnommen werden, für die Tierseuchendiagnostik genutzt. Damit geht ein tierärztliches Arbeitsgebiet verloren. Durch die Weiterentwicklung diagnostischer Tests werden die Möglichkeiten zur Nutzung der Milch für die Krankheitsdiagnostik und Überwachung von Infektionskrankheiten immer vielfältiger (BARKEMA et al., 2015) und die diesbezüglichen Angebote von Landeskontrollverbänden und anderen Untersuchungseinrichtungen nehmen zu. In Verbindung mit diesen Diagnostikleistungen bieten die landwirtschaftlichen Verbände zunehmend auch Beratungsleistungen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten an, so wie dies bei der Hygieneberatung zur Sicherung der Eutergesundheit oder zur Salmonellosebekämpfung bei Schweinen bereits Praxis ist. Hier steht der betreuende Tierarzt zunehmend im Wettbewerb mit anderen Berufsgruppen.

Betrachtet man die gegenwärtig in Deutschland beginnenden Aktivitäten zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen (GIERKE & KÖHLER, 2009; CAMPE et al., 2014; DONAT & KÖHLER, 2016) wird deutlich, dass gerade bei dieser Infektionskrankheit dem Hygiene- und Bestandsmanagement zur Unterbrechung der Infektionsketten eine zentrale Rolle zukommt. Allein die Tatsache, dass die gegenwärtig geltenden Empfehlungen des BMEL zur Bekämpfung der Paratuberkulose in die „Empfehlungen des Bundeslandwirtschaftsministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern“ integriert sind, spricht für die hohe Bedeutung der hygienischen Maßnahmen im Gesamtkonzept der Bekämpfung, die auch von anderen Autoren betont wird (SWEENEY et al., 2012). Die „Leitlinien für die Durchführung einer Tierärztlichen Bestandsbetreuung in Rinderbeständen“ benennen als Bestandteile der Bestandsbetreuung zum einen Präventivmaßnahmen gegen Krankheiten und ein umfassendes Tiergesundheitsmonitoring mit Behandlungsmaßnahmen auf Einzeltier-, Gruppen- und Bestandebe-
zogen, zum anderen auch Maßnahmen, welche die Hauptfaktoren für die Gesundheit, die Fruchtbarkeit und die Leistungsfähigkeit der Tiere beeinflussen (BPT, 2011). Diese betriebsspezifische Faktorenanalyse, die auf der Erfassung, Bewertung, Wichtung und Beeinflussung von Umweltfaktoren einschließlich Ernährung und Betreuung beruht, ist ein zentrales Element der tierärztlichen Bestandsbetreuung im Allgemeinen. Die Erfahrungen aus der Bekämpfung der BoHV1, der BVDV und auch der Paratuberkulose zeigen, dass dieser Wissens- und Erfahrungsschatz in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten unverzichtbar und von hohem Wert für den Bekämpfungs-

erfolg ist. Daher muss die Bekämpfung von Infektionskrankheiten im Zusammenspiel mit der betriebsspezifischen Faktorenanalyse und der Beeinflussung von Umweltfaktoren als integraler Bestandteil der tierärztlichen Bestandsbetreuung betrachtet werden.

1.3 Besonderheiten der Paratuberkulose in Bezug auf die Bekämpfung im Rinderbestand

Bei der Paratuberkulose handelt es sich um eine chronische progressive granulomatöse Enteritis, die neben den Hauswiederkäuern auch wildlebende Arten befällt (FECTEAU & WHITLOCK, 2010). Die Krankheit ist seit mehr als einhundert Jahren bekannt; die Herausforderungen bezüglich ihrer Bekämpfung und der von ihr verursachten Kosten haben sich im Laufe der Jahre erhöht. Die Krankheit hat sich weltweit verbreitet (FERNÁNDEZ-SILVA et al., 2012a), wahrscheinlich befördert durch das moderne Bestandsmanagement in der Tierhaltung (ARSENAULT et al., 2014) und den Tierhandel (COLLINS, 2016). Die Tatsache, dass zwei Genotypen des Erregers der Paratuberkulose, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), in Europa dominieren (FERNÁNDEZ-SILVA et al., 2012b), stützt diese Auffassung.

Folgende Aspekte sind für die Bekämpfung der Paratuberkulose besonders wichtig:

- die lange Inkubationszeit der Krankheit mit individuell unterschiedlicher Immunantwort
- die sich daraus ergebenden Schwierigkeiten bei der Anwendung diagnostischer Tests in der Frühphase der Erkrankung
- die hohe Tenazität des Erregers in der Umwelt
- das mögliche zoonotische Potential des Erregers
- die vielfältigen Übertragungswege des Erregers innerhalb des Bestandes
- die gegenwärtig fehlenden Voraussetzungen zum wirksamen Schutz vor der Weiterverbreitung zwischen den Beständen über den Tierhandel
- die fehlende Wirksamkeit von bisher verfügbaren Impfstoffen in Bezug auf den Schutz vor der Infektion

Inkubationszeit und Immunantwort

Die Infektion mit MAP führt nach längerer Latenz und einer mehrjährigen subklinischen Erkrankungsphase mit einem Rückgang der Milchleistung zu einer klinischen Erkrankung mit therapieresistenten Durchfällen, Gewichtsverlust und Proteinmangel-ödemen. Im weiteren Verlauf der Krankheit kann das Rind einer Dehydratation oder Kachexie erliegen (SWEENEY, 1996; TIWARI et al., 2006). Diese klinischen Symptome treten meist zwei bis fünf Jahre nach der Infektion auf, die sich im Allgemeinen in den ersten Wochen nach der Geburt vollzieht. Leistungseinbußen können sich bereits in der subklinischen Erkrankungsphase zeigen.

Die mit Paratuberkulose assoziierten pathologischen Veränderungen sind primär im letzten Abschnitt des Dünndarms lokalisiert, können aber auch in ausgeprägter Form auftreten und alle Abschnitte des Dün- und Dickdarms betreffen. Die Darmwand verdickt sich und zeigt eine als pathognomonisch geltende Faltenbildung. Dadurch kann die Nährstoffresorption behindert sein. Die Gewebsveränderungen sind durch eine granulomatöse Entzündung in der Submukosa gekennzeichnet (ARSENAULT et al., 2014).

Die in individuell unterschiedlichem Maße protektive zellvermittelte Immunantwort, in welche verschiedene Populationen von T-Lymphozyten involviert sind, ist auf den Darm und die mesenterialen Lymphknoten begrenzt (COUSSENS, 2001). Nachdem MAP über sogenannte M-Zellen die Darmschranke überwunden hat, wird das Bakterium von Makrophagen, die in den Peyer'schen Platten angesiedelt sind, aufgenommen (CHIODINI, 1996). In den Makrophagen kann MAP überleben und deren Antigenpräsentation vermindern. Dabei ist der Aktivierungszustand des Makrophagen entscheidend. Sind diese nicht aktiviert, kann MAP überleben und die Freisetzung von Interferon γ reicht für die Zellaktivierung nicht aus. Trotzdem kommt es bei einem Teil der Makrophagen zu ausreichender Zytokinausschüttung und Antigenpräsentation. Von aktivierten T-Helfer-Zellen freigesetzte Botenstoffe locken weitere Makrophagen an und aktivieren diese, um den Erreger abzutöten. Wenn genügend nicht infizierte Makrophagen aktiviert werden, die in der Folge MAP aufnehmen, können diese die Infektion unter Kontrolle bringen. Ein adäquat aktiviertes Immunsystem des Wirts wäre folglich in der Lage, die Infektion zu kontrollieren (ARSENAULT et al., 2014).

Sofern sich diese Balance zwischen zellvermittelter Immunreaktion und Erregervermehrung zugunsten des Erregers verändert, kommt es durch Einwanderung weiterer Entzündungszellen zur Ausbildung entzündlicher granulomatöser Veränderungen im Darm. Auf welchem Wege MAP in das Darmlumen freigesetzt wird, ist bisher nicht bekannt. In späteren Erkrankungsstadien kommt es zum Absinken der zellulären und zum Anstieg der humoralen Immunantwort (COUSSENS, 2004), die genauen Mechanismen dieses Übergangs sind noch nicht geklärt. Die humorale Immunantwort wird nicht als protektiv angesehen. Zeitpunkt und Dauer der Antikörpersekretion kann daher nicht vorhergesagt werden. Der Zusammenhang zwischen Erregerfreisetzung in das Darmlumen und Immunantwort ist bisher nicht geklärt. Es wird vermutet, dass die Erregerausscheidung von der Läsionsform abhängig ist, wobei schwere und häufigere Läsionen in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auftreten. Manche Autoren beobachteten die Bildung humoraler Antikörper erst in einer späteren Phase des Erkrankungsverlaufs (CHIODINI, 1996), während andere Untersucher in Abhängigkeit von der Infektionsdosis bereits 4-5 Monate post infectionem Antikörper detektierten (MORTIER et al., 2014a). In diesem Stadium sind häufig sowohl die Erregerausscheidung als auch die humorale Immunreaktion nachweisbar, wenn auch nicht immer zeitgleich. MAP-Antikörper sind im späten subklinischen Krankheitsstadium und bei klinisch kranken Kühen mittels ELISA häufiger nachweisbar wie bei Tieren im frühen Krankheitsstadium (KÖHLER et al., 2008a).

Anwendung diagnostischer Tests in der Frühphase der Erkrankung

Auf die Sensitivität der labordiagnostischen Untersuchungsverfahren am lebenden Tier haben die aktuelle Stärke der MAP-Kotausscheidung bzw. der Immunreaktion, die untersuchte Tierpopulation sowie das Alter der Tiere und damit das Krankheitsstadium einen Einfluss. Im Frühstadium der Erkrankung führen verschiedene Methoden zum direkten oder indirekten Nachweis des Erregers häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Interpretation solcher Befunde erfordert Kenntnisse über die Pathogenese der Krankheit und deren Auswirkungen auf Untersuchungsergebnisse, welche diese Unterscheide erklären können. Ohne dieses Hintergrundwissen können widersprüchliche Untersuchungsbefunde zu einem Vertrauensverlust bezüglich der

Diagnostik und der Bekämpfung führen. Daher ist die frühe Identifizierung infizierter Tiere eine der größten Herausforderungen in der Bekämpfung der Paratuberkulose.

Die gegenwärtig verfügbaren Untersuchungsmethoden umfassen den Nachweis des mit dem Kot ausgeschiedenen Erregers im Ausstrich oder mittels bakteriologischer Kultur, den Nachweis des Erregergenoms mittels molekularbiologischer Methoden, die histopathologische Untersuchung von Biopsiematerial und den Nachweis von Antikörpern in Serum- oder Milchproben mittels ELISA (COLLINS et al., 2006). Die Durchführung dieser Methoden ist in der amtlichen Methodensammlung des Friedrich-Loeffler-Instituts beschrieben (FLI, 2015). Die Anwendung der Durchflusszytometrie zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper (SCHILLINGER et al., 2013) und fluoreszenzoptischer Methoden zum Nachweis vermehrungsfähiger MAP-Zellen in Milch (AKINEDEN et al., 2014) wurden erprobt. Mit serologischen Nachweismethoden kann, bedingt durch die Pathogenese und die Zusammenhänge von Inkubationszeit und Immunantwort, immer nur ein Teil der mit MAP infizierten Tiere detektiert werden, deren Sensitivität und die Spezifität sind daher begrenzt (COLLINS et al., 2006). Die mit bakteriologischen oder molekularbiologischen Methoden nachweisbare Erregerausscheidung ist in der frühen subklinischen Phase intermittierend und daher nicht immer nachweisbar (MCKENNA et al., 2006a). Für die frühe subklinische Phase stehen also keine zuverlässigen Diagnostika zur Verfügung.

Auf das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung von Kotproben haben ihre Lagerung, die Einwirkzeit von Hexadecylpyridiniumchlorid zur Abtötung der Begleitflora, die Anzahl eingesetzter Kulturröhrchen pro Kotprobe sowie betriebsspezifische Faktoren einen Einfluss. Durch wiederholte Untersuchungen kann der Anteil ermittelter Ausscheider gesteigert und die Sensitivität der Methode erhöht werden (GIERKE, 2009). Ein Nachteil der kulturellen Untersuchung ist die lange Dauer von 12 Wochen bis Abschluss der Untersuchungen bei negativen Proben. Mit Hilfe der PCR ist heute bereits die Erkennung früherer Stadien der Infektion unmittelbar nach dem Beginn der Erregerausscheidung möglich (COLLINS, 2016). Zur Einzeltierdiagnostik der Paratuberkulose am lebenden Tier ist der Erregernachweis mit kulturellen oder molekularbiologischen Untersuchungen gegenwärtig die Methode der Wahl (Dr. Michael T. Collins, persönliche Mitteilung, 7. Juli 2016). Die Speziesidentifikation im Kulturmateriale erfolgt durch Prüfung auf mykobaktinabhängiges Wachstum oder durch eine

MAP-spezifische PCR aus Kulturmaterial (FLI, 2015). Eine weitere Möglichkeit ist die Abschwemmung vom Kulturmedium nach vier Wochen und der Erregernachweis mit PCR (FAWZY et al., 2015). Mittlerweile stehen auch PCR-Methoden zur Verfügung, die den MAP-Nachweis direkt aus Rinderkot nach DNA-Extraktion mit Hilfe von Magnetpartikel bzw. Siliziumkarbidsäulen mit oder ohne Mikrofiltration, jedoch ohne vorherige Kultivierung, ermöglichen (LOGAR et al., 2012; STING et al., 2014; PLAIN et al., 2014; ALAJMI et al., 2016). Zum molekularbiologischen Nachweis von MAP sind mehrere zuverlässige PCR-Protokolle verfügbar (MÖBIUS et al., 2008), die Targets verwenden, die nur einmal (hspX, F57) oder mehrfach (IS900) im MAP-Genom vorkommen. Letzteres führt möglicherweise zu einer höheren Sensitivität der IS900-Protokolle (BOEHLSKE & HERTHNEK, 2010).

Die mikroskopische Untersuchung von Kot- oder Gewebeproben mit Hilfe des Direktausstrichs und der Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis säurefester Stäbchen empfiehlt sich nur bei klinisch kranken Tieren. Hier ist in veränderten Darmabschnitten und den zugehörigen Lymphknoten die Nachweisrate akzeptabel (FLI, 2015).

Die Sensitivität der serologischen Nachweismethoden für die Paratuberkulose ist im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten gering (KÖHLER et al., 2008a). Insbesondere bei subklinisch infizierten Rindern werden mit serologischen Tests nur 15 % bis 40 % der Tiere erkannt (GIERKE & KÖHLER, 2009). Auch die diagnostische Spezifität der ELISA-Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP variiert beträchtlich, für gegenwärtig in Deutschland zugelassene Testsysteme liegt diese über 99,0 % (KÖHLER et al., 2008a). Die hohe Variabilität der in der internationalen Literatur publizierten Werte für die diagnostische Sensitivität und Spezifität von serologischen Tests ist neben testbedingten Eigenschaften auch durch voneinander abweichende Referenzmethoden (Gewebekultur oder Kotkultur) und von Unterschieden in der Referenzpopulation hinsichtlich des Anteils klinisch erkrankter Rinder und des Anteils der Rinder in früheren Krankheitsstadien abhängig (NIELSEN & TOFT, 2008). COLLINS et al. (2006) gaben unter Berücksichtigung dieser Unsicherheiten in den Daten und des Mittels der Testeigenschaften über verschiedene Populationen hinweg Orientierungswerte im Vergleich zur pathologischen Untersuchung an (Tab. 1).

Tab. 1: Orientierungswerte für die Sensitivität und Spezifität verschiedener Nachweisverfahren zur Diagnostik der Paratuberkulose beim einzelnen Rind relativ zur pathologischen Untersuchung

Test	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Bakteriologische Untersuchung von individuellen Kotproben	60 ± 5	99,9 ± 0,1
PCR von individuellen Kotproben	30 ± 5	99,5 ± 0,5
ELISA in Serum- oder Milchproben	30 ± 5	99,0 ± 1,0
Untersuchung von Biopsiematerial	90 ± 5	100

Tenazität des Erregers

Die speziellen Zellwandeigenschaften vom MAP bedingen eine hohe Widerstandfähigkeit des Bakteriums gegenüber Umwelteinflüssen. MAP kann daher in der Umgebung sehr lange überleben, bei 5 °C für mehr als neun Monate, bei 15 °C für mindestens 3,5 Monate und bis zu 55 Wochen in trockener und schattiger Umgebung (LOVEL et al., 1944; JØRGENSEN et al., 1977; WHITTINGTON et al., 2004). Direkte Sonneneinstrahlung führt zur Inaktivierung des Erregers innerhalb von ca. 100 Stunden (GAY & SHERMAN, 1992). Gegenüber den meisten Desinfektionsmitteln ist MAP auf Grund der Säure- und Alkoholfestigkeit der Zellwand unempfindlich. Entsprechend der Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und für wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich sind gegen Mykobakterien nur Präparate mit Peressigsäure, Kresolen oder organischen Säuren als Wirkstoff geprüft und wirksam (DVG, 2016).

In Gülle, die in Lagunen gelagert wurde, fanden sich vermehrungsfähige Bakterien nach acht Wochen und DNA von MAP nach 175 Tagen (GREWAL et al., 2006). In 66 % der Wasserproben aus einem südwalisischen Fluss war MAP-Genom nachweisbar (PICKUP et al., 2006). In 7,8 % der Proben unbehandelten Wassers aus nordirischen Wasseraufbereitungsanlagen wurde MAP kultiviert (WHAN et al., 2005). Versuche zur Abtötung von MAP in Milch durch Pasteurisierung ergaben eine unvollständige Inaktivierung, wobei hohe Keimkonzentrationen unter nichtkommerziellen Pasteurisierungsbedingungen eingesetzt wurden (HAMMER et al., 2003). In einem geringen Anteil von 1,6 % pasteurisierter Konsummilchproben war MAP kulturell nachweisbar (AYELE et al., 2005), sodass gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden kann, dass MAP die molkereiübliche Pasteurisierung der Milch überlebt (GIERKE & KÖHLER, 2009).

Zoonotisches Potential

Ein zoonotisches Potential der Infektion mit MAP wird diskutiert (HAMMER & KNAPPSTEIN, 1998; BÜLTE et al., 2005; ATREYA et al., 2014), da eine Beteiligung des Bakteriums an der Erkrankung Morbus Crohn des Menschen bisher nicht sicher ausgeschlossen werden kann (FELLER et al., 2007; UZOIGWE et al., 2007). Eine Metaanalyse zum zoonotischen Potential von MAP, die 128 Studien einschloss,

ergab unabhängig vom MAP-Diagnoseverfahren eine signifikant positive Beziehung zu Morbus Crohn. Daher kann das zoonotische Potential von MAP nicht ignoriert werden. Wegen der bedeutenden Wissenslücken im Verständnis der Rolle von MAP in der Entwicklung von Morbus Crohn kann sein Einfluss auf die menschliche Gesundheit bisher nicht quantifiziert oder beschrieben werden. Die Evidenz ist nicht stark genug, um einen potentiellen Einfluss einer MAP-Exposition auf die öffentliche Gesundheit zu proklamieren (WADDELL et al., 2015a). Diese Einschätzung führt gegenwärtig dazu, dass es in den meisten Ländern keine amtliche Bekämpfung der Paratuberkulose gibt und wenig öffentliche Mittel dafür bereitgestellt werden. Auf der anderen Seite wird gegenwärtig eine internationale multizentrische Studie durchgeführt, in der Morbus Crohn-Patienten mit Antibiotika behandelt werden, die gegen MAP wirksam sind. Sollte diese Studie eine Therapierbarkeit von Morbus Crohn mit diesen Antibiotika bestätigen, kann dies die wissenschaftliche Meinungsbildung über das zoonotische Potential von MAP beeinflussen (COLLINS, 2016).

Unabhängig von der tatsächlichen Evidenz hat jedoch allein die Möglichkeit, dass MAP als Erreger mit zoonotischem Potential angesehen werden könnte und damit beim Endverbraucher Ängste geschürt werden würden, gegenwärtig erheblichen Einfluss auf die Aktivitäten der Milchindustrie im Rahmen freiwilliger Programme in verschiedenen Ländern, z. B. den Niederlanden, Dänemark und Belgien (WEBER & LAM, 2012; KUDAHL et al., 2008; MINTIENS, 2014). Allerdings ist das in diesen Ländern verfolgte Ziel nicht die Verdrängung des Erregers aus der Population oder zumindest aus bestimmten Beständen, sondern das Bestreben um eine Verringerung des MAP-Eintrags in die Verarbeitungskette für Milchprodukte. Wenn die Verbindung von Morbus Crohn und MAP bestätigt würde, können negative Einflüsse auf den Verbrauch von Milchprodukten nur dann vermieden werden, wenn die Milchwirtschaft glaubhaft versichern kann, dass eine Behandlung von Milch ein Risiko für den Verbraucher ausschließen kann (GROENENDAAL & ZAGMUTT, 2008). Eine Ausscheidung von MAP über die Milch ist möglich, sollte jedoch nicht überbewertet werden. In einer österreichischen Studie zeigte sich, dass von Kühen mit subklinischer Paratuberkulose MAP nur bei einem kleinen Anteil der Tiere und über einen begrenzten Zeitraum ausgeschieden wird. In der betrachteten Herde war der Anteil der testpositiven Tiere bei ca. 5 %, in der Tankmilch war der Verdünnungseffekt so groß, dass der MAP-Gehalt in dieser unterhalb der Nachweisgrenze der qPCR war (KHOL et al.,

2013). Es darf jedoch nicht außeracht gelassen werden, dass bei klinisch kranken Tieren dieser Effekt höher sein kann und dass sich ab einem bestimmten Krankheitsstadium der Erreger über den gesamten Organismus verbreitet und somit auch über Fleisch in die Nahrungskette eingetragen werden kann (ANTOIGNOLI et al., 2008).

Übertragungsmöglichkeiten innerhalb eines Bestandes

Die meisten Bekämpfungsprogramme bezüglich Paratuberkulose fokussieren auf die Implementierung von Management- und Hygienemaßnahmen zur Unterbrechung der Infektionsketten zwischen den einzelnen Tieren innerhalb eines Bestandes und zwischen den Beständen. Für die Übertragung innerhalb eines Bestandes ist der horizontale fäkal-orale Infektionsweg am bedeutsamsten, wobei der pseudovertikalen Übertragung von der Mutter auf das neugeborene Kalb die höchste epidemiologische Bedeutung beigemessen wird. Dabei gelten die neugeborenen Kälber als die empfänglichsten Tiere (SWEENEY et al., 2012). Aber auch in einem späteren Entwicklungsstadium sind Rinder empfänglich. In einer kanadischen Studie konnten Jungrinder bis zu einem Alter von 12 Monaten experimentell infiziert werden (MORTIER et al., 2013). Zudem war unter hohem Infektionsdruck eine Übertragung von MAP auf 15 Monate alte Jungrinder zu beobachten (FECTEAU et al., 2010). Werden Kälber in frühem Lebensalter (zwei Wochen) mit einer hohen Dosis MAP-Erreger infiziert, so beginnt deren aktive Erregerausscheidung bereits nach weniger als einem Monat und kann bei einem Teil der Tiere fortlaufend während des gesamten ersten Lebensjahres beobachtet werden. Werden dagegen die Tiere mit geringer Dosis oder in späterem Lebensalter infiziert, zeigt sich ca. zwei Monate nach der Infektion bei den meisten Kälbern oder Jungrindern eine kurzzeitige Erregerausscheidung, die jedoch nur ein bis drei Monate anhält (MORTIER et al., 2014b). Ergänzend zu dieser experimentellen Studie belegen MAP-Nachweise mit Hilfe von Umgebungskotproben aus Gruppenbuchten von Kälbern unterschiedlichen Alters, dass Jungtiere altersabhängig MAP ausscheiden (WOLF et al., 2015a).

Neben der horizontalen Ausscheidung spielt auch der intrauterine Übertragungsweg von der Mutter auf das Kalb bei der Verbreitung innerhalb von Beständen eine Rolle. Die Metaanalyse der bisherigen Studien schätzte eine Inzidenz der intrauterin infi-

zierten Kälber für subklinisch infizierte Kühe auf 9 % und für Kühe mit klinischen Symptomen der Paratuberkulose auf 39 % (WHITTINGTON & WINDSOR, 2009).

Die indirekte Erregerübertragung spielt bei Paratuberkulose auf Grund der hohen Tenazität eine vergleichsweise große Rolle. Ein systematischer Review der bis zum Jahr 2010 zu diesem Thema publizierten Studien kam zu dem Ergebnis, dass Kontakt der Kälber mit Kuhkot dabei der wichtigste Risikofaktor ist (DORÉ et al., 2012). Dieser Kontakt ist im Milchviehbetrieb auf verschiedenen Wegen möglich. Eine Reihe von Studien untersuchte daher einzelne Faktoren, die mit MAP-positiven Testergebnissen in Beziehung stehen, also die Erregerübertragung zu begünstigen scheinen:

- Kontakt zu anderen Kühen zur Geburt (PILLARS et al., 2011b; TIWARI et al., 2009)
- gruppenweise Kalbung anstelle der Nutzung einer Einzelkalbebox (PITHUA et al., 2013)
- Verfütterung von Erst-Kolostrum MAP-positiver Kühe (DIEGUEZ et al., 2008)
- Verfütterung von Mischkolostrum (PILLARS et al., 2011b; SORGE et al., 2012)
- Verfütterung nicht verkehrsfähiger Milch an Zuchtkälber (RIDGE et al., 2009)
- Gruppenaufzucht der Kälber statt Einzelhaltung (TIWARI et al., 2009)
- Weidegang von Kälbern in Weideparzellen gemeinsam mit kranken Kühen (NORTON et al., 2009)

Im Stallstaub kann neben anderen darmpathogenen Erregern wie Clostridien (SCHMID et al., 2013b) auch MAP nachgewiesen werden (EISENBERG et al., 2010a; 2010b). Es besteht zumindest eine epidemiologische Beziehung zwischen der Anzahl milchserologisch positiver Tiere und der Kontamination von Stallstaub aus der Umgebung der Tiere mit MAP (EISENBERG et al., 2013a). In Infektionsversuchen bei Kälbern mit Inokulation von MAP auf nasalem oder transtrachealem Weg konnte MAP in Gewebeproben aus dem Darm kulturell nachgewiesen werden. Das zeigt, dass durch die Inhalation MAP-haltiger Aerosole die Infektion ausgelöst werden kann (EISENBERG et al., 2011). Die Bedeutung dieses Infektionswegs unter Feldbedingungen ist noch unklar, dürfte jedoch in den Hintergrund treten, wenn die für die Kälberhaltung idealen Bedingungen mit ausreichender Belüftung mit frischer Luft oder Haltung im Außenbereich (ROLAND et al., 2016) gewährleistet werden.

Die Vielfalt der möglichen Infektionswege in einer Rinderherde und die lange Dauer der Erregerexposition, bedingt durch die lange Überlebensfähigkeit vom MAP in der Umgebung der Rinder erschweren die Unterbrechung der Infektionsketten im Rinderbestand. Auf die hierfür notwendigen Management- und Hygienemaßnahmen wird in Kapitel 1.7 näher eingegangen.

Verhinderung der Weiterverbreitung zwischen den Beständen

Die Paratuberkulose ist bekannt als eine Erkrankung der Wiederkäuer mit einem breiten Wirtsspektrum, das Rinder, Schafe, Ziegen und Hirsche einschließt (WHITTINGTON & SERGEANT, 2001). Der Erreger der Paratuberkulose konnte bei Hunden detektiert (GLANEMANN et al., 2008) und auch aus einer Reihe anderer Tierarten wie Dachse, Katzen, Opossums, Kaninchen oder Krähen isoliert werden (MÜNSTER et al., 2013).

Der wichtigste Übertragungsweg zwischen den Beständen ist der Tierverkehr. Dagegen war ein Effekt des Erregereintrags über andere Tierarten oder Wild weniger bedeutsam. Lediglich einzelne Studien ergaben ein erhöhtes Risiko bei Kontakt von Wildtieren und anderen Haustieren auf Weiden (Kaninchen, Hirsche, Gehegewild), Kontakt von Wildtieren zu Futterlagerstätten und Kot von Rindern (RANGEL et al., 2015). Gleichwohl besteht bei gemeinsamem Weidegang von mehreren Tierarten auf gemeinsamer Standweide ein nicht zu vernachlässigendes Übertragungsrisiko (HEUER, 2016).

Insbesondere bei der Verbringung subklinisch infizierter Tiere besteht ein hohes Risiko für die Verschleppung des Erregers in bisher nicht betroffene Bestände. Der größte Risikofaktor für eine Milchviehherde ist der direkte Import von Rindern (BARRETT et al., 2011). Die gegenwärtig verfügbare Diagnostik am lebenden Tier erlaubt keine ausreichend sichere Aussage, ob das Tier latent mit MAP infiziert ist oder nicht. Angesichts des meist jüngeren Alters der Tiere beim Zukauf zur Bestandsergänzung (tragende Färsen, Jungkühe nach der ersten Kalbung) oder zur Zucht (Deckbullen) ist dieser Sachverhalt von großer Bedeutung. Zu Reduktion der Übertragung zwischen den Beständen ist es zwingend notwendig, den Status der Herkunftsherde der Rinder zu berücksichtigen (COLLINS, 2016) und solche Herden zu identifizieren, die ein geringes bzw. ein hohes Risiko aufweisen, von Paratuberkulose betroffen zu sein

(GARRY, 2011). Daher sollten Zuchtorganisationen Regeln implementieren, dass Rinder, die von ihren Mitgliedern verkauft werden, aus test-negativen Herden stammen, und auf dieses Ziel schrittweise hinarbeiten. Benötigt wird eine Untersuchung und Zertifizierung auf Herdenebene, die es erlaubt, Rinder nur von solchen Herden zu kaufen, die eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, frei von Paratuberkulose zu sein (COLLINS, 2016). Aus diesem Grunde sind verschiedene Zertifizierungsprogramme initiiert worden, mit deren Hilfe für die betreffenden Herden eine sehr niedrige, unter der Nachweisgrenze der Tests liegende Infektionsprävalenz bescheinigt werden kann und damit ein sehr geringes Risiko, dass mit Tieren aus dieser Herde MAP in andere Bestände verschleppt wird (MCKENNA et al, 2006b; TMSFG, 2008; USDA, 2010). Auch der im „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ (TMSFG, 2008) definierte Status „Paratuberkulose-unverdächtiger Rinderbestand“ erfüllt diesen Zweck. Er wird nur an solche Bestände vergeben, deren Kühe über drei Jahre kulturell negativ untersucht waren. Der Status bietet damit eine hohe Sicherheit, dass ein aus diesem Bestand verkauftes Rind nicht mit MAP infiziert ist. Seit 2014 ist diese Statusdefinition in die aktuell gültigen Empfehlungen zur Bekämpfung der Paratuberkulose aufgenommen worden (BMEL, 2014). Zum Schutz der Paratuberkulose-unverdächtigen Rinderbestände und der Bestände in der Anerkennungsphase wird empfohlen, dass in diese nur Rinder verbracht werden dürfen, die ebenfalls aus Paratuberkulose-unverdächtigen Beständen stammen. Gegenwärtig gibt es lediglich in den Ländern Sachsen und Thüringen entsprechend anerkannte Rinderbestände. Dies führt dazu, dass in den anderen Bundesländern die meisten Rinder nach wie vor auf der Basis von Einzeltierbefunden oder völlig ohne Untersuchung aus Paratuberkulose verbracht werden. Diese Vorgehensweise im Tierhandel begründet ein hohes Risiko der Weiterverbreitung zwischen den Beständen. Erst eine höhere Beteiligung der Rinderhalter an der Paratuberkulosebekämpfung mit zunehmender Zertifizierung unverdächtiger Bestände kann diese Situation ändern. Da diese Statuszertifizierung in Deutschland bisher auf freiwilliger Grundlage und ohne bindende Rechtsgrundlage erfolgt, ist die Regelung rein privatrechtlich.

Auch innerhalb der Europäischen Union gibt es bezüglich Paratuberkulose im Tierverkehr keine tierseuchenrechtlichen Vorgaben. Der Käufer kann daher vom Verkäufer nur auf privatrechtlicher Basis Untersuchungen auf Paratuberkulose fordern. Ge-

gegenwärtig erfolgt dies selten. Auch im internationalen Tierhandel mit Drittländern werden Atteste verwendet, die auf der Einzeltieruntersuchung beruhen. Dabei fällt auf, dass gerade solche Länder, die in ihrem Hoheitsgebiet keinerlei Aktivitäten zur Bekämpfung der Paratuberkulose entwickeln, beim Import eine amtstierärztliche Attestierung bezüglich Paratuberkulose fordern, zumeist in dem Sinne, dass in den letzten Jahren Paratuberkulose nicht amtlich zur Kenntnis gelangt sein darf (COLLINS, 2016). Die Praxis zeigt, dass die Drittland-Attestierung damit unterlaufen wird, dass potentielle Verkäufer keine Untersuchungen auf Paratuberkulose in ihren Beständen durchführen lassen. Hinzu kommt, dass ein Teil der deutschen Rinderzüchter und ihre Organisationen diese Attestierungsanforderung nutzen, um eine Verweigerung gegenüber jeglicher Paratuberkulose-Diagnostik im Rinderbestand zu begründen. Damit ergibt sich gegenwärtig die paradoxe Situation, dass für eine akzeptable Sicherheit im Tierhandel in Bezug auf Paratuberkulose eine mehrfache Untersuchung der Tiere des Bestandes notwendig wäre, jedoch ein Teil der Rinderhalter mit dem Verweis auf ausbleibende Exporterlöse auf jegliche Diagnostik verzichtet und das Risiko der Krankheitsverbreitung billigend in Kauf nimmt. Die Weltorganisation für Tiergesundheit (O.I.E.) hat es somit nicht vermocht, im internationalen Tierhandel eine sinnvolle Zertifizierung zu etablieren, die einer Weiterverbreitung der Paratuberkulose wirksam vorbeugt (COLLINS, 2016).

Impfung

Wegen der genannten Schwierigkeiten in der Kontrolle der Paratuberkulose werden auch solche Bekämpfungsansätze verfolgt, die eine Impfung beinhalten (BASTIDA & JUSTE, 2011). Die gegenwärtig verwendete Inaktivatvakzine kann die Infektion nicht verhindern, begrenzt jedoch die Erregerausscheidung und verlangsamt die Ausprägung der klinischen Symptomatik (ARSENAUT et al., 2014). Wegen dieser begrenzten Leistungsfähigkeit der verfügbaren Vakzine gibt es verschiedene Neuentwicklungen von Impfstoffkandidaten, welche vor der Infektion schützen (BULL et al, 2014; LYBECK et al., 2014) oder die Ausbreitung des Erregers im Körper reduzieren (THAKUR et al., 2014) sollen. Gegenwärtig sind solche protektiven Impfstoffe noch nicht verfügbar. Die in Spanien, Australien und anderen Ländern verwendete

Inaktivat-Vakzine ist in Deutschland gegenwärtig nicht zugelassen und kommt daher hier nicht zum Einsatz.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Besonderheiten der Paratuberkulose erschweren die Anwendung der herkömmlichen Ansätze zur Bekämpfung von Tierseuchen bzw. Infektionskrankheiten, wie sie gegenwärtig in Deutschland und anderen Ländern in der Bekämpfung der BoHV1- oder BVDV-Infektion praktiziert werden. In Bezug auf Paratuberkulose sind der veterinärbehördlichen Arbeit in Deutschland durch bisher fehlende tierseuchenrechtliche Bekämpfungsvorschriften und die nicht geklärte lebensmittelhygienische Relevanz Grenzen gesetzt. Im Rahmen freiwilliger Programme, die es in mehreren deutschen Bundesländern gibt, hat der Rinderhalter in Deutschland die Möglichkeit, in seinem Bestand Maßnahmen gegen die Paratuberkulose einzuleiten. Hier hat der bestandsbetreuende Tierarzt die Möglichkeit, den Landwirt zu beraten, um entsprechend der gegebenen Möglichkeiten die Verbreitung der Paratuberkulose in Bestand und ihre Schädwirkungen einzugrenzen.

1.4 Ansätze zur Bekämpfung der Paratuberkulose

Weltweit sind verschiedenste Programme initiiert worden, um in infizierten Herden die Ausbreitung der Erkrankung einzudämmen (WELLS, 2005; MCKENNA et al., 2006b). Die meisten dieser Kontroll- und Präventionsprogramme beruhen auf einer freiwilligen Teilnahme der Tierhalter, lediglich in Japan und Schweden existieren verpflichtende Bekämpfungsprogramme. In Deutschland ist die Paratuberkulose meldepflichtig, sofern entsprechende typische pathologische Veränderungen festzustellen sind, der Erreger in Proben von Tieren nachgewiesen wird oder serologische Befunde in Verbindung mit klinischen Anzeichen auftreten. Veterinärbehördliche Konsequenzen resultieren daraus jedoch nicht. In Österreich sind klinische Erkrankungen anzeigespflichtig und führen zu einem Schlachtverbot und einer Milchliefer Sperre für das betroffene Tier. Ziel der dortigen Bekämpfungsverordnung es ist, klinisch kranke Tiere mit MAP-Nachweis aus der Lebensmittelkette zu entfernen. Die Verordnung ermächtigt die Veterinärbehörden, die Tötung und unschädliche Beseitigung solcher Rinder anzuordnen. In diesen Fällen erhält der Tierhalter eine tierseuchenrechtliche Entschädigung (BAUMGARTNER & KHOL, 2008). In der Europäischen Union wer-

den freiwillige Bekämpfungsprogramme unter anderem in Dänemark, den Niederlanden und im Vereinigten Königreich (NIELSEN 2011) sowie einigen deutschen Bundesländern, wie Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, Brandenburg, Sachsen und Thüringen (GIERKE & KÖHLER, 2009) durchgeführt. Als Hauptgründe für die Teilnahme an einem solchen Programm nannten dänische Landwirte die Verbesserung der Tiergesundheit sowie die Vermeidung von Leistungsminderungen, die mit einer MAP-Infektion einhergehen und hohe finanzielle Verluste für einen Betrieb bedeuten können (NIELSEN, 2011). In den Niederlanden und in Australien steht die Vermarktungssicherheit der tierischen Produkte Milch und Fleisch im Mittelpunkt der Maßnahmen (VAN ROERMUND et al., 2005, BAUMGARTNER & KHOL, 2008). In einigen Ländern werden die Kontrollmaßnahmen durch Zertifizierungsprogramme begleitet, um denjenigen Herden, in denen nach wiederholten jährlichen Untersuchungen keine positiven Tiere gefunden wurden, den Herdenstatus eines Paratuberkulose-unverdächtigen Bestandes oder zumindest mit hoher Sicherheit eine niedrige Prävalenz der Erkrankung zu bescheinigen.

Bei der Entwicklung von nationalen oder regionalen Bekämpfungsstrategien auf freiwilliger Basis kommt es darauf an, dass die Landwirte zur Teilnahme an diesen Programmen motiviert sind. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn es darum geht, in einer betroffenen Herde die Ausbreitung der Infektion unter Kontrolle zu bringen oder in einer vermutlich nicht infizierten Herde den Status „unverdächtig“ zu bestätigen. Diese unterschiedlichen Zielstellungen bedingen unterschiedliche Strategien. In den infizierten Herden geht es insbesondere die Implementierung von Hygienemaßnahmen, dagegen in den zu zertifizierenden Beständen um eine valide Bestätigung des unverdächtigen oder niedrigprävalenten Status (MCKENNA et al., 2006b). Mehrstufige Programme sind auch in anderen Ländern vorgeschlagen worden (KHOL & BAUMGARTNER, 2012) bzw. in Kraft (USDA, 2010).

Die Paratuberkulose kann im Rinderbestand kontrolliert und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch getilgt werden, wenn die dazu erforderlichen Maßnahmen über einen längeren Zeitraum durchgehalten werden. Dabei ist die Unterbrechung der fäkal-oralen Infektionskette im Wesentlichen eine Frage der Hygiene. Die Sicherstellung der Wirksamkeit der Hygienemaßnahmen ist dabei genauso wichtig wie die Erkennung und Eliminierung von Erregerausscheidern im Bestand bzw. deren Separierung

von empfänglichen Kälbern. Entscheidende Punkte für eine erfolgreiche Bekämpfung dieser Infektionskrankheit sind (COLLINS, 2016):

- Rinderpraktiker sollten sich als Wissensvermittler und Wegweiser in Fragen der öffentlichen Gesundheit verstärkt engagieren und die Paratuberkulose zu einem Teil der routinemäßigen tierärztlichen Bestandsbetreuung machen.
- Die milchverarbeitende Industrie sollte finanzielle Anreize schaffen, damit Milcherzeuger ihre Herden untersuchen lassen.
- Milch von MAP-negativen Herden sollte besser bezahlt werden.
- Zuchtorganisationen sollten Anforderungen formulieren, dass von ihren Mitgliedern nur Tiere aus MAP-negativen Herden verkauft werden.
- Staatliche Stellen sollten die Infrastruktur für diese marktbasierenden Programme schaffen: zugelassene Untersuchungsmethoden, zertifizierte Labore, Standards für die Klassifizierung der Herden auf der Basis der Wahrscheinlichkeit, Paratuberkulose-frei zu sein.

In Deutschland hat die Bekanntmachung von Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft vom 7. Juli 2014 mit den darin enthaltenen Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose in Rinderhaltungen wesentliche neue Impulse für die Bekämpfung dieser Infektionskrankheit gegeben. Neben einer Strukturierung der Bekämpfung in eine Kontrollphase und eine Zertifizierungsphase, gefolgt von der Anerkennung als Paratuberkulose-unverdächtiger Bestand, sehen die Empfehlungen drei Optionen für die Durchführung der Kontrollphase vor:

- Erkennung MAP-positiver Herden durch die Untersuchung von Umgebungskotproben
- Identifizierung von Hochrisikotieren durch serologische Untersuchungen von Blut- oder Milchproben
- Erkennung von Erregerausscheidern im subklinischen Krankheitsstadium durch bakteriologische Untersuchung von Kotproben

In allen Phasen sind Maßnahmen zur Verbesserung des Hygiene- und Bestandsmanagements zu implementieren, klinisch verdächtige Tiere bakteriologisch zu untersuchen und Tiere mit positivem Befund schnellstmöglich aus den Herden zu entfernen. Auf der Basis der Empfehlungen des BMEL wurden die freiwilligen Programme in Sachsen und Thüringen aktualisiert. In Hessen, Niedersachsen und Mecklenburg-Vorpommern sind Programme implementiert worden (REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIESSEN, 2015; ANONYMUS 2016a; MLUV 2016). Damit verfügt nunmehr die Mehrzahl der Flächenländer Deutschlands über strukturierte Programme zur Bekämpfung der Paratuberkulose. In drei Bundesländern, die über solche Programme nicht verfügen (Baden-Württemberg, Bayern, Rheinland-Pfalz), unterstützen die Tierseuchenkassen die Landwirte bei ihren betrieblichen Maßnahmen mit Beihilfen für die Diagnostik und die Entfernung MAP-positiver Tiere (DONAT & KÖHLER, 2016).

1.5 Verfahren zur Diagnostik der Paratuberkulose auf Bestandsebene

Für die Feststellung, ob ein Rinderbestand von Paratuberkulose betroffen ist oder nicht, können grundsätzlich zwei Ansätze zur Anwendung kommen:

- die individuelle Untersuchung aller Tiere einer Herde oder einer repräsentativen Stichprobe
- die Untersuchung von Sammelproben solcher Substrate, in denen Erreger oder Antikörper nachweisbar sind, und die eine Aussage für die Herde ermöglichen.

Die individuelle Untersuchung von Einzeltieren mit Interpretation der Ergebnisse auf Herdenebene ist eine verbreitete Vorgehensweise zur Erkennung MAP-positiver Rinderbestände (TAVORNPANICH et al., 2008). Dieser Ansatz impliziert in jedem Falle eine hohe Anzahl zu untersuchender Proben (JAYARAO et al., 2004). Herdenuntersuchungen auf der Basis des Erregernachweises sind dabei wegen der guten Spezifität der Methode gut interpretierbar, erfordern jedoch hohen Aufwand an Zeit, Arbeit und Geld. Dabei zeigte eine zufällig ausgewählte Stichprobe von 80 Tieren eine gute Sensitivität aus Herdenebene von ca. 94 im Vergleich zur Untersuchung aller Tiere (KUBE, 2014). Die molekularbiologische Untersuchung von Rinderkot ohne vorherige Kultivierungsschritte spart gegenüber der Kotkultur Zeit, ist jedoch auf Grund der

notwendigen Extraktionsschritte ähnlich arbeits- und kostenintensiv. Zudem ist die Sensitivität in der Auffindung von schwachen Ausscheidern geringer (DRESSEL, 2012).

Auf Grund der Schnelligkeit in der Durchführung (COLLINS et al., 2006), dem realisierbaren hohen Probendurchsatz sowie der Automatisierbarkeit (HOHMUTH, 2002; KALIS et al., 2002) und der niedrigen Kosten im Vergleich zum Erregernachweis (KÖHLER et al., 2008b) werden serologische Einzeltieruntersuchungen mit ELISA-Testsystemen zum Nachweis von MAP-Antikörpern in verschiedenen Ländern im Rahmen der jeweiligen Bekämpfungsprogramme häufig eingesetzt (KUDAHL et al., 2008; COLLINS et al., 2010; WEBER & LAM, 2012). Diese serologischen Untersuchungsverfahren sind von einer humoralen Immunantwort und dem Vorhandensein von Antikörpern abhängig, was bei vielen Tieren erst in den späteren Krankheitsphasen der Fall ist (MCKENNA et al., 2006a). Wegen der begrenzten Sensitivität und Spezifität dieser serologischen Testverfahren auf Einzeltierebene ergeben sich auf Herdenebene erhebliche Unsicherheiten bezüglich der Aussage, ob eine Herde als MAP-positiv anzusehen ist oder nicht (HUMPHRY et al., 2004). Dabei bezeichnet die Herdensensitivität die Zahl der richtig als positiv bewerteten Herden im Verhältnis zur Zahl der tatsächlich positiven Herden und die Herdenspezifität die Anzahl der richtig als negativ bewerteten Herden im Verhältnis zur Zahl der tatsächlich negativen Herden. Beide Maßzahlen werden durch die Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde, die Zahl der untersuchten Proben, die Testsensitivität und -spezifität auf Einzeltierebene sowie die Zahl der positiven Tiere, ab der die Herde als positiv bewertet wird, beeinflusst (CHRISTENSEN & GARDNER, 2000). Wenn lediglich imperfekte diagnostische Verfahren zur Verfügung stehen, erfordert das eine größere Zahl zu beprobender Tiere innerhalb einer Herde für eine Aussage auf Herdenebene und eine größere Zahl zu untersuchender Herden für eine Prävalenzschätzung in einer Region. Sofern die Spezifität in nennenswertem Ausmaß von 100 % abweicht, führt das dazu, dass allein deswegen auch in MAP-negativen Herden Tiere mit positiven Befund auftreten. Beispielsweise wäre bei 99 % Spezifität unter 100 untersuchten Tiere rechnerisch ein Tier fälschlicherweise MAP-positiv. Daher sind in Deutschland nur solche ELISA-Tests zugelassen, die eine Spezifität von mehr als 99 % aufweisen (FLI, 2012). Bei einer Krankheit mit einer niedrigen Prävalenz sind falsch positive Testresultate nicht von richtig positiven Ergebnissen zu unterscheiden. Beispielswei-

se würden bei einer Prävalenz von 3 % Tests mit einer Sensitivität von 30 % ebenso ein positives Tier unter 100 Tieren ermitteln. TAVORNPANICH et al. (2012) erstellten daher für verschiedene Prävalenzklassen Tabellen, aus denen das Risiko einer MAP-Infektion aus zwei Hauptkomponenten geschätzt werden kann: der Detektionswahrscheinlichkeit auf der Basis der Testergebnisse einer Stichprobe von Tieren und der maximalen Zahl der Tiere mit positivem Testergebnis oder der Kotprobenpools mit positivem Ergebnis der bakteriologischen Kultur. LAVERS et al. (2014) begegneten diesem Problem, indem sie nur solche Herden als MAP-positiv bewerteten, die ≥ 2 % testpositive Tiere aufwiesen. Herden mit einer Prävalenz von im Milch-ELISA positiven Tieren über 0 % und < 2 % hatten die gleiche Wahrscheinlichkeit, MAP-positiv oder MAP-negativ zu sein. Serologische Untersuchungen von Blut- oder Milchproben mit ELISA-Testsystemen auf MAP-Antikörper sind somit schwieriger (TAVORNPANICH et al., 2012) oder bisweilen gar nicht (LAVERS et al., 2014) interpretierbar.

Das Ergebnis der milchserologischen Untersuchung beim Einzeltier, ausgedrückt als relative optische Dichte (Proben/Positivkontrolle), wird von einer Reihe von tier- oder bestandspezifischen Faktoren beeinflusst: Milchleistung, Laktation, Herde, Proteinkonzentration der Milch, Gehalt an somatischen Zellen, Laktationsstand. Dabei kann eine hohe Milchmenge zumindest bei erstlaktierenden Kühen dazu führen, dass das Ergebnis von positiv zu negativ verändert wird. Die Gesamtmenge des über die Milch sezernierten Immunglobulins G ist relativ konstant, jedoch führt die Milch zu einer Verdünnung der MAP-spezifischen Antikörper unter die Nachweisgrenze (EISENBERG et al., 2015a). In einer Felduntersuchung in sächsischen Milchviehbeständen zeigte sich, dass in klinisch unauffälligen Herden die serologische Einzeltieruntersuchung auch bei Nutzung eines hochspezifischen ELISA-Testsystems wegen der fehlenden Sensitivität des Tests nur bedingt geeignet ist, die Prävalenz zu bestimmen (BÜTTNER, 2013). Die blutserologische Untersuchung erfordert zudem eine gesonderte Fixation der Tiere und manuellen Arbeitsaufwand. Trotz der bekannten Einflüsse auf das Testergebnis, der begrenzten Sensitivität und Spezifität und der daraus resultierenden Risiken einer Fehldiagnose wird die serologische Untersuchung einer Stichprobe von 30 zielgerichtet ausgewählten Tieren einer Herde gegenwärtig in dem privatwirtschaftlich organisierten Bekämpfungsprogramm im Vereinigten Königreich empfohlen und verwendet (ORPIN & SIBLEY, 2016).

Die Untersuchung gepoolter Kotproben in der Kotkultur mit anschließender Nachuntersuchung der Einzelproben aus MAP-positiven Pools eignet sich gut für eine Diagnostik auf Bestandsebene, da sie eine hohe Spezifität mitbringt, die aus der hochspezifischen kulturellen Untersuchung resultiert. Mit Untersuchung der Kotproben in Pools können Kosten gespart werden (VAN SCHAİK et al., 2003), jedoch bleibt, bedingt durch die Kultivierungsdauer und die erforderliche Nachuntersuchung MAP-positiver Pools, der Aufwand an Zeit und Arbeit etwa gleich. Die optimale Poolgröße liegt zwischen drei und fünf Proben. Durch das Poolen sinkt die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von Schwachausscheidern und damit die Sensitivität der Methode. Daher ist dieser diagnostische Ansatz für Herden der Größenordnung 100 bis 250 Kühe und mit niedriger Prävalenz nicht empfehlenswert (VAN SCHAİK et al., 2003). In der Untersuchung einer chilenischen Milchviehherde mit 300 Kühen war die Sensitivität auf Einzeltierebene deutlich reduziert, die Herdensensitivität sank jedoch nur geringfügig auf ~98 % (VAN SCHAİK et al., 2007). Als Alternative zur Kotkultur eignet sich die *real time* PCR zur Untersuchung gepoolter Kotproben und liefert schnell quantitative Ergebnisse, die gut mit der Koloniezahl auf dem HEYM-Kulturmedium korrelieren (ALY et al., 2010a).

Als Alternative zu dieser Vorgehensweise können aus der Stallumgebung der Tiere entnommene Kotproben (Umgebungskotproben) verwendet werden (ROSENBERGER et al., 1991; RAIZMAN et al., 2004; LOMBARD et al., 2006), weil diese Probennahme einfach und preiswert ist (TAVORNPANICH et al., 2008). Die Probennahme findet dabei bevorzugt in Bereichen mit hohem Kuhverkehr (PILLARS et al., 2009; WOLF et al., 2015b) und in Dung- und Güllelagerstätten (BERGHAUS et al., 2006; PILLARS et al., 2009; FERNÁNDEZ-SILVA et al., 2011) statt. Umgebungskotproben werden bevorzugt in den Stallbereichen entnommen, in denen die adulten Tiere gehalten werden, da im Kot älterer Tiere mit höherem MAP-Konzentrationen zu rechnen ist als im Kot von Jungtieren (WHITLOCK & BUERGELT, 1996). Die am häufigsten positiven Lokalisationen sind Triebwege, Vor- und Nachwartehefe und Güllelager (RAIZMAN et al., 2004; BERGHAUS et al., 2006; PILLARS et al., 2009; KHOL et al., 2009). Einige Protokolle enthalten auch Proben aus der Kalbebucht und der Krankenbucht. Das beruht auf der Annahme, dass während der Kalbung oder der Krankheit das Immunsystem belastet und damit wahrscheinlich die Erregerausscheidung erhöht ist (NIELSEN & TOFT, 2012). Allerdings war in bisherigen Studien in der

Kalbebuch und der Krankenbuch keine höhere Nachweisrate zu verzeichnen (LAVERS et al., 2013). Es zeigte sich jedoch, dass mit steigender Zahl der Einzelproben in einem Probenset die Genauigkeit der Methode zunimmt (WOLF et al., 2015b).

Bei der Untersuchung von Umgebungskotproben kommt es darauf an, dass von mehreren Stellen Kot manuell aufgenommen und in einem Probengefäß vermischt wird. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nicht Kot von einzelnen Haufen gesammelt wird, sondern die Entnahme dort stattfindet, wo technologisch bedingt der Kot mehrerer Kühe durchmischt ist (z. B. Tränkestellen, Wartehöfe oder Abwurschächte von Faltschiebern; BERGHAUS et al., 2006). Das Ziel besteht darin, Kot von möglichst vielen Kühen in die Probe zu integrieren. Dieses Ziel kann auch damit erreicht werden, dass für die Probennahme Sockentupfer verwendet werden. Diese wurden ursprünglich für die Probennahme in Geflügelbeständen zur Untersuchung auf *Salmonella spp.* entwickelt (SKOV et al., 1999). Der Probennehmer zieht sich dabei kommerziell erhältliche Sockentupfer aus absorbierendem Material über die mit Einmalstiefel geschützten Gummistiefel und geht damit über die Laufflächen für Kühe (Gruppenbuchten, Triebwege, Wartehöfe). Der Vorteil der Sockentupfer liegt darin, dass mit jedem einzelnen Schritt neues Material in die Probe einbezogen wird und so die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Kot der MAP-Ausscheider tatsächlich in der Probe wiedergefunden werden kann. Damit steigert sich die Sensitivität der Methode. Zudem ist die Probennahme weniger arbeitsaufwändig als die manuelle Kotentnahme im Stall und besser zu standardisieren (EISENBERG et al., 2013b).

Zur Untersuchung der Umgebungskotproben kommen die Kotkultur und der molekularbiologische Nachweis mittels PCR zur Anwendung. Meist genügen lediglich geringfügige Modifikationen, insbesondere wenn das Probenmaterial im Wesentlichen eine gemischte Kotprobe darstellt (WHITTINGTON, 2010) und nicht durch Beimengungen von beispielsweise Stroh oder Erde beeinträchtigt ist (WOLF et al., 2016a). Die in der qPCR gemessenen ct-Werte korrelieren auch bei Umgebungskotproben in hohem Maße mit der im HEYM-Festmedium ermittelten Koloniezahl (ALY et al., 2010a). Im Gegensatz zu Umgebungskotproben sind für Sockentupfer Wasch- und Aufbereitungsschritte notwendig, um das Kotmaterial vom Vlies des Sockentupfers zu trennen (EISENBERG et al., 2013b).

Zum Nachweis von MAP in Stallstaub können Vakuum-Impinger, elektrostatische Staubkollektoren oder Staubbücher verwendet werden (EISENBERG et al., 2010a; 2010b). Da sich der Staub am besten an solchen Stellen ansammelt, die oberhalb der Kühe liegen, kann er auch dort am besten gesammelt werden. Damit steht ein Probenmaterial zur Verfügung, in dem sich über mehrere Wochen MAP anreichern kann und es können Rückschlüsse gezogen werden, ob bereits Wochen vor der Probenahme MAP-Ausscheider im Bestand waren. Zum Nachweis von MAP aus Stallstaub muss dieser zunächst vom Staubbuch oder dem Staubkollektor abgewaschen und in einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt konzentriert werden (EISENBERG et al., 2010a). Wahrscheinlich eignet sich der direkte PCR-Nachweis, so wie er in den Studien von EISENBERG et al. (2010a; 2010b) verwendet wurde, für das Medium Stallstaub besser als die Kultivierung, da diese Methode nicht vom Vorhandensein vermehrungsfähiger MAP-Bakterien abhängig ist.

Für Milchviehbetriebe bietet sich als ein weiteres Medium für die Identifikation MAP-positiver Herden die Untersuchung von Tankmilch an. Hier können sowohl der Erreger als auch MAP-Antikörper nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Nachweis von MAP in Tankmilch deutlich weniger sensitiv ist als der MAP-Nachweis in Umgebungskotproben (HERTHNEK et al., 2008, ALAJMI et al., 2016). Auch der Nachweis von MAP-Antikörpern in der Tankmilch erwies sich als wenig geeignet für die Identifikation MAP-positiver Herden. In einer Studie in Rheinland-Pfalz waren 80 % der historisch MAP-positiven Herden mit negativem Ergebnis auf MAP-Antikörper in der Tankmilch getestet worden (GEUE et al., 2007). In einer niederländischen Studie wurde im Vergleich zur milchserologischen Einzeltieruntersuchung eine Herdensensitivität der ELISA-Untersuchung von Tankmilch von 24 % bei 99 % Spezifität ermittelt (EISENBERG et al., 2013a).

Unter Berücksichtigung dieser Untersuchungsergebnisse erscheint der direkte Erregernachweis aus Umgebungskotproben als eine Methode, die mit wenig Arbeitsaufwand und geringen Kosten einen ersten Eindruck über die Paratuberkulose-Situation in einer Rinderherde geben kann. Daher sollte deren Praxistauglichkeit und Sensitivität näher geprüft werden.

1.6 Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit

Auf Grund der spezifischen Pathogenese der Paratuberkulose mit der jahrelangen Inkubationszeit bis zum Auftreten erster klinischer Fälle muss die subklinische Krankheitsphase in die Betrachtung der Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit einbezogen werden. Es ist folglich zwischen den Schäden durch die klinischen Erkrankungen und den Auswirkungen der Infektion auf den Organismus in der subklinischen Krankheitsphase zu unterscheiden. Letztere sind weniger deutlich sichtbar und werden daher kontrovers diskutiert, zumal bisherige Studienergebnisse zu widersprüchlichen Ergebnissen führten.

Es wurde eingeschätzt, dass nur etwa 10 - 15 % der infizierten Tiere das Stadium der klinischen Erkrankung erreichen, weil sie oftmals vorher wegen schlechter Produktivität aus dem Bestand abgehen (ABBAS et al., 1983; WHITLOCK & BUERGELT, 1996; MCKENNA et al., 2006a). Daraus resultiert in größeren Milchviehherden eine Prävalenz von Tieren mit klinischen Symptomen, die für Paratuberkulose sprechen, von etwa 5 % (RAIZMAN et al., 2007a). Die vorzeitige Schlachtung dieser Tiere mit klinischen Symptomen ist ein wesentlicher Aspekt der wirtschaftlichen Auswirkungen der Paratuberkulose. Im Vergleich zu den Kühen, die ihre Laktation gesund beendeten, war deren Nutzungsdauer im Mittel um 200 Tage verkürzt (RAIZMAN et al., 2007a). BENEDEICTUS et al. (1987) schätzten einen Verlust von ca. 30 % des Schlachtwertes für klinisch kranke Kühe im Vergleich zu nicht erkrankten Schlachtkühen. Wirtschaftlich bedeutsam sind dabei nicht nur die verminderten Schachterlöse (WHITLOCK und BUERGELT, 1996), sondern auch die Bestandsergänzungskosten zur Remontierung dieser Tiere sowie der Aufwand an tierärztlicher Leistung, Medikamenten und zusätzlicher Pflegearbeit bei Versuchen, die erkrankten Tiere zu behandeln. In einigen Ländern sind klinisch kranke Tiere mit positivem MAP-Nachweis in einer Kotprobe nicht schlachtbar. Nach der österreichischen Paratuberkulose-Verordnung (ANONYMUS, 2006) sind diese Tiere binnen drei Werktagen der tierschutzgerechten Tötung zuzuführen bzw. das gesamte Fleisch dieses Tieres für untauglich zu erklären. Eine ähnliche Regelung gilt seit Anfang 2016 in der Schweiz (MEYLAN et al., 2016). Damit wird das klinisch erkrankte Tier, abgesehen von einer eventuellen pauschalen Entschädigung von 750 Euro, wie sie in Österreich für die auf amtliche Anordnung getöteten Tiere gezahlt wird, zum Totalverlust.

Da die klinischen Fälle meist nur einen kleinen Anteil der Tiere der Herde betreffen, werden diese von manchem Rinderhaltern nicht als bedeutsam eingestuft. Dagegen betreffen die bereits im subklinischen Stadium entstehenden Schäden einen höheren Anteil. Nach WHITLOCK und BUERGELT (1996) muss für jedes klinisch erkrankte mit etwa 25 weiteren infizierten Tieren gerechnet werden. Je nachdem wie weit die Krankheit fortgeschritten ist, zeigen Milchkühe im subklinischen Stadium der Paratuberkulose eine reduzierte Milchleistung und schlechtere Futterverwertung (GARCIA & SHALLOO, 2015). Das Schlachtgewicht ist bei den serologisch positiven Tieren um 10 % und bei den kulturell positiven um 15 % geringer; zusammen mit der Minderung der Schlachtkörperqualität führt das zu verminderten Schachtwerten von 17 % bzw. 31 % (KUDAHL & NIELSEN, 2009).

Die reduzierte Milchleistung leistet einen wesentlichen Beitrag zu den wirtschaftlichen Verlusten. Hierbei hängt die Reduktion der Milchleistung vom Stadium der subklinischen Infektion, dem in der bakteriologischen Diagnostik festgestellten Ausscheidungsniveau (RAIZMAN et al., 2007b; SMITH et al., 2009), von der Höhe der humoralen Immunantwort (VILLARINO et al., 2011; SORGE et al., 2011) sowie von der Laktationsnummer (BEAUDEAU et al., 2007; ALY et al., 2010b, SORGE et al., 2011) ab. Zudem sind die in Studien errechneten Unterschiede davon abhängig, welche diagnostische Untersuchungsmethode verwendet wurde (BEAUDEAU et al., 2007; GONDA et al., 2007). Wegen der Komplexität der Einflussfaktoren sind die Ergebnisse der Studien widersprüchlich: Während in den meisten Studien die testpositiven Tiere weniger Milch geben als die negativen Kontrolltiere (BEAUDEAU et al., 2007; ALY et al., 2010b), ergaben andere Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen (JOHNSON et al., 2001; PILLARS et al., 2011a) oder eine höhere Milchleistung bei serologisch positiven Tieren (MCNAB et al., 1991). Untersuchungen in zwei gut gemanagten Thüringer Hochleistungsherden hatten ebenfalls keine Unterschiede zwischen kulturell MAP-positiven Kühen und ihren negativen Stallgefährten gezeigt (STIER, 2008). Diese insgesamt heterogene Datenlage implizierte weiteren Forschungsbedarf bezüglich des Einflusses der Paratuberkulose auf die Milchleistung.

Ähnlich inkonsistent sind die Studienergebnisse zu Milchinhaltsstoffen und der somatischen Zellzahl. Während in den Studien von GONDA et al. (2007) und HENDRICK et al. (2005) eine signifikante Verminderung des Milchfett- und Milcheiweißgehalts

bei MAP-positiven Kühen (serologisch oder bakteriologisch) beschrieben ist, fanden andere Studien keine Unterschiede (NORDLUND et al., 1996).

In einer Reihe von Publikationen wird auf eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber anderen Krankheiten bei Paratuberkulose-infizierten Rindern verwiesen, gleichwohl ist die Datenlage dazu begrenzt (GARCIA & SHALLOO, 2015). In einer Studie in amerikanischen Milchviehherden konnte gezeigt werden, dass eine Pneumonie in derselben Laktation dazu führte, dass starkausscheidende Kühe erste klinische Anzeichen der Paratuberkulose zeigten. Außerdem wurde eine Verminderung der Gesamteiweißkonzentration im Serum nachgewiesen. Zusammenhänge zu einer Keto- se, Lahmheit, Festliegen, Nachgeburtverhalten, Metritis, zu subklinischer oder klinischer Mastitis zeigten sich jedoch nicht. Auch der Nachweis eines häufigeren Auftretens von klinischer oder subklinischer Ketose, gemessen als erhöhte Konzentration von Betahydroxybutyrat in Blutserum, konnte nicht gefunden werden (RAIZMAN et al., 2007a). Diese hätte vermutet werden können, weil die entzündlichen Veränderungen der Darmschleimhaut die Nährstoffresorption am Darm wahrscheinlich beeinträchtigen. Auch in Untersuchungen in sächsischen Milchviehbeständen erwies es sich als schwierig, bei Tieren mit positivem Nachweis von MAP-Antikörpern eine subklinische Ketose nachzuweisen. Gleichwohl konnte gezeigt werden, dass Kühe mit serologisch positivem Paratuberkulosebefund erhöhte Blutspiegel an freien flüchtigen Fettsäuren und erniedrigte Selen-Blutspiegel aufwiesen (SPREER, 2006).

Als Maßzahl für die subklinische Mastitis dient häufig die somatische Zellzahl, die ein Qualitätsmerkmal der Rohmilch darstellt und deshalb im Rahmen der Milchleistungsprüfung regelmäßig erhoben wird. In den meisten Studien wurde kein Zusammenhang zwischen den Untersuchungsergebnissen in Bezug auf Paratuberkulose und der somatischen Zellzahl gefunden (HENDRICK et al., 2005; RAIZMAN et al., 2007b; GONDA et al., 2007). Dagegen konnte ein Zusammenhang mit dem Nachweis von Antikörpern in zwei Studien festgestellt werden (BAPTISTA et al., 2008; MARTINS et al., 2016). Wahrscheinlich muss berücksichtigt werden, dass Antikörper erst in den späteren Krankheitsstadien nachgewiesen werden, in denen das Immunsystem eine höhere Grundaktivität aufweist.

Die Ergebnisse der Studien zum Einfluss der Paratuberkulose auf die Fruchtbarkeit sind divergierend (GARCIA & SHALLOO, 2015). Sie ergaben sowohl eine Verlänge-

zung der Zwischenkalbezeit für MAP-positive Milchkühe im Vergleich zu MAP-negativen Stallgefährten (JOHNSON-IFEARULUNDU et al., 2000; ANSARI-LARI et al., 2012), keinen Effekt (RAIZMAN et al., 2009) oder eine Verkürzung (LOMBARD et al., 2005). In ähnliche Richtung weisen die Ergebnisse von einer Studie in 1069 französischen Herden, die eine höhere Non-return Rate der im MAP-Antikörper-ELISA positiv getesteten Kühe im Vergleich zu Tieren mit negativem Testergebnis ergab. Der Effekt war für Besamungen in der ersten und zweiten Laktation signifikant, für spätere Besamungen nicht mehr. Es ist daher zu vermuten, dass der Effekt der MAP-Infektion auf die Fruchtbarkeit vom Krankheitsstadium abhängt (MARCÉ et al., 2009). In Untersuchungen in 16 Thüringer Rinderbeständen hatten die MAP-negativen Tiere eine um zwei Tage kürzere Zwischenkalbezeit als die MAP-positiv getesteten Stallgefährten. Dabei zeigte sich, dass dieses Ergebnis sowohl von der verwendeten Untersuchungsmethode als auch von einer signifikanten Interaktion zwischen Bestand und MAP-Status des Tieres abhängt. Betrachtet man die einzelnen Herden, so variierte der Effekt eines positiven Testergebnisses auf die Zwischenkalbezeit zwischen einer Verlängerung um 16 und einer Verkürzung um 31 Tage (KÜPPER et al., 2013).

Insgesamt gesehen sind Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Herdengesundheit erkennbar und nachvollziehbar, jedoch scheinen die herdenspezifischen Einflüsse beträchtlich zu sein. Wahrscheinlich sind sie der Grund dafür, dass Studien, die in wenigen Herden durchgeführt wurden, unterschiedliche Ergebnisse erlangen. Ein Ansatz kann darin bestehen, eine größere Anzahl von Herden in die Untersuchung einzubeziehen und weitere Merkmale zu erfassen. Da offensichtlich auch die Untersuchungsmethode einen Einfluss auf die Ergebnisse der Modelle hat, sind Untersuchungen von Interesse, die auf dem Erregernachweis mittels Kotkultur beruhen.

1.7 Einflussnahme bestandsbetreuender Tierärzte auf die Bekämpfung der Paratuberkulose im Rinderbestand

Wenn es gelingt, dass die in der Rinderpraxis tätigen Tierärzte die Paratuberkulose zu einem Teil des Tiergesundheitsmanagements in jeder betreuten Herde machen, so kann das einer der Hauptpunkte eines zukunftsweisenden Konzepts in der Bekämpfung dieser Erkrankung sein. Dies erlangt umso mehr an Bedeutung, als dass marktbasierenden Programmen, die in Zusammenarbeit mit der Milch- und Fleischindustrie von manchen Autoren eine größere Chance auf Wirksamkeit eingeräumt wird als staatlichen Programmen (COLLINS, 2016).

Ohne Zweifel hat der bestandsbetreuende Tierarzt eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten im Rinderbestand. Im Kontext von Paratuberkulose geht der vom praktizierenden Tierarzt zu leistende Beitrag beträchtlich über die in Kapitel 1.2 erörterten Aspekte hinaus, zumal die Paratuberkulose bisher in Deutschland keinerlei amtlicher Bekämpfung unterliegt und daher von Veterinärämtern im Regelfall nicht bearbeitet wird. Dabei hat der bestandsbetreuende Tierarzt in der Regel den Vorteil eines stabilen Vertrauensverhältnisses zwischen ihm und seinem landwirtschaftlichen Klienten. Seine Diagnose und seine Bewertung einer Situation genießt in den meisten Fällen Vertrauensvorschuss und sein tierärztlicher Rat hat gute Chancen, befolgt zu werden.

Eine klinische Symptomatik im Bestand, die auf Paratuberkulose hindeutet, kann der bestandsbetreuende Tierarzt als Erster wahrnehmen. Um diese labordiagnostisch zu untermauern, sollten dem Praktiker einfach durchzuführende und kostengünstige labordiagnostische Untersuchungen verfügbar sein. Dabei muss dieser in der Lage sein, aus den verfügbaren Möglichkeiten die geeigneten auszuwählen (Kapitel 1.5).

Im Rahmen der Bestandsbetreuung sollte der Tierarzt regelmäßig mit den Leistungskennzahlen des Bestandes befasst sein (z. B. Ergebnisse der Milchleistungsprüfung, Kennwerte der Herdenfruchtbarkeit u. a.). Er kann daher einschätzen, ob die Leistung der Herde durch die Paratuberkulose beeinträchtigt ist oder nicht. Er sollte daher eingehende Kenntnisse darüber besitzen, in welchem Umfang die in Kapitel 1.6 beschriebenen Leistungseinbußen durch Paratuberkulose verursacht oder zumindest verstärkt werden können und dies zur Bewertung der Situation in der Herde heran-

ziehen. Idealerweise kann er Auswirkungen der Paratuberkulose auf das wirtschaftliche Ergebnis der Milchviehhaltung vermitteln.

Als regelmäßiger Erbringer einer Dienstleistung ist der bestandsbetreuende Tierarzt häufig im Bestand tätig und kennt die betrieblichen Abläufe. Er ist damit wie kein anderer dafür prädestiniert, wirksame Maßnahmen zur Unterbrechung der Erregerübertragung von den ausscheidenden Kühen zu den empfänglichen Kälbern zu empfehlen. Hierfür existieren allgemeine Empfehlungslisten, beispielsweise in den Empfehlungen des Bundeslandwirtschaftsministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern (BMEL, 2014) oder dem Leitfaden „Biosicherheit in Rinderhaltungen“ (ANONYMUS, 2016b). Diese hier genannten Maßnahmen sind gerichtet auf die Einhaltung einer „besten fachlichen Praxis“ in verschiedenen Bereichen, die für die Übertragung des Erregers der Paratuberkulose als wesentlich erachtet werden. Diese Empfehlungen sind von hohem Wert für die Verbesserung der hygienischen Situation in Rinderhaltungen. Gleichwohl ist dieser Ansatz aus zwei Gründen problematisch. Erstens unterscheidet sich die Auffassung, was beste fachliche Praxis ist. Zweitens ist es schwierig, innerhalb einer solchen Liste zu priorisieren, also diejenigen Maßnahmen zu identifizieren, die den größten Effekt auf das zu lösende Problem haben, hier die Senkung der Übertragung von MAP auf empfängliche Tiere. Da für diese fäkal-orale Übertragung eine Reihe von Übertragungswegen in Frage kommt, ist die Liste entsprechend lang. Es kann zu der Empfehlung führen, „einfach alles“ zu verbessern. Das birgt die Gefahr, dass der Landwirt, der diese Empfehlungsliste umsetzen soll, sich überfordert fühlt, resigniert und sich dem Programm verweigert, oder aber sich die Maßnahmen herauspicks, die für ihn am leichtesten umzusetzen sind, ohne darauf zu achten, ob diese auch die wirksamsten sind (MORE & O'GRADY, 2016). Die Information, welchen Effekt eine Maßnahme auf den Bekämpfungserfolg wirklich hat, ist von zentraler Bedeutung für den praktizierenden Tierarzt, wenn er den Rinderhalter entsprechend beraten will. Daher sollten diese Fragen im Rahmen einer Kohortenstudie in einem longitudinalen Ansatz nachgegangen werden.

In der gegenwärtigen Diskussion um die Bekämpfung der Paratuberkulose wird von manchen daran Beteiligten in Frage gestellt, ob es möglich ist, in ursprünglich MAP-positiven Beständen die Infektion soweit zu kontrollieren, dass das Erreichen des Status „paratuberkulose-unverdächtig“ nach den Empfehlungen des BMEL (BMEL,

2014) möglich ist. Daher bestand die Aufgabe, anhand einer Verlaufsuntersuchung in den am Thüringer Bekämpfungsprogramm beteiligten Herden nachzuweisen, dass eine solche Erregerverdrängung möglich ist. Dieser Nachweis würde dem betreuenden Tierarzt die notwendige Sicherheit geben, gegenüber seinen Klienten die Empfehlung aussprechen, dieses Ziel der Paratuberkulosebekämpfung auf Herdenebene anzugehen und die langjährigen Sanierungsbemühungen auf sich zu nehmen.

1.8 Zielstellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den möglichen Beitrag des bestandsbetreuenden Tierarztes zu einer erfolgreichen Paratuberkulosebekämpfung auf Herdenebene herauszuarbeiten. Ein gut ausgebildeter Tierarzt ist am besten in der Lage, die Rinderhalter dabei begleitend zu beraten und deren Engagement auch künftig aufrechtzuerhalten. Für diese Aufgabe benötigt der Bestandsbetreuer Argumente, die den Landwirt überzeugen, dass seine Mühen in der Zukunft zu besserer Tiergesundheit und letztendlich einem besseren Betriebsergebnis führen. Dazu braucht der Tierarzt valide Informationen darüber, welche Maßnahmen im Bestand effektiv zur Senkung der Zahl neuer Fälle beitragen können und somit für den Landwirt effizient sind. Entscheidend sind ferner handhabbare diagnostische Werkzeuge, sowohl für den Einstieg in das Problem als auch dessen weitere Bearbeitung. Um die daraus resultierenden Befunde zu erkennen, braucht der Tierarzt fundiertes Wissen über Eigenschaften der diagnostischen Methoden und deren Interpretation. Es war Ziel dieser Arbeit, Argumente für die Beratungstätigkeit des Tierarztes herauszuarbeiten sowie diagnostische und bekämpfungsstrategische Ansätze aufzuzeigen. Dazu waren folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Welche einfachen Testverfahren erlauben dem Tierarzt eine erste Einschätzung, ob ein Rinderbestand von Paratuberkulose betroffen ist oder nicht, und wie sind diese Verfahren hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität auf Herdenebene einzuschätzen?
- Lassen sich Minderungen der Milchleistung durch Paratuberkulose im subklinischen Stadium nachweisen und Einflussfaktoren auf Herdenebene ermitteln?

- Führen die Paratuberkulose im subklinischen Stadium und die wahrscheinlich verminderte intestinale Nährstoffresorption zu metabolischen Störungen?
- Lassen sich unter den Hygienemaßnahmen zur Verminderung der Erregerübertragung im Bestand solche Maßnahmen identifizieren, die einen hohen Einfluss auf den Erfolg der Bekämpfung haben?
- Kann der Erreger der Paratuberkulose in einer Herde soweit zurückgedrängt werden, dass initial MAP-positive Herden den Status Paratuberkulose-unverdächtig erwerben können?

Die Beantwortung dieser Fragen soll es dem bestandsbetreuenden Tierarzt ermöglichen, die Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen zu initiieren und gemeinsam mit den Landwirten umsetzbare Wege und realistische Ziele zu entwickeln, um die Paratuberkulose auf Herdenebene zu bekämpfen.

2 Zusammenstellung der Publikationen

Für die Zusammenstellung der Publikationen wurde statt der chronologischen Reihenfolge die thematische Zusammengehörigkeit und die für die gemeinsame Diskussion der Ergebnisse notwendige Reihenfolge gewählt.

2.1 Die Anwendung von Umgebungskotproben zur Diagnostik der Paratuberkulose auf Bestandsebene

- 2.1.1 Donat K, Schau U, Soschinka A (2011): Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mit Hilfe von Umgebungskotproben. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 10–17 (Studie 1)

Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124,
360–367 (2011)
DOI 10.2376/0005-9366-124-360

© 2011 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

Eingegangen: 15.03.2011
Angenommen: 30.06.2011

Online first: 26.08.2011

[http://vetline.de/zeitschriften/bmtw/
open_access.htm](http://vetline.de/zeitschriften/bmtw/open_access.htm)

Zusammenfassung

Summary

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2011/12409-360 \$ 15.00/0

Thüringer Tierseuchenkasse, Jena

Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mithilfe von Umgebungskotproben

Identification of Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* infected dairy herds by environmental sampling

Karsten Donat, Ute Schau, Annela Soschinka

Ziel der Arbeit war es, in Rinderherden mit bekannter Einzeltierprävalenz (P) die Untersuchung von Umgebungskotproben auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) zur Einschätzung des Herdenstatus bezüglich Paratuberkulose in Abhängigkeit von P zu prüfen.

In 31 MAP-infizierten Milchviehherden mit Laufstallhaltung sowie in 15 nicht infizierten Herden wurde P durch jährlich wiederholte Gesamtbestandsuntersuchungen der Kühe in der Kotkultur ermittelt. Von den infizierten Herden hatten acht eine sehr niedrige (> 0–2 %), 14 eine niedrige (> 2–5 %), vier eine mittlere (> 5–10 %) und fünf eine hohe P (> 10 %). Im Mittel wurden neun Umgebungskotproben je Bestand aus dem Laufbereich der laktierenden Kühe, dem Melkbereich, dem Krankenbereich, dem Abkalbbereich und den Übergängen zum Kälberbereich entnommen. Die Kultivierung erfolgte über zwölf Wochen auf HEYM-Festmedium mit Speziesdifferenzierung durch Anzüchtung ohne Mycobactinzusatz oder PCR.

Alle nicht infizierten Bestände (100 %) wurden als negativ und 22 (71 %) der infizierten Bestände mittels Umgebungskotproben als positiv bewertet. In neun nicht detektierten infizierten Beständen lag P bei 0,04–4,04 %. Der Anteil positiver Umgebungskotproben war von P signifikant abhängig.

Am häufigsten wurde MAP in Proben aus dem Laufbereich (53,3 %) und dem Melkbereich (45,2 %) isoliert. In Beständen mit P > 5 % genügte die Untersuchung dieser Bereiche zur positiven Bestandsdiagnose, in niedrigprävalenten Beständen war die Beprobung weiterer Bereiche notwendig.

Mittels Umgebungskotproben können MAP-infizierte Milchviehherden mit P > 2 % mit einer Herdensensitivität von 87 % und mit vertretbarem Aufwand identifiziert werden. Das ermöglicht die Einschätzung des Herdenstatus von Rinderbeständen bezüglich Paratuberkulose und die effektive Durchführung einer Prävalenzstudie.

Schlüsselwörter: Paratuberkulose, Kotkultur, Umgebungskotproben, Herdensensitivität, Herdenprävalenz

In herds with known prevalence (P) use of environmental sampling (ES) to detect *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infected cattle herds was proofed in relation to P.

In 31 MAP-infected free stall dairy herds and 15 non-infected herds P was defined by annually repeated whole herd testing by fecal culture (34 877 individual samples). Eight infected herds had a very low (> 0–2%), 14 a low (> 2–5%), four a medium (> 5–10%), and five a high P (> 10%). A mean number of nine environmental samples per herd were collected from the floor of lactating cows, milking, calving and sick cow areas and the crossover to the calf area. After twelve weeks cultivation on HEYM-medium with and without mycobactin positive samples were further characterized by PCR.

All non-infected herds (100%) showed negative and 22 (71%) of the infected herds positive results in ES. Nine infected herds with negative ES results had a low P (0.04–4.04%). Proportion of positive ES depended on P and on sampling areas with 53.3 % positive results in lactating cow areas and 45.2% in milking areas. For P > 5%, ES in these two areas caused a positive herd status; herds with P < 5% required sampling in the other areas too.

The ES method has a herd sensitivity of 87% for dairy herds with $P > 2\%$ and provides an efficient tool to determine MAP infection status or herd prevalence.

Keywords: paratuberculosis, fecal culture, environmental sampling, herd sensitivity, herd prevalence

Einleitung

Die Paratuberkulose ist eine unheilbare, chronische und progressive Darmerkrankung der Wiederkäuer, die in betroffenen Rinderbeständen hohe wirtschaftliche Verluste verursacht. Sie wird durch den Erreger *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) verursacht und führt nach einer Phase der Latenz und einer langen subklinischen Erkrankungsphase zu wässrigen und unstillbaren Durchfällen und Ödembildung (Sweeney, 1996). Wirtschaftliche Verluste treten insbesondere wegen des Rückgangs der Milchleistung durch die verminderte Nährstoffresorption und wegen der Erhöhung des Abgangsrisikos auf (Tiwari et al., 2006). Ein zoonotisches Potenzial der Infektion mit MAP wird diskutiert, da eine Beteiligung von MAP an der Erkrankung Morbus Crohn des Menschen nicht sicher ausgeschlossen werden kann (Feller et al., 2007; Uzoigwe et al., 2007).

Die Erregeraufnahme erfolgt im Jungtieralter oral durch direkte Aufnahme von erregerhaltigem Kot aus der Umgebung der Tiere bzw. über kontaminierte Milch, Futter und Wasser oder durch transplazentare Übertragung. Die Inkubationszeit bis zum Auftreten erster klinischer Symptome kann mehrere Jahre dauern, wobei auch lange Inkubationszeiten von acht bis zehn Jahren keine Seltenheit sind (Gierke und Köhler, 2009). Besonders während der subklinischen Erkrankungsphase, in der infizierte und klinisch unauffällige Tiere den Erreger mit dem Kot freisetzen, erfolgt häufig eine unbemerkte Verbreitung und Anreicherung des Erregers in der Umgebung der Tiere (Köhler et al., 2003).

MAP hat eine hohe Tenazität in der Stallumwelt und ist in Rindergülle bei 5 °C über neun Monate und bei 15 °C über dreieinhalb Monate überlebensfähig (Jørgensen, 1977), im Flüssigmist mindestens 56 Tage (Gierke und Köhler, 2009). Die Ausscheidung geringer Erregermengen durch Rinder im subklinischen Krankheitsstadium spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Tier zu Tier (Tiwari et al., 2006). Ein Erregernachweis im Kot gelingt erst bei Rindern im Alter von zweieinhalb bis fünfeinhalb Jahren mit hoher Wahrscheinlichkeit (Nielsen und Ersbøll, 2006). Die Aussagefähigkeit des Antikörpernachweises zur Diagnose der Paratuberkulose auf Einzeltierebene ist fraglich (Köhler et al., 2008a).

Zur Beurteilung des Infektionsgeschehens ist die wiederholte Untersuchung des Gesamtbestandes mit der kulturellen Kotuntersuchung geeignet (Wells et al., 2002; Crossley et al., 2005; Gierke und Köhler, 2009), zudem existieren weltweit zahlreiche molekularbiologische Methoden zum Nachweis von MAP mit Primern für verschiedene Zielregionen, beispielsweise IS 900, f57 und locus 255, die in Proben mit hoher Bakterienlast eine gute Sensitivität zeigen, welche jedoch in Proben mit geringerer Bakterienzahl abnimmt (Möbius et al., 2008).

Die Paratuberkulose ist weltweit verbreitet. In Deutschland ist sie meldepflichtig. Es wird jedoch nur ein kleiner Teil der Infektionen erkannt und über das amtliche

Tierseuchen-Nachrichten-System (TSN) gemeldet. Das entspricht möglicherweise nicht der realen Verbreitung (Köhler et al., 2003). Detailliertere Daten zu Verbreitung der Erkrankung wurden von den Bundesländern veröffentlicht, die freiwillige Bekämpfungsprogramme durchführen (Luyven et al., 2002; Böttcher und Gangl, 2004; Hacker et al., 2004; Donat et al. 2005). Ein Vergleich dieser Ergebnisse ist jedoch nur sehr bedingt möglich, da die Daten mit unterschiedlichen diagnostischen Verfahren ermittelt wurden (Köhler et al., 2005). Eine Prävalenzschätzung für Deutschland auf einheitlicher methodischer Grundlage fehlt bisher.

Unabhängig von der Feststellung des Infektionsstatus für die einzelnen Tiere eines Bestandes sollte durch eine einfache und kostengünstige Screeningmethode geprüft werden können, ob die Herde in einem solchen Umfang mit MAP infiziert ist, dass die Etablierung von Maßnahmen gegen die Paratuberkulose einen Nutzen für den Betrieb verspricht. Dazu gibt es verschiedene methodische Ansätze.

Serologische Untersuchungen zum Nachweis von MAP-Antikörpern in Einzelblutproben, Einzelmilchproben oder Tankmilchproben können, obwohl kostengünstig, kleinere Herden mit niedriger Prävalenz nicht zuverlässig detektieren (Wells et al., 2002). Mit den verfügbaren Tests (Testsensitivität ca. 50 %, Testspezifität ca. 99 %) lassen sich durch Untersuchung einer Stichprobe von ca. 30 Tieren lediglich Herden mit ≥ 50 Tieren und einer Prävalenz von $\geq 5\%$ mit einer Herdensensitivität von 70 % und einer ebenso großen Herdenspezifität identifizieren (Humphrey et al., 2004). Ein weiterer Nachteil der serologischen Untersuchungen ist, dass in großen Herden bei Tests mit einer Spezifität unter 100 % die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Ergebnissen steigt, da Infektionen mit anderen Mykobakterien, Nocardien oder Corynebakterien in Abhängigkeit vom Testsystem zu Kreuzreaktionen mit dem MAP-Antigen führen können. In Testsystemen, die eine Vorabsorption mit einem Extrakt von *Mycobacterium phlei* vorsehen, sind diese reduziert (Yokomizo et al., 1985; Köhler et al., 2008b).

Eine gute Alternative, insbesondere für Laufstallhaltungen, stellt die kulturelle Untersuchung von Kot aus der Stallumgebung der Tiere dar. Bei dieser Methode nutzt man die hohe Tenazität des Erregers im Stall und im Flüssigmist. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine sichere Erkennung von hochprävalenten Herden mithilfe von Umgebungskotproben möglich (Raizman et al., 2004; Lombard et al., 2006; Berghaus et al., 2006) und von der Einzeltierprävalenz abhängig ist (Pillars et al., 2009). In den bisherigen Studien wurden die einbezogenen Herden lediglich durch Stichprobenuntersuchungen oder ELISA-Untersuchungen charakterisiert (Raizman et al., 2004; Lombard et al., 2006; Berghaus et al., 2006). Die Ergebnisse von Pillars et al. (2009) basieren auf der Untersuchung von lediglich sieben Herden. Zudem stammen die bisher zur dieser Problematik vorliegenden Publikationen aus nordamerikanischen Milchviehherden. Deren Ergeb-

TABELLE 1: Lokalisationen der Umgebungskotprobenentnahmen im Rinderbestand und Anzahl der jeweils beprobten Bestände

	Lokalisation	beprobte Bestände	Bereich	beprobte Bestände
1	Vorwarte Hof	44	Melkbereich	46
2	Melkstandzutrieb	43		
3	Gruppe der Frischabkalber	35	Laufbereich	45
4	Gruppe der hochlaktierenden Kühe	45		
5	Krankenabteil, Krankengruppe, Krankreihe	31	Krankbereich	31
6	Abkalbeabteil, -reihe, Abkalbestall	44	Abkalbebereich	44
7	Übergänge zum Kälberbereich	36	Übergänge Kälberbereich	36
8	Futtertische, Stallarbeitsmaschinen	16	Sonstige Bereiche	16

nisse sind wegen den durch die VO (EG) 853/2004 geregelten strengeren Hygieneanforderungen an Milch produzierende Betriebe in Europa und demzufolge abweichenden Haltungsbedingungen nicht ohne Weiteres auf deutsche Milchviehherden übertragbar.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher, anhand einer größeren Zahl von Herden, in denen die Einzeltierprävalenz durch wiederholte jährliche Untersuchungen der Kühe eines Bestandes in der Kotkultur ermittelt wurde, die Methode der Untersuchung von Umgebungskotproben unter den Haltungsbedingungen größerer Milchviehherden mit Laufstallhaltung in Deutschland zu prüfen.

Material und Methoden

Betriebs- und Herdenauswahl

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 46 Betriebe einbezogen, die am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ teilnahmen. Im Rahmen dieses Programmes wurden zur Feststellung des Bestandsstatus und zur Identifizierung von mit MAP infizierten Tieren jährlich von allen Kühen der Milchviehherde individuelle Kotproben entnommen und auf das Vorhandensein von MAP untersucht. Von diesen Betrieben mit einer mittleren Bestandsgröße (Mittelwert) von 446 Rindern im Alter über 24 Monate (Minimum: 116, Maximum: 2249) und insgesamt 26 461 Rindern im Alter von über 24 Monaten wurden im zweijährigen Referenzzeitraum vom 16. September 2008 bis 27. September 2010 insgesamt 34 877 Einzeltierkotproben entnommen, deren Untersuchung im Zeitraum vom 1. Januar 2009 bis zum 31. Dezember 2010 abgeschlossen wurde. Die Probenentnahme erfolgte in der Regel durch den bestandsbetreuenden Tierarzt, entweder geschlossen als Bestandsuntersuchung oder fraktioniert in Verbindung mit bestimmten tierärztlichen Tätigkeiten, wie beispielsweise Trächtigkeitsuntersuchungen oder Puerperalkontrollen, im Mittel in 20 Fraktionen (Minimum: zwei, Maximum: 113). Einmal positiv beurteilte Tiere wurden im zweiten Jahr nicht erneut untersucht.

Als „infiziert“ wurde eine Herde definiert, in der von allen untersuchten Einzeltierkotproben in mindestens einer Probe ein kulturelles Wachstum von MAP nach-

gewiesen werden konnte. Sofern in der Herde innerhalb des Untersuchungszeitraumes keines der Tiere ein positives Ergebnis aufwies, wurde diese als „nicht infiziert“ klassifiziert. Auf der Basis dieser zweijährigen Einzeltieruntersuchungen wurden 31 Bestände als infiziert und 15 Bestände als nicht infiziert eingestuft und zur Untersuchung von Umgebungskotproben ausgewählt. Sofern einzelne Betriebe auf mehreren Standorten Rinderbestände hielten, wurden diese wegen der umfangreichen innerbetrieblichen Tierbewegungen als ein Bestand betrachtet. Die an der Studie beteiligten Bestände repräsentieren typische Milchviehhaltungen in den ostdeutschen Bundesländern, die von größeren Agrarunternehmen, zumeist Agrargenossenschaften, betrieben und von Angestellten bewirtschaftet werden. Alle beteiligten Betriebe hielten ihre Tiere in Laufställen.

Probennahme

Einzeltierkotproben

Die Einzeltierkotproben wurden mit einem jeweils neuen Untersuchungshandschuh rektal entnommen und in ein steriles Plastikgefäß abgestreift, das vom Labor zur Verfügung gestellt wurde und mit einem Barcode versehen war. Zur Erfassung der Tierkennzeichnung diente ein EDV-lesbares Formular zur Eintragung der zehnstelligen Ohrmarkennummer der Kuh neben der aufzuklebenden Barcode-Doublette. Das Gefäß wurde dicht verschlossen und mithilfe eines täglich verkehrenden Kuriersystems in das Labor der Thüringer Tierseuchenkasse transportiert. Die Lagerung bis zur Untersuchung erfolgte bei -20 °C .

Umgebungskotproben

Die Entnahme der Umgebungskotproben wurde von den Tierärzten des Thüringer Tiergesundheitsdienstes im Rahmen von Besuchen im Laufe des Jahres 2010 vorgenommen. Die Probenentnahme erfolgte nach einem einheitlichen Schema an acht bis zehn stark von Rindern frequentierten Lokalisationen im Bestand, in drei Herden, wovon zwei zu den nicht infizierten Beständen und einer zu den Beständen mit mittlerer Prävalenz gehörte ($P = 7,3\%$), wurden nur sechs Proben entnommen. Die wichtigsten Lokalisationen waren der Zu- und Abtrieb zum Melkstand, der Laufbereich der laktierenden Kühe, der Krankbereich, der Abkalbebereich und der Übergang zum Kälberbereich. In einigen Betrieben wurde Kot an weiteren Punkten, wie Stallarbeitsmaschinen oder Futtertischen entnommen. Die Zusammenfassung der einzelnen Lokalisationen zu Bereichen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die Proben wurden manuell unter Verwendung eines neuen Latex-Schutzhandschuhs bzw. unter Zuhilfenahme eines desinfizierten Spachtels entnommen und jeweils in sterile, verschließbare Plastikgefäße abge-

TABELLE 2: Zuordnung der untersuchten Herden zu den Prävalenzklassen

Prävalenzklasse	Einzeltier-Prävalenz (%)	Herdenanzahl (n)
Nicht infiziert	0	15
Sehr niedrige Prävalenz	> 0–2	8
Niedrige Prävalenz	> 2–5	14
Mittlere Prävalenz	> 5–10	4
Hohe Prävalenz	> 10	5
Summe		46

streift. Nach dem direkten Transport in das Labor der Thüringer Tierseuchenkasse erfolgte die Lagerung bis zur Untersuchung bei –20 °C.

Bakteriologische Kultur

Die kulturelle Untersuchung sowohl der Einzeltier- als auch der Umgebungskotproben erfolgte in Anlehnung an die in der amtlichen Methodensammlung des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI), Stand April 2010, veröffentlichte Methode des kulturellen Nachweises (FLI, 2010), eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Gierke (2009).

Zunächst wurden 3 g Kot entnommen und zur Dekontamination mit 30 ml 0,75%iger Hexadecylpyridiniumchlorid-Lösung (Fa. Acros Organics, bezogen über Fisher Scientific GmbH, D) vermischt. Nach einer Sedimentation der groben Bestandteile über 5 min wurden 20 ml des Überstandes abgenommen, 30 min bei 200 U/min geschüttelt und anschließend für 24–48 Stunden abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und 0,2 ml des Sediments auf kommerziell erhältliche Nährböden mit Herrod’s Egg Yolk Medium (HEYM) mit Mycobactin sowie Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin (ANV) (Fa. Becton Dickinson GmbH, D) überimpft. Zur zusätzlichen Unterdrückung unerwünschter Begleitflora wurden weitere 0,04 ml ANV (eigene Herstellung) über die beimpfte Nährbodenoberfläche geschwenkt. Die Inkubation der halboffenen Nährbodenröhrchen fand zunächst für sieben Tage bei 37 °C im Dunkeln unter aeroben Bedingungen in leichter Schräglage der Röhrchen statt, sodass sich die Nährbodenoberfläche in der Horizontalen befand. Anschließend wurden sie dicht verschlossen, senkrecht aufgestellt und für weitere elf Wochen – wie oben beschrieben – inkubiert. Das Ablesen der Kulturen erfolgte makroskopisch und unter dem Stereomikroskop. Die Kulturen wurden ab der fünften Bebrütungswoche im zweiwöchigen Abstand makroskopisch beurteilt. Die Differenzierung verdächtiger Kolonien erfolgte mittels Ziehl-Neelsen-Färbung sowie Subkultur (Prüfung des mycobactin-abhängigen Wachstums) oder einer IS900-PCR nach Englund et al. (1999). Zur qualitativen Erfassung der Befunde diente die Laborsoftware der Fa. Agro Data GmbH, Cottbus, D. Eine Barcode-Etikettierung aller Probenröhrchen und der Kulturröhrchen gewährleistete die sichere Zuordnung der Ergebnisse.

Statistische Analyse

Die Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde wurde als Anteil der Tiere mit Nachweis von MAP in der Kotkultur im Verhältnis zur Zahl der untersuchten Tiere im Untersuchungszeitraum von 24 Monaten ermittelt. Der Anteil positiver Umgebungskotproben

wurde auf der Basis der einzelnen Proben errechnet, nicht auswertbare Proben wurden nicht gewertet. Bei ein- oder mehrfachem Nachweis an derselben Lokalisation gemäß Tabelle 1 wurde nur ein positiver Nachweis gewertet.

Die Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde und dem Anteil positiver Umgebungskotproben pro Bestand erfolgte durch Berechnung des nichtparametrischen Korrelationskoeffizienten nach Spearman. Zur Beschreibung des Zusammenhangs diente ein lineares Regressionsmodell. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,01$ festgelegt. Zur Berechnung wurde die Statistiksoftware SPSS 11.5 für Windows (Fa. SPSS Inc., USA) genutzt.

Ergebnisse

Einzeltierkotproben

Im Rahmen dieser Studie wurden in 46 Thüringer Milchviehherden über einen Zeitraum von zwei Jahren insgesamt 34 877 Proben kulturell untersucht, von denen 1111 Tiere (3,19 %) ein positives Ergebnis aufwiesen, 1396 Proben (3,9 %) waren nicht auswertbar. Es konnten 15 nicht infizierte Herden identifiziert werden (Tab. 2). Nach Feststellung der Einzeltierprävalenzen, die zwischen 0,04 % und 22,96 % lagen, wurden die Herden vier verschiedenen Klassen zugeordnet (Tab. 2). Acht Herden wurden in die Gruppe mit sehr niedriger Prävalenz (> 0–2 %), 14 in die Gruppe mit niedriger Prävalenz (> 2–5 %), vier in die mit mittlerer (> 5–10 %) und fünf in die Klasse mit hoher Prävalenz (> 10 %) eingeordnet.

TABELLE 3: Ergebnisse der Untersuchung von Einzelkotproben und von Umgebungskotproben in den Beständen mit sehr niedriger und niedriger Prävalenz im gesamten Bestand und in den einzelnen Bereichen (Mk. Melkbereich, Lf. Laufbereich, Kr. Krankbereich, Ka. Abkalbbereich, ÜK Übergang zum Kälberbereich, So. Sonstige Bereiche, pos. positiv, neg. negativ, n. a. nicht auswertbar, n Anzahl, k. P. keine Probe)

Gesamtbestand				Umgebungskotproben						Einzeltierkotproben		
n	pos. (n)	neg. (n)	n. a. (n)	nach Bereichen						n	pos. (n)	pos. (%)
				Mk. (n)	Lf. (n)	Kr. (n)	Ka. (n)	ÜK (n)	So. (n)			
Herden mit sehr niedriger Prävalenz (n = 8)												
10	0	10	0	0	0	0	0	k. P.	0	2341	1	0,0
8	0	8	0	0	0	0	0	0	k. P.	1257	6	0,5
8	0	8	0	0	0	k. P.	0	0	0	335	2	0,6
11	1	10	0	0	0	1	0	0	0	1743	13	0,7
9	1	8	0	0	1	0	0	0	0	521	5	1,0
10	0	9	1	0	0	0	0	0	k. P.	409	4	1,0
9	0	9	0	0	0	0	0	0	k. P.	508	8	1,6
10	0	10	0	0	0	k. P.	0	0	0	410	7	1,7
Herden mit niedriger Prävalenz (n = 14)												
10	3	7	0	0	3	k. P.	0	0	k. P.	549	13	2,4
9	3	6	0	2	1	k. P.	k. P.	0	k. P.	122	3	2,5
9	2	7	0	1	0	k. P.	1	k. P.	k. P.	1069	31	2,9
10	5	5	0	2	3	0	0	0	k. P.	927	27	2,9
10	0	10	0	0	0	k. P.	0	0	k. P.	1413	46	3,3
10	3	7	0	3	0	0	0	0	k. P.	459	16	3,5
10	8	2	0	2	2	1	1	1	k. P.	1604	56	3,5
9	1	8	0	0	1	0	0	0	k. P.	334	12	3,6
8	1	7	0	0	0	0	0	1	k. P.	606	23	3,8
10	0	9	1	0	0	0	0	0	0	869	33	3,8
10	0	10	0	0	0	0	0	0	k. P.	223	9	4,0
9	1	8	0	0	1	0	0	k. P.	k. P.	1019	43	4,2
9	6	3	0	2	2	1	0	1	0	1973	89	4,5
10	6	4	0	2	2	0	0	2	k. P.	1253	61	4,9

TABELLE 4: Anzahl (n) und Anteil (%) als positiv erkannter infizierter Herden jeder Prävalenzklasse bei unterschiedlicher Auswahl beprobter Bereiche

Prävalenzklasse	Einzeltierprävalenz							
	> 0–2 %		> 2–5 %		> 5–10 %		> 10 %	
Anzahl Herden	8		14		4		5	
Auswahl beprobter Bereiche	n	%	n	%	n	%	n	%
Lauf-, Melk-, Kranken- und Kälberbereich	2	25	11	78,6	4	100	5	100
Lauf-, Melk- und Krankenbereich	2	25	10	71,4	4	100	5	100
Lauf-, Melk- und Kälberbereich	1	12,5	11	78,6	4	100	5	100
Lauf-, Melk- und Abkalbereich	1	12,5	10	71,4	4	100	5	100
Lauf- und Melkbereich	1	12,5	10	71,4	4	100	5	100

Umgebungskotproben

Insgesamt wurden 419 Umgebungskotproben aus 46 Herden untersucht. 77 Umgebungskotproben (18,5 %) wiesen ein positives Kulturergebnis auf und 340 (81,5 %) ein negatives. Zwei Proben (0,5 %) waren nicht auswertbar.

Keiner der als nicht infiziert klassifizierten Bestände, hatte ein positives Ergebnis in den Umgebungskotproben. Von acht Herden mit sehr niedriger Prävalenz waren sechs Herden mit Umgebungskotproben als negativ und zwei als positiv eingestuft worden. Von den 14 Herden mit niedriger Prävalenz hatten drei Herden in der Untersuchung von Umgebungskotproben ein negatives und die übrigen elf ein positives Ergebnis (Tab. 3).

Von den 31 infizierten Beständen konnten insgesamt 22 (71 %) in der Untersuchung der Umgebungskotproben als positiv erfasst werden. Dieses Ergebnis wurde auch dann erreicht, wenn nur die Lauf-, Melk- und Krankenbereiche sowie die Übergänge zum Kälberbereich in die Betrachtung einbezogen wurden. Bei weiterer Reduktion der beprobten Bereiche wären ein oder zwei Bestände mit niedriger Prävalenz nicht als positiv bewertet worden, was einen Sensitivitätsverlust der Methode zur Folge gehabt hätte. Jedoch war festzustellen, dass allein die Beprobung von Melk- und Laufbereich immer noch zur Erkennung von 64,5 % der infizierten Bestände geführt hätte. Der Anteil richtig identifizierter Bestände je Prävalenzklasse bei unterschiedlicher Auswahl der Bereiche ist in Tabelle 4 dargestellt. Falsch negativ wurden insgesamt neun Bestände beurteilt (Tab. 5).

Am häufigsten konnten positive Proben im Laufbereich laktierender Kühe (53,3 %), im Melkbereich (45,2 %) und im Übergang zum Kälberbereich (30,8 %) gewonnen werden. Die Nachweisraten von MAP in den einzelnen Bereichen sind in Tabelle 6 aufgeführt. In den Herden mit sehr niedriger und niedriger Prävalenz konnten entsprechend 40,9 %, 31,8 % und 21,0 % positive Kulturergebnisse festgestellt werden. Betrachtet man die neun Herden, die den Prävalenzklassen „mittel“ und „hoch“ zugeordnet werden können, erhält man 87,5 % positive Umgebungskotproben im Laufbereich der Kühe, 77,8 % im Melkbereich und 57,1 % im Übergang zum Kälberbereich.

Die Proben aus „Sonstigen Bereichen“ umfassten Probenahmen an Orten, mit denen die Tiere nicht unmittelbar in Berührung kamen, wie z.B. Futtertische oder Stallarbeits-

maschinen. In den dort gewonnenen Proben konnte MAP nicht nachgewiesen werden.

Zwischen der errechneten Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde und dem Anteil positiver Umgebungskotproben an der Gesamtanzahl genommener Umgebungskotproben pro Bestand konnte eine hohe Korrelation ($r = 0,783$; $p < 0,01$) festgestellt werden. Der Zusammenhang wird durch folgende Regressionsgleichung (lineares Regressionsmodell) beschrieben (Abb. 1):

$$\text{Anteil}_{UP} = 3,47 \times \text{Anteil}_{EP} + 0,06$$

(UP: Umgebungskotproben, EP: Einzeltierkotproben innerhalb der Herde)

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung ist die erste im europäischen Raum durchgeführte Studie zur Identifizierung MAP-infizierter Milchviehherden mithilfe von Umgebungskotproben, in der die Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde bezüglich einer Infektion mit MAP durch wiederholte kulturelle Gesamtbestandsuntersuchungen der Milchkühe ermittelt worden war. In den meisten der bisherigen Untersuchungen, waren die Herden lediglich aufgrund der Untersuchung von Stichproben (Lombard et al., 2006) oder gepoolten Kotproben (Berghaus et al., 2006) charakterisiert worden. Von den 31 infizierten Beständen wurden 22 (71 %) durch die Untersuchung von Umgebungskotproben als positiv erkannt. Dagegen fand sich in den 15 als nicht infiziert eingestuft Beständen in keiner der Umgebungskotproben ein positiver Nachweis von MAP. Das Ergebnis bezüglich der infizierten Herden stimmt mit dem von Lombard et al. (2006) überein, die aus 50 mittels Stichproben auf Basis der individuellen Kotkultur als positiv eingestuften Herden 38 Herden (76 %) mittels Umgebungskotproben detektierten. Eine ähnliche Detektionsrate von 70 % erzielten Berghaus et al. (2006) im Vergleich zu einer mit gepoolten Kotproben vorgenommen Bestandseinstufung. In unserer Untersuchung sind alle Herden mit einer Einzeltierprävalenz über 5 % sicher erkannt worden, jede durch mindestens drei positive Umgebungskotproben, was mit den Ergebnissen von Raizman et al. (2004) übereinstimmt. Von den 23 positiven Herden mit einer Einzeltierprävalenz über 2 % waren hier 20 erkannt worden. Daraus würde sich eine Herdensensitivität von 87 % errechnen, sofern die Zielstellung darin besteht,

TABELLE 5: Positiver Anteil der Einzeltierkotproben (EP) in infizierten Herden mit negativem Ergebnis in der Untersuchung der Umgebungskotproben (UP)

Herde	Anzahl UP (n)	UP negativ (n)	UP nicht auswertbar (n)	Ø Herdengröße 2009–2010 (n)	Anzahl EP (n)	Anzahl EP positiv (n)	EP positiv (%)
A	10	10	0	1177	2341	1	0,04
B	8	8	0	771	1257	6	0,48
C	10	9	1	504	869	33	3,80
D	8	8	0	168	335	2	0,60
E	10	9	1	265	409	4	0,98
F	9	9	0	288	508	8	1,57
G	10	10	0	199	410	7	1,71
H	10	10	0	773	1413	46	3,26
I	10	10	0	182	223	9	4,04

TABELLE 6: Anzahl (n) und Anteil (%) der mit positivem (pos.) und negativem (neg.) Ergebnis beprobten Bereiche in infizierten Beständen mit unterschiedlicher Prävalenz

Lokalisation	beprobte Herden (n)	pos. (n)	pos. (%)	neg. (n)	neg. (%)
Gesamtanzahl infizierter Herden					
Laufbereich	30	16	53,3	14	46,7
Melkbereich	31	14	45,2	17	54,8
Übergang Kälberbereich	26	8	30,8	18	69,2
Krankbereich	23	4	17,4	19	82,6
Abkalbbereich	30	5	16,7	25	83,3
Sonstige	9	0	0,0	9	100,0
Herden mit sehr niedriger und niedriger Prävalenz					
Laufbereich	22	9	40,9	13	59,1
Melkbereich	22	7	31,8	15	68,2
Übergang Kälberbereich	19	4	21,0	15	79,0
Krankbereich	16	3	18,8	13	81,3
Abkalbbereich	21	2	9,5	19	90,5
Sonstige	7	0	0,0	7	100,0
Herden mit mittlerer und hoher Prävalenz					
Laufbereich	8	7	87,5	1	12,5
Melkbereich	9	7	77,8	2	22,2
Übergang Kälberbereich	7	4	57,1	3	42,9
Krankbereich	7	1	14,3	6	85,7
Abkalbbereich	9	3	33,3	6	66,7
Sonstige	2	0	0,0	2	100,0

Herden mit einer Prävalenz über 2 % zu identifizieren. Auch Pillars et al. (2009) konnten bei Einzeltierprävalenzen über 2 % in 75 % der Fälle MAP aus Umgebungskotproben isolieren.

Die Erkennung der Herden mit sehr niedriger Einzeltierprävalenz (< 2 %) mithilfe von Umgebungskotproben ist mit der hier verwendeten Methodik nicht mit ausreichender Sicherheit möglich.

Der Anteil positiver Umgebungskotproben je Bestand ist von der Einzeltierprävalenz in der Herde anhängig, es besteht eine hohe und signifikante Korrelation ($r = 0,783$; $p \leq 0,01$), die auch Pillars et al. (2009) nachweisen konnten.

Wir haben in dieser Studie unterschiedliche Stallbereiche beprobt, um einschätzen zu können, in welchem Stallbereich die Wahrscheinlichkeit für positive MAP-Nachweise in Umgebungskotproben am höchsten ist. Im Laufbereich gelang der Nachweis in 53,3 % der hier entnommenen Proben, im Melkbereich in 45,2 % (Tab. 6). Das steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lombard et al. (2006), die an den Melkstandausgängen 52,3 % positive Proben sowie ähnliche Nachweisraten auf den Laufgängen (48,8 %) und in den Haltungsgruppen (49,1 %) fanden. Auch bei Pillars et al. (2009) lag der positive Anteil der Proben vom Boden der Gruppen der laktierenden Kühe bei 44,4 %. Das ist allein dadurch zu erklären, dass diese Bereiche von den meisten Kühen der Herde täglich frequentiert werden. Das Ergebnis der Beprobung des Laufbereichs der Kühe war bei Pillars et al. (2009) nicht von der Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde abhängig, da auch in den Beständen mit geringer Einzeltierprävalenz der MAP-Nachweis in diesem Bereich positiv war. Der Laufbereich und der Melkbereich der laktierenden Kühe sind somit die geeignetsten Orte der Probennahme.

An den Übergängen zum Kälberbereich (30,8 %), im Abkalbbereich (16,7 %) und im Krankbereich (17,4 %) haben wir deutlich weniger positive Proben gefunden. Diese Bereiche hatten auch bei Pillars et al. (2009) deutlich geringere Nachweisraten.

Probenahmen an weiteren Punkten, wie Stallmaschinen oder Futterwegen, sind weniger geeignet, diese führten hier niemals zu positiven Nachweisen.

In den amerikanischen Untersuchungen (Lombard et al., 2006; Pillars et al., 2009) erwies sich das primäre Dunglager (Güllebehälter oder Festmistlager) häufig als MAP-positiv und wäre demnach als ein geeigneter Ort der Probennahme anzusehen. Da eine Probennahme in Güllebehältern wegen der schwierigen Zugänglichkeit und der potenziellen Gefahr für den Probennehmer in den von uns untersuchten Herden nicht praktikabel gewesen wäre, wurde in dieser Untersuchung aus Gründen des Arbeitsschutzes bewusst auf eine Probennahme in diesem Bereich verzichtet.

In unseren Untersuchungen wurden ausnahmslos Milchviehherden in Laufställen beprobt. Für Herden mit Anbindehaltung und für Mutterkuhhaltungen können die hier vorgestellten Ergebnisse daher nicht gelten. Bei Anbindehaltung haben eventuell vorhandene Ausscheider nur einen geringen Bewegungsspielraum. In Mutterkuhhaltungen ist bei der dort üblichen Weidehaltung mit einer verminderten Anreicherung von MAP in der Umgebung und daher mit geringeren Nachweisraten zu rechnen. Für diese Haltungsformen bzw. Produktionsrichtungen sind somit gesonderte Untersuchungen erforderlich.

Die kulturelle Untersuchung von Umgebungskotproben erfordert einen Zeitaufwand von über zwölf Wochen bis das Ergebnis feststeht. Dieser relativiert sich jedoch angesichts der vergleichsweise langsamen Ausbreitungsgeschwindigkeit der Paratuberkulose innerhalb von Beständen und von Bestand zu Bestand. Durch die geringe Probenzahl je Bestand ist dieser Untersuchungsansatz kostengünstig. Legt man die gegenwärtig in Deutschland üblichen Untersuchungsgebühren für eine kulturelle mykobakteriologische Untersuchung zwischen 18 und 30 Euro zugrunde, so ergeben sich für eine Herdenuntersuchung mit fünf Umgebungskotproben reine Laborkosten von 96 bis 150 Euro je Bestand. Für eine serologische Untersuchung einer Stichprobe

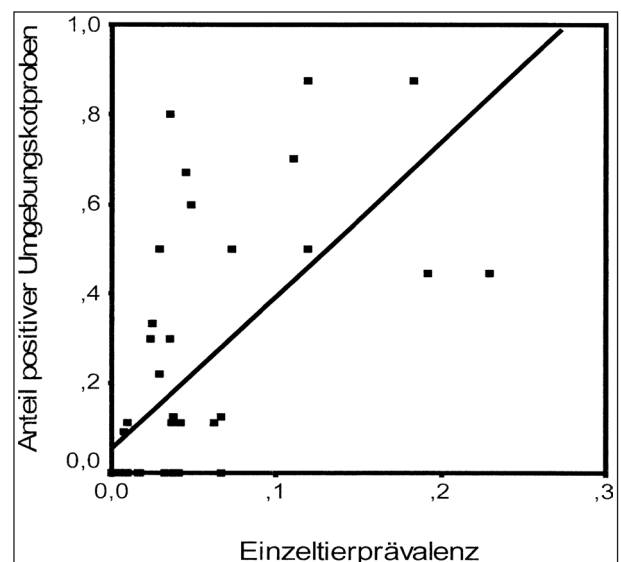


ABBILDUNG 1: Abhängigkeit des Anteil positiver Umgebungskotproben (UP) vom Anteil positiver Einzeltierkotproben (EP) in 31 infizierten Beständen (lineare Regression, Anteil UP = $3,47 \times$ Anteil EP + 0,06).

von 30 Tieren müssten ebenfalls 150 Euro kalkuliert werden, jedoch ist diese Stichprobengröße bei Anwendung der gegenwärtig verfügbaren Testsysteme nicht ausreichend (Wells et al., 2002; Humphrey et al., 2004). Tavorpanich et al. (2008) verglichen in einem Simulationsmodell mehrere Verfahren zur Detektion infizierter Herden, wobei es sich um mehrere ELISA-Tests, die Kotkultur im individuellen und gepoolten Ansatz und um Umgebungskotproben handelte. Dabei ergaben sich für die Untersuchung der Umgebungskotproben die geringsten Kosten.

Es ist zu schlussfolgern, dass der Nachweis von MAP in Umgebungskotproben von der Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde abhängt. Bei hoher und mittlerer Einzeltierprävalenz (> 5 %) ist dieser sicher und bei einer Einzeltierprävalenz zwischen 2 % und 5 % mit verminderter Sensitivität möglich. Bestände mit einer Einzeltierprävalenz unter 2 % können mit der hier verwendeten Untersuchungsmethode nicht sicher erkannt werden. Sofern für eine Prävalenzstudie eine minimal zu erkennende Prävalenz festgelegt würde, die größer als 2 % ist, kann eine akzeptable Herdensensitivität über 85 % erreicht werden. Die Herdenspezifität dieses Untersuchungsansatzes war in dieser Untersuchung 100 %, da in keiner der 15 als nicht infiziert charakterisierten Herden MAP in Umgebungskotproben nachgewiesen wurde.

Für die Entnahme von Umgebungskotproben in Milchviehherden mit Laufstallhaltung kann folgende Vorgehensweise empfohlen werden:

- Die Beprobung von drei bis fünf Stallbereichen je Herde ist ausreichend.
- Der Melkbereich und der Laufbereich der laktierenden Kühe sind in jedem Falle einzubeziehen.
- Die Auswahl der übrigen Bereiche richtet sich nach der Größe der Herde, dem üblichen Entmistungs-, Reinigungs- und Desinfektionsregime und dem Tierverkehr.
- Ein schneller Transport der Proben in das Untersuchungslabor ist sicherzustellen. Alternativ können die Proben bei –20°C gelagert werden.

Milchviehhalter können mit dieser Methode auf wirtschaftliche Weise feststellen, ob ihre Herde in erheblichem Maße von Paratuberkulose betroffen ist.

Danksagung

Die Autoren danken den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Thüringer Tierseuchenkasse für die Probenahme im Rinderbestand und die technische Durchführung der Laboruntersuchungen sowie den beteiligten Rinderhaltern und ihren bestandsbetreuenden Tierärzten für die Unterstützung des Projekts.

Conflict of interest: Die Autoren erklären, dass keine geschützten finanziellen, beruflichen oder anderweitigen Interessen an einem Produkt oder einer Firma bestehen, welche die in dieser Veröffentlichung genannten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

- Berghaus RD, Farver TB, Anderson RJ, Adaska JM, Gardner IA (2006): 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 Dairy Sci* 89: 963–970.
- Böttcher J, Gangl A (2004): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J Vet Med B* 51: 443–448.
- Crossley BM, Zagmutt-Vergara FJ, Fyock TL, Whitlock RH, Gardner IA (2005): Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet Microbiol* 107: 257–263.
- Donat K, Eulenberger K, Kämpfer P (2005): Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in sächsischen Rinderbeständen. *Tierärztl Umsch* 60: 497–501.
- Englund S, Ballagi-Pordány A, Bölske G, Johansson KE (1999): Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33: 163–171.
- Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M (2007): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9: 607–613.
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit (2010): Amtliche Methodensammlung, Stand April 2110, Paratuberkulose [zitiert vom 04. Mai 2011]: 277–208, < www.fli.bund.de/de/startseite/publikationen/amtliche-methodensammlung.html>
- Gierke F (2009): Ermittlung von Einflussfaktoren auf die intravitam Diagnostik der Paratuberkulose. Berlin, FU, veterinärmed. Fak., Diss.
- Gierke F, Köhler H (2009): Tenazität, Ausscheidung und Übertragungswege des Paratuberkuloseerregers – Konsequenzen für die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen. *Praktischer Tierarzt* 90: 1169–1178.
- Hacker U, Hüttner K, Konow M (2004): Untersuchungen zur serologischen Prävalenz der Paratuberkulose in Mecklenburg-Vorpommern. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 117: 140–144.
- Humphrey RW, Cameron A, Gunn GJ (2004): A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. *Prev Vet Med* 65: 173–188.
- Jørgensen JB (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord Vet Med* 29: 267–270.
- Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, Martin G (2008a): 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, Gierke F, Möbius P (2008b): Paratuberculosis – current concepts and future of the diagnosis. *Magyar Allatorv Lapja* 130 Suppl. I: 67–69.
- Köhler H, Conraths FJ, Geure L (2005): Epidemiologie, Diagnostik und Bekämpfung der Paratuberkulose. *Tierärztl Umsch* 60: 492–497.
- Köhler H, Geue L, Conraths FJ (2003): Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 10: 40–44.
- Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry FB, Salman MD (2006): 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.
- Luyven G, vom Schloß A, Saßerath M (2002):** Paratuberkulose-sanierung in Nordrhein-Westfalen. Dtsch Tierärztl Wschr 109: 524–527.
- Möbius P, Hotzel H, Rassbach A, Köhler H (2008):** Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 205 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet Microbiol 126: 324–333.
- Nielsen SS, Ersbøll AK (2006):** Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. J Dairy Sci 89: 4557–4566.
- Pillars RB, Grooms DL, Woltanski JA, Blair E (2009):** Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. Can Vet J 50: 1039–1046.
- Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Bey RF, Oakes MJ, Bentley DC, Olsen KE (2004):** The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. J Dairy Sci 87: 2959–2966.
- Sweeney RW (1996):** Transmission of paratuberculosis. Vet Clin North Am 12: 305–312.
- Tavornpanich S, Muñoz-Zanzi CA, Wells SJ, Raizman EA, Carpenter TE, Johnson WO, Gardner IA (2008):** Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in midwestern US dairy herds. Prev Vet Med 83: 65–82.
- Tiwari A, van Leeuwen JA, McKenna LB, Keefe GP, Barkema HW (2006):** Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. Can Vet J 47: 874–882.
- Wells SJ, Whitlock RH, Wagner BA, Collins J, Garry F, Hirst H, Lawrence J, Saville WJ, Naugle AL (2002):** Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds: J Am Vet Med Assoc 220: 1053–1057.
- Uzoigwe JC, Khaita ML, Gibbs PS (2007):** Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. Epidemiol Infect 135: 1057–1068.
- Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS (1985):** A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. Jpn J Vet Sci 47: 111–119.

Korrespondenzadresse:

Dr. med. vet. Karsten Donat
Thüringer Tierseuchenkasse
Victor-Goerttler-Straße 4
07745 Jena
kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

2.1.2 Donat K, Kube J, Dressel J, Einax E, Pfeffer M, Failing K (2015): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. *Epidemiol Infect* 143, 975–985 (Studie 2)

Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and *real-time* PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture

K. DONAT¹*, J. KUBE¹, J. DRESSEL¹, E. EINAX¹, M. PFEFFER² AND K. FAILING³

¹Animal Health Service, Thuringian Animal Diseases Fund, Jena, Thuringia, Germany

²Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Centre of Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Saxony, Germany

³Unit for Biomathematics and Data Processing, Veterinary Faculty, Justus-Liebig-University, Gießen, Hesse, Germany

Received 18 April 2014; Final revision 24 August 2014; Accepted 30 August 2014;
first published online 2 October 2014

SUMMARY

Environmental samples are a cost-saving and easy-to-use approach to diagnose paratuberculosis at the herd level. Detailed knowledge concerning its uncertainties in herds with a low prevalence of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) is required to design sampling strategies in control programmes. This study aimed to calculate a threshold level of the apparent within-herd prevalence (WHP_{app}) as determined by individual mycobacterial cultivation (faecal culture; FC) of all cows thus allowing the detection of a herd as MAP-positive at a certain probability level (P_d). Out of 200 environmental samples taken twice from five predefined locations in a barn, 25 were positive by FC and 60 were positive by a quantitative real-time PCR method (qPCR). A logistic regression model was used to calculate the WHP_{app} threshold of detection. For 50% P_d , a WHP_{app} threshold of 2.9% was calculated for the combination of three samples (milking area, main cow alleyways, holding pen) tested simultaneously both by FC and qPCR. The threshold increased to 6.2% for 90% P_d . Repeated environmental sampling did not reduce the WHP_{app} threshold. Depending on the particular needs for prevalence estimation or in control programmes (single or repeated sampling) the provided WHP_{app} thresholds at different P_d will enable decisions to be made about various sampling strategies.

Key words: Faecal culture, infectious disease control, *Mycobacterium (avium paratuberculosis)*, veterinary epidemiology and bacteriology, zoonoses.

INTRODUCTION

Paratuberculosis, or Johne's disease, is a chronic granulomatous enteric disease, predominantly of ruminants, which is caused by *Mycobacterium avium* subspecies (spp.) *paratuberculosis* (MAP). It is characterized by a

long incubation period of up to 10 years, resulting in a latent, a subclinical, and a clinical stage of disease. Therapy-resistant aqueous diarrhoea and formation of oedema due to hypoproteinaemia are cardinal symptoms of late-stage clinical paratuberculosis [1]. Economic losses are caused by reduced slaughter weight [2], increased susceptibility to other diseases [3], premature culling [4] and, in the dairy industry, decreased milk production even in cows without clinical symptoms [5–8]. Furthermore, there may be a role

* Author for correspondence: Dr. K. Donat, Thüringer Tierseuchenkasse, Victor-Goerttler-Strasse 4, D-07745 Jena, Germany.
(Email: kdonat@thueringertierseuchenkasse.de)

of MAP as a potential zoonotic pathogen. A link between MAP and Crohn's disease, a human inflammatory bowel disease, is discussed [9, 10]. MAP survives current pasteurization treatments and, therefore, is a potential human foodborne pathogen [11].

With respect to the economic impact of Johne's disease and the potential risk for human health, effective measures to control the disease should be implemented in MAP-positive herds to limit the spread of the disease, and to reduce the shedding of MAP into the environment, and the carry-over into the food chain. Currently, identification of MAP-positive herds by testing individual animals is hampered by the lack of affordable, specific and sufficiently sensitive approaches for a diagnosis at the herd level. First, bacterial culture of faecal samples on solid or liquid media (faecal culture; FC) is still considered the 'gold standard' for MAP identification [9, 12], but it is time-consuming and costly. Further, it may render false-negative results when applied at a sampling time point without MAP shedding. Bacterial culture of pooled faecal samples can reduce the testing costs per animal by 43% up to 73%, but it decreases test sensitivity at the individual animal level to 60% [13]. Second, ELISA tests, which are commercially available and commonly used, perform with a lack in sensitivity and specificity, and do not allow the categorization of a herd as MAP-positive or MAP-negative in specific cases [1, 14]. Therefore, a cost-efficient and manageable screening method to categorize herds with regard to their MAP status would be valuable. Bacterial culture of environmental faecal samples has been shown to detect dairy herds with an estimated moderate to high within-herd prevalence (WHP) as MAP-positive [15–17]. This approach utilizes the long-term survival of MAP under various environmental conditions. In liquid manure MAP can survive at 5 °C for more than 9 months and at 15 °C for at least 3.5 months [18, 19]. In the absence of essential nutrients MAP may enter a 'state of dormancy' and return to a viable state under better conditions [20]. In freestall herds, targeted sampling in alleyways, waiting yards, manure storage areas and holding pens showed the best outcome of detection [15–17, 21, 22].

The number of positive environmental samples and the amount of MAP in those samples are positively correlated with WHP [15, 16]. The sensitivity at the herd level as determined by composite environmental sampling varies in a wide range from 33.3% to 89.7% depending on the number of samples and WHP [23].

Recently, sensitivity of a set of six environmental samples collected from different locations within a barn and tested by FC was found to be 71% (95% confidence interval 49–86) compared to a herd classification based on pooled FC samples, with samples from five cows in each pool [24].

Due to the higher test sensitivity and test specificity, the studies that determined individual Johne's disease status by identification of the organism [21, 22, 25], are less susceptible to misclassification bias than those using identification based on percentage of antibodies against MAP [26], which is particularly important in herds with low prevalence. These studies indicated that environmental samples tested by FC do not identify MAP-positive herds with a WHP <2% and showed inconsistent results when apparent WHP (WHP_{app}) ranged between 2% and 10%.

For the last decades attempts have been made to apply polymerase chain reaction (PCR) techniques directly on faecal samples, which is able to provide much faster results than FC [1]. A variety of primers against different targets in the MAP genome has been established, i.e. IS900, IS Mav3, F57 and locus 255. Most of the single-step methods are reliable, while nested PCR methods are at a higher risk of being disturbed by contaminations [27]. Sensitivity of PCR from faecal samples depends on the DNA extraction procedures, which should ensure an effective removal of PCR inhibitors like phytic acid, polysaccharides, phenolics or bile salts [28]. Therefore, most PCR methods are less sensitive than FC [29]. Recently, real-time PCR for the detection of MAP combined with a high-efficiency DNA extraction was developed which was reported to have an equal or higher sensitivity compared to FC on Herrold's egg yolk medium (HEYM) [30–32].

Therefore, our study aimed to calculate a threshold of WHP that allows the identification of low-prevalence herds as MAP-positive with an acceptable probability using environmental samples tested by FC and quantitative real-time PCR (qPCR).

MATERIAL AND METHODS

Study population

Twenty Holstein dairy herds enrolled in the 'Paratuberculosis Control Programme in Thuringian Cattle Herds' and housed in freestalls, with an average herd size of 253 cows (40–538) were selected for this study. The programme included, among other

measures, annual screenings of all cows for MAP by FC. If a cow tested positive by FC (FC+), it was not retested the next year. The Thuringian MAP control programme followed the recommendations of Sweeney *et al.* [9], who suggested immediate culling of heavy shedders and the elimination of low shedders at the end of lactation or in case of other problems.

According to the aim of the present study, 14 herds with a WHP_{app} (see below) less than 10% were selected based on the results of herd screenings for the years 2008–2010, and three herds had a WHP_{app} larger than 10%. Additionally, three herds which never had a FC+ test result in the annual herd screenings during the previous three years were included (Table 1).

Estimation of WHP_{app}

All cows in the 20 herds without a FC+ test result, i.e. first lactation cows and cows tested FC-negative (FC-) in previous years were tested once by individual FC during January and June 2011. Samples were taken by a veterinarian of the Thuringian Animal Health Service using a new glove for each cow and a sterile 125 ml plastic cup with a screw cap and bar code for sample identification. The numbers of tested cows, cows with MAP-positive test results from previous years, and number of cows in each herd are given in Table 1. We calculated WHP_{app} using the FC result of each cow in the herd (Table 1) and therefore, WHP_{app} was estimated with a high accuracy level and not biased by pooling or selection of sampled individuals.

Environmental sampling

Faecal samples from the barn environment of the cattle were collected by a veterinarian of the Animal Health Service. In a previous study [22] a total of five sampling sites within the barns were identified and proven to be suitable for environmental sampling: milking area (waiting pen), main alleyway, lactating cow floor (fresh cow pen), maternity (calving) pen, and crossover to calf area. For each of these five areas a composite sample consisting of ten randomly collected subsamples was taken at different sites within the sampling location using a clean and disinfected scraper. The subsamples were placed together in a sterile 125 ml plastic cup with a screw cap and transported in a cooler to the laboratory within 2 h. Environmental samples were taken twice for each herd within 4 months with a median interval of 132

days (minimum 118, maximum 160) in different seasons. In the cool season sampling was performed during March and April 2011 and in the warm season samples were taken during July and August 2011.

Bacterial culture

After transportation to the laboratory all faecal samples were stored at -20°C until cultivation to avoid undesired bacterial and fungal growth and to ensure consistent sample handling. FC of individual samples and environmental samples was performed according to the official manual of diagnostic procedures published by the FLI [33]. Differentiation of characteristic colonies was done by Ziehl-Neelsen staining and an IS900 PCR [29].

DNA isolation from faeces

The DNA was extracted from faeces using the MagMax™ Total Nucleic Acid isolation kit (Life Technologies GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions. The samples were thawed, homogenized and 0.3 g was transferred into 1 ml phosphate buffered solution. The MagMax™ Express 96 instrument (Life Technologies GmbH) was applied for nucleic acid purification and DNA was eluted in a final volume of 200 μl buffer solution.

DNA amplification and real-time PCR

For the detection of MAP DNA, the TaqMan® MAP (Johne's) Reagents kit (Life Technologies GmbH), performed on a 7500 fast real-time PCR cycler (Life Technologies GmbH), was used according to the manufacturer's instructions.

Statistical data analysis

Results of bacterial culture and qPCR were recorded and descriptive statistics were generated using a Microsoft Excel calculation spreadsheet (Microsoft Corporation, USA). All other statistical analyses were done using the statistical software package BMDP/Dynamic (release 8.1; W. J. Dixon, Statistical Solutions Ltd, Ireland). At each step a statistical significance level of $\alpha = 0.05$ was used.

To analyse the relationship between the WHP_{app} and the colony growth score (FC) or the cycle threshold (C_t) value (qPCR) of environmental samples,

Table 1. Determination of apparent within-herd prevalence (WHP_{app})

Herd	Cows (n)	Known FC positive cows ^a (n)	Tested cows (n)	FC pos. ^b (n)	WHP_{app} (%)
1	253		253	0	0
2	417		417	0	0
3	204		204	1	0.49
4	211		211	0	0
5	224		224	0	0
6	198		198	7	3.54
7	301	4	297	9	4.32
8	465		465	32	6.88
9	380	2	378	14	4.21
10	182		182	13	7.14
11	322	4	318	15	5.90
12	259	4	255	9	5.02
13	538	9	529	17	4.83
14	40		40	1	2.50
15	150		150	9	6.00
16	168		168	14	8.33
17	236		236	10	4.24
18	185		185	22	11.89
19	195		195	66	33.85
20	135	25	110	31	41.48
Total	5063	48	5015	270	

FC, Faecal culture; MAP, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*.

^a MAP-positive cows tested by FC in previous years and still kept in the herd.

^b FC MAP-positive cows.

respectively, Spearman's rank correlation coefficients were calculated for each location and test method.

As environmental samples were collected twice, and WHP_{app} could be calculated only once for each herd, additionally to the observation in spring, the FC and qPCR results were aggregated using the highest colony growth score for FC and the lowest C_t value for qPCR observed in spring or summer for each location.

Concerning WHP_{app} of a certain herd as an influencing factor of interest ($n = 20$), its relationship to the dichotomized MAP findings (negative or positive) in the environmental samples was assessed using a logistic regression model analysed with the asymptotic logistic regression procedure BMDPLR [34].

Due to significant relationships for WHP_{app} in the logistic regression model, two, three or five locations were selected in order to combine their findings into a single binary outcome, being positive if at least one of these locations showed a positive result, and negative if all locations were negatively tested.

Inversion of the logistic function yields a WHP_{app} estimate associated with a given probability of detection (P_d) of a MAP-positive herd. For practical reasons in a control programme or for prevalence estimation, a high P_d is desirable. A value of $P_d = 0.9$ was selected because on the one hand it is commonly used in epidemiological problems and on the other, the slope of the logistic function is still rising steeply enough to limit the uncertainty of WHP_{app} estimation. Furthermore, $P_d = 0.5$ was selected because this is the inflexion point of the sigmoid logistic function, and this is the point of maximal slope which minimizes the uncertainty of WHP_{app} estimation. By means of the program BMDPLE [34], which uses maximum likelihood techniques, estimates as well as asymptotic standard errors for these detection thresholds were found. From this, approximate 95% confidence intervals for the thresholds of interest were computed.

The formula for the detection threshold is:

$$WHP_{app}(P_d) = (\ln(P_d/(1 - P_d)) - a)/b,$$

where P_d = desired probability of detection; $WHP_{app}(P)$ = apparent within-herd prevalence with detection probability P ; a = constant parameter in the logistic function; b = model coefficient relating to WHP_{app} in the logistic regression; and \ln = natural logarithm.

In order to analyse the accordance between the FC and qPCR results, Cohen's kappa coefficient was calculated. Additionally, McNemar's procedure was used to test for deviation of symmetry of differing results in the fourfold table of the dichotomized FC and qPCR findings.

RESULTS

WHP_{app}

Out of a total of 5015 individual faecal samples, 270 were MAP-positive and 4710 MAP-negative by FC (Table 1). The 20 study herds had a median WHP_{app} of 4.6% (first quartile 2.0%, third quartile 6.9%). In four herds none of the cows was positively tested.

Environmental samples

Regarding the first sampling (cool season), FC resulted in 18 FC+ and 76 FC- environmental samples. When qPCR was applied, 31 samples showed a positive (qPCR+) and 69 a negative (qPCR-) result.

Table 2. Environmental samples tested by FC and qPCR for MAP grouped by location of sampling

Location of sampling	Method of MAP detection	FC			
		Pos. ^a	Neg. ^b	n.a. ^c	
Milking area	qPCR	Pos.	7	4	2
		Neg.	2	17	8
Maternity pen	qPCR	Pos.	0	12	2
		Neg.	1	23	2
Crossing to calf area	qPCR	Pos.	1	7	1
		Neg.	1	23	7
Main alleyway	qPCR	Pos.	6	9	1
		Neg.	1	20	3
Holding pen	qPCR	Pos.	6	8	0
		Neg.	0	24	2
Total	qPCR	Pos.	20	40	6
		Neg.	5	107	22
		Total	25	147	28

FC, Faecal culture; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; MAP, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*.

^a MAP-positive.

^b MAP-negative.

^c Not assessable FC due to contamination.

Due to fungal or bacterial contamination six samples were not assessable during the cool season and 22 samples during the warm season, where 35 samples were qPCR+ and 65 qPCR-. Taken together, 33% of the environmental samples were qPCR+ and 12.5% FC+ (Table 2). Based on the results of 172 environmental samples with valid results by FC and qPCR, Cohen's kappa was 0.334 indicating a moderate but significant ($P < 0.001$) association of FC and qPCR in environmental samples. McNemar's test showed a significant asymmetry of the differing test results by FC and qPCR ($P < 0.0001$), where PCR resulted in a higher number of positive tests.

Association between WHP_{app} and FC or qPCR results

Spearman's rank correlation coefficients (r_s) for the relationship between WHP_{app} and colony growth score (FC) of environmental samples or the C_t values of qPCR for each location are given in Table 3. Additionally, we calculated r_s for combinations of two or three locations which showed a significant association with WHP_{app}, and for a combination of all locations. All combinations showed a significant correlation with WHP_{app} gaining best results for the FC colony score using a combination of three samples (milking area, main alleyway, holding pen) or all samples.

Association between WHP_{app} and herds' MAP status as determined by FC or qPCR

When the single sampling strategy was implemented, the main alleyway was the only location where both techniques (FC and qPCR) and the combination of both were significantly associated with WHP_{app}. For the holding pen this was the case only when qPCR was applied, and for the combination of both methods. Double sampling resulted in a significant association with WHP_{app} for the main alleyway tested by both methods and the combination of both. Additional significance was found for the maternity area tested by qPCR and the combination of qPCR and FC. Despite two combinations in qPCR testing in the single sampling, all combinations of locations resulted mostly in significant associations with WHP_{app} (Table 4).

Estimates of WHP_{app} associated with a given probability of detection

For a combination of two samples, the estimate of WHP_{app} (\pm standard error) associated with 90% probability of detection of a MAP-positive herd yielding from the inversion of the logistic function was $10.2 \pm 2.6\%$ for FC and $7.9 \pm 1.5\%$ for qPCR without relevant differences between single and double sampling (Table 5).

Using a combination of three samples once, the estimated WHP_{app} associated with 90% probability of detection decreased to $6.4 \pm 0.9\%$ for FC and increased to $10.9 \pm 4.0\%$ for qPCR. When reducing the probability of detection to 50%, the estimate decreased to $5.1 \pm 0.5\%$ for FC and $4.9 \pm 1.5\%$ for qPCR. For double sampling, the latter decreased to $3.5 \pm 1.1\%$. Applying both tests and a combination of three or all samples resulted in an estimate of $6.2 \pm 4.0\%$ for 90% and $2.9 \pm 1.0\%$ for 50% probability of detection for both single and double sampling (Table 5).

DISCUSSION

Control of paratuberculosis, or Johne's disease, in cattle herds requires the identification of MAP-positive herds in order to implement control measures. Testing individual cow samples is time-consuming and expensive and may be hampered by the lack of sensitivity or specificity if only one sample per individual is tested. Consequently, environmental sampling

Table 3. Spearman's rank correlation coefficient (r_s) for the correlation between within-herd prevalence and colony growth score of the FC or C_t value of the qPCR for single and double sampling and for each location sampled for the combination of two, three or five samples

Location	Single sampling						Double sampling					
	Colony score ^a			C_t value ^b			Colony score			C_t value		
	n^c	r_s^d	P value	n	r_s	P value	n	r_s	P value	n	r_s	P value
Milking area	18	0.597	0.007	20	-0.581	0.007	18	0.597	0.009	20	-0.627	0.003
Maternity	19	0.0	n.s.	20	-0.396	n.s.	20	0.260	n.s.	20	-0.730	<0.001
Crossing to calf area	18	0.146	n.s.	20	-0.329	n.s.	20	0.181	n.s.	20	-0.547	0.012
Main alleyway	19	0.695	<0.001	20	-0.704	<0.001	19	0.695	<0.001	20	-0.694	<0.001
Holding pen	20	0.576	<0.001	20	-0.780	<0.001	20	0.579	0.007	20	-0.752	<0.001
2 locations combined ^e	20	0.691	<0.001	20	-0.747	<0.001	20	0.700	<0.001	20	-0.767	<0.001
3 locations combined ^f	20	0.848	<0.001	20	-0.712	<0.001	20	0.858	<0.001	20	-0.780	<0.001
5 locations combined ^g	20	0.846	<0.001	20	-0.688	<0.001	20	0.860	<0.001	20	-0.758	<0.001

FC, Faecal culture; C_t , cycle threshold; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; n.s., not significant.

^a Colony score of environmental samples' FC test (c.f.u.): +, 1–10; ++, 11–50; +++, 51–100; +++, >100.

^b C_t value of environmental samples' qPCR.

^c Number of herds with valid test results of environmental samples tested by either qPCR or FC.

^d Spearman's rank correlation coefficient.

^e Combination of two locations (main alleyway, holding pen).

^f Combination of three locations (milking area, main alleyway, holding pen).

^g Combination of all five locations.

has been described as an easy and cost-effective herd-level screening method [14–17]. Although there is controversy as to whether this approach is appropriate for herds with low MAP prevalence [21, 24, 25], herd-level sensitivity and specificity values have been published [24] and, for a given WHP_{app} to be detected, found to be comparable or even better than serological testing [14]. Therefore, environmental samples tested by FC can be considered an alternative method for herd diagnosis in low-prevalence herds [24]. Using two methods of MAP detection simultaneously, FC and qPCR, this prospective study was performed in well-characterized dairy herds with a low-level WHP_{app} known from individual FC testing in previous years. Thus, we were able to fill a gap in the knowledge regarding the benefit of using qPCR instead of, or simultaneously with, FC.

Compared to previous studies [14–17], the strength of our study design is that we used the gold standard for the determination of WHP_{app} , i.e. the individual testing of all cows in the herd. Thus, the WHP_{app} we used in the model was not influenced by any bias of pooling or selection of sampled individuals [9, 12, 35] resulting in a WHP_{app} estimation with a high accuracy level. Nonetheless, a certain level of uncertainty remains in the estimation of WHP_{app} that results

from the use of an imperfect test. FC is highly specific (>99%) but has a sensitivity that is estimated to be approximately 60% relative to necropsy [9]. Because necropsy is not a realistic option for field studies and for diagnosis in the framework of control programmes, we decided to refer to the FC-based WHP_{app} . The estimation of WHP_{app} was animal based with numerous animals per herd, and we cannot exclude that variability may be caused by fluctuating shedding, which only becomes apparent by repeated sampling. Because of the high cost of our approach based on individual culture of each sample, the individual FC test was not repeated. Hence, this uncertainty cannot be excluded from the estimation of the WHP_{app} threshold.

Our results demonstrate the advantages and limitations of using a qPCR to detect MAP in environmental samples. Contrary to the time-consuming FC method, qPCR allows MAP detection within a few days and detected a significantly higher number of environmental samples as MAP-positive without specificity problems [36]. Environmental samples that tested MAP-positive originated from herds known to be MAP-positive, except for five samples from herd 2 that was known to be MAP-negative for at least 5 years. The herd was retested by individual FC of

Table 4. Results of the logistic regression to analyse the association between WHP_{app} and MAP status of herds ($n = 20$) determined by FC, qPCR or the combination of both for different combinations of locations

Location	Single sampling						Double sampling					
	FC ^a		qPCR ^b		FC and qPCR ^c		FC		qPCR		FC and qPCR	
	OR ^d	<i>P</i> ^e	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>
2 locations combined ^f	2.07	0.044	2.73	0.030	2.48	0.030	2.07	0.044	1.74	0.041	1.74	0.041
3 locations combined ^g	5.76	0.016	1.44	0.094	1.96	0.026	5.76	0.016	1.74	0.041	1.96	0.026
5 locations combined ^h	5.76	0.016	1.48	0.078	1.96	0.026	5.76	0.016	1.96	0.026	1.96	0.026

WHP_{app} , apparent within-herd prevalence; MAP, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*; FC, faecal culture; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; OR, odds ratio.

^a Herds classified as MAP-positive by testing the sample by FC.

^b Herds classified as MAP-positive by testing the sample by qPCR.

^c Herds classified as MAP-positive by testing the sample by FC or qPCR.

^d Odds ratio for the description of the association between WHP_{app} and MAP status.

^e *P* value for odds ratio.

^f Combination of two locations (main alleyway, holding pen).

^g Combination of three locations (milking area, main alleyway, holding pen).

^h Combination of all five locations.

all cows the following year and 3 years after the study without any positive results. The samples were retested using another PCR protocol targeting the F57 locus with negative results. Although we suppose that the initial qPCR results of these samples might be false positive, another reason for the positive results could be a MAP shedder with low or intermittent shedding resulting in very low WHP. We did not exclude these samples from the model because in the practical use of qPCR-tested environmental samples, these samples are regarded as positive which should be represented by our model.

With respect to the locations of sampling, the qPCR performed much better for samples from the maternity pen and the crossing to calf area with 20 samples qPCR MAP-positive compared to only four samples with positive results by FC. Because all study herds are involved in the control programme, this may result from the activities of the herd managers to ensure a high hygienic standard by frequent disinfection in areas of critical importance (maternity pen, crossing to calf area), and consequently, MAP was not cultivable but detectable by PCR. Regarding the correlation of the C_t value with WHP_{app} , we observed a significant Spearman's rank correlation coefficient of -0.730 for the maternity pen and -0.547 for the crossing to calf area for double sampling (Table 3). In samples from the main alleyways, the holding pens of lactating cows

and the milking area, qPCR nearly doubles the number of MAP-positive samples compared to FC; the correlation with WHP_{app} was significant for the C_t values and the FC colony score as well indicating that these three locations are appropriate for environmental sampling and testing by FC as well as by qPCR. The best correlation with WHP_{app} ($r_s = 0.78$) was achieved when samples from the holding pen were tested by qPCR. This corresponds to the correlation between C_t values and colony-forming units in a previous study with a non-standardized sampling protocol [32]. The combination of three samples (holding pen, main alleyway, milking area) enhanced correlation markedly for colony scores, but not for C_t values. The combination of all five sample locations did reduce and double sampling did not improve the correlation compared to single sampling. When focusing on cow concentration areas (lactating cow floor, cows' alleyway), our results are in line with the results of previous studies [15, 21]. Although manure storage areas were shown to be suitable locations for MAP detection by environmental sampling in previous studies [15–17, 21] we excluded them from our study on health and safety grounds. As we intend to establish environmental sampling as a sufficiently sensitive, cost-saving and easy-to-use approach to identify MAP-positive dairy herds, we aim to avoid a hazardous situation for the person sampling.

Table 5. Estimates of WHP_{app} threshold value \pm asymptotic s.e. and approximate 95% confidence intervals for the detection of a MAP-positive herd using a combination of two, three or five environmental locations tested by FC, qPCR or the combination of both, respectively, at different probabilities of detection

		Double sampling						
		Single sampling			Double sampling			
		FC ^a			qPCR ^b			
		FC and qPCR ^c			FC and qPCR ^c			
P_d (%)	WHP _{app} \pm s.e. ^e	95% CI _{app} ^f	WHP _{app} \pm s.e.	95% CI _{app}	WHP _{app} \pm s.e.	95% CI _{app}	WHP _{app} \pm s.e.	95% CI _{app}
Combination of two environmental samples (main alleyway, holding pen)								
50	7.2 \pm 1.2	4.7–9.6	5.7 \pm 0.7	4.2–7.2	5.2 \pm 0.8	3.7–6.7	7.2 \pm 1.2	4.7–9.6
90	10.2 \pm 2.6	4.9–15.4	7.9 \pm 1.5	4.8–11.0	7.7 \pm 1.6	4.5–10.8	10.2 \pm 2.6	4.9–15.4
Combination of three environmental samples (milking area, main alleyway, holding pen)								
50	5.1 \pm 0.5	4.2–6.1	4.9 \pm 1.5	1.9–7.9	2.9 \pm 1.0	1.0–4.9	5.1 \pm 0.5	4.2–6.1
90	6.4 \pm 0.9	4.6–8.2	10.9 \pm 4.0	3.0–18.9	6.2 \pm 1.6	3.0–9.4	6.4 \pm 0.9	4.6–8.2
Combination of five environmental samples (milking area, maternity, crossing to calf area, main alleyway, holding pen)								
50	5.1 \pm 0.5	4.2–6.1	4.1 \pm 1.4	1.3–6.9	2.9 \pm 1.0	1.0–4.9	5.1 \pm 0.5	4.2–6.1
90	6.4 \pm 0.9	4.6–8.2	9.9 \pm 3.3	3.3–16.4	6.2 \pm 1.6	3.0–9.4	6.4 \pm 0.9	4.6–8.2

WHP_{app}, Apparent within-herd prevalence; s.e., standard error; MAP, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*; FC, faecal culture; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; CI, confidence interval.

^a Herds classified as MAP-positive by testing environmental samples by FC.

^b Herds classified as MAP-positive by testing environmental samples by qPCR.

^c Herds classified as MAP-positive by testing environmental samples by using both qPCR and FC.

^d Probability of detection MAP-positive herds as positive.

^e Estimated threshold value of the WHP_{app} \pm approximate s.e. for the detection of a MAP-positive herd.

^f Approximate 95% CI of the estimated threshold value of the WHP_{app} for the detection of a MAP-positive herd.

The estimation of the WHP_{app} threshold value for detection of a MAP-positive herd using different combinations of sampling and methods of testing showed the lowest WHP_{app} percentage as 90% P_d for a combination of three and five samples tested by FC and qPCR simultaneously. Relaxing P_d to 50% resulted in a lowering of this estimate from $6.2 \pm 1.6\%$ to $2.9 \pm 1.0\%$ WHP_{app} . Our results are in line with previous studies [24] using a set of six samples with a sensitivity approaching 100% at moderate WHP_{app} levels of 8%, and 90% sensitivity at a WHP_{app} of $\sim 5\%$. This may encourage the use of a set of two or three environmental samples instead of six samples which is demanded by the Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program published by the USAD [37]. Furthermore, in contrast to our study, Lavers *et al.* [24] estimated the WHP_{app} of the study herds using initially a pooled FC consisting of five samples followed by individual culture of samples from positive pools. This less elaborate approach lowers the sensitivity of the FC method [13, 38] because a sample from a single cow containing a low amount of MAP would not be detected by the pool FC due to the dilution effect. Consequently, WHP_{app} could be underestimated, as the individual FC was done only from MAP-positive pools. To a certain degree, our results confirm the limitations of detecting low-prevalence MAP-positive herds using only environmental samples, that have been postulated by other studies regardless of the detection methods used [21, 22, 25]. The WHP_{app} thresholds resulting from our model refer to WHP_{app} calculated from individual FC results. Although FC is currently the most sensitive method to diagnose paratuberculosis in living animals, its sensitivity is estimated to be about 60–70% relative to necropsy, with a specificity $\geq 99\%$ [9, 39]. If we had used the true prevalence in our model, the estimated threshold value would be even higher. We waived this option because necropsy is not a realistic option. Nonetheless, for practical use in control programmes, the 90% P_d WHP_{app} threshold is an orientation value of what can be expected from the use of a single environmental sampling. In voluntary control programmes it is important to identify herds with a high WHP_{app} because these herds account for the highest risk of MAP shedding into the environment and the food chain. These farms should be identified and given advice as a priority. Applying two test methods on a set of three samples resulted in a WHP_{app} threshold of 6.2% and, therefore, meets the requirement necessary to identify these herds.

In our dataset double sampling did not reduce threshold value compared to single sampling by FC or the combination of FC and qPCR. This confirms the results of Lavers *et al.* [24] who stated only minimal improvement of sensitivity with a second sampling. This may disprove the assumption that repeated sampling, which is frequently used in control programmes, will reduce the WHP_{app} threshold that allows the detection of a herd as MAP positive. By contrast, when only qPCR was applied, double sampling lowered the estimated threshold calculated for single sampling. This may be due to the perceptible influence of the positive qPCR results in herd 2. That would, at least in part, explain the worse performance of qPCR in the logistic regression model, particularly in the single sampling approach. Because our model is based on only 20 herds, it presumably reacts rather sensitively to misclassification causing a bias in threshold estimation. Although repeated sampling did not reduce the WHP_{app} threshold it enhances P_d at certain WHP_{app} levels. For example, using the calculated WHP_{app} threshold of 2.9% at $P_d = 0.5$ for a set of three samples tested by both FC and qPCR and assuming five statistical independent observations, the resulting P_d would be 0.969, which is an acceptable value even for a monitoring programme that aims to detect herds with a $WHP_{app} > 3\%$ with a probability of > 0.95 . Obviously, limitations remain regarding the use of environmental samples for monitoring herds not suspected of paratuberculosis in certification programmes.

In our study the high number of unanalysable FCs from samples collected during the warm season (Table 2) might have limited the improvement which would be expected from repeated sampling. As in most cases fungal contamination hampered the identification of MAP cultures and we suspect that the higher air temperature and humidity during the summer facilitated the growth of mould in the faeces which accumulated in the barn. Therefore, the decontamination procedure was not able to inactivate the mould spores completely, and consequently, more culture tubes were affected by fungal overgrowth.

Taken together, our results favour a combination of three environmental samples taken once per herd and tested simultaneously by FC and qPCR to be an option that is less laborious but similar in sensitivity compared to a set of five environmental samples. Repeated sampling as well as the inclusion of more samples did not improve the probability of identifying a herd as MAP-positive. The set of three

environmental samples showed a similar probability of detecting a MAP-positive herd compared to a set of five samples.

If this easy-to-use approach were to be applied as a first diagnostic step in a control programme, it would allow the detection of those herds that need to implement control measures as soon as possible because they are likely to have a relevant number of MAP shedders. This may advance the implementation of control measures and the entry into a paratuberculosis control programme to reduce the spread of the disease within the herd. On the other hand, our results show that environmental sampling is not an adequate diagnostic approach to detect MAP-positive dairy herds with a WHP_{app} of less than ~3%. Individual testing is still needed for the detection of herds with a very low WHP_{app} as well as for control measures within a herd (e.g. specific hygienic measures, separation and culling of shedders). Further research is required for the use of repeated environmental sampling to monitor certified herds in order to detect a re-introduction of the infectious agent.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was a part of the ‘Paratuberculosis control programme in Thuringian dairy herds’ of the Thuringian Ministry of Social Welfare and Health, which is financed by the Thuringian Animal Disease Compensation Fund. The work was supported by ‘Landesvereinigung Thüringer Milch e.V.’. The authors thank Ute Schau and her team for performing the faecal culture and Felix Häslér, Life Technologies GmbH, for the technical support concerning qPCR.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Tiwari A, et al.** Johne’s disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian Veterinary Journal* 2006; **47**: 874–882.
2. **Whitlock RH, Hutchinson LT, Merkal RS.** Prevalence and economic consideration of Johne’s disease in the northeastern U.S. *Proceedings of the United States Animal Health Association* 1985; **89**: 484–490.
3. **Raizman EA, et al.** The association between culling due to clinical Johne’s disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Preventive Veterinary Medicine* 2007; **80**: 166–178.
4. **Smith RL, et al.** Effect of Johne’s disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2010; **93**: 3513–3524.
5. **Raizman EA, et al.** The association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal shedding or clinical Johne’s disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 2007; **78**: 179–195.
6. **Beauveau F, et al.** Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in dairy cows. *Veterinary Research* 2008; **38**: 625–634.
7. **Raizman EA, Fetrow JP, Wells SJ.** Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 2009; **92**: 4929–4936.
8. **Smith RL, et al.** A longitudinal study on the impact of Johne’s disease status on milk production in individual cows. *Journal of Dairy Science* 2009; **92**: 2653–2661.
9. **Sweeney RW, et al.** Paratuberculosis (Johne’s disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; **26**: 1239–1250.
10. **Over K, et al.** Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne’s disease, and Crohn’s disease: a review. *Critical Reviews in Microbiology* 2011; **37**: 141–156.
11. **Antognoli MC, et al.** Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with ante-mortem test results. *Veterinary Microbiology* 2008; **127**: 300–308.
12. **Ayele WY, Machackova M, Pavlik I.** The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinary Medicine Czech* 2001; **46**: 205–224.
13. **Vialard J, et al.** Detection of bovine paratuberculosis by culture of pooled faeces [in French]. *Revue de Médecine Vétérinaire* 1993; **144**: 527–533.
14. **Donat K, et al.** Herd prevalence studies of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in cattle using serological tests: opportunities, limitations and costs [in German]. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 2012; **125**: 10–19.
15. **Raizman EA, et al.** The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 2004; **87**: 2959–2966.
16. **Berghaus RD, et al.** Use of age and milk production data to improve the ability of enzyme-linked immunosorbent assay test results to predict *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* faecal culture status. *Journal of Dairy Science* 2006; **89**: 963–970.
17. **Lombard JE, et al.** Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd

- infection status on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 2006; **89**: 4163–4171.
18. **Lovel R, Levi M, Francis J.** Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology* 1944; **54**: 120–129.
 19. **Jørgensen JB.** Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nordisk veterinærmedicin* 1977, **29**: 267–270.
 20. **Gumber S, Whittington RJ.** Analysis of the growth pattern, survival and proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following exposure to heat. *Veterinary Microbiology* 2009; **136**: 82–90.
 21. **Pillars RB, et al.** Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Canadian Veterinary Journal* 2009; **50**: 1039–1046.
 22. **Donat K, Schau U, Soschinka A.** Identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infected dairy herds by environmental sampling [in German]. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 2011; **124**: 10–17.
 23. **Lombard JE, et al.** Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 2013; **108**: 234–238.
 24. **Lavers CJ, et al.** Evaluation of environmental faecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. *Canadian Veterinary Journal* 2013; **54**: 1053–1060.
 25. **Smith RL, et al.** Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2011; **102**: 1–9.
 26. **McKenna SL, et al.** Johne's disease in Canada part II: disease impact, risk factors, and control programs for dairy producers. *Canadian Veterinary Journal* 2006; **47**: 1089–1099.
 27. **Möbius P, et al.** Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 2008; **126**: 324–33.
 28. **Pozzato N, et al.** Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. *Journal of Microbiological Methods* 2011; **84**: 413–417.
 29. **Englund S, et al.** Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1999; **33**: 163–171.
 30. **Logar K, et al.** Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sub-clinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC Veterinary Research* 2012; **8**: 49.
 31. **Rommel A.** New diagnostic tool for detection of Johne's disease [in German]. *Tierärztliche Umschau* 2012; **67**: 257–259.
 32. **Aly SS, et al.** Correlation between Herrold egg yolk medium culture and real-time quantitative polymerase chain reaction results for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pooled faecal and environmental samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2010; **22**: 677–683.
 33. **Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) Federal Research Institute for Animal Health.** Amtliche Methodensammlung Stand: April 2012 (http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Amtliche_Methodensammlung/Methodensammlung_201204.pdf). Assessed 15 August 2013.
 34. **Dixon WJ (ed.).** BMDP Statistical Software Manual, *Volumes I and II.* Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press, 1993, pp. 775–794 and 1105–1144.
 35. **Whittington RJ, Sergeant ES.** Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Australian Veterinary Journal* 2001; **79**: 267–278.
 36. **Dressel J.** Direct detection of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in bovine faeces – a comparative study (diploma thesis). Zwickau, Germany: Hochschule Fresenius University of Applied Sciences, 2012, 71 pp.
 37. **United States Department of Agriculture (USDA).** Animal and Plant Health Inspection Service, Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program, effective 1 September 2010 (http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/downloads/johnes-ups.pdf). Assessed 27 February 2014.
 38. **Raizman EA, et al.** Estimated within-herd prevalence (WHP) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a sample of Minnesota dairy herds using bacterial culture of pooled faecal samples. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2011; **75**: 112–116.
 39. **Köhler H, et al.** Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine serum. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 2008; **121**: 203–210.

2.1.3 Klawonn W, Einax E, Pützschel R, Schmidt M, Donat K (2016): Johne's disease: Reliability of environmental sampling to characterize MAP-infection in beef cow-calf herds. *Epidemiol Infect* 144: 2392-2400

(Studie 3)

Johne's disease: reliability of environmental sampling to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in beef cow-calf herds

W. KLAWONN¹, E. EINAX², R. PÜTZSCHEL³, M. SCHMIDT³ AND K. DONAT^{2*}

¹ Animal Health Service, State Laboratory of Rhineland-Palatinate, Koblenz, Rhineland-Palatinate, Germany

² Animal Health Service, Thuringian Animal Diseases Fund, Jena, Thuringia, Germany

³ Animal Health Service, Saxon Animal Diseases Fund, Dresden, Saxony, Germany

Received 8 September 2015; Final revision 8 March 2016; Accepted 10 March 2016;
first published online 20 April 2016

SUMMARY

Environmental samples are considered to be a cost-effective method of identifying *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)-positive dairy herds, but evidence for beef cow-calf herds is weak. This study aims at evaluating this approach in a total of 20 German herds that were characterized by individual faecal samples ($n = 2545$) of all cows. For 14 MAP-positive herds having at least one MAP-positive animal, the within-herd prevalence was calculated from concurrent individual faecal culture-based testing. Six herds certified as 'MAP free' based on the negative results of previous years served as MAP-negative controls. On average, six environmental samples were taken at the end of winter from areas with high cow traffic and tested for MAP by faecal culture. According to the environmental samples, nine (64.3%) out of the 14 MAP-positive cow-calf herds were infected. The percentage of positive environmental samples and the apparent within-herd prevalence (Spearman's $P = 0.73$, $P < 0.001$) as well as the herd-level test results (positive and negative) and the herd's status based on individual testing (Fisher's exact test, $P = 0.014$) showed a positive association. Considering limitations in low-prevalence herds, MAP-positive beef cow-calf herds are detectable by environmental samples in temperate climate zones.

Key words: Epidemiology, faecal culture, herd-level diagnosis, infectious disease control *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

INTRODUCTION

The first description of samples taken from an animal's environment in order to prove a herd's paratuberculosis infection was done in the early 1990s. Approximately 50 environmental samples were taken per farm from ten farms with paratuberculosis-infected herds and one further dairy herd in Pennsylvania; 15–20 from designated locations within the barn, 20–30 samples

from the fields, creek banks, pastures and yards [1]. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) was found in 5/11 farms with a recent history of Johne's disease. Most of the positive samples were taken from pastures and yards. The highest frequency of positive cultures occurred in farms with the largest number of heavily infected cattle. A markedly larger number of farms were tested for the first time in 80 herds known to be infected and 28 herds known to be uninfected from voluntary Johne's disease programmes in Minnesota [2]. Individual animal faecal samples from up to 100 cows from each farm were cultured in pools of five cows and compared with the results of

* Author for correspondence: Dr K. Donat, Thüringer Tierseuchenkasse, Victor-Goerttler-Straße 4, D-07745 Jena, Germany. (Email: kdonat@thueringertierseuchenkasse.de)

two environmental faecal samples (EFS) per farm on average. Seventy-eight per cent of the herds known to be infected and one of the unsuspecting herds showed a positive reaction by EFS culture. Examinations of EFS for MAP by use of faecal culture or polymerase chain reaction (PCR) has proved to be a suitable method for the evaluation of Johne's disease status in dairy cattle herds in subsequent examinations [3-8]. By contrast, there are insufficient studies regarding the suitability of this approach for the evaluation of a beef cow-calf herd's situation [9]. This joint research project, involving three federal states in Germany, aimed to obtain the first experience in sampling and validity of EFS in cow-calf operations. This study is, to the best of our knowledge, the first within Europe and Germany, and possibly worldwide, that deals with this topic in beef cow-calf herds.

MATERIAL AND METHODS

Study population

A total of 20 cow calf herds (Simmental, Limousin, Charolais or cross-breed herds), monitored by the animal health services of the federal states Rhineland-Palatinate, Saxony and Thuringia, were included in the study. Herds from Thuringia and Saxony were enrolled into a voluntary control programme as described previously [10]. However, in Rhineland-Palatinate a paratuberculosis control programme is not implemented. The total herd size ranged between 30 and 515 (median 195.5). During winter all herds used a stable or an open-front loose barn, and pasture during the rest of the year. Calving season differed between herds (Table 1). According to the current within-herd prevalence, herds with a high ($n = 6$) and a low ($n = 8$) within-herd prevalence were chosen for comparison with six herds that were certified as 'herds not suspected of having paratuberculosis'. In five of the latter herds all cows had been monitored for 3 years by annual individual faecal culture without any positive result, one herd was also tested by antibody ELISA over 7 years instead of first faecal culture without any positive result.

Environmental and individual sampling

On the 20 farms, six EFS had been taken on average from areas with high cow traffic (feed alley, drinking system, running alleyway), from the holding pen in the barn, the calving pen, the manure store as well

as from the winter camp, mainly during the end of winter holding. An adequate number of at least five subsamples were manually taken using new latex safety gloves and a disinfected spatula from each location. The number of samples were primarily chosen according to the holding compartments. Technical reasons like grouping within the herd, the availability of manure at distinct locations and the contamination of manure with soil or straw had some impact as well. Therefore, the number of representative locations that could be sampled varied accordingly from herd to herd (min 1, max 14, Table 1). In the first instance areas with high cow traffic were sampled in all herds. The subsamples were placed together in a sterile 125 ml plastic cup with a screw cap (Urine cup UB 100, Labortechnik GmbH, Germany).

At about the same time as taking EFS, the herd's cows were individually sampled and tested by culture ($n = 2545$). All cows in the herd were sampled. The individual animal faecal samples were always taken with a new examination glove from the rectum. All faecal samples were wiped into a sterile plastic cup as described above which contained a barcode. For the animal's identification, an EDP-readable form was used to complete the cow's ten-digit ear tag number. EFS as well as individual samples were transported in a cooler to the laboratory and stored until examination at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 1-4 weeks.

Faecal culture

All samples from Rhineland-Palatinate and Thuringia were examined in the laboratory of the Thuringian animal health service in Jena and those from Saxony in the Saxon state laboratory for public and veterinary health in Dresden. The cultural examination of the individual animal samples as well as the EFS was performed according to the official manual of diagnostic procedures published by the Friedrich-Loeffler-Institut, German Federal Research Institute of Animal Health [11]. The differentiation of suspicious colonies was done via Ziehl-Neelsen staining as well as subculture (testing of the mycobactin-dependent growth) and an IS900 PCR [12]. Inconclusive PCR results due to inhibited PCR runs were repeated after dilution of the extracted DNA. All suspicious colonies were identified as MAP. Repeated cultivations were performed when bacterial and fungal growth of contaminants led to suspicion of overgrowth and reduced interpretability of the culture. Non-evaluable samples due to contamination were not taken into consideration.

Table 1. Herd characteristics and detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) in individual faecal samples and environmental faecal samples in 20 beef cow-calf operations

Herd	Region*	Calving season	Breed	Total herd size	Individual faecal samples			Environmental faecal samples		
					Samples (n)	MAP positive (n)	MAP positive (%)	Samples (n)	MAP positive (n)	MAP positive (%)
1	TH	Spring	Simmental	30	22	0	0.0	3	0	0.0
2	TH	Winter	Simmental	152	84	0	0.0	4	0	0.0
3	TH	Autumn/ winter	Simmental	53	28	0	0.0	3	0	0.0
4	TH	Spring	Simmental	320	201	0	0.0	7	0	0.0
5	TH	Spring/ summer	Simmental	71	61	0	0.0	3	0	0.0
6	RP	Year-round	Simmental, Limousin, cross-breed	153	83	0	0.0	10	0	0.0
7	SN	Winter	Simmental, Limousin	175	118	1	0.9	14	0	0.0
8	SN	Year-round	cross-breed	487	368	9	2.5	5	1	20.0
9	TH	Autumn/ winter	Charolais	286	121	3	2.5	6	2	33.3
10	SN	Spring	Simmental, Limousin, cross-breed	515	203	7	3.5	11	0	0.0
11	RP	Year-round	Limousin	216	82	3	3.5	3	1	33.3
12	TH	Spring/ summer	Limousin	470	270	10	3.7	4	0	0.0
13	RP	Summer/ autumn	Limousin	167	54	2	3.7	1	0	0.0
14	TH	Winter	Simmental	260	183	7	3.8	7	0	0.0
15	SN	Spring/ summer	Simmental, cross-breed	318	195	9	4.6	6	1	16.7
16	TH	Spring/ summer	Limousin	396	174	10	5.7	9	5	55.6
17	RP	Year-round	cross-breed	95	54	4	7.4	3	3	100.0
18	RP	Year-round	Limousin cross-breed	253	143	11	7.7	9	3	33.3
19	RP	Spring/ autumn	Others	87	50	4	8.0	2	1	50.0
20	TH	Spring/ summer	Simmental	95	51	22	43.1	7	4	51.1

* TH, Thuringia; RP, Rhineland-Palatinate; SN, Saxony.

Within-herd prevalence calculation and herd classification

Herds defined as MAP positive were those that had at least one sample containing a proven cultural growth of MAP out of all examined individual animal faecal samples. Provided that farmers had a bovine population in several places, they were seen as one farm due to the extensive within-operation animal movement. The apparent within-herd prevalence of infected animals was calculated by dividing the number of faecal culture-positive samples by the number of tested

individuals. According to other authors (e.g. [13, 14]), herds with a mean apparent MAP prevalence $\leq 5\%$ were categorized as low-prevalence herds, and those above this threshold as high-prevalence herds.

A farm was declared as EFS positive if MAP was established in at least one of the farm's EFS.

Statistical analysis

Fisher's exact test [15] was used to verify the association of the farm's EFS results with the herd's status

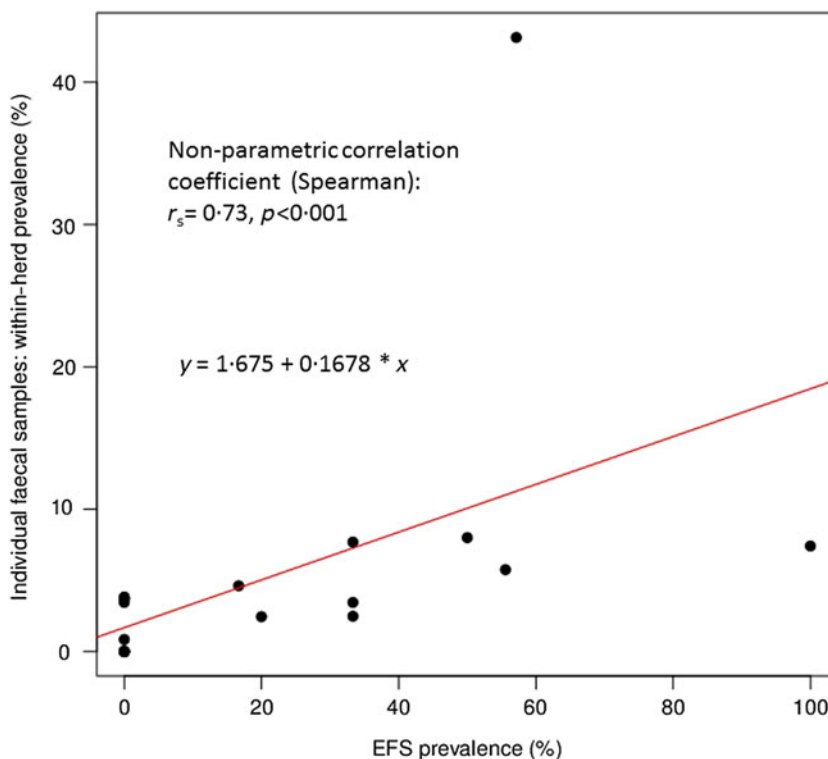


Fig. 1. Correlation between the percentage of positive environmental faecal samples (EFS) and the amount of positive individual faecal samples.

on the basis of individual animal faecal samples. The calculation of the non-parametric correlation coefficient according to Spearman [16] was used to describe the relationship between within-herd prevalence and the percentage of positive EFS per farm. Due to the high variation in the number of EFS between herds, the calculations were performed with and without farms with <3 EFS. Furthermore, in the analysis two farms with <3 EFS were excluded along with another herd with an extreme individual animal faecal prevalence, as it was considered to be an outlier. The significance level was specified as $P < 0.05$. 'R' statistical software was used for the calculations [17].

RESULTS

Table 1 shows the test results of the EFS and the individual animal faecal samples. Based on the results of the individual animal faecal samples, the 14 infected beef cow-calf herds were classified in two groups, i.e. farms with high (>5%) and low (≤5%) within-herd prevalence. The latter herds had a median of 3.5% (min 0.9%, max 4.6%) for their individual animal faecal prevalence; which was 7.7% (min 5.8%, max 43.1%) for the high-prevalence herds. The overall

testing of 117 EFS by faecal culture showed positive results in 21 (17.9%) samples. Sixteen of the positive samples came from high-prevalence herds whereas only five were from low-prevalence herds. The EFS of the six certified MAP-negative beef cow-calf herds did not show any MAP-positive result. However, within all high-prevalence herds, MAP was established in at least one EFS whereas in the EFS of the low-prevalence herds only four (44.4%) out of nine showed a MAP-positive result. In total, 9/14 MAP-positive cow-calf herds (64.3%) were detected as infected due to examination of EFS. A significant positive relationship (Spearman's non-parametric correlation coefficient, $r_s = 0.73, P < 0.001$) was detected between the percentage of positive EFS and the amount of positive individual animal faecal samples (see Fig. 1). The re-analysis without the two farms with <3 EFS collected and the farm with an extreme individual animal faecal prevalence resulted in $r_s = 0.69 (P < 0.01)$. Fisher's exact test also showed significant associations ($P = 0.014$) between the dichotomous EFS results at the farm level and of the herd's status due to individual animal faecal sample testing (positive and negative). The test remained significant after exclusion of the two farms with <3 EFS collected and one

Table 2. *Detection of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) in environmental faecal samples in the six cow-calf herds certified as 'none suspecting of having paratuberculosis' and the 14 MAP-positive beef cow-calf herds with respect to the location of sampling*

Location of sampling	MAP unsuspecting herds			MAP-positive herds			
	Samples (n)	Herds (n)	MAP positive (n)	Samples (n)	Herds (n)	MAP positive (n)	MAP positive (%)
Calving pen				5	3	0	0.0
Pasture/windbreak	2	1	0	2	2	0	0.0
Areas of high animal traffic (feeding alleyways, watering place, yards)	12	5	0	36	10	9	25.0
Group pens (embedding)	7	4	0	27	7	1	3.7
Sick cow pens				2	2	2	100.0
Dunghill				2	2	1	50.0
Boot soles	2	2	0	4	3	3	75.0
Cattle crush's floor, alley and forcing pen	7	1	0	8	2	4	50.0
Winter camp				1	1	1	100.0

farm with an extreme individual animal faecal prevalence ($P = 0.035$).

As inferred from Table 2, most samples were taken in areas with high animal traffic in infected farms (40.0%) as well as unsuspecting ones (41.4%). MAP was found in 25% of the samples taken from infected farms.

With regard to just the high-prevalence infected herds, there is a share of 56.3% (9/16 samples) taken from areas with high cow traffic that tested positively. In addition, positive samples were taken from the examiners' boot soles, the cattle crush floor, its alley and forcing pen, as well as from pens holding sick cows. Thirty-five of the 51 samples that were taken in other areas than those with a high animal traffic were from low-prevalence farms and only two of the samples showed a positive result: the first taken from a group pen, the other from a pen used by animals suspected of Johne's disease.

DISCUSSION

The present study is the first in Europe, possibly worldwide, that deals with the use of EFS to identify a MAP infection in beef cow-calf herds: six herds that were certified as 'herds not suspected of having paratuberculosis' due to repeated herd examinations in individual faecal culture were compared with 14 MAP-positive cow-calf herds. The within-herd prevalence in these herds ranged between 0.9% and 43.1% (median 3.8%), hence nine of them are low-prevalence and five high prevalence herds. An American study

examined 380 beef cow-calf herds with 10 371 cows serologically; 7.9% of the herds and 0.4% of the cows, respectively, were detected as positive by ELISA, but an underestimation of the prevalence due to limited sensitivity of the ELISA test was assumed [18]. Other authors tested 840 cows serologically and by faecal culture (pools of five with individual animal follow-up examinations of positive pools) [19]. Although MAP was only proven in the faeces of two animals, Bayesian estimates of true prevalence indicated that 20% [95% confidence interval (CI) 3-38] of herds had at least one MAP-positive cow with a within-herd prevalence of positive herds of 22% (95% CI 8-42). In a Swiss study, a within-herd prevalence of 6.4% in seven infected beef herds was detected by faecal culture and PCR in pools of three [20]. The number of animals sampled in these herds ranged from 25 to 130 with an average number of 56 animals aged >1 year. In all of the 20 cow-calf herds of the present study, on average six EFS were tested culturally. The samples were collected simultaneously (± 1 month) at the last individual sampling. The results show that MAP-infected cow-calf herds with a within-herd prevalence of 5% can be precisely identified by examination of EFS. According to an examination of Canadian dairy herds, EFS taken in spring and summer are more likely to be positive than samples taken during the winter months [21]. Next to possible influences of temperature and humidity, the examiners stated differences in the taking of samples as possible reasons, i.e. a lower number of samples taken from liquid manure lagoons and pits. Alternatively, a shorter

length of MAP survival was reported at high temperatures due to intensive insolation [22, 23]. Hence, the beginning of spring at the ending of the cold season seems to be the ideal time for taking EFS from cow-calf herds in temperate climate zones. At this point, a lot of cow-calf herds are still kept in stables, or the cow's winter camp can be used for sampling, respectively. Depending on within-herd prevalence the reliability of the examination of EFS of cow-calf herds is, at this point, comparable with that of dairy cattle herds. Out of 31 MAP-positive herds, 22 (71%) proved to be positive by EFS, and all dairy herds with a within-herd prevalence >5% were EFS positive in a German study [7]. North American studies estimate the herd-level sensitivity of EFS taken from areas with high animal traffic in dairy herds at 68-80% [9, 24, 25]. The herd-level sensitivity of 64.3% stated in the present study is comparable to these former data; the slightly lower value might be due to the relatively low number of tested herds. A specificity of 100% can be assumed for faecal culture as the test method, because the cultural examination of faeces can be seen as 'gold standard' and speciation with IS900 PCR in combination with cultural morphology and Ziehl-Neelsen staining guarantee very high diagnostic precision. The negative EFS results throughout from herds certified as not suspected of having paratuberculosis justify this assumption. By sequential acquisition of EFS, the diagnostic precision can be further increased [26, 27]. In doing so, the infection can be proven in herds with a lower within-herd prevalence. A longitudinal study in seven Canadian dairy herds identified a lower limit of within-herd prevalence at 2% for the proof of infection by EFS [5]. Another Canadian study compared the results of EFS taken at 3-month intervals with the examination of pools of five taken at bi-annual intervals with a follow-up examination of positive pools in the within-herd prevalence. Due to sequential acquisition, the sensitivity was able to be increased from 71% at a single EFS examination to 90% at an examination performed six times in >30 herds. However, a loss of specificity from 99% to 96% resulted from sampling six times [8]. Almost the same results were achieved in eight German herds with sequential sampling of gauze pads from the soles of boots (i.e. boot swabs): over 3 years a total 130 samples were taken by walking the paths of lactating cows in the barn; 58/64 boot swabs (90.6%) were from four infected herds. In the four herds that were assumed to be negative due to missing positive test results by individual faecal

culture 1.5% of the swabs showed a positive result by faecal culture. Presumably, cows in one of the latter herds were not completely MAP negative, but the within-herd prevalence was low. Alternatively, these positive results might have been caused by MAP new entries of birds and other wild animals [27]. All things being equal, the transmittal from bovine herds to wild animals seems to be more likely than the other way around [28-31]. On the other hand, positive results in the ELISA of unsuspecting farms might have been caused by unspecific reactions due to other mycobacteria [32-34].

The cow alleyways as well as the manure store or liquid manure lagoons and pits turned out to be highly efficient for sampling [2, 21, 35, 36]. For our examination, most of the samples from infected (40.0%) as well as unsuspecting (41.4%) herds were taken in areas with high cow traffic. MAP was established in 25% of the infected farms. Considering only the infected farms with high prevalence, the detection rate doubled to 56.3%. By contrast, for alleyways of dairy cattle herds, detection rates of 40-53% were found [4, 5, 7, 21, 35]. The detection rate for dairy cattle might also be related to husbandry, a higher number of heavy shedders within the herd and higher within-herd prevalence. For dairy herds with a high (35%) to medium (16%) prevalence due to individual animal's faecal culture a sensitivity of 100% and 95% were calculated, respectively, when four EFS per farm were taken; however, when examining 10 EFS from herds with a prevalence of 5% this only achieved 38% [37]. For the present examination the within-herd prevalence showed >10% in only one herd. In our examination, positive samples were also taken from the soles of the Wellington boots of the examiners, the cattle crush floor or its alley and forcing pen as well as from sick cow pens. These locations can indeed be seen as suitable for sampling; however, the relatively low number of samples from these areas should be considered. In seven Michigan dairy herds positive EFS were gained beyond areas with a high animal traffic or the manure or liquid manure stores only in farms with within-herd prevalence near or above 5% [5]. By contrast, other publications stress the necessity of sampling from different areas for farms with a low within-herd prevalence [7]. In the present examination of cow-calf herds, a positive sample was taken from a group pen's floor in low prevalently infected herds, which was one of two positive samples from this farm with a prevalence of 2.5% calculated from individual testing by faecal culture.

Considering that this study focuses on the probability of having test-positive EFS with respect to apparent within-herd prevalence, the large variation in the number of samples tested in herds is expected to strongly affect test performances, particularly sensitivity. Herds were very different regarding herd size and rearing conditions. Therefore, it was not possible to specify the sampling locations in advance as in previous studies performed in dairy herds [38], and the number of samples per farm varied between 1 and 14. The number of samples primarily varied according to the holding compartments of the herds. Furthermore, technical reasons such as grouping within the herd as well as the availability of manure at distinct locations and the contamination of manure with soil or straw influenced the sampling in a specific herd. As a study evaluating the use of boot swabs and liquid manure samples for herd-level diagnosis of paratuberculosis [10], we demonstrated a good sensitivity of EFS even if only one or two samples per herd were analysed. Hence, herds with only few EFS were not excluded from the initial analysis. In a second analysis both herds with low numbers of EFS were omitted from analysis in order to reduce the influence of the large variation in number of samples. One herd with a very high individual animal faecal prevalence was also excluded, because it was considered as an outlier. These changes resulted in a minor reduction of Spearman's rank correlation coefficient that still demonstrated a significant relationship between the EFS test results and the individual animal faecal prevalences. Despite this, our study demonstrates that a pre-definition of sampling locations or the number of samples is more challenging in beef cow-calf herds than in dairy herds. Considering the fact that the number of EFS collected at one farm visit influences the diagnostic sensitivity of the EFS approach [21], a minimum number of EFS collected per farm visit should be ensured to avoid a drop in sensitivity. Regarding the results of this study and previous studies [21, 38], a minimum number of three EFS seems to be adequate. If the on-farm situation does not allow an adequate sampling at three different types of location, unaccessible samples should be replaced by others [21].

Other authors also observed an increase of the number of MAP-positive EFS and thus of the method's sensitivity in dairy herds in relation to a rising within-herd prevalence [1, 2, 7, 8]. Recently, this association was described by a logistic regression model and used to calculate thresholds of the within-herd-prevalence that allow the identification of a herd

as MAP positive [38]. Corresponding evidence was also given when performing a sequential taking of boot swabs [27], and the appropriate logistic regression model led to a within-herd prevalence threshold of ~4% for single sampling of a boot swab and liquid manure sample, when faecal culture and a real-time PCR were applied simultaneously [10]. The present examination of cow-calf herds has also shown a positive relationship between the percentage of positive EFS and the apparent within-herd prevalence estimated by individual faecal culture testing. Hence, EFS can not only be used for the detection of infected herds, but also for supporting the sanitation of infected farms. In this manner, the success or failure of hygienic measures can be established and elucidated to the animal owners. Furthermore, this approach can be used in monitoring programmes and in studies to estimate herd-level prevalence of MAP infection in a region or country. If the establishment of appropriate control programmes at the regional or federal level proves successful, the danger of a new introduction of the infectious agent into a herd by the purchase of animals would finally decrease for beef cow-calf as well as dairy herds due to the testing of herds by EFS. In a recent Swiss study, purchase of animals was identified as the most important risk factor overall followed by contact of heifers and calves with faecal material from adult animals, but both factors were not significant for the seven examined beef herds in their study [20]. It can be stated that the purchase of cattle into the stock should be rated as an important risk factor whereas the relevance of wild animals or other domestic animals for the infection's transmission is not measurable [31]. According to a model calculation, after two sequenced negative tests of EFS, the probability of a cow's individual faecal culture being positive is already <1% [8]. Herds with a medium to high within-herd prevalence can already be very precisely identified after a single EFS examination as probably having the highest risk of new infection in free herds. In addition, the examination of EFS in herds with high, medium or low within-herd prevalence is the most economic method for identification of MAP-positive herds [37]. More research is needed to clarify which sampling protocols are ideal for beef cow-calf herds.

ACKNOWLEDGEMENTS

This joint research project was undertaken and financed by the animal health services of three

German federal states. The authors thank the Saxon Veterinary State Laboratory and Laboratory of the Thuringian animal health service and their staff for support. Furthermore, the authors gratefully acknowledge the financial support from the animal disease funds of Rhineland-Palatinate, Saxony and Thuringia, respectively. Finally, the authors thank the participating cattle farmers and all veterinarians who collected samples.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Rosenberger AE, *et al.* Isolation of *M. paratuberculosis* from the environment of dairy farms with a known history of Johne's disease. Third International Colloquium on Paratuberculosis. 1991 (www.paratuberculosis.info/proc3/page440.htm). Accessed 20 May 2015.
- Raizman EA, *et al.* The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 2004; **87**: 2959–2966.
- Berghaus RD, *et al.* Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *Journal of Dairy Science* 2006; **89**: 963–970.
- Lombard JE, *et al.* Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 2006; **89**: 4163–4171.
- Pillars RB, Grooms DL, Kaneene JB. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Canadian Veterinary Journal* 2009; **50**:1039–1046.
- Aly SS, *et al.* Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on California free-stall dairies. *Journal of Dairy Science* 2009; **92**: 3634–3642.
- Donat K, Schau U, Soschinka A. Identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infected dairy herds by environmental sampling. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2011; **124**: 360–367.
- Lavers CJ, *et al.* Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. *Canadian Veterinary Journal* 2013; **54**:1053–1060.
- Sweeney RW, *et al.* Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; **26**: 1239–1250.
- Donat K, *et al.* Within-herd prevalence thresholds for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-positive dairy herds using boot swabs and liquid manure samples. *Epidemiology and Infection*. Published online: 26 June 2015. doi:10.1017/S0950268815000977.
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) - Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit. Amtliche Methodensammlung (www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Amtliche_Methodensammlung/FLI_Methodensammlung201305.pdf). Accessed 20 May 2015.
- Englund S, *et al.* Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 1999; **33**: 163–171.
- van Schaik G, *et al.* Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2003; **15**: 233–241.
- Lavers CJ, *et al.* Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. *Journal of Dairy Science* 2014; **97**: 299–309.
- Fisher R A. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 1922; **85**: 87–94.
- Spearman C. The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology* 1904; **15**: 72–101.
- r-projekt-org. The R Project for Statistical Computing. (www.r-projekt.org). Accessed 20 May 2015.
- Dargatz DA, *et al.* Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; **219**: 497–501.
- Pruvot M, *et al.* Pathogens at the livestock-wildlife interface in Western Alberta: does transmission route matter? *Veterinary Research* 2014; **45**: 18.
- Künzler R, *et al.* Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss dairy and beef herds. *BMC Veterinary Research* 2014; **10**: 132.
- Wolf R, *et al.* Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results. *Journal of Dairy Science* 2015; **98**: 275–287.
- Whittington RJ, *et al.* Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**: 2989–3004.
- Eppleston J, *et al.* Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different climatic zones of Eastern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 2014; **80**: 2337–2342.
- Lombard JE, *et al.* Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 2013; **108**: 234–238.

25. **Wolf R, et al.** High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling. *Journal of Dairy Science* 2014; **97**: 6250–6259.
26. **Kalis CH, et al.** Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Preventive Veterinary Medicine* 2004; **65**: 189–204.
27. **Eisenberg T, et al.** Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) detection. *Journal of Dairy Research* 2013; **80**: 485–489.
28. **Corn JL, et al.** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**: 6963–6967.
29. **Fritsch I, et al.** Suspicion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transmission between cattle and wild-living red deer (*Cervus elaphus*) by multitarget genotyping. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; **78**: 1132–1139.
30. **Elliott GN, et al.** Environmental risk factors in the incidence of Johne's disease. *Critical Reviews in Microbiology* 2014 (<http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/1040841X.2013.867830>). Accessed 20 May 2015.
31. **Rangel SJ, et al.** A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. *Canadian Veterinary Journal* 2015; **56**: 169–177.
32. **Crawford GC, et al.** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infections in a tule elk (*Cervus elaphus nannodes*) herd. *Journal of Wildlife Disease* 2006; **42**: 715–723.
33. **Norby B, et al.** Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physico-chemical characteristics. *Veterinary Microbiology* 2007; **124**: 153–159.
34. **Pruvot M, et al.** Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum* in Alberta cow-calf operations. *Preventive Veterinary Medicine* 2014a; **117**: 95–102.
35. **Smith RL, et al.** Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2011; **102**: 1–9.
36. **Kruze J, et al.** Herd-level prevalence of Map infection in dairy herds of southern Chile determined by culture of environmental fecal samples and bulk-tank milk qPCR. *Preventive Veterinary Medicine* 2013; **111**: 319–324.
37. **Tavornpanich S, et al.** Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in Midwestern US dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2008; **83**: 65–82.
38. **Donat K, et al.** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. *Epidemiology and Infection* 2015; **143**: 975–985.

2.1.4 Donat K, Hahn N, Eisenberg T, Schlez K, Köhler H, Wolter W, Lenz M, Noll I, Pützschel R, Failing K, Zschöck M (2016): Within-herd prevalence threshold for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* positive dairy herds using boot swabs or liquid manure samples. *Epidemiol Infect* 144: 413–424 (Studie 4)

Within-herd prevalence thresholds for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-positive dairy herds using boot swabs and liquid manure samples

K. DONAT^{1*}, N. HAHN¹, T. EISENBERG², K. SCHLEZ², H. KÖHLER³,
W. WOLTER⁴, M. ROHDE², R. PÜTZSCHEL⁵, U. RÖSLER⁶, K. FAILING^{7†}
AND P. M. ZSCHÖCK^{2†}

¹ Animal Health Service, Thuringian Animal Diseases Fund, Jena, Thuringia, Germany

² Department of Veterinary Medicine, Hessian State Laboratory, Gießen, Hesse, Germany

³ Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, Thuringia, Germany

⁴ Hesse State Council, Wetzlar, Hesse, Germany

⁵ Animal Health Service, Saxon Animal Diseases Fund, Dresden, Saxony, Germany

⁶ Institute of Animal and Environmental Hygiene, Department of Veterinary Medicine at the Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

⁷ Unit for Biomathematics and Data Processing, Veterinary Faculty, Justus-Liebig-University, Gießen, Hesse, Germany

Received 28 September 2014; Final revision 15 March 2015; Accepted 20 April 2015;
first published online 26 June 2015

SUMMARY

The control of Johne's disease requires the identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)-positive herds. Boot swabs and liquid manure samples have been suggested as an easy-to-use alternative to sampling individual animals in order to diagnose subclinical Johne's disease at the herd level, but there is a need to evaluate performance of this approach in the field. Using a logistic regression model, this study aimed to calculate the threshold level of the apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture, thus allowing the detection of whether a herd is MAP positive. A total of 77 boot swabs and 75 liquid manure samples were taken from 19 certified negative and 58 positive dairy herds. Faecal culture, three different polymerase chain reaction (PCR) methods and the combination of faecal culture with PCR were applied in order to detect MAP. For 50% probability of detection, a within-herd prevalence threshold of 1·5% was calculated for testing both matrices simultaneously by faecal culture and PCR, with the threshold increased to 4·0% for 90% probability of detection. The results encourage the use of boot swabs or liquid manure samples, or a combination both, for identifying MAP-positive herds and, to a certain extent, for monitoring certified Johne's disease-negative cattle herds.

Key words: Boot swabs, herd-level diagnosis, infectious disease control, *Mycobacterium (avium paratuberculosis)*, veterinary epidemiology.

INTRODUCTION

Johne's disease, or paratuberculosis, is a chronic granulomatous enteritis predominantly found in ruminants,

which is caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). MAP infection is believed to happen in the first year of life, although initial clinical

* Author for correspondence: Dr K. Donat, Thüringer Tierseuchenkasse, Victor-Goertler-Straße 4, D-07745 Jena, Germany. (Email: kdonat@thueringertierseuchenkasse.de)

† These authors contributed equally as joint senior authors.

symptoms can only be observed months or even years after infection. Animals suffer from therapy-resistant profuse diarrhoea, meaning that cachexia and the development of oedema due to hypoproteinaemia are typical symptoms in the late stage of the disease [1]. Economic losses are caused by reduced slaughter weight [2], increased susceptibility to other diseases [3], premature culling [4] and, with regard to the dairy industry, reduced lactation performance even in cows with no clinical symptoms [5–8]. Furthermore, many authors discuss the zoonotic potential of MAP in the pathogenesis of Crohn's disease, a form of granulomatous enteritis in humans [9, 10].

With respect to the economic impact of Johne's disease and the presumed zoonotic potential of MAP, effective measures to control the disease should be implemented in MAP-positive herds in order to limit prevalence and thus shedding of the agent into the environment as well as to prevent it from being carried over into the food chain. The first step towards implementing control measures within a herd is the identification of a herd as being MAP positive.

Sampling individual animals in order to identify infected herds has its limitations. While faecal culture applied on individual faecal samples is still considered the most sensitive method, it is labour-intensive, time-consuming and costly [11]. Applying polymerase chain reaction (PCR) on faecal samples allows the detection of MAP in a relatively short time, but it is also expensive. Sensitivity and specificity vary according to the method applied [12]. Both depend on the DNA extraction procedures, which must ensure an effective removal of PCR inhibitors like phytic acid, polysaccharides, phenols or bile salts [13]. ELISA testing for MAP antibodies on selected animals is hampered by limited diagnostic sensitivity and specificity compared to detecting organisms, and also by the resulting difficulties when interpreting results with low numbers of reactors [14, 15].

Environmental sampling protocols have been developed and evaluated over several years [16–22]. The herd-level sensitivity of environmental sampling depends on the number of samples and within-herd prevalence (WHP), and varies widely from ~30% to ~90% [23]. It was estimated to be ~70% when sampling one set of six environmental samples in low-prevalence herds [24]. A recent study calculated thresholds of MAP shedders' apparent within-herd prevalence (WHP_{app}) that allow the detection of a MAP-positive herd at different probabilities (P_d) (~3% at 50% P_d), which demonstrates that

environmental sampling is capable of identifying herds with a low prevalence but has limitations in herds with very low WHP_{app} [25].

As one option, sampling socks as known from *Salmonella* testing (boot swabs) have been suggested as an easily accessible matrix for MAP detection in dairy herds [26, 27], and have been studied in a longitudinal approach. It was possible to detect high-prevalence herds with a high degree of accuracy by repeatedly taking one sample per herd [26]. Performance in herds with low prevalence has yet to be clarified. As such, data regarding the sensitivity of this approach is necessary in order to assess its applicability in the field.

Various authors emphasize bacterial culture of environmental samples as a suitable tool for MAP detection in dairy herds with moderate to high WHP [16–20]. This approach utilizes the lengthy survival of MAP under environmental conditions [28, 29]. Recently, quantitative real-time PCR protocols for the detection of MAP combined with high-efficiency DNA extraction were evaluated, identifying more individual faecal samples [30] and more environmental samples [31] as MAP positive than with faecal culture on Herrold's egg yolk medium. Although these results also suggest an acceptable test performance of a PCR using boot swabs, this matrix has not yet been evaluated.

First, we hypothesize that sampling boot swabs and liquid manure is sufficient to detect MAP-positive herds when faecal culture as well as PCR are applied; and second, that the environmental sampling approach is suitable to identify MAP-positive dairy herds at an acceptable probability level even if the WHP_{app} is low and only one or two environmental samples are collected. Therefore, our study aimed to estimate WHP_{app} thresholds of this approach at different probability levels, applying both PCR and faecal culture simultaneously or separately.

MATERIALS AND METHODS

Study population

A total of 77 dairy herds in Thuringia, Hesse and Saxony, all federal states of Germany, with an average herd size of 356 cows per herd (27–1170) were selected for this study. All herds were housed in free stalls. The herds in Thuringia and Saxony had been enrolled in voluntary control programmes of bovine Johne's disease for several years; these are organized by Thuringia and Saxony's respective animal health services [32, 33]. Among other measures, the programmes include annual

screenings of all lactating and dry cows, including breeding bulls, for MAP by faecal culture. Depending on herd size and herd management aspects, these animals are all sampled for testing either on one day per year or in a continuous manner in connection with other management measures (e.g. puerperal controls, pregnancy tests, drying off). Herds which never had a faecal culture-positive test result in the annual herd screenings over three consecutive years are certified as 'herds not suspected of having paratuberculosis'. The rigour of this certification corresponds to level 6 of the Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program of the United States Department for Agriculture [34]. In the present study, herds were selected whose owners had agreed to take part in this project ($n = 67$). In Hesse, all herds included in the present study were found to contain at least one MAP shedder during a previous regional MAP survey conducted in 2007, which was based on individual serological testing with subsequent faecal culture. Several subsequent studies examined these herds during the following years [26], but effective control measures were never implemented and the herds remained MAP positive. The Hessian herds were subjected to *ad hoc* WHP_{app} determination at the time of environmental sampling ($n = 10$).

Individual faecal sampling and determination of herd prevalence

Individual faecal samples were taken directly from the rectum and immediately transported to the laboratory for further processing. WHP_{app} of MAP shedders was calculated as the proportion of faecal culture-positive cows in the total cows sampled from the herd. In Hesse, individual as well as environmental samplings were conducted at the same time since no previous data on individual faecal culture existed. By contrast, in Thuringia and Saxony the latest individual cows' faecal culture results obtained during the preceding year were used in order to estimate WHP_{app}. A list of individuals that were kept in the herd on the day of environmental sampling was taken from the German database of animal origin (HI-Tier) and adjusted to the data in the laboratory database, extracting the test results for all cows after first calving and bulls aged >24 months.

Boot swabs and liquid manure sampling

Boot swab samples were collected as described by Eisenberg *et al.* [26] during September and

December 2012. Two samplers walked around, mainly in areas with high cow traffic, collecting four boot swab samples in parallel. Sampling involved manure concentration areas where most of the cows commingled and which had proven suitable for environmental sampling in previous studies [16, 19, 20]: main cow alleyways, travel routes, crossovers, waiting pen, lactating cow pens. To achieve rough standardization, walking was limited to at least 100 and not more than 200 steps. Basically, walking involved the normal route of a lactating cow to the milking parlour, starting in the lactating cows' pen and ending in the waiting pen. After sampling, the boot swabs were removed; three boot swabs coated well in manure were placed in the inner of two nested aseptic plastic bags, of which the outermost was labelled to ensure correct identification.

Additionally, samples from liquid manure storage areas (tanks, lagoons, pits or pre-flooders) were obtained at the same time by submerging a sampling container up to 10 cm beneath the surface of the manure. At least 50 ml manure was decanted into a sterile 125 ml plastic cup with screw cap. All the samples were transported in a cooler to the laboratory within 3 h. All samples were stored at -20°C . For further processing, boot swabs were cut into small pieces and handled as described by Eisenberg *et al.* [26].

Bacterial culture

The faecal culture of individual liquid manure as well as prepared boot swab samples was done on Herrold's egg yolk medium according to the official manual of diagnostic procedures published by the Friedrich-Loeffler-Institut, the German Federal Research Institute of Animal Health [35]. Differentiation of characteristic colonies was performed by Ziehl-Neelsen staining and PCR [36]. Samples were characterized as faecal culture-positive or faecal culture-negative. The amount of colony-forming units (c.f.u.) on the surface of the culture medium was scored semi-quantitatively, with 1–10 c.f.u. as '+', 11–50 c.f.u. as '++' and 51–100 c.f.u. as '+++'. If there were >100 c.f.u. on the surface, growth was characterized as '++++'.

DNA isolation from faeces, DNA amplification and PCR

Since different methods for DNA preparation and PCR were used by each laboratory, the respective methodologies are presented separately with the

following abbreviations: Hessian State Laboratory (laboratory A): PCR A; Thuringian Animal Health Service (laboratory B): PCR B; Friedrich-Loeffler-Institut (laboratory C): PCR C.

PCR A

The liquid manure and prepared boot swab samples were processed according to the established bacterial culture protocol as an enrichment step. After 4 weeks of incubation at 37 °C, culture surface runoffs were harvested from each of the tubes and investigated by F57/IC real-time PCR. Duplex F57/IC real-time PCR was developed as a modification of a method published previously [37, 38]. The modified 20 µl PCR mixture for the duplex real-time PCR assay contained 1 µl of the primers F57-F (5'-TAC GAG CAC GCA GGC ATTC-3') and F57-R (5'-CGG TCC AGT TCG CTG TCAT-3') (10 pmol/µl), 0.63 µl F57 TaqMan probe (5'-CY5-CCT GAC CCT TC-BHQ1-3') (10 pmol/µl), 125 copies of internal amplification control (IAC) DNA, 0.5 µl EGFP 4(5) mix [39], 10.0 µl 2 × Quantitect Multiplex Master Mix No Rox (Qiagen, Germany), and a 5 µl aliquot of the DNA sample. EGFP 4(5) mix contains 2.5 pmol/µl of each primer EGFP-11-F (5'-CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G-3'), EGFP-10-R (5'-CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3') and 1.25 pmol/µl EGFP-1HEX probe (5'-HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1-3').

The PCR tubes were then placed in a thermocycler (Mx3005 P, Stratagene, Germany) with a pre-heated lid and subjected to initial denaturation at 95 °C for 15 min followed by 50 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min each and annealing and extension at 60 °C for 90 s each. Analysis of fluorescence was performed using Mx3000 P software (Stratagene). Amplification curves were carefully analysed after checking raw fluorescence values, baseline settings and the threshold as recommended by the manufacturer. Positive signals were recorded as cycle threshold (C_t) values.

PCR B

The general protocol utilized represented a commercially available integrated work flow including DNA isolation from faeces, DNA amplification and qPCR that was licensed in Germany for the detection of MAP from individual faecal samples and environmental faecal samples (Life Technologies GmbH, Germany). The DNA was extracted from faeces using the MagMax™ Total Nucleic Acid Isolation

kit, using the MagMax™ Express 96 instrument (Life Technologies GmbH) according to the manufacturer's instructions; it uses magnetic beads to separate the DNA from the faeces. To detect MAP DNA, the VetMAX™ MAP Real-Time PCR Screening kit, performed on a 7500 fast real-time PCR cycler (Life Technologies GmbH), was applied according to the manufacturer's instructions. A sample was identified as positive if C_t values were ≤ 37.0 , and negative if C_t values were > 37.0 .

PCR C

A commercially available qPCR protocol was used. The DNA was extracted from faeces using a commercial nucleic acid isolation kit (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen) after pre-concentration of samples using Adiafilter (Adifil 100, AdiaGene, France) according to the manufacturer's instructions. The filter system performed the centrifiltration of 10 ml faecal supernatant to concentrate bacteria, enabling an increase in the sensitivity of the global PCR method. In order to detect MAP DNA, a commercial IS900-based real-time PCR method (Adiavet Paratb, AdiaGene) was used according to the manufacturer's instructions. A sample was identified as positive if C_t values were < 38.0 , and inconclusive for C_t values between 38.0 and 40.0.

Statistical data analysis

Data recording and editing as well as descriptive statistics and WHP_{app} computation were performed using a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft Corporation, USA). The statistical software package BMDP/Dynamic (Release 8.1; W. J. Dixon, Statistical Solutions Ltd, Ireland) was used for all other statistical analyses [40]. A statistical significance level of $\alpha = 0.05$ was used in general.

In the first step of the data analysis, Spearman's rank correlation coefficient (r_s) was calculated for each matrix in order to analyse the relationship between WHP_{app} on the one hand and the semi-quantitative colony growth score or the C_t values (qPCR) of boot swabs and liquid manure samples on the other.

Concerning WHP_{app} of a certain herd as an influencing factor of interest ($n = 77$), its relation to the dichotomized MAP findings (negative or positive; MAP status) in the samples (boot swabs or liquid manure or combination of both), each determined by

faecal culture and PCR in each of three laboratories was assessed using a logistic regression model analysed using the asymptotic logistic regression procedure BMDPLR [40]. The applicability of the underlying logistic model was tested with the goodness-of-fit χ^2 test and the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test to verify that the model fitted the data adequately. Additionally, the linear associations between the logit of the outcomes and WHP_{app} as the numeric predictor were examined by scattergrams. This assumption in particular is important for the reversibility of the logistic equation to estimate WHP_{app} thresholds to given probabilities (see below).

The findings of the boot swab and liquid manure samples were presented for three outcomes: PCR, faecal culture and both tests applied simultaneously.

The findings of the boot swab and liquid manure samples were combined to a single binary outcome (MAP status), being positive if at least one of these matrices showed a positive result, and negative if both matrices tested negatively.

Inversion of the logistic function yields an estimate of WHP_{app} related to a given P_d of a herd as MAP positive. For practical reasons, a high P_d (e.g. = 0.9) is desirable in control programmes or for prevalence estimation. At $P_d = 0.9$ the slope of the logistic function is still rising steeply enough, thus limiting the uncertainty of WHP_{app} estimation. Additionally, the point of maximal slope ($P_d = 0.5$) was selected in the analysis, because this is the point of inflection of the sigmoid logistic function. This minimizes the inaccuracy of the WHP_{app} estimation when dropping the perpendicular at the WHP_{app} axis.

By means of maximum-likelihood techniques [40], WHP_{app} thresholds as well as asymptotic standard errors for these detection thresholds were estimated from the data using the program BMDPLE [40]. Approximate 95% confidence intervals (CIs) for the thresholds of interest were computed using the asymptotic standard errors.

The formula of the logistic model used is

$$P_d = \text{probability(herd} = +) \\ = \exp(a + b \cdot WHP_{app}) / (1 + \exp(a + b \cdot WHP_{app})),$$

leading to the WHP_{app} threshold formula:

$$WHP_{app}(P_d) = (\ln(P_d/(1 - P_d)) - a) / b,$$

where P_d = desired probability of detection (absolute number, not in per cent); $WHP_{app}(P)$ = apparent within-herd prevalence with detection probability P ; a = constant parameter in the logistic function;

b = model coefficient relating to WHP_{app} in the logistic regression; \ln = natural logarithm.

RESULTS

WHP_{app}

A total of 22 057 faecal culture test results (883 MAP positive and 21 174 MAP negative) were used to calculate WHP_{app} . The average sample size was 272 (minimum 11, maximum 916) cows per herd. On average, 86.8% of the cows kept in the herd at the time of environmental sampling had valid individual faecal culture test results allowing estimation of WHP_{app} (Table 1). Cows that were introduced into the herd between the date of environmental sampling and individual sampling diminished the percentage of cows with valid test results, as shown in Table 1. Samples from one herd with 27 cows showed an unexpectedly high percentage of bacterial and fungal contamination which resulted in 17 non-analysable samples. Since one sample was MAP positive and the calculated WHP_{app} of 9.1% was found to be in the expected range, the herd was not excluded from the study.

Environmental samples

Apart from one boot swab (laboratory C), all 77 boot swab and 75 liquid manure samples were analysable with faecal culture in each laboratory. Positive and negative results of the PCR tests and the corresponding faecal culture results are given in Table 2. Out of 77 boot swabs, three or four were not analysable in PCR B or PCR C, while none were not analysable in PCR A. Because of solid dung systems, two herds did not supply liquid manure samples, which is why 75 samples were tested. Of these, seven samples in PCR B and five in PCR C were not analysable because of inconclusive C_t values.

Association between WHP_{app} and faecal culture or qPCR results

Spearman's rank correlation coefficients for the relationship between WHP_{app} and colony growth score in faecal culture or the C_t values of each qPCR are given in Table 3. All test methods showed a significant correlation with WHP_{app} ($P < 0.0001$), with the best association between WHP_{app} and the C_t values seen in PCR B.

Table 1. Herd size, sample size and estimated apparent within-herd prevalence (WHP_{app}) of 77 herds

	Minimum	First quartile	Median	Third quartile	Maximum
Herd size (n)	27	115	200	472	1170
Sample size (n)*	11	85	204	402	916
Sample size (%)†	33·4	71·1	86·8	93·2	100·0
MAP-positive cows (n)	0	0	12	15	87
MAP-negative cows (n)	10	73	204	377	916
WHP_{app} (%)‡	0·0	0·0	2·4	9·0	46·8

MAP, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

* Number of cows kept in the herd on the day of environmental sampling and which tested positively or negatively for MAP.

† Relation of sample size to herd size on the day of environmental sampling.

‡ Apparent within-herd prevalence on the day of environmental sampling.

Table 2. Number of boot swabs and liquid manure samples which tested negatively or positively by FC in three different laboratories and using three different PCR methods (A, B, C) for MAP

Matrix	Method of MAP detection		Laboratory					
			A		B		C	
			PCR		PCR		PCR	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	
Boot swab	FC	Pos.	31	9	31	5	34	6
		Neg.	3	34	3	35	3	29
Liquid manure	FC	Pos.	28	11	30	5	19	2
		Neg.	1	35	3	30	19	30

FC, Faecal culture; PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; MAP, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; Pos., MAP-positive; Neg., MAP-negative.

Table 3. Spearman's rank correlation coefficient for the correlation between within-herd prevalence and colony growth score of the faecal culture in three laboratories (A, B and C) or C_t values of three PCR methods (A, B and C) for boot swabs and liquid manure samples from 77 dairy herds

Test method and laboratory	Matrix			
	Boot swabs		Liquid manure samples	
	r_s	P value	r_s	P value
FC (colony score*)				
A	0·7554	<0·0001	0·7628	<0·0001
B	0·7538	<0·0001	0·7937	<0·0001
C	0·7857	<0·0001	0·6272	<0·0001
PCR (C_t value†)				
A	-0·6686	<0·0001	-0·6693	<0·0001
B	-0·7589	<0·0001	-0·8089	<0·0001
C	-0·7211	<0·0001	-0·7676	<0·0001

PCR, Polymerase chain reaction; MAP, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; FC, faecal culture; C_t , cycle threshold; r_s , Spearman's rank correlation coefficient.

* Colony score of samples' faecal culture test (c.f.u.): +, 1–10; ++, 11–50; +++, 51–100; +++++, >100.

† C_t value of environmental samples' PCR.

Table 4. Results of the different logistic regressions to analyse the associations between MAP status of herds ($n = 77$) determined by different methods (FC or PCR or the combination of both) applied to boot swabs and liquid manure samples in three different laboratories (outcomes of interest) and the WHP_{app} as the predictor

Matrix	Lab.	MAP status detected by PCR alone			MAP status detected by faecal culture alone			MAP status detected by faecal culture and PCR combined		
		Regression coefficient \pm s.e.	OR	P value*	Regression coefficient \pm s.e.	OR	P value	Regression coefficient \pm s.e.	OR	P value
Boot swabs										
	A	0.274 \pm 0.072	1.31	0.0003	0.503 \pm 0.129	1.65	<0.0001	0.570 \pm 0.153	1.77	0.0001
	B	0.490 \pm 0.119	1.63	<0.0001	0.421 \pm 0.104	1.52	<0.0001	0.489 \pm 0.124	1.63	0.0001
	C	0.331 \pm 0.089	1.39	0.0002	0.800 \pm 0.215	2.23	<0.0001	0.634 \pm 0.172	1.89	0.0001
Liquid manure samples										
	A	0.305 \pm 0.078	1.36	0.0001	0.606 \pm 0.161	1.83	<0.0001	0.558 \pm 0.151	1.75	0.0001
	B	0.574 \pm 0.155	1.77	0.0001	0.531 \pm 0.140	1.70	0.0001	0.625 \pm 0.170	1.87	0.0001
	C	0.477 \pm 0.131	1.61	0.0002	0.290 \pm 0.073	1.34	<0.0001	0.523 \pm 0.142	1.69	0.0002

MAP, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; FC, faecal culture; PCR, polymerase chain reaction; WHP_{app} , apparent within-herd prevalence; s.e., standard error; OR, odds ratio.

* P value for odds ratio.

Association between WHP_{app} and herds' MAP status as determined by faecal culture or PCR

Shown by logistic regression, the MAP status as determined by each faecal culture or each PCR was significantly associated with WHP_{app} (Table 4). An adequate model fit was verified by the goodness-of-fit χ^2 test as well as the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test and by the inspection of an approximate linear association between the logit of the outcome and the WHP_{app} . The regression coefficients resulting from the logistic regression model were all statistically significantly positive, indicating increasing MAP detection probabilities with increasing WHP_{app} . The corresponding odds ratios (OR) ranged between 1.31 and 1.83 (2.23 in one case), showing a corresponding mean rise of the odds of detection of MAP when WHP increases by 1%. Applying both the faecal culture and the PCR methods simultaneously in the same laboratory resulted in slightly increased median OR in the range of 1.63 and 1.89.

Estimates of the WHP_{app} relating to a given P_d

For boot swabs, the lowest thresholds were estimated when faecal culture C was applied (P_d 50%: 2.54 \pm 0.49%; P_d 90%: 5.29 \pm 1.05%) (Tables 5 and 6). If liquid manure samples were used alone, analysing faecal culture A as well as all PCR test outcomes resulted in comparable estimates for P_d 50% and slightly higher estimates for P_d 90%. The outcomes for faecal culture C were considerably higher, which is caused by

a markedly lower number of positive test results, obviously because cultivation was performed 9 months later than in laboratories A and B and storage at -20°C did not completely prevent degradation of viable bacteria. The distinctly higher estimates for PCR A indicate a lower sensitivity of this method compared to PCR B and PCR C.

Simultaneous testing by faecal culture together with PCR methods led to slightly lower WHP_{app} thresholds in each laboratory compared to faecal culture results. PCR C together with faecal culture C applied on boot swabs (P_d 50%: 2.39 \pm 0.54%; P_d 90%: 5.85 \pm 1.24%) and PCR B together with faecal culture B applied on liquid manure samples (P_d 50%: 2.57 \pm 0.56%; P_d 90%: 6.08 \pm 1.28%) showed the lowest estimates for a single sample. The best results were obtained when the results of both samples were included in the model. Again, the lowest WHP_{app} thresholds were estimated for PCR C and faecal culture C applied on a combined set of boot swab and liquid manure samples (P_d 50%: 1.49 \pm 0.39%; P_d 90%: 3.99 \pm 0.90%; Fig. 1).

DISCUSSION

In order to control paratuberculosis in cattle herds, it is necessary to identify MAP-positive herds, to focus on these herds, and to persuade farmers to enrol in voluntary control programmes and implement control measures in their herds. As sampling individual animals in order to identify infected herds has its limitations, testing environmental samples by faecal culture

Table 5. Estimates of WHP_{app} threshold value \pm asymptotic s.e. and 95% CI_{app} for the detection of a MAP-positive herd using a boot swab or a liquid manure sample or the combination of both applying FC (three different laboratories A, B, C), PCR (three different methods A, B, C) or the combination of each PCR with FC in the same laboratory at 50% probability of detection

Test method applied	Boot swabs		Liquid manure sample		Combination of boot swab and liquid manure samples	
	$WHP_{app} \pm$ s.e.	95% CI_{app}	$WHP_{app} \pm$ s.e.	95% CI_{app}	$WHP_{app} \pm$ s.e.	95% CI_{app}
FC A	3.31 \pm 0.69	1.94–4.69	2.95 \pm 0.60	1.74–4.15	2.51 \pm 0.54	1.44–3.58
FC B	4.41 \pm 0.83	2.75–6.08	3.27 \pm 0.67	1.92–4.61	2.66 \pm 0.54	1.58–3.74
FC C	2.54 \pm 0.49	1.55–3.53	9.68 \pm 1.56	6.56–12.79	2.66 \pm 0.54	1.58–3.74
PCR A	5.67 \pm 1.17	3.33–8.01	6.50 \pm 1.21	4.08–8.92	3.93 \pm 0.80	2.33–5.53
PCR B	4.53 \pm 0.79	2.95–6.11	3.72 \pm 0.73	2.26–5.18	4.43 \pm 0.79	2.95–6.11
PCR C	4.09 \pm 0.94	2.21–5.97	3.12 \pm 0.72	1.68–4.56	1.96 \pm 0.56	0.84–3.08
PCR A + FC A	2.64 \pm 0.60	1.44–3.83	2.84 \pm 0.62	1.59–4.08	2.40 \pm 0.55	1.30–3.51
PCR B + FC B	3.55 \pm 0.71	2.12–4.98	2.57 \pm 0.56	1.44–3.70	2.36 \pm 0.53	1.30–3.42
PCR C + FC C	2.39 \pm 0.54	1.30–3.47	2.90 \pm 0.65	1.60–4.20	1.49 \pm 0.39	0.70–2.28

WHP_{app} , Apparent within-herd prevalence; s.e., standard error; CI_{app} , approximate confidence interval; MAP, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; FC, faecal culture; PCR, polymerase chain reaction.

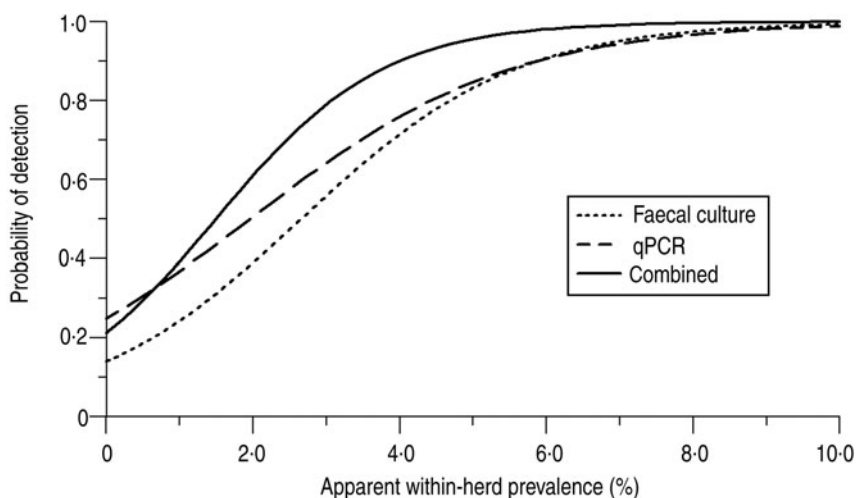


Fig. 1. Logistic functions of the probability of detection using boot swabs and liquid manure samples combined (results from laboratory C).

is not only an alternative for herd diagnosis in low-prevalence herds, but actually shows test characteristics [22, 25] better than those demonstrated for milk ELISA testing at the herd level [15].

Our study aimed to demonstrate that even two samples—one boot swab and one liquid manure sample—are sufficient to identify MAP-positive herds. This study was performed in dairy herds well characterized with regard to their disease status according to the control programme regulations, with either herds not suspected of having paratuberculosis or MAP-positive herds with WHP_{app} known from individual faecal

culture testing in previous years. This enabled us to calculate thresholds for identifying a herd as MAP-positive from a representative number of 77 study herds with a median WHP_{app} of 2.4%. The number of herds involved is one strength of our study compared to previous faecal culture-based studies, which applied environmental sampling of seven [19] and 46 herds [20], respectively.

Compared to previous studies [16–18, 24], another strength of our study design is that we used the most sensitive method currently available for the diagnosis of Johne's disease in living animals for the estimation of WHP_{app} , i.e. individual faecal culture. Due to the

Table 6. Estimates of WHP_{app} threshold value \pm asymptotic s.e. and 95% CI_{app} for the detection of a MAP-positive herd using a boot swab or a liquid manure sample or the combination of both applying FC (three different laboratories A, B, C), PCR (three different methods A, B, C) or the combination of each PCR with FC in the same laboratory at 90% probability of detection

Test method applied	Boot swabs		Liquid manure sample		Combination of boot swab and liquid manure samples	
	$WHP_{app} \pm$ s.e.	95% CI_{app}	$WHP_{app} \pm$ s.e.	95% CI_{app}	$WHP_{app} \pm$ s.e.	95% CI_{app}
FC A	7.69 \pm 1.53	4.63–10.74	6.57 \pm 1.33	3.91–9.23	5.79 \pm 1.19	3.41–8.17
FC B	9.63 \pm 1.81	6.02–13.25	7.41 \pm 1.50	4.40–10.41	5.87 \pm 1.18	3.52–8.22
FC C	5.29 \pm 1.05	3.19–7.39	17.26 \pm 3.10	11.05–23.46	5.86 \pm 1.17	3.52–8.21
PCR A	13.70 \pm 2.82	8.06–19.34	13.71 \pm 2.70	8.31–19.11	9.10 \pm 1.78	5.54–12.66
PCR B	9.01 \pm 1.60	5.81–12.21	7.55 \pm 1.52	4.51–10.59	9.01 \pm 1.60	5.81–12.21
PCR C	10.73 \pm 2.26	6.21–15.25	7.73 \pm 1.66	4.41–11.05	5.86 \pm 1.35	3.16–8.56
PCR A + FC A	6.49 \pm 1.36	3.77–9.22	6.77 \pm 1.42	3.93–9.62	5.96 \pm 1.27	3.43–8.50
PCR B + FC B	8.05 \pm 1.57	4.90–11.19	6.08 \pm 1.28	3.52–8.65	5.70 \pm 1.20	3.30–8.11
PCR C + FC C	5.85 \pm 1.24	3.37–8.33	7.10 \pm 1.51	4.08–10.11	3.99 \pm 0.90	2.19–5.79

WHP_{app} , Apparent within-herd prevalence; s.e., standard error; CI_{app} , approximate confidence interval; MAP, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; FC, faecal culture; PCR, polymerase chain reaction.

higher sensitivity and specificity of faecal culture, studies that estimated WHP_{app} by direct detection of the organism in individual samples from each animal [19–21] are less susceptible to misclassification bias than those using identification based on the detection of antibodies against MAP or pooled samples. Therefore, our WHP_{app} estimation was not influenced by any bias as can be anticipated after pooling, resulting in more precise data. This is particularly important in herds with low prevalence. Nonetheless, some uncertainty remains as a result of the suboptimal sensitivity of faecal culture, which is estimated to be approximately 60% relative to tissue culture [22]. We decided to refer to the faecal culture-based WHP_{app} because necropsy followed by tissue culture is not a realistic option for diagnosis in the framework of control programmes or field studies. Furthermore, the estimation of WHP_{app} was animal-based, and it cannot be ruled out that intermittent shedding by low shedders may cause some variability in the faecal culture outcome. In addition, at least in Thuringia, not all cows present in the herd on the day of environmental sampling had been tested; only those that had been sampled previously had, resulting in an average proportion of tested cows of 86.8% (Table 1). This may have led to an underestimation of WHP_{app} in herds with more shedders among the non-tested cows compared to the tested ones, or vice versa. We accepted this potential misclassification bias, as the percentage of non-tested cows was far smaller than the percentage

of those tested. As such, this uncertainty cannot be excluded from the WHP_{app} estimation.

As the measured values of both MAP detection tests (C_t values for PCR, colony growth score for faecal culture) showed a highly significant association with WHP_{app} (Table 3), we calculated a logistic regression for both methods separately and for the combination of the faecal culture with PCR applied on boot swab or liquid manure samples for each laboratory (Table 4). As expected, the use of two test methods simultaneously increased the OR resulting from the logistic regression model, demonstrating a higher chance of identifying a herd as MAP positive when WHP_{app} increases. Consequently, the outcome of the WHP_{app} threshold estimation by the logistic model showed the same effect. Applying two tests resulted in lower WHP_{app} estimates in boot swabs, liquid manure samples and the combination of both matrices, respectively. Applying faecal culture (all laboratories) or PCR C to a combined boot swab and liquid manure sample, the estimate was lower compared to the use of only one matrix, apart from boot swabs tested by faecal culture in laboratory C (Tables 5 and 6). These markedly good results may be explained by the laboratory's many years of experience with faecal culture as Germany's national reference laboratory for paratuberculosis. This result may encourage the application of faecal culture on boot swabs alone, if the laboratory ensures a high standard for this test method.

The lowest estimates were calculated for the combination of faecal culture and PCR in laboratory C for a combined boot swab and a liquid manure sample with 1.5% at 50% P_d and 4.0% at the 90% P_d level. These values clearly demonstrate that using a combination of one boot swab and one liquid manure sample is sufficiently sensitive to identify dairy herds with a low prevalence of MAP shedders at an acceptable probability level. Even boot swabs alone performed rather satisfactorily, with estimated thresholds of about 2.4% at 50% P_d and 5.8% at 90% P_d . This is of considerable practical value as boot swabs are very easy to sample, pack and ship. Nonetheless, our results show that the combination of both matrices, one sample collected in cow concentration areas and the other one representing manure storage areas, leads to the most reliable outcome. Although the application of two methods on one sample appears to be elaborative and expensive, it is worthwhile as part of control programmes because it enhances the application options of environmental sampling. The detection limit of about 4% at 90% P_d enables the use of environmental sampling as a reliable screening tool. The 90% P_d WHP_{app} threshold gives an indication of what can be expected from the use of single sampling in voluntary control programmes or prevalence studies. It is important to identify herds with a high WHP_{app} because these herds represent the highest risk of MAP shedding into the food chain and the environment. In voluntary control programmes, these farms should be identified and given priority by consultants in order to enable the immediate introduction of control measures.

The reduction to 1.5% at 50% P_d may allow herds not suspected of having paratuberculosis to be monitored in certification programmes, at least for herds with fewer than 50 cows, taking into account the following: In those herds, one shedder will cause a WHP_{app} of $\geq 2\%$, which means that, theoretically, environmental sampling has the potential to detect all herds of this size in which there is one MAP shedder. Repeated sampling will not further reduce the WHP_{app} threshold, but it enhances the P_d at a certain WHP_{app} level. Assuming, for example, five statistically independent observations of boot swab and liquid manure samplings with the calculated WHP_{app} threshold of 1.5% at P_d of 50%, the resulting P_d would be 96.9% and, therefore, acceptable. Despite concerns with respect to the misclassification of low-prevalence MAP-positive herds as 'false MAP-negative' by using solely environmental samples [19–21], our results

encourage the application of environmental sampling to monitor herds certified as not suspected of having paratuberculosis under certain conditions. Serious limitations remain for the use of environmental sampling to monitor large herds, especially in multi-site housing systems.

Taken together, these results confirm the hypothesis that boot swabs and liquid manure samples are an efficient means of identifying MAP-positive dairy herds. We favour a combination of one boot swab and one liquid manure sample tested simultaneously by faecal culture and PCR. This approach is suitable for identifying MAP-positive dairy herds at an acceptable probability level even if the WHP_{app} is low.

The use of one boot swab sample alone impairs the detectable WHP_{app} threshold to a certain degree, but is still a useful approach. Further research is required in a longitudinal study to evaluate the repeated use of boot swabs and liquid manure samples in herds previously certified as not suspected of having paratuberculosis, particularly in order to detect a reintroduction of the infectious agent.

ACKNOWLEDGEMENTS

This joint research project was undertaken and financed by the animal health services of three German federal states (organizing institutions: Hessian State Laboratory, Hesse State Council, Saxon Animal Disease Fund, Thuringian Animal Disease Fund). The authors thank all institutions for their support. Furthermore, the authors gratefully acknowledge the financial support by the Thuringian Dairy Industry Association (Landesvereinigung Thüringer Milch e.V.) and the Hessian Animal Disease Fund. Above all, the authors would like to thank the dairy farmers who participated, the laboratory staff, all veterinarians who collected samples, and Matthew Rockey for improving the English.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Tiwari A, et al.** Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian Veterinary Journal* 2006; **47**: 874–882.
2. **Whitlock RH, et al.** Prevalence and economic consideration of Johne's disease in the north-eastern U.S.

- Proceedings of the United States Animal Health Association* 1985; **89**: 484–490.
3. **Raizman EA, et al.** The association between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Preventive Veterinary Medicine* 2007; **80**: 166–178.
 4. **Smith RL, et al.** Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2010; **93**: 3513–3524.
 5. **Gonda MG, et al.** Identification of a QTL on BTA20 affecting susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Animal Genetics* 2007; **38**: 389–396.
 6. **Beaudeau F, et al.** Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Veterinary Research* 2008; **38**: 625–634.
 7. **Raizman EA, et al.** Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 2009; **92**: 4929–4936.
 8. **Smith RL, et al.** A longitudinal study on the impact of Johne's disease status on milk production in individual cows. *Journal of Dairy Science* 2009; **92**: 2653–2661.
 9. **Feller M, et al.** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases* 2007; **9**: 607–613.
 10. **Uzoigwe JC, et al.** Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiology and Infection* 2007; **135**: 1057–1068.
 11. **Collins MT.** Diagnosis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2011; **27**: 581–591.
 12. **Sweeney RW.** Pathogenesis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2011; **27**: 537–546.
 13. **Pozzato N, et al.** Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. *Journal of Microbiological Methods* 2011; **84**: 413–417.
 14. **Donat K, et al.** Herd prevalence studies of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in cattle using serological tests: Opportunities, limitations and costs. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 2012; **125**: 361–370.
 15. **Lavers CJ, et al.** Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. *Journal of Dairy Science* 2014; **97**: 299–309.
 16. **Raizman EA, et al.** The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 2004; **87**: 2959–2966.
 17. **Berghaus RD, et al.** Use of age and milk production data to improve the ability of enzyme-linked immunosorbent assay test results to predict *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* faecal culture status. *Journal of Dairy Science* 2006; **89**: 963–970.
 18. **Lombard JE, et al.** Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 2006; **89**: 4163–4171.
 19. **Pillars RB, et al.** Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Canadian Veterinary Journal* 2009; **50**: 1039–1046.
 20. **Donat K, et al.** Identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infected dairy herds by environmental sampling. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 2011; **124**: 10–17.
 21. **Smith RL, et al.** Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2011; **102**: 1–9.
 22. **Sweeney RW, et al.** Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; **26**: 1239–1250.
 23. **Lombard JE, et al.** Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 2013; **108**: 234–238.
 24. **Lavers CJ, et al.** Evaluation of environmental faecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. *Canadian Veterinary Journal* 2013; **54**: 1053–1060.
 25. **Donat K, et al.** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. *Epidemiology and Infection* 2015; **143**: 975–985.
 26. **Eisenberg T, et al.** Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) detection. *Journal Dairy Research* 2013; **80**: 485–489.
 27. **Wolf R, et al.** Evaluation of an alternative environmental sampling method for the detection of MAP. In: *Proceedings of the 12th International Colloquium on Paratuberculosis*. Providence: International Association for Paratuberculosis, 2014, p. 219.
 28. **Lovel R, et al.** Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology* 1944; **54**: 120–129.
 29. **Jørgensen JB.** Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nordisk veterinærmedicin* 1977; **29**: 267–270.
 30. **Logar K, et al.** Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC Veterinary Research* 2012; **8**: 49.
 31. **Dressel J.** Comparative study concerning the direct detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bovine faeces (diploma thesis) [in German].

32. **Thüringer Ministerium für Soziales, Familie und Gesundheit.** Johne's disease control programme in cattle herds in Thuringia [in German]. *Thüringer Staatsanzeiger* 2008; **18**: 556–558.
33. **Saxon Animal Diseases Fund** (<http://www.tsk-sachsen.de/index.php/rindergesundheit/leistungen-a-programme/96-paratuberkulose-programm>). Accessed 12 February 2015.
34. **United States Department of Agriculture (USDA). Animal and Plant Health Inspection Service.** Uniform program standards for the voluntary bovine Johne's Disease Control Program, effective 1 September 2010 (http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/downloads/johnes-ups.pdf). Accessed 27 February 2014.
35. **Anon.** Official Manual of Diagnostic Procedures, release April 2012 [in German]. (http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Amtliche_Methodensammlung/Methodensammlung_201204.pdf). Accessed 15 August 2013.
36. **Englund S, et al.** Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1999; **33**: 163–171.
37. **Schönenbrücher H, et al.** New triplex real time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; **74**: 2751–2758.
38. **Fawzy A, et al.** Improvement of sensitivity for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in bovine fecal samples by specific duplex F57/IC real-time and conventional IS900 PCRs after solid culture enrichment. *Tropical Animal Health and Production*. Published online: 26 February 2015. doi:10.1007/s11250-015-0784-9.
39. **Hoffmann B, et al.** A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *Journal of Virological Methods* 2006; **136**: 200–209.
40. **Dixon WJ (ed.).** *BMDP Statistical Software Manual*, volumes I and II. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press, 1993, pp. 775–794, 1105–1144.

2.2 Eignung serologischer Untersuchungsverfahren zur Beurteilung der Paratuberkulosesituation einer Rinderherde

- 2.2.1 Donat K, Schau U, Soschinka A, Köhler H (2011): Untersuchungen zur Herdenprävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderbeständen mit Hilfe serologischer Testverfahren: Möglichkeiten, Grenzen und Kosten. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 125: 361-370 (Studie 5)

Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 125,
361–370 (2012)
DOI 10.2376/0005-9366-125-361

© 2012 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
kdonat@thueringertierseuchenkasse.
de

Eingegangen: 26.09.2011
Angenommen: 13.03.2012

Online first: 10.05.2012
[http://vetline.de/zeitschriften/bmtw/
open_access.htm](http://vetline.de/zeitschriften/bmtw/open_access.htm)

Zusammenfassung

Summary

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2012/12509-361 \$ 15.00/0

Thüringer Tierseuchenkasse, Jena¹
Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese, Jena²

Untersuchungen zur Herdenprävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderbeständen mithilfe serologischer Testverfahren: Möglichkeiten, Grenzen und Kosten

Herd prevalence studies of Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) in cattle using serological tests: opportunities, limitations and costs

Karsten Donat¹, Ute Schau¹, Anneka Soschinka^{1,2}, Heike Köhler²

Die Bewertung des Infektionsstatus von Rinderherden bezüglich *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) basiert auf den Ergebnissen von Kotkultur oder dem Nachweis von spezifischen MAP-Antikörpern in einer aussagekräftigen Stichprobe von Einzeltieren. Ziel dieser Untersuchung war es, die Laborkosten für eine repräsentative Studie zur Herdenprävalenz von MAP-Infektionen bei Rindern in Thüringen zu kalkulieren. Dazu war unter Berücksichtigung der Sensitivität und der Spezifität der gegenwärtig in Deutschland zugelassenen ELISA-Testsysteme die Mindestzahl der zu untersuchenden Tiere zu ermitteln, welche die Angabe des MAP-Status einer Rinderherde mit 95%iger Sicherheit erlaubt. Die diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten der serologischen Testsysteme wurden anhand von 460 kulturell MAP-positiven Rindern aus 16 Beständen mit Erregernachweis und von 344 kulturell MAP-negativen Rindern aus sieben Beständen ohne Erregernachweis bestimmt. Die notwendigen Stichprobengrößen wurden in Abhängigkeit von der Herdengröße kalkuliert ebenso wie die insgesamt erforderlichen Kosten für die Laboruntersuchung.

Die bewerteten vier ELISA-Testsysteme hatten in Relation zur Kotkultur diagnostische Sensitivitäten zwischen 23,3 % und 32,2 % und diagnostische Spezifitäten zwischen 96,8 % und 98,6 %. Daraus errechnete sich für den besten ELISA-Test eine erforderliche Stichprobengröße von 610 Tieren je Herde und 1,69 Millionen Euro Laborkosten, für den kulturbasierten Untersuchungsansatz dagegen 0,47 Millionen Euro bei einer maximal erforderlichen Stichprobengröße von 41 Rindern je Herde. Die Kosten einer serologischen Herdenuntersuchung übertrafen für alle verwendeten Testsysteme die Kosten eines kulturbasierten Untersuchungsansatzes.

Serologische Testsysteme sind für die Beurteilung des MAP-Infektionsstatus großer Rinderbestände mit den Einschränkungen, die aus der erforderlichen Stichprobengröße und der Wertung positiver Testergebnisse resultieren, geeignet. Für die Beurteilung kleiner Herden eignen sie sich nicht.

Schlüsselwörter: Paratuberkulose, Antikörper, Herdenstatus, Stichprobengröße, Kosten

Infection status of cattle herds concerning *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) is based on direct MAP detection or detection of MAP specific antibodies. This study aimed to calculate laboratory costs for a representative herd prevalence survey of MAP infections in Thuringian cattle herds. Therefore, sensitivity and specificity of ELISA-tests for detection of MAP antibodies which are licensed in Germany had to be evaluated using the target population to calculate the sample size which allows to classify a herd as MAP positive or MAP negative at a 95 % probability level.

A total of 460 fecal culture positive cattle from 16 MAP positive herds and 344 fecal culture negative individuals from seven MAP negative herds were tested in each of the four ELISA's. In relation to fecal culture, diagnostic sensitivity ranged

between 23.3% and 32.2%, and diagnostic specificity between 96.8% and 98.6%. A minimum sample size of 610 individuals per herd and 1.69 Mio Euro laboratory costs were calculated for the best performing ELISA test. Using the fecal culture based approach a maximum sample size of 41 cattle and 0.47 Mio Euro were necessary. Costs of serological testing exceeded costs for a culture based testing for all ELISA-tests.

Considering limitations of required sample size and difficult assessment of positive test results, serological testing is suitable to evaluate MAP infection status in large cattle herds, but not in small herds.

Keywords: paratuberculosis, antibodies, herd status, sample size, costs

Einleitung

Die Paratuberkulose ist eine weltweit verbreitete, progressive Darmerkrankung der Wiederkäuer mit hohen wirtschaftlichen Folgen für die betroffenen Herden, insbesondere durch verminderte Milchleistung und erhöhte Tierabgänge (Chi et al., 2002). Sie wird durch den Erreger *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) verursacht und führt nach einer Periode der Latenz und einer langen subklinischen Erkrankungsphase zu wässrigen und unstillbaren Durchfällen, Ödembildung und dem Abmagern der Tiere (Sweeney, 1996; Tiwari et al., 2006). In Deutschland ist die Paratuberkulose meldepflichtig.

Die Bildung von Antikörpern gegen MAP hängt vom Infektionsstadium ab und ist bei klinisch kranken Tieren häufiger als bei latent infizierten (Köhler et al., 2008a). Im Zeitraum der Latenz überwiegen zelluläre Immunreaktionen, die Bildung von Antikörpern setzt erst in einer späteren Phase des Erkrankungsverlaufs ein (Chiodini, 1996). Die genauen Mechanismen des Übergangs von der zellulären zu einer humoralen Immunantwort sind jedoch noch nicht geklärt. Der Zeitpunkt und die Dauer der Antikörpersekretion können daher nicht vorhergesagt werden. Diese Besonderheiten der Antikörperbildung bei Paratuberkulose bedingen, dass im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten die Sensitivität der serologischen Nachweismethoden zur Identifizierung MAP-infizierter Tiere gering ist (Köhler et al., 2008b). Insbesondere bei klinisch inapparent infizierten Rindern werden mit serologischen Tests nur 15–40 % der Tiere erkannt (Gierke und Köhler, 2009). Die Literaturangaben unterscheiden sich erheblich. Sie sind aufgrund voneinander abweichender Referenzmethoden, der sich in unterschiedlichen Erkrankungsstadien befindlichen, untersuchten Tiere und der Unterschiede in der Prävalenz sowie im Anteil klinisch erkrankter Rinder in der Referenzpopulation kaum vergleichbar (Köhler et al., 2008a).

Gleichzeitig hängt die Testsensitivität von der Intensität der Erregerausscheidung, die im fortgeschrittenen Krankheitsstadium zunimmt (Collins et al., 2005; Clark et al., 2008) und von der Vergleichsmethode (McKenna et al., 2005a) ab.

Die diagnostische Spezifität der ELISA-Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP variiert beträchtlich, für gegenwärtig in Deutschland zugelassene Testsysteme liegt diese bei über 99 % (Köhler et al., 2008a). Sie ist für Testsysteme, die eine Vorabsorption der Serumprobe mit einem *Mycobacterium phlei*-Extrakt beinhalten, höher als in Testsystemen ohne diesen Vorabsorptionsschritt (McKenna et al., 2005b; Köhler et al., 2008a).

Die von Nielsen und Toft (2008) beurteilten Testevaluierungsstudien von ELISA's zur Bestimmung von MAP-Antikörpern in Milch ergaben für die Erkennung MAP-ausscheidender Tiere Sensitivitäten von 21–61 % und Spezifitäten von 83–100 %.

Die Feststellung des MAP-Status einer Rinderherde dient einerseits dem Zweck der Schätzung der Herdenprävalenz (Anteil der Rinderherden in einer definierten Region, die für ein bestimmtes Merkmal zum Untersuchungszeitpunkt mit einer festgelegten statistischen Sicherheit als positiv bewertet werden). Sie kann andererseits sinnvoll sein, um vor der Einleitung von Kontroll- oder Zertifizierungsprogrammen in einem ersten Schritt mit bestimmter Sicherheit zu ermitteln, ob der Erreger der Paratuberkulose im jeweiligen Rinderbestand verbreitet ist.

Die Herdensensitivität (Zahl der richtig als positiv bewerteten Herden im Verhältnis zur Zahl der tatsächlich positiven Herden) und die Herdenspezifität (Anzahl der richtig als negativ bewerteten Herden im Verhältnis zur Zahl der tatsächlich negativen Herden) von Testverfahren werden sowohl durch die Einzeltierprävalenz (Anteil der positiven Tiere an allen Tieren innerhalb der Herde) und die Zahl der untersuchten Proben beeinflusst, als auch durch die Testsensitivität und -spezifität auf Einzeltierebene sowie den Anteil positiver Rinder, ab dem die Herde als positiv bewertet wird (Christensen und Gardner, 2000). Sofern die Sensitivitäten und Spezifitäten der verwendeten Testverfahren von den Anforderungen an einen idealen Test (100 % Sensitivität, 100 % Spezifität) abweichen, führt dies bereits auf Einzeltierebene und in der Folge auch bei Untersuchungen zur Herdenprävalenz zu statistisch nicht gesicherten Aussagen, beziehungsweise die für die geforderte statistische Sicherheit notwendige Stichprobengröße erhöht sich. Imperfekte diagnostische Verfahren erfordern in Abhängigkeit von der Einzeltierprävalenz und der Testgenauigkeit eine größere Zahl zu beprobender Tiere innerhalb einer Herde, um die Freiheit dieser von einem bestimmten Merkmal (z. B. einer Krankheit oder einer Infektion) nachzuweisen und eine größere Zahl zu untersuchender Herden, um die Herdenprävalenz in einem Territorium mit einer bestimmten Sicherheit schätzen zu können. Cameron und Baldock (1998) entwickelten eine Formel und ein Kalkulationsprogramm (FreeCalc 2.0, Cameron, 2001), welches auf iterative Weise die Zahl der zu untersuchenden Tiere berechnet, die notwendig ist, um für ein bestimmtes Konfidenzniveau und eine begrenzte Population die Freiheit von einem Merkmal nachzuweisen. Der Vorteil gegenüber anderen Ansätzen, die einen perfekten Test und eine unendliche Population voraussetzen, liegt in der Berücksichtigung der tatsächlich vor-

handenen Sensitivität und Spezifität des eingesetzten Testsystems und der realen Populationsgröße. Humphry et al. (2004) leiteten eine für die Planung von Studien praktikable Formel zur Bestimmung der Zahl zu untersuchender Herden für die Schätzung der Herdenprävalenz mit einer bestimmten Sicherheit bei gegebener Sensitivität und Spezifität eines Untersuchungsansatzes auf Herdenebene ab.

Ziel dieser Untersuchung war es, die Eignung der in Deutschland verfügbaren serologischen Testverfahren für die Feststellung des MAP-Status der Rinderherden in Thüringen zu prüfen. Dabei sollten sowohl die Limitierungen durch die Sensitivität und Spezifität des Testsystems Berücksichtigung finden, als auch die finanziellen Aufwendungen im Vergleich zu einem anderen Untersuchungsverfahren geprüft werden. Deshalb war es zunächst erforderlich, die in Deutschland zur Zeit zugelassenen Tests zur serologischen Untersuchung von Blutproben auf Antikörper gegen MAP einer erneuten Prüfung auf ihre Sensitivität und Spezifität innerhalb der Thüringer Rinderpopulation zu unterziehen. Nach der Berechnung der erforderlichen Zahl der je Herde zu beprobenden Rinder und der Ableitung der Zahl der zu untersuchenden Herden sollten auf der Basis dieser Daten die Laboruntersuchungskosten einer Herdenprävalenzstudie kalkuliert werden. Für eine Kostenermittlung bei zu planenden Untersuchungen ist von besonderem Wert, dass die Berechnungen auf realen, betriebswirtschaftlich ermittelten Laborkosten je Probe beruhen. Die finanziellen Aufwendungen sollten unter den wirtschaftlichen Bedingungen kalkuliert werden, die denen der geplanten Studien entsprechen. Deshalb wurden der Kostenbemessung die Daten eines Thüringer Routinelabors zugrunde gelegt. Insbesondere abweichende Lohn- und Allgemeinkosten erschweren eine Ableitung solcher Daten aus der internationalen Literatur.

Material und Methoden

Auswahl und Herkunft der untersuchten Rinder

Im Rahmen dieser Studie wurden 804 Rinder aus insgesamt 23 Thüringer Rinderherden untersucht, die am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen“ teilnahmen. Es handelte sich um sieben „historisch freie“ Herden, in denen im Verlauf des Bekämpfungsprogramms bei über mehrere Jahre fortgeführter kultureller Bestandsuntersuchung niemals MAP-Ausscheider nachgewiesen wurden (Tab. 2) und um 16 Herden, in denen mindestens ein Tier des Bestandes in der Kotkultur ein positives Ergebnis aufwies. Die mittlere Anzahl (Median) der Rinder im Alter von über 24 Monaten in diesen Herden betrug 457 (Minimum: 100, Maximum: 1333 Rinder, Stichtagsmeldung an die Thüringer Tierseuchenkasse zum 3. Januar 2011). Diese Spannweite in der Anzahl der pro Herde gehaltenen Rinder über 24 Monaten repräsentiert die Bestandsgrößen, in denen mehr als 80 % der Thüringer Rinder gehalten werden (Tab. 1). Mit 14,1 % werden in Thüringen die meisten Rinder im Alter von über 24 Monaten in Beständen der Größenklasse von 200–300 Rindern gehalten. Als Näherungswert für eine „mittelgroße Thüringer Rinderherde“ wurde daher unseren Berechnungen eine Bestandsgröße von 300 Rindern zugrunde gelegt.

In den positiven Herden wurden für den Antikörper-Nachweis im Jahr 2010 Blutproben von insgesamt 460 Rindern entnommen, von denen ein positives Kulturergebnis vorlag und die noch im Bestand vorhanden waren. In sechs der sieben historisch freien Herden wurden jeweils 50, in einem Bestand 44 Rinder für die serologische Untersuchung herangezogen. Insgesamt handelte es sich um 344 kulturell negativ getestete Rinder.

Gewinnung der Einzeltierkotproben, kulturelle Untersuchung auf MAP und Prävalenzberechnung

Von jedem Rind, das zum Zeitpunkt der Probenentnahme älter als 24 Monate war, wurde mit einem neuen Untersuchungshandschuh rektal Kot entnommen und in ein vom Labor zur Verfügung gestelltes, steriles Plastikgefäß abgestreift. Das Gefäß, das mit einem Barcode versehen war, wurde dicht verschlossen und durch einen Kurierdienst innerhalb von 24 h in das Labor des Tiergesundheitsdienstes der Thüringer Tierseuchenkasse (TGD-Labor) transportiert. Dort wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei –20 °C gelagert. Die Identifikation des Individuums wurde durch die Eintragung seiner zehnstelligen Ohrmarkennummer und das Aufkleben der Barcode-Doublette des Probengefäßes auf ein EDV-lesbares Formular sichergestellt.

Die kulturelle Untersuchung der Einzeltierkotproben erfolgte in Anlehnung an die in der amtlichen Methodensammlung des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI), Stand April 2010, veröffentlichte Methode des kulturellen Nachweises (FLI, 2010), eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Gierke (2009). Besonderheiten der Durchführung werden im Folgenden beschrieben.

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden zunächst 3 g Kot je Probe entnommen und zur Dekontamination mit 30 ml 0,75%iger Hexadecylpyridiniumchlorid-Lösung (Fa. Acros Organics, bezogen über Fisher Scientific GmbH, D) vermischt. Nach einer Sedimentation der groben Bestandteile über 5 min wurden 20 ml des Überstandes abgenommen, 30 min bei 200 U/min geschüttelt und anschließend abgedunkelt für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden der Überstand dekantiert und 0,2 ml des Sediments auf kommerzielles Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) mit Mycobactin sowie Amphotericin B, Nalidixinsäure

TABELLE 1: Zahl der Thüringer Rinderbestände mit Rindern im Alter über 24 Monate nach Bestandsgröße und Anzahl darin gehaltenen Rinder im Alter über 24 Monate auf der Basis der Stichtagsmeldung bei der Thüringer Tierseuchenkasse zum 3. Januar 2011

Bestandsgrößenklasse	Rinderbestände		Rinder	
	n	%	n	%
1–5	1832	56,4	4204	2,5
6–50	847	26,1	14 053	8,4
51–100	170	5,2	12 373	7,4
101–200	144	4,4	20 024	11,9
201–300	97	3,0	23 609	14,1
301–400	48	1,5	16 763	10,0
401–500	40	1,2	17 777	10,6
501–600	20	0,6	10 767	6,4
601–700	16	0,5	10 572	6,3
701–800	6	0,2	4541	2,7
801–900	4	0,1	3427	2,0
901–1000	7	0,2	6526	3,9
> 1000	17	0,5	23 302	13,9
Summe	3248		167 938	

und Vancomycin (ANV, Fa. Becton Dickinson GmbH, D) überimpft. Zur zusätzlichen Unterdrückung unerwünschter Begleitflora wurden weitere 0,04 ml ANV (eigene Herstellung, Endkonzentrationen: Amphotericin B 0,125 mg/ml, Nalidixinsäure 0,25 mg/ml, Vancomycin 0,25 mg/ml) über die beimpfte Nährbodenoberfläche geschwenkt.

Ab der fünften Bebrütungswoche bei 37° C fand in 14-tägigem Abstand die makroskopische Beurteilung des Bakterienwachstums statt. Die Differenzierung verdächtiger Kolonien wurde mittels Ziehl-Neelsen-Färbung, Subkultur (Prüfung des Mycobactin-abhängigen Wachstums) und/oder einer IS900-PCR nach Englund et al. (1999) vorgenommen. Die Befunde wurden qualitativ mit einer SQL-Datenbank (Fa. Agro Data GmbH, D) erfasst. Eine Barcode-Etikettierung aller Probenröhrchen, Verbrauchsmaterialien und der Kulturröhrchen gewährleistete die sichere Zuordnung der Tierkennzeichnungen zu den Proben und Ergebnissen.

Die den nachfolgenden Berechnungen zugrunde liegende durchschnittliche scheinbare Einzeltierprävalenz in positiven Herden wurde aus der Gesamtzahl der in den Jahren 2009 und 2010 kulturell untersuchten Rinder aus den 16 Herden mit Erregernachweis und der Anzahl der kulturell positiven Rinder aus diesen Herden errechnet (Tab. 2).

Blutentnahme, Antikörperbestimmung mit vier kommerziellen ELISA-Testkits

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte durch Tierärzte der Thüringer Tierseuchenkasse im Rahmen von Betreuungsbesuchen im Jahr 2010 in den teilnehmenden Betrieben. Bei den Rindern, von denen ein Ergebnis in der Einzeltierkotuntersuchung vorlag und die sich zum

Zeitpunkt der Blutentnahme noch im Bestand befanden, wurde eine Punktion der Vena coccygea mittels EDTA-Kabevette® (Primavette V EDTA, Fa. Kabe Labortechnik GmbH, D) vorgenommen. Nach dem direkten Transport in das TGD-Labor wurde das Blut bei 840 x g für 5 min zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Die quantitative und qualitative Bestimmung der MAP-Antikörper fand mit den vier verschiedenen kommerziellen ELISA-Testkits statt, die zum Zeitpunkt unserer serologischen Untersuchungen (März 2010 bis Januar 2011) in Deutschland zugelassen waren. Es handelte sich dabei um die Testsysteme CATTLETYPE® MAP Ab (LDL – Labordiagnostik GmbH Leipzig, D), POURQUIER® ELISA Paratuberculosis serum and milk (Institut Pourquier SAS, F), ID Screen® Paratuberculosis Indirect ELISA kit (ID Vet, F) und PARACHEK® 2 (Prionics AG, CH, bezogen über Prionics Deutschland GmbH, D). Ständen in den Durchführungsanweisungen verschiedene Probeninkubationszeiten zur Auswahl, wurde stets die kürzere gewählt. Die Messung der Extinktion und die Befundung der Ergebnisse fanden mit dem Photometer Sunrise™ (Fa. Tecan Deutschland GmbH, D) statt. Alle Ergebnisse wurden quantitativ und qualitativ erfasst. Für die qualitative Auswertung wurden die vom Hersteller angegebenen Cut-offs verwendet.

Validierung der Testsysteme

Für die Berechnungen der Validierungsparameter standen die Programme WIN EPISCOPE 2.0 (<http://www.clive.ed.ac.uk>, Thrusfield et al. 2001), SPSS 11.5 für Windows (Fa. SPSS Inc., USA) und Microsoft Office Excel 2007 (Fa. Microsoft Deutschland GmbH, D) zur Verfügung. Die diagnostischen Sensitivitäten und Spe-

TABELLE 2: *Historie der Bestandsüberwachung per Einzeltierkotprobenuntersuchung in den einbezogenen Beständen. Eine beispielhafte Darstellung der Probeneinsendungen und der Untersuchungsergebnisse erfolgt für die Jahre 2009 und 2010*

Bestand	Kontrollprogramm seit	Bestandsgröße 2009 & 2010	Untersuchte Rinder 2009 & 2010	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung			Einzeltierprävalenz je Herde
				positiv	negativ	n. a.	
als historisch von frei von Paratuberkulose bewertete Herden							
A	2005	390	308	0	302	6	-
B	2007	1333	1878	0	1831	47	-
C	2006	1019	2371	0	2300	71	-
D	2006	482	959	0	900	59	-
E	2005	148	396	0	388	8	-
F	2006	499	275	0	244	31	-
G	2006	458	894	0	878	16	-
Herden mit kulturell positiven MAP-Befunden							
H	2006	457	932	27	890	15	2,9
I	2004	424	640	50	590	0	7,8
J	2006	723	1158	206	878	74	17,8
K	2001	773	1406	46	1336	24	3,3
L	2006	504	1009	36	898	75	3,6
M	2006	539	312	62	245	5	19,9
N	2007	456	634	373	258	3	58,8
O	2006	994	1604	56	1422	126	3,5
P	2006	100	169	76	91	2	45,0
Q	2006	411	733	93	616	24	12,7
R	2006	1129	2183	150	1988	45	6,9
S	2007	457	607	67	534	6	11,0
T	2009	363	566	23	187	11	4,1
U	2006	199	410	7	400	3	1,7
V	2005	888	1395	68	1275	42	4,9
W	2005	288	549	13	523	13	2,4
Gesamt		8705	14 307	1353	12 131	468	9,5

n. a.: nicht auswertbare Kulturen.

TABELLE 3: Ergebnishäufigkeiten von vier verschiedenen ELISA-Testsystemen bei der Bestimmung von Antikörpern gegen MAP in Bezug zum Ergebnis der Kotkultur, getrennt nach Beständen mit positivem und negativem Status

Kultureller MAP-Status		Positiv 460		Negativ 344	
ELISA	Ergebnis	n	%	n	%
A	negativ	342	74,3	335	97,4
	verdächtig	11	2,4	0	0,0
	positiv	107	23,3	9	2,6
B	negativ	307	66,7	339	98,5
	verdächtig	5	1,1	0	0,0
	positiv	148	32,2	5	1,5
C	negativ	312	67,8	336	97,7
	verdächtig	5	1,1	2	0,6
	positiv	143	31,1	6	1,7
D	negativ	321	69,8	333	96,8
	positiv	139	30,2	11	3,2

zifitäten der einzelnen Testkits einschließlich der jeweiligen 95%igen Konfidenzintervalle (CI) wurden relativ zu den Ergebnissen der kulturellen Untersuchung der Einzeltierkotproben ermittelt.

Die Sensitivitätsberechnung für alle vier ELISA-Systeme erfolgte auf der Basis der Ergebnisse der serologischen Tests von 460 kulturell positiven Rindern. Aus den Ergebnissen der ELISA-Tests in Seren von 344 nicht infizierten und kulturell negativen Rindern aus den sieben historisch freien Herden wurden die Spezifitäten für die verwendeten serologischen Tests berechnet.

Rinder, die nach den Herstellerangaben als verdächtig einzustufen waren, wurden für die Spezifitätsberechnung als positiv und für die Sensitivitätsberechnung als negativ betrachtet. Dieses Vorgehen führt zu einer eher konservativen Schätzung beider Parameter.

Berechnung der erforderlichen Stichprobengröße und der Kosten

Um in einer Herde die Anwesenheit des Erregers der Paratuberkulose festzustellen, ist bei Verwendung eines imperfekten Tests die Mindestzahl der zu beprobenden Rinder zu kalkulieren, die eine Angabe des MAP-Status einer Rinderherde auf einem bestimmten Signifikanzniveau erlaubt, welches für diese Studie auf 95 % festgelegt wurde. Die Berechnung dieser Mindestzahlen erfolgte unter Verwendung der Software FreeCalc 2.0

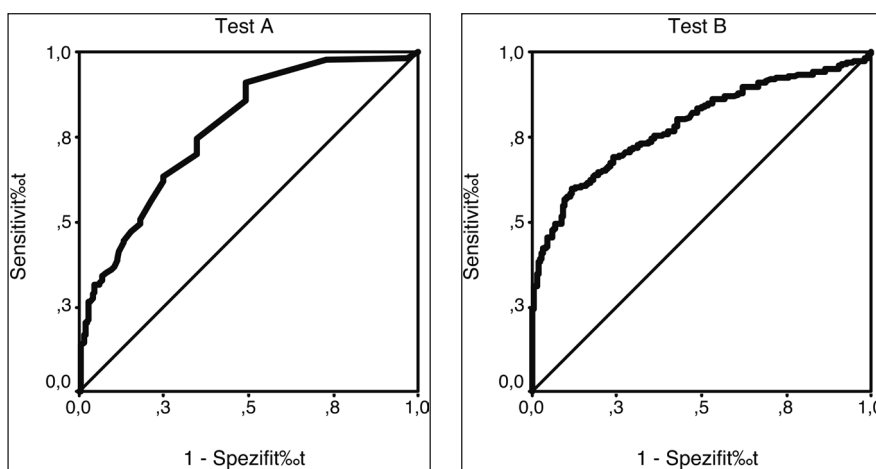


ABBILDUNG 1: ROC-Kurven der ELISA-Testsysteme A und B.

(<http://www.ausvet.com.au>, Cameron, 2001) nach der von Cameron und Baldock (1998) angegebenen Formel:

$$P(T^+=x) = \sum_{y=0}^d \frac{\binom{d}{y} \binom{N-d}{n-y}}{\binom{N}{n}} \sum_{j=0}^{\min(x,y)} \binom{y}{j} Se^j (1-Se)^{y-j} \binom{n-y}{x-j} (1-Sp)^{x-j} Sp^{n-x+j}$$

P(): Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses

T+: testpositive Tiere

Se: Sensitivität des Tests

Sp: Spezifität des Tests

d: Anzahl der für das betrachtete Merkmal (wahr) positiven Tiere in der Population

y: Anzahl der für das betrachtete Merkmal (wahr) positiven Tiere in der Stichprobe

x: Anzahl der Tiere mit positivem Testergebnis in der Stichprobe

j: Anzahl richtig positiver Testergebnisse

x-j: Anzahl falsch positiver Testergebnisse

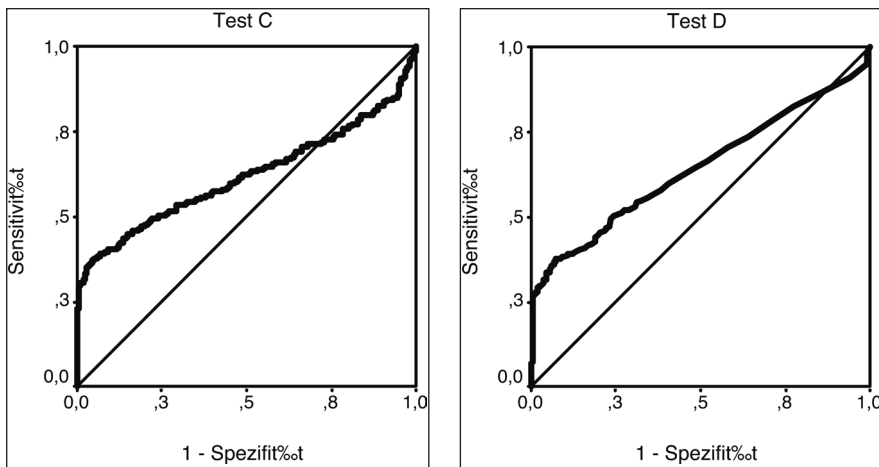
n: Stichprobengröße

N: Populationsgröße

Die Kalkulationen der Zahl der zu testenden Rinder je Herde wurden, beginnend ab einer Herdengröße von 100 Rindern, in Schritten von je 100 Stück bis zur Herdengröße von 1000 Rindern vorgenommen, wobei eine erwartete Einzeltierprävalenz innerhalb der Herde von 10 % sowie Wahrscheinlichkeiten für den α -Fehler und den β -Fehler von $p < 0,05$ vorausgesetzt wurden. Die Testsensitivitäten und -spezifitäten gingen jeweils mit den unteren Grenzen ihrer 95%igen Konfidenzintervalle in die Berechnung ein. Sofern diese Bedingungen nicht eingehalten werden konnten, wurde die Stichprobengröße nicht berechnet. Um einen Vergleich mit einer anderen Methode durchführen zu können, wurden diese Werte unter gleichen Voraussetzungen auf der Basis der Einzeltierkotkultur berechnet, für die auf der Grundlage der Daten von Köhler et al. (2008a), eine Testsensitivität von 70,0 % bei einer Spezifität von 99,9 % angenommen wurde.

Die Zahl der im Rahmen einer Prävalenzstudie zu untersuchenden Herden leiteten wir aus den von Humphry et al. (2004) publizierten Tabellen ab, wobei wir von einer Herdenprävalenz von 10 %, ausgingen und einer Herdenspezifität des Verfahrens von 90 %, eine Toleranz von 5 % und eine Sicherheit von 95 % voraussetzten. Unter Voraussetzung einer Herdensensitivität von 70 % müssen demnach 574 Herden untersucht werden.

Für die serologische Untersuchung mit den kommerziellen Testsystemen A bis D wurden die Kosten der Laboruntersuchung pro Tier und Antikörperbestimmung errechnet. Berücksichtigt wurden dabei die im Ergebnis betriebswirtschaftlicher Analysen kalkulierten Kosten, wie sie im TGD-Labor der Thüringer Tierseuchenkasse für serologische Untersuchungen auf Paratuberkulose entstehen. Diese beinhalten die Personalkosten, die Materialkosten sowie die Allgemenkosten. Berechnungsgrundlage für die Personalkosten waren die im Jahr 2010 entstandenen Lohn- und Lohnnebenkosten für die betreffenden Mitarbeiter, die auf der für die Bearbeitung einer Probe benötigten Arbeitszeit basierten. Als Grundlage für die Berechnung der Materialkosten dienten die Einkaufs-



ABILDUNG 2: ROC-Kurven der ELISA-Testsysteme C und D.

preise im Jahr 2010. Die Allgemeinkosten umfassen Abschreibungen auf Laborgeräte sowie Hard- und Software im Anlagevermögen und Raumkosten. Da die Testkitpreise häufig von Bezugsmengen abhängig sind, wird für diese Studie mit einem mittleren Wert je Probe gearbeitet, den wir aus den durchschnittlichen Testkitkosten je Probe für jeden Test im Einkauf des TGD-Labors der Thüringer Tierseuchenkasse errechneten. Zudem gleichen sich die Bearbeitungszeit und demzufolge auch der Ansatz für die Personalkosten und die Allgemeinkosten für die ELISA-Tests in hohem Maße, sodass für die vier untersuchten Testsysteme die gleichen Beträge zugrunde gelegt werden konnten. Zum Vergleich wurden die Kosten für eine auf der Einzeltierkotkultur beruhenden Studie ermittelt, wobei für die Untersuchungskosten ebenfalls auf die in gleicher Weise durchgeführten Kalkulationen des TGD-Labors der Thüringer Tierseuchenkasse zurückgegriffen wurde.

Zur Kalkulation für eine Herdenprävalenzstudie mit dem Ziel der Identifikation von Paratuberkulose betroffenen Beständen wurden neben der Zahl der zu beprobenden Herden für jedes Testsystem die minimale Herdengröße und die sich dafür ergebende Stichprobengröße zu Grunde gelegt, für die sich unter den eingangs definierten Bedingungen eine Stichprobengröße kalkulieren ließ.

Ergebnisse

Ergebnisse der Antikörperbestimmung und Charakterisierung der verwendeten ELISA-Testsysteme

Die Häufigkeiten der positiven, verdächtigen und negativen Antikörpernachweise mithilfe der ELISA-Systeme A bis D sind in Tabelle 3 angegeben. Für ELISA D wurden keine verdächtigen Ergebnisse ermittelt, da dessen Anwendervorschrift keinen verdächtigen Bereich vorsieht.

Die relativ zu den Ergebnissen der Kotkultur ermittelten Testeigenschaften sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Im Ergebnis der ROC-Analyse erhält man AUC Werte zwischen 0,79 (CI: 0,76–0,82 %) für Test B und 0,62 (CI: 0,58–0,66 %) für Test C (Abb. 1 und 2, Tab. 4).

Berechnung von Prävalenz, Stichprobengröße und Kosten

Für die Gesamtheit der 16 Herden mit Erregernachweis errechnete sich bei 1353 MAP-positiven von 14 307

untersuchten Rindern in den Jahren 2009 und 2010 eine mittlere Einzeltierprävalenz von 9,5 % (Minimum: 1,7 %, Maximum: 58,8 %, Tab. 1). In insgesamt 7081 Einzeltierkotproben aus sieben historisch freien Beständen war im Untersuchungszeitraum kein Erreger nachgewiesen worden und die Einzeltierprävalenz demzufolge gleich null.

In Abhängigkeit von der ermittelten Einzeltierprävalenz, den Testeigenschaften und der Herdengröße ergaben sich notwendige Stichprobenumfänge pro Herde von mindestens $n = 610$ für Test B und $n = 935$ für Test C. Unter Annahme einer Seroprävalenz in der Herde von 10 %, eines Fehlers erster Art von $\alpha \leq 0,05$ und eines Fehler zweiter Art von $\beta \leq 0,05$ sind dabei bis zu 23 beziehungsweise 46 testpositive Tiere möglich, obwohl die Herde als MAP-negativ zu klassifizieren ist (Tab. 5). Unter den hier definierten Voraussetzungen war für die Testsysteme A und D aufgrund ihrer Testeigenschaften keine Berechnung von Stichprobengrößen möglich.

Bei 574 zu untersuchenden Herden errechneten sich für Test B etwa 350 000 und für Test C ungefähr 537 000 zu beprobende Rinder. Für die Kotkultur würden sich unter gleichen Voraussetzungen Herden ab einer Tierzahl von 30 Rindern mit einer Stichprobe von $n = 27$ untersuchen lassen. Bei zunehmender Herdengröße steigt die erforderliche Stichprobe auf höchstens $n = 41$ zu untersuchenden Rindern an und bleibt ab einer Herdengröße von 800 Tieren konstant.

Für die Berechnungen zur Vergleichsmethode Kotkultur errechnet sich bei einer angenommenen mittleren Bestandsgröße von 300 Rindern ein notwendiger Untersuchungsumfang von näherungsweise 24 000 Rindern (Tab. 7).

Die Kostenkalkulation für eine Prävalenzstudie ist in Tabelle 6 angegeben. Als Arbeitszeitaufwand für die Probenbearbeitung ermittelten wir für die ELISA-Testsysteme 60 Sekunden je Probe (s/Probe) und für die Kotkultur 383 s/Probe. In gleicher Weise unterschied sich der Prüfliteraufwand mit 33 s/Probe für die ELISA-Tests und 76 s/Probe für die Kotkultur. Hinzu kommen Arbeiten im Probeneingang mit 40 s/Probe und für Befunderstellung und Rechnungslegung mit 35 s/Probe, die für ELISA und Kotkultur in gleicher Höhe anfallen. Die Kosten je Arbeitskraftstunde belaufen sich für den Probeneingang auf 36,60 Euro, für die Probenbearbeitung auf 41,40 Euro, für den

TABELLE 4: Berechnete Parameter zur Charakterisierung der ELISA-Testsysteme (95%iges Konfidenzintervall in Klammern) bei Einsatz zur Einzeltierdiagnostik

Test	Sensitivität %	Spezifität %	AUC
A	23,3	97,4	0,77
	(19,4–27,1)	(95,7–99,1)	(0,74–0,81)
B	32,2	98,6	0,79
	(27,9–36,4)	(97,3–99,9)	(0,76–0,82)
C	31,1	97,7	0,62
	(26,9–35,3)	(96,1–99,3)	(0,58–0,66)
D	30,2	96,8	0,64
	(26,0–34,4)	(94,9–98,7)	(0,61–0,68)

TABELLE 5: Notwendige Stichprobengröße für serologische Untersuchungen bei Herdengrößen bis zu 1000 Rindern unter Berücksichtigung der Testeigenschaften (untere Grenze des 95%igen Konfidenzintervalls) für die ELISA-Tests B und C (keine Kalkulation möglich für Test A und D)

ELISA-Test	Herdengröße (n)	Zu erwartende MAP-Ausscheider (n)	Stichprobengröße/Herde (n)	Mögliche falsch positive Rinder (n)
Test B	700	70	610	23
	800	80	612	23
	900	90	613	23
	1000	100	613	23
Test C	1000	100	935	46
Kotkultur	30	3	27	0
	100	10	36	0
	300	30	39	0
	800	80	41	0
	1000	100	41	0

Prüfleiter auf 54,00 Euro und für Befunderstellung/Rechnungslegung auf 39,60 Euro. Im Bereich Materialkosten betrug der kalkulierte Mittelwert für die ELISA-Testkitkosten 1,86 Euro je Probe. Für die Kotkultur liegt der Schwerpunkt auf den Materialkosten für die Kulturnährböden in Höhe von 8,95 Euro. Die Gerätekosten, ermittelt durch anteilige Abschreibung des ELISA-Readers und den auf die Untersuchungszeit bezogenen Anteil an den Gesamtabschreibungen, beliefen sich auf 0,39 Euro je Probe im ELISA-Test und 1,54 Euro je kultivierter Kotprobe. Der durch die längere Untersuchungszeit bedingte höhere anteilige Aufwand für Abschreibungen auf Hard- und Software sowie für Raumkosten belief sich für die Kotkultur auf 1,61 Euro beziehungsweise 1,84 Euro je Probe, während sich für die ELISA-Tests 0,42 Euro beziehungsweise 0,48 Euro ergaben. Insgesamt errechneten sich für eine im ELISA-Test untersuchte Probe Gesamtkosten in Höhe von 4,82 Euro und für die kulturelle Untersuchung einer Kotprobe in Höhe von 19,87 Euro.

Entsprechend ergeben sich erhebliche Unterschiede im Gesamtaufwand für die Laboruntersuchung je nach verwendetem Test. Bei Einsatz der Kotkultur ist dieser am geringsten, bei Verwendung von Test C am höchsten. Für eine Herdenprävalenzstudie auf Basis serologischer Tests ist mindestens mit Laboruntersuchungskosten von ca. 1,7 Mio. Euro (Test B) zu rechnen. Im Vergleich dazu würde eine Herdenprävalenzstudie auf der Basis der kulturellen Untersuchung von individuellen Kotproben Laboruntersuchungskosten in Höhe von ca. 0,5 Mio. Euro verursachen (Tab. 7).

Diskussion

Mit den vorliegenden Ergebnissen wird belegt, dass der MAP-Infektionsstatus unter Anwendung serologischer Testverfahren lediglich für sehr große Rinderherden ermittelt werden kann. Um in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Testsystems aussagefähige Ergebnisse zu erzielen, liegt die Mindeststichprobengröße bei $n = 608$ Rindern, sofern übliche Qualitätskriterien für eine Herdenprävalenzstudie zugrunde gelegt werden. Bei der Bewertung der Ergebnisse einzelner Herdenuntersuchungen wäre zu beachten, dass die suboptimalen Testspezifitäten eine erhebliche Zahl falsch positiver Ergebnisse bedingen können. Damit wird eine zuverlässige Einschätzung des Infektionsstatus für eine Herde immer dann nicht möglich sein, wenn die Zahl der posi-

tiven Befunde über null, jedoch unterhalb der Zahl der möglicherweise testbedingt falsch positiven Befunde liegt.

Bihmann et al. (2012) ermittelten unter 1271 testpositiven dänischen Milchviehherden mit einer durchschnittlichen Herdengröße von 152 Rindern eine mittlere scheinbare Prävalenz von 4,5 %. Unterstellt man eine ähnliche Seroprävalenz in Thüringer Rinderherden, so ist anzunehmen, dass in einem relevanten Anteil der untersuchten Herden eine Zahl an Seroreagenten festgestellt wird, die in dem kritischen Bereich zwischen null und der maximalen Zahl falsch-positiver Reagenten liegt, die noch zu einer Einstufung als negative Herde führen würde. Da zwischen wahr und falsch positiven Tieren nicht

unterschieden werden kann, wären Herden mit solchem Ergebnis nicht bewertbar.

In der vorliegenden Studie wurde vor der eigentlichen Berechnung der Stichprobengröße eine Re-Evaluierung der diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten der eingesetzten ELISA's unter Berücksichtigung der von Nielsen und Toft (2008) formulierten Anforderungen an eine ideale Testevaluierung vorgenommen:

- Die Testevaluierung fand in der eigentlichen Zielpopulation statt. Dabei handelte es sich um Rinderbestände, die seit mehreren Jahren am „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Thüringer Rinderbeständen“ teilnahmen. Die Bestandsgröße der in die Studie einbezogenen Bestände entsprach einem Querschnitt der Thüringer Rinderbestände.

- Die ausgewählten MAP-positiven Rinder wurden nach einem von der humoralen Immunantwort unabhängigen und intra vitam detektierbaren Merkmal als „infiziert“ klassifiziert, hier durch kulturelle Untersuchung auf MAP.

- Mit 460 Blutproben von MAP-positiven Rindern und 344 Proben von MAP-negativen Rindern aus historisch negativen Herden basierte diese Testsystemevaluierung im Gegensatz zu den Studien von Clark et al. (2008) und Fry et al. (2008), die auf wesentlich geringeren Stichproben MAP-positiver Rinder beruhten, auf einer ausreichenden und mit Collins et al. (2005) vergleichbaren Stichprobengröße.

TABELLE 6: Kalkulation und Aufschlüsselung der Kosten für die Antikörperbestimmung mit den analysierten ELISA-Testkits pro untersuchter Serumprobe im Vergleich mit der Kotkultur

Kostenart	Kosten je Probe (€)	
	ELISA	Kotkultur
Probeneingang	0,25	0,25
Probenbearbeitung	0,69	4,41
Prüfleiter	0,50	1,04
Verwaltung/Rechnungslegung	0,23	0,23
Summe Personalaufwand	1,67	5,93
ELISA Testkit	1,83	–
Einwegmaterial	0,03	0,25
Kulturnährböden	–	8,70
Summe Materialkosten	1,86	8,95
Geräte	0,39	1,54
Hard- und Software	0,42	1,61
Raumkosten	0,48	1,84
Summe Allgmeinkosten	1,29	4,99
Gesamtsumme	4,82	19,87

TABELLE 7: Kalkulation der Anzahl der zu beprobenden Rinder (n) und der Gesamtlaborkosten einer möglichen Herdenprävalenzstudie auf der Basis serologischer Testsysteme oder der Kotkultur für 574 Herden (nach Humphry et al. [2004] erforderliche Anzahl zu beprobender Herden für eine Herdensensitivität von 70 % bei einer Herdenspezifität von 90 %, einer Toleranz von 5 %, einer Sicherheit von 95 % und einer Herdenprävalenz von 10 %)

Test	Herdengröße (n)	Stichprobengröße/Herde (n)	Anzahl zu beprobender Rinder	Testkosten je Probe (€)	Gesamtlaborkosten (€)
ELISA B	700 ¹	610	350 140	4,82	1 687 674,80
ELISA C	1000 ¹	935	536 690	4,82	2 586 845,80
Kotkultur	300 ²	41	23 534	19,87	467 620,58

¹ Gemäß FreeCalc 2.0 erforderliche Herdenmindestgröße, um bei der Klassifizierung der Herden als MAP-positiv oder MAP-negativ Wahrscheinlichkeiten für den α -Fehler und den β -Fehler von $p < 0,05$ einzuhalten.

² Näherungswert für eine mittelgroße Thüringer Rinderherde.

Die hier vorgenommene Kalkulation der Stichprobengröße für eine aussagefähige serologische Herdenuntersuchung beruht auf Berechnungsverfahren, die einen imperfekten diagnostischen Test berücksichtigen. Insbesondere bei serologischen Untersuchungen auf MAP-Infektionen spielt dieser Ansatz eine wesentliche Rolle, da zum einen die Bildung von Antikörpern erst in einer späteren Erkrankungsphase einsetzt (Chiodini, 1996) und von der Aktivierung bestimmter T-Helferzellen abhängt (Coussens, 2004) und zum anderen die ELISA-Testsysteme beim Nachweis dieser Antikörper sehr unterschiedlich reagieren (Köhler et al., 2008a). Durch Verwendung der Kalkulationssoftware FreeCalc 2.0 (Cameron, 2001), welche eine Berücksichtigung der Testeigenschaften ermöglicht, konnte die erforderliche Stichprobengröße je Herde und die Zahl der möglichen testbedingt falsch positiven Reagenten berechnet werden.

Die vorgelegten Daten belegen, dass eine Beurteilung der Herdenprävalenz mit serologischen Methoden nur bei sehr großen Herden möglich ist. Der Test mit der in dieser Untersuchung besten Sensitivität und Spezifität (Test B) erlaubt zur Einschätzung des Herdenstatus den Einsatz in Beständen ab etwa 700 zu untersuchenden Rindern. Dabei ist zu berücksichtigen, dass hier nicht die Bestandsgröße als solche maßgebend ist, denn diese beinhaltet auch die für eine aussagefähige Untersuchung zu jungen Nachzuchttiere. Es muss vielmehr die Zahl der untersuchungsfähigen, also mindestens 24 Monate alten Rinder, berücksichtigt werden. In Thüringen erfüllen nur 34 Rinderbestände diese Voraussetzung, das sind 1,0 % der insgesamt 3248 Rinderhaltungen mit Tieren im Alter über 24 Monate (Stichtagsmeldung an die Thüringer Tierseuchenkasse zum 3. Januar 2011). Damit ist die Zahl der in Thüringen verfügbaren Bestände, in denen eine Feststellung des MAP-Status der Herde mit 95%iger Sicherheit auf der Basis serologischer Untersuchungen möglich wäre, viel zu gering.

Für kleinere Herden konnten bei Einhaltung der üblichen Wahrscheinlichkeiten für α - und β -Fehler keine aussagefähigen Stichprobengrößen kalkuliert werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Auffassung von Gierke und Köhler (2009), die den Einsatz von ELISA-Testverfahren lediglich zum Herdenscreening in großen Beständen empfehlen. Die Auffassung, dass die Antikörperbestimmung mittels ELISA ein geeignetes Testverfahren zur Herdenzertifizierung und zum Einsatz in Kontrollprogrammen sei, wie sie von

Collins et al. (2005), Franken (2005) und Fry et al. (2008) vertreten wird, kann für Herden unter 700 zu untersuchenden Rindern nicht bestätigt werden.

Für eine korrekte Schätzung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität verschiedener Tests ist eine Vergleichsmethode wichtig, die eine eindeutige Einstufung erlaubt, ob ein Tier infiziert ist oder nicht. Wenn diese Referenzmethode die Anforderungen an einen perfekten Test nicht erfüllt, was für die meisten ante-mortem-Tests gilt, sind Schätzungen der diagnostischen Sensitivität und Spezifität von Testverfahren nur Annäherungen, da der Fehler in der Vergleichsmethode in die Bewertung der zu prüfenden Methode eingeht (OIE, 2009). Die hier als

Referenzmethode verwendete kulturelle Untersuchung von Kotproben auf Festmedien mit anschließender Speziesdifferenzierung über eine Subkultur ohne Mycobactin oder mittels PCR ist hochspezifisch (~ 100 %), hat jedoch bezüglich infizierter Rinder eine deutlich unter 100 % liegende diagnostische Sensitivität. Bedingt wird das hauptsächlich durch die besondere Pathogenese der Paratuberkulose, denn erst nach einer langen Phase der Latenz wird MAP mit dem Kot ausgeschieden. Eine frühere Diagnose ließe sich nur durch Untersuchung des Zielgewebes von MAP, der Darmschleimhaut oder besser der Darmlymphknoten stellen, also post mortem. Solche Untersuchungen sind wegen des hohen Aufwands für die Beschaffung der Rinder, ihre pathologische Untersuchung und für eine so große Stichprobenzahl, die dieser Untersuchung zugrunde liegt, schwer zu leisten. Unsere Annahmen zur Sensitivität und Spezifität der Kotkultur beruhen auf den von Köhler et al. (2008a) veröffentlichten Daten, die von insgesamt 87 Tieren mit für Paratuberkulose typischen pathomorphologischen Veränderungen in 71 Fällen aus Organmaterial und in 64 Fällen aus Kot MAP isolieren konnten. Raizman et al. (2011) nahmen in ihrer Untersuchung ebenfalls eine 70%ige Sensitivität und 99,5%ige Spezifität der Kotkultur an. Im Gegensatz dazu gelang McKenna et al. (2005a) lediglich bei 36 von 160 in der Gewebekultur positiven Rindern ein MAP-Nachweis in der Kotkultur. In jener Untersuchung führten jedoch methodische Unterschiede in beiden Kulturmethoden zu dieser Differenz, denn die Gewebekultur wurde wie bei Köhler et al. (2008a) auf HEYM-Festnährböden durchgeführt, während die Kotkultur auf einer Flüssigkultur beruhte. Da in unserer Untersuchung für die Kotkultur HEYM-Festnährböden Verwendung fanden, griffen wir auf die Befunde von Köhler et al. (2008a) zurück. Die diagnostischen Sensitivitäten wurden in unserer Untersuchung „relativ zur Kotkultur“ angegeben. Wir sehen in dieser Vorgehensweise den Vorteil, dass die für die Bekämpfung der Paratuberkulose epidemiologisch entscheidenden Rinder, also diejenigen, die den Erreger mit dem Kot ausscheiden, die Bezugsgröße darstellen. Zweifellos haben alle infizierten Rinder das Potenzial, den Erreger auszuschleiden, was bei einer angestrebten Eradikation der Paratuberkulose in jedem Fall zu berücksichtigen wäre. Gegenwärtig steht jedoch eine Bewertung der epidemiologischen Situation in Thüringen und die Kontrolle der Ausbreitung der Paratuberkulose im Vordergrund. Um diese Fragestellung zu beantworten, erscheint die

in dieser Studie vorgeschlagene Vorgehensweise als angezeigt.

Die hier berechneten Sensitivitäten von 32,2 % für Test B und 30,2 % für Test D entsprechen in etwa denen, die Collins et al. (2005) für die ELISA-Testsysteme B und D und Clark et al. (2008) für Testkit D relativ zur Kotkultur erzielen konnten. Höhere Werte für die ELISA's C, B und D wurden in einer chilenischen Studie (Fry et al., 2008) ermittelt. Mit 41,5 % erwies sich dort Kit C als sensitivster Test. Höhere Sensitivitäten für Kit B mit 53,6 % und C mit 58,2 % bestimmten Köhler et al. (2008a). Die Ergebnisse der Antikörperbestimmung wurden in deren Untersuchung mit denen der Gewebe- und Kotkultur verglichen. Allerdings wurden insgesamt nur 110 Rinder aus zwei Herden mit einem hohen Anteil klinisch erkrankter Rinder untersucht. Die Prävalenz in der „Testpopulation“ lag mit 27,8 % deutlich höher als die durchschnittliche Prävalenz der hier untersuchten Population mit 9,5 %. In jener Untersuchung mit insgesamt fünf ELISA-Tests hatten zwei gegenwärtig in Deutschland zugelassene Tests (Test B und C) bei der Untersuchung klinisch kranker Rinder jeweils eine diagnostische Sensitivität von 77,4 % (CI: 62,7–92,1 %) und bei der Untersuchung klinisch inapparent infizierter und MAP ausscheidender Rinder eine solche von 33,9 % (CI: 22,1–45,7 %) für Test B beziehungsweise 41,9 % (CI: 29,7–54,3 %) für Test C. Da die von uns untersuchten Rinder alle aus Herden stammen, die sich aktiv am Thüringer Landesprogramm zur Bekämpfung der Paratuberkulose beteiligen, welches eine Merzung der Erregerausscheider vorsieht, überwog in unserer Studie der Anteil klinisch inapparent infizierter Rinder. Das erklärt die bestehende Übereinstimmung mit den von Köhler et al. (2008a) erzielten Ergebnissen für klinisch inapparent infizierte Rinder.

In den meisten bisher veröffentlichten Studien lagen die Spezifitäten für die hier untersuchten ELISA's über 99,0 %. Lediglich Clark et al. (2008), ermittelten für Kit D eine Spezifität von 97,8 %, die mit der hier berechneten für diesen Test vergleichbar ist.

Vergleicht man die Berechnungen der AUC für die Testsysteme B und C mit den von Köhler et al. (2008a) errechneten Werten von 0,909 bzw. 0,830, so bestätigt sich, dass der ELISA B die höchste Genauigkeit aufweist. Allerdings sind die von uns ermittelten Testvaliditäten wesentlich geringer und die Tests damit weniger exakt als von Köhler et al. (2008a) angegeben, was mit den bereits diskutierten Aspekten bezüglich der Prävalenz und der untersuchten Testpopulation im Zusammenhang steht.

Die häufig vertretene Auffassung, dass der Einsatz serologischer Tests durch die niedrigeren Kosten für den Einzeltest und den geringeren Zeitaufwand vergleichsweise niedrige Untersuchungskosten verursacht, wird durch die hohe erforderliche Stichprobenzahl und notwendige Beschränkung auf sehr große Rinderbestände relativiert. Ein Vergleich mit dem Verfahren der kulturellen Untersuchung von Kotproben zeigt, dass durch die niedrigere Stichprobengröße die Gesamtlaborkosten für eine Herdenprävalenzstudie weit unter denen einer solchen mit serologischen Tests liegen würden. Zudem erlaubt der kulturbasierte Untersuchungsansatz auch die Einbeziehung kleiner und mittlerer Bestände mit 30 und mehr untersuchungsfähigen Rindern in eine Herdenprävalenzstudie.

Schlussfolgerung

Im Ergebnis dieser Studie ist festzustellen, dass die zurzeit zugelassenen serologischen Testsysteme für die Feststellung des MAP-Status von sehr großen Rinderherden bedingt geeignet sind. Beschränkungen ergeben sich aus der notwendigen Stichprobengröße und aus der Bewertung der positiven Testergebnisse. Für die Beurteilung von kleineren Herden sind die diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten der ELISA-Tests nicht ausreichend. Für die Durchführung einer validen Herdenprävalenzstudie bezüglich der Paratuberkulose eignen sich die gegenwärtig verfügbaren serologischen Tests nicht.

Die Kenntnis der Testeigenschaften ist von entscheidender Bedeutung für die exakte Berechnung von ausreichenden Stichprobengrößen. Voraussetzung ist jedoch, dass die Testeigenschaften unter solchen Bedingungen ermittelt werden, die denen der Zielpopulation entsprechen.

Die notwendige Stichprobengröße bedingt in hohem Maße die Kosten einer Herdenuntersuchung.

Danksagung

Die Autoren danken den Firmen ID Vet, Montpellier, F, und Prionics AG, Schlieren-Zurich, CH, für die kostenlose Bereitstellung von Testkits für diese Untersuchungen. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Thüringer Tierseuchenkasse möchten wir für die Probennahme im Rinderbestand und die technische Durchführung der Laboruntersuchungen sowie den beteiligten Rinderhaltern für die Unterstützung des Projekts danken.

Conflict of interest: Die Autoren erklären, dass keine geschützten finanziellen, beruflichen oder anderweitigen Interessen an einem Produkt oder einer Firma bestehen, welche die in dieser Veröffentlichung genannten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

- Bihmann K, Nielsen SS, Toft N, Ersbøll K (2012):** Spatial differences in occurrence of paratuberculosis in Danish dairy herds and in control programme participation. *Prev Vet Med* 103: 112–119.
- Cameron (2001):** FreeCalc Software Version 2. <http://www.ausvet.com.au> (23. März 2011).
- Cameron AR, Baldock FC (1998):** A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev Vet Med* 34: 1–37.
- Chi L, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP (2002):** Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med* 55: 137–153.
- Chiodini RJ (1996):** Immunology: Resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 313–343.
- Christensen J, Gardner IA (2000):** Herd-level interpretation of test results epidemiologic studies of animal diseases. *Prev Vet Med* 45: 83–106.
- Clark DL, Koziczowski JJ, Radcliff RP, Carlson RA, Ellingson JL (2008):** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus enzyme-

linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 91: 2620–2627.

- Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH (2005):** Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 685–692.
- Coussens (2004):** Model for immune response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect Immun* 72: 3089–3096.
- Englund S, Ballagi-Pordány A, Bölske G, Johansson KE (1999):** Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33: 163–171.
- Franken P (2005):** Paratuberculosis control in the Netherlands: the target and an overview of activities. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen Denmark 2005, 15–19.
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit (2010):** Amtliche Methodensammlung, Stand April 2010, Paratuberkulose [zitiert vom 04. Mai 2011]: 277–208 (www.fli.bund.de/de/startseite/publikationen/amtliche-methodensammlung.html).
- Fry MP, Kruze JU, Collins MT (2008):** Evaluation of four commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds. *J Vet Diagn Invest* 20: 329–332.
- Gierke F (2009):** Ermittlung von Einflussfaktoren auf die intravitale Diagnostik der Paratuberkulose. Berlin, FU, Veterinärmed. Fak., Diss.
- Gierke F, Köhler H (2009):** Tenazität, Ausscheidung und Übertragungswege des Paratuberkuloseerregers – Konsequenzen für die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen. *Praktischer Tierarzt* 90: 1169–1178.
- Humphry RW, Cameron A, Gunn GJ (2004):** A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. *Prev Vet Med* 65: 173–188.
- Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, Martin G (2008a):** 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, Gierke F, Möbius P (2008b):** Paratuberculosis – current concepts and future of the diagnosis. *Magyar Allatorv Lapja* 130 Suppl. I: 67–69.
- McKenna SLB, Keefe GP, Barkema HW, Sockett DC (2005a):** Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol* 110: 105–111.
- McKenna SLB, Sockett DC, Keefe GP, McClure J, VanLeeuwen JA, Barkema HW (2005b):** Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 17: 463–466.
- Nielsen SS, Toft N (2008):** Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and fecal culture techniques. *Vet Microbiol* 129: 217–235.
- OIE Organisation Mondiale de la Santé Animale (2009):** Principles and Methods of Validation of diagnostic assays for infectious diseases. OIE Terrestrial Manual, 6th ed., Paris.
- Raizman EA, Wells SJ, Muñoz-Zanzi CA, Tavornpanich S (2011):** Estimated within-herd prevalence (WHP) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a sample of Minnesota dairy herds using bacterial culture of pooled fecal samples. *Can J Vet Res* 75: 112–116.
- Sweeney RW (1996):** Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 12: 305–312.
- Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K (2001):** WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec* 148: 567–572.
- Tiwari A, Van Leeuwen JA, McKenna LB, Keefe GP, Barkema HW (2006):** Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J* 47: 874–882.

Korrespondenzadresse:

Dr. med. vet. Karsten Donat
 Thüringer Tierseuchenkasse, AdöR
 Victor-Goerttler-Straße 4
 07745 Jena
 kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

2.2.2 Donat K, Schlotter K, Erhardt G, Brandt HR (2014): Prevalence and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. Vet Rec 174: 119 (Studie 6)

Paper

Prevalence of paratuberculosis in cattle and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests

K. Donat, K. Schlotter, G. Erhardt, H. R. Brandt

Commercial ELISA kits are widely used in the diagnosis of paratuberculosis of dairy cattle. It is critically important to understand the influences on these test results and their relation to faecal culture (FC) results in order to interpret the findings and to make decisions concerning serial testing and control measures. A total of 1021 cattle (423 FC positive, 598 FC negative) from 14 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) positive herds were tested with four ELISA systems and FC simultaneously to calculate the kappa coefficients for the agreement of the different ELISA systems as well as find influencing factors. For the agreement of FC and ELISA, the kappa coefficients were low and ranged from 0.19 to 0.24, whereas, results of the different ELISA were consistently high (0.74–0.90). Agreement with FC was enhanced with the duration of control ($P \leq 0.001$) and the lactation number ($P \leq 0.01$), and reduced with within-herd prevalence ($P \leq 0.001$). There were substantial differences in the detection rate of low (15–24 per cent) and high (85–100 per cent) MAP shedders. In conclusion, the factors shown to influence test sensitivity, should be taken into account for validation and interpretation of ELISA tests. The benefit of serial ELISA testing is low.

Introduction

Paratuberculosis is a progressive enteritis in ruminants, which causes high economic losses on affected farms by reduction of milk yield (Beaudeau and others 2007, Raizman and others 2009), a threefold higher risk of premature culling (Hendrick and others 2005) and impaired fertility (Marcé and others 2009). Furthermore, a zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) as a presumed agent in the pathogenesis of human granulomatous enteritis, Crohn's Disease, is discussed (Feller and others 2007). The pathogens resistance to chemical disinfectants (Chiodini and others 1984) and milk pasteurisation (Chiodini and Hermon-Taylor 1993, Hammer and others 2003) is high. Because of these facts, the disease negatively affects not only animal health, milk yield, and animal welfare, but also food hygiene and human health.

Measures to limit the spread of the disease between herds and to reduce prevalence of paratuberculosis within herds are being focused on the dairy and beef industry, and control programmes have been initiated in different countries (Wells 2005, McKenna and others 2006a, Kudahl and others 2008). Clinical signs only tend to develop

after a long-lasting subclinical period (2–10 years) during which currently available tests show varying results and an insufficient sensitivity (McKenna and others 2005). The humoral immune response, and consequently, the synthesis of specific antibodies depends on the stage of the disease, and is more pronounced in clinically affected individuals than in those with symptomless infections or in early stages of the disease (Köhler and others 2008a). Antibodies are synthesised only after the activation of a specific immune cell subtype, T2-helper cells (Coussens 2004). Therefore, the diagnostic sensitivity of test systems to detect MAP antibodies in serum is low (McKenna and others 2005) and varies for milk between 21 per cent and 61 per cent (Nielsen and Toft 2008). In relation to faecal culture, it is about 30 per cent (Collins and others 1990) even though faecal culture itself can detect about 50–70 per cent of MAP-infected cattle (Stabel 1997, Köhler and others 2008b, Raizman and others 2009). Nonetheless, faecal culture is the most reliable method for the diagnosis of paratuberculosis in living animals (Köhler and others 2008b).

Despite the low sensitivity, different ELISA tests are widely used for diagnosis of paratuberculosis in epidemiological studies and control programmes in the USA (Collins and others 2005) and Europe (Kudahl and others 2008), because it allows high throughput and automation of the test procedure at lower costs compared to faecal culture (Homuth 2002, Kalis and others 2002). Hence, knowledge of how the different ELISA tests compare with one another, and the relation of ELISA testing to faecal culture is desirable to compare results of different ELISA tests.

Test performance can be improved by using several tests and combining their results (serial or parallel testing). For this, the tests used and the sequence of testing should be chosen according to the aim of testing and the consequence of the test result. For the use in paratuberculosis control, Boettcher and Gangl (2004) suggested a serial ELISA testing with a high sensitive ELISA test and a lower specificity followed by a high specific ELISA test with a diminished sensitivity.

Veterinary Record (2013)

doi: 10.1136/vr.101533

K. Donat, Dr. med. vet.

K. Schlotter, Dr. med. vet.
Thuringian Animal Diseases Fund,
Thuringian Animal Health Service,
Victor-Goerttler-Str. 4, Jena D-07745,
Germany

K. Schlotter,
Bavarian Animal Health Service e. V.,
Senator-Gerauer-Straße 23,
Grub/Poing D-85586,
Germany

G. Erhardt, Prof. Dr. med. vet.

H. R. Brandt, apl. Prof. Dr. agr.
Institute of Animal Breeding and Genetics,
Justus Liebig University, Ludwigstraße
21b, Gießen D-35390, Germany;

E-mail for correspondence:
kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

Provenance: not commissioned;
externally peer reviewed

Accepted December 4, 2013

Several national voluntary control programmes included a serial testing with an ELISA test as a screening test and faecal culture or PCR as an appeal test (McKenna and others 2006b).

Distinct differences in sensitivity and specificity of the tests used make this approach more effective, whereas a high agreement of test results diminishes the benefit of serial or parallel testing.

We hypothesised a high level of agreement between the commercial ELISA test kits and a low agreement concerning the results of faecal culture and ELISA tests. Furthermore, this study aimed to identify test-independent influences affecting the agreement of tests.

Material and methods

Study population

A dataset of 1021 German Holstein herdbook cows originating in 14 farms was available. All animals were routinely screened for MAP status in 2009 as part of the voluntary control programme in Thuringia (Donat and others 2012) by faecal culture, where 423 faecal culture MAP-positive and 598 MAP-negative cows were selected, which were sampled for faecal culture between April and November 2009, and were still alive at the end of the cultivation process. Blood samples for ELISA tests were taken shortly after the final assessment of the faecal culture during July 2009 and February 2010. All negative control animals were chosen from the same farm, having the same age and, if available, the same sire as the positive animals. The average number of tested cows per herd was 76 (9–344).

The herds joined the 'Paratuberculosis Control Program in Thuringian Cattle Herds' which is organised by the Thuringian Animal Health Service and includes, among other measures, annual screenings of all cows of the herd for MAP by faecal culture, culling of culture-positive cows as soon as possible, hygienic measures to avoid infections of youngstock, the certification of unsuspected herds, and regulations concerning animal transfers into the herd.

The within-herd prevalence (P) used in this study was calculated from the results of the annual herd testing in the years 2008–2010 by dividing the number of faecal culture-positive results by the number of all tested faecal samples. This given period includes the years immediately after the conversion of the diagnostic approach from serology to faecal culture, and therefore, an effect of control measures on P could not be expected. In recent years, first effects on incidence reduction are noticeable and confirm the enhanced diagnostic efforts. The three-year period under consideration covers one generation interval in dairy cows and minimises short-term effects on P. P refers only to the mature cows of the herd (youngstock is excluded from the annual screening), and is representative for the control programme herds. The onset of the control measures was defined by signing the agreement of control with the Animal Health Service. The whole control period, as well as the duration of the faecal culture-based herd testing from the start till the year 2011, is given in Table 1. The lactation number of each animal tested was determined using the German Database for Animal Origin (HI-Tier).

TABLE 1: Within-herd prevalence, duration of control measures and of faecal culture-based herd testing in 14 herds of the study

Herd	Within-herd prevalence (%)	Duration of control		Faecal culture-based herd testing	
		Begin	Years	Begin	Years
A	38.1	2000	11	2008	3
B	19.3	2001	10	2007	4
C	2.3	2001	10	2007	4
D	3.7	2000	11	2004	7
E	9.9	2007	4	2007	4
F	3.9	2002	9	2005	6
G	5.2	2001	10	2006	5
H	4.4	2006	5	2008	3
I	4.2	2001	10	2008	3
J	5.4	2001	10	2004	7
K	12.3	2002	9	2004	7
L	9.1	2001	10	2005	6
M	4.1	2003	8	2009	2
N	53.2	2007	4	2007	4

Sample handling

Faecal culturing was done according to the official manual of diagnostic procedures published by the Friedrich-Loeffler-Institut, the Federal Research Institute of Animal Health, in 2010 (FLI 2010), modified as follows for routine screenings of whole herds:

- After transportation to the laboratory of the Thuringian Animal Health Service by a courier service within 24 h after sampling, all faecal samples were stored at -20°C until cultivation to avoid undesired bacterial and fungal growth, and to ensure a consistent sample handling.
- The regular decontamination period of 24 h was extended to 48 h when a high amount of undesired bacterial and fungal growth was expected due to the experience from former samples of cows from the same herd, and for samples which cultivation had to be repeated due to contamination.
- Due to the high amount of samples for routine annual screenings (approximately 30,000/year), the inoculation was limited to one Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) slant initially, followed by one or more repeated cultivations when bacterial and fungal growth of contaminants suspected overgrowth and reduced interpretability of the culture.

Samples were characterised as MAP positive or MAP negative using a conventional IS900 PCR (Englund and others 1999). The level of shedding was categorised semiquantitatively by the amount of cfu on the surface of culture medium with 1–10 cfu as 'low', 11–50 cfu as 'moderate' and 51–100 cfu as 'high'. If more than 100 cfu were on the surface, growth was characterised as 'very high'.

Whole-blood samples were taken by the veterinarians of the Thuringian Animal Health Service during regular visits shortly after finishing the cultivation from the caudal tail vein using an EDTA-Kabevette (Primavette V EDTA, Kabe Labor Technik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, D). The tubes were transported into the laboratory of the Thuringian Animal Health Service within 5 h and centrifuged for 5 min at $840\times g$ (Rotanta TR 440, Hettich, Tuttlingen, D). Plasma was stored at -20°C until analysed. Four different commercial ELISA systems which were licensed in Germany at the time of the serological survey were used for the detection of MAP antibodies:

- ▶ CATTLETYPE MAP Ab, (ELISA A, Labordiagnostik GmbH Leipzig (LDL), Leipzig, D),
- ▶ POURQUIER ELISA Paratuberculosis serum and milk (ELISA B, Institut Pourquier SAS, Montpellier, F),
- ▶ ID Screen Paratuberculosis Indirect ELISA kit (ELISA C, ID Vet, Montpellier, F)
- ▶ PARACHEK 2 (ELISA D, Prionics AG, Schlieren-Zurich, CH).

ELISA tests were accomplished according to the manufactures' instructions. If different incubation periods between the separate reaction steps were reported, the shortest was selected. Cut-offs recommended by the manufacturer were used.

Statistical analysis

Calculation of kappa coefficients

Kappa coefficients were calculated for the agreement between faecal culture and the four ELISA systems and for the agreement between the different ELISA systems among each other, respectively. All computations were made using the SAS statistical package for Windows (SAS Systems for Windows V.9.00; SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) The following ranges were considered for the interpretation of the kappa coefficient (Grouven and others 2007): <0.20 : slight level of agreement; 0.21–0.40: low level of agreement; 0.41–0.60: moderate agreement; 0.61–0.80: substantial agreement; 0.81–1.00: excellent agreement. For each ELISA test, suspect results according to manufactures instructions were assessed to be missing.

Determination of influencing factors on the agreement between faecal culture and ELISA results

To investigate the influence of the lactation number of cows, the duration of the overall control period and the faecal culture-based control programme, and the within herd prevalence on the agreement between

faecal culture and ELISA results a binary trait ('1' for agreement of tests both positive or negative, or '0' for no agreement of tests) was built and analysed with the GLIMMIX procedure of SAS using a binomial distribution and the logit link function. Besides the farm, all above mentioned effects were included as fixed effects and classified into 3–4 classes as can be seen in the results. In this analysis, an animal was defined as ELISA positive only when all four ELISA tests were positive. The lactation number was available for 966 of the total 1021 animals.

Calculation of sensitivity (Se) according to the level of shedding

The basis of the calculation of the validation parameters was formed by the results of 423 faecal culture-positive cattle from 14 MAP-positive herds. The sensitivities of the different ELISA systems were determined relative to the results in our modified faecal culture with consideration of the level of shedding, using the programmes WIN EPISCOPE V.2.0 (www.clive.ed.ac.uk, Thursfield and others 2001), SPSS V.11.5 for windows (SPSS, Illinois, Chicago, USA) and Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D). Samples tested suspicious in ELISA were assessed to be missing.

Results

The within-herd prevalence of the farm, the respective duration of the overall control period and the faecal culture-based control programme are given in Table 1.

Kappa coefficients

As shown in Table 2, the Kappa coefficients for the agreement of faecal culture and ELISA ranged from 0.19 (ELISA A, slight level of agreement) to 0.24 (ELISA B, low level of agreement) resulting in an agreement of 64–66 per cent. The agreement of results between the different ELISA kits was high, the kappa coefficients ranged from 0.74 to 0.90 with an agreement of 93–97 per cent.

Influencing factors on the agreement between faecal culture and ELISA results

Control period

The estimated percentage of agreement between tests and the number of animals within the classes of the control period in years are shown in Table 3. There were significant differences among the estimated means of the agreement between faecal culture and ELISA ($P \leq 0.05$). The longer the time of participation in the control programme, the better the agreement. Farms which were enrolled in the paratuberculosis control programme only for four years, had an estimated agreement of 59.3 per cent while this increased to 68.3 per cent in herds with a control period of at least 10 years.

In agreement with the results of the influence of the control period, there were significant differences ($P \leq 0.001$) between the estimated faecal culture/ELISA agreement means when considering the time variable. The longer the faecal culture-based control period, the better the agreement of faecal culture and serology (Table 4).

TABLE 2: Kappa coefficient (above diagonal) and percentage of agreement (below diagonal, data shown as percentages) for each combination of test pairs

	Faecal culture	ELISA A	ELISA B	ELISA C	ELISA D
Faecal culture	41.4	0.19	0.24	0.21	0.22
ELISA A	64.4	13.7	0.77	0.74	0.79
ELISA B	65.9	93.8	18.3	0.90	0.84
ELISA C	64.5	92.8	97.1	18.7	0.80
ELISA D	65.4	94.5	95.2	94.0	17.6

On the diagonal the percentages of test-positive individuals of the different tests are specified.

TABLE 3: Estimated agreement percentage for classes of duration of control period

Duration of the control period (years)	Number of animals (farms)	Agreement percentage (significance $P \leq 0.05$)
4	361 (2)	59.3
5–9	224 (4)	67.9
≥ 10	436 (8)	68.3

TABLE 4: Estimated compliance percentage for classes of the duration of the faecal culture-based control period

Duration of the faecal culture-based control period (years)	Number of animals (farms)	Agreement percentage (significance $P \leq 0.001$)
2–3	208 (4)	51.0
4	514 (5)	63.0
≥ 5	299 (5)	78.3

Within-herd prevalence

The differences in the agreement of tests between the MAP prevalence classes were significant ($P \leq 0.001$). Lower within-herd prevalence are associated with higher agreement (Table 5), except in the class with prevalence less than five per cent.

Number of lactation

From each lactation number, approximately the same number of cows was considered for the calculation (192–260 individuals). The influence of lactation number of cows on the agreement percentage is significant ($P \leq 0.01$). Cows in higher lactations show a significant higher agreement between tests (Table 6), except for lactation number 1.

Influence of the level of shedding on ELISA test results

For the 423 faecal culture-positive cows, the level of shedding was categorised as 'low' in 362 cows (85.0 per cent), in merely 31 individuals (7.3 per cent) it was estimated as 'high' or 'very high' (Fig 1). It is noticeable that there are substantial differences in the detection rate of MAP antibodies between the separate categories. While the ELISA systems used detected only 15.2 per cent (ELISA A) to 24.3 per cent (ELISA B) of the faecal culture-positive individuals categorised as 'low shedders', the detection rate gained to 85.7 (ELISA A) to 100 per cent (ELISA B, C and D) in 'high shedders'. In cows which were classified as 'very high' shedders, the detection rate was between 70.6 (ELISA A) and 76.5 per cent (ELISA B, C, and D). Using these frequencies for sensitivity calculation within the shedder classes, the relative diagnostic sensitivity of the ELISA tests in relation to faecal culture varies from 15.6 (ELISA A) to 100 per cent (ELISA B, C and D; Fig 1). Among the faecal culture-negative cows, the percentage of ELISA positives ranges from 6.4 (ELISA A) to 11.5 (ELISA C) per cent. Detailed data is given in Table 7.

Discussion

Our study demonstrates substantial influences of test independent factors on the diagnostic characteristics of currently available tests to diagnose paratuberculosis in living animals: We were able to substantiate influences of the control programme duration, the within-herd prevalence, and the number of lactation on the agreement of cultural

TABLE 5: Estimated agreement percentage for classes of the within-herd MAP prevalence

MAP prevalence (per cent)	Number of animals (farms)	Agreement percentage (significance $P \leq 0.001$)
<5	200 (6)	70.5
5–10	168 (3)	82.1
11–20	197 (2)	67.5
≥ 21	456 (3)	55.3

MAP, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

TABLE 6: Estimated agreement percentage for classes of the number of lactations at time of testing

Number of lactations	Number of cows	Agreement percentage (significance $P \leq 0.01$)
1	215	66.5
2	260	60.4
3	192	72.4
≥ 4	239	73.6

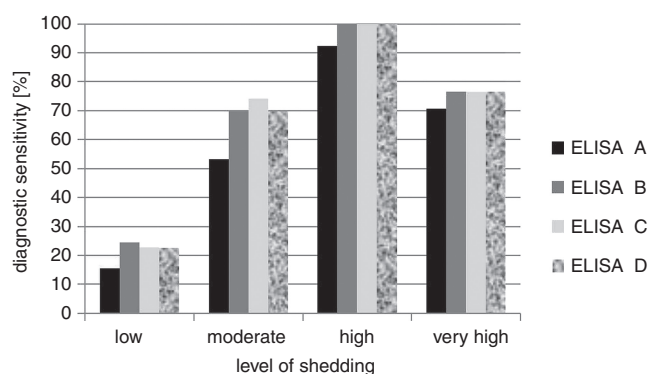


FIG 1: Relative sensitivity of the different ELISA test systems with respect to the level of shedding

and serological test results. For the latter, all four ELISA tests used had to be positive. Furthermore, we found considerable differences of the ELISA test diagnostic sensitivity with respect to the level of MAP shedding.

The diagnostic specificity of faecal culture has been accepted as 100 per cent (Whitlock and others 2000), published data about its diagnostic sensitivity range between 23 per cent and 74 per cent (Nielsen and Toft 2008). We used the cultivation method, which is authorised by the Friedrich-Loeffler-Institut, the Federal Research Institute of Animal Health (FLI 2010) and achieves a sensitivity of up to 70 per cent, calculated from data published by Köhler and others (2008a). The use of only one single HEYM slant instead of three reduced the sensitivity of faecal culture by the factor 0.6 (Gierke 2010), and the storage at -20°C for one month by the factor 0.87 (Raizman and others 2011).

We used plasma from cows which were previously tested positive by faecal culture. This is a strength of our study, because this approach enabled us to compensate for the lack of faecal culture sensitivity and uncertainties concerning the comparison standard. Therefore, the sensitivity of the commercial ELISA kits is given as relative sensitivity in relation to our faecal culture. Because in the herds enrolled in our control programme, cows with positive test results are usually culled without delay, the study population is limited mainly to animals which had not yet showed clinical signs (Whitlock and others 2000).

One thousand and twenty-one individuals were selected systematically from 14 herds, according to the sampling protocol of another study (Küpper and others 2012) that focussed on genetic aspects. The selection of a matching pair, a faecal culture positive and a related negative one from one herd, minimised influences of unknown genetic aspects. Furthermore, the use of animals from 14 herds minimised a

herd bias and allowed the calculation of the influence of herd-specific factors.

The high levels of agreement among the four ELISA tests for all ELISAs are in contrast with the results of McKenna and others (2005) and Gierke (2010), who found a poor agreement among the ELISAs they evaluated. This may be due to the selection of the ELISAs we approved. All tests are licensed in Germany, are approved to have a good specificity (>99 per cent) and use a preabsorption step with *Mycobacterium phlei* to reduce unspecific reaction. Donat and others (2012) redetermined the specificity of the ELISA tests within the study population for infectious cattle with values of 97.4, 98.6, 97.7 and 96.8 per cent for the test A–D, respectively. Nielsen and Toft (2008) reviewed studies of a number of commercial and in-house ELISAs, and observed specificities for infectious cattle in the range between 0.41 and 1.00. Therefore, the procedure for licensing in Germany may have improved the agreement among ELISA tests.

By contrast, the agreement between all four ELISAs and faecal culture was poor, with kappa values ranging from 0.19 to 0.24. These results are in accordance with other studies (Pinedo and others 2008, Pradhan and others 2009). Mainly the low detection rate of low shedders by the ELISA tests diminished the agreement of faecal culture and serological testing in our study. The sensitivity of the ELISA depends on the population of cattle tested and their stage of infection (Collins and others 2005). Our calculation of the ELISAs diagnostic sensitivity in relation to our faecal culture of 15.2–24.4 per cent for low shedders supports this concept. The increase of sensitivity in high shedders (85.7–100 per cent) is in line with the report of van Weering and others (2007), who found a sensitivity of ELISA B for predominantly high shedders of 89 per cent.

Considering the fact that the immune response to the MAP infection is initially cell-mediated and followed by humoral immunity in later stages during the course of the disease, the efficiency of an ELISA would depend on the prevalence of animals among each stage of disease (Whitlock and Buergelt 1996). ELISAs have a higher sensitivity in high shedders compared with low shedders (Whitlock and others 2000). Generally, the same subgroup of faecal culture-positive individuals had a negative result in each of the four ELISA tests (data not shown). Obviously, they may not have detectable antibodies, and therefore, the negative test outcome might be likely considered a result of the missing humoral immune reaction and not as a weakness of the ELISA test itself.

From the widely accepted concept of the pathogenesis and the onset of the humoral immune response in paratuberculosis we can derive from our data that testing by faecal culture enables the detection of MAP-infected animals at an earlier stage of disease and with higher sensitivity than serological testing. Only 22.6 (ELISA A) to 30.2 (ELISA B) per cent of the faecal culture-positive animals were detected by the serological testing. Compared with a more sensitive

TABLE 7: ELISA test results of four ELISA tests in different categories according to faecal culture test results

MAP status		Faecal culture									
		Positive								Negative	
Cows (n)		Very high		High		Moderate		Low		598	
		n	Per cent	n	Per cent	n	Per cent	n	Per cent	n	Per cent
A	Positive	12	70.6	12	85.7	17	51.5	55	15.2	38	6.4
	Suspicious	0	0	1	7.1	1	0.3	9	2.5	14	2.3
	Negative	5	29.4	1	7.1	15	45.5	298	82.3	546	91.3
B	Positive	13	76.5	14	100	23	69.7	88	24.3	59	9.9
	Suspicious	0	0	0	0	0	0	4	1.1	6	1.0
	Negative	4	23.5	0	0	10	30.3	270	74.6	533	89.1
C	Positive	13	76.5	14	100	23	69.7	82	22.7	69	11.5
	Suspicious	0	0	0	0	2	0	3	0.8	6	1.0
	Negative	4	23.5	0	0	8	30.3	277	76.5	523	87.5
D	Positive	13	76.5	14	100	23	69.7	82	22.7	62	10.4
	Suspicious	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	Negative	4	23.5	0	0	10	30.3	280	77.3	536	89.6

MAP, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

faecal culture method, the performance of the ELISA tests would be further reduced.

Our findings are in line with the results of Sweeney and others (2006) who found negative ELISA results in 174 (62 per cent) of their 282 faecal culture-positive cows, and 52 (18 per cent) cows became ELISA positive later than faecal culture-positive, whereas only 12 cows showed their first positive result in the ELISA test. This concept is in contrast with the findings of Nielsen (2008), who postulated that MAP antibodies were generally detected prior to the start of bacterial shedding in a Danish study. This may be due to the limited specificity of the used ELISA of 90 per cent and its high sensitivity of 80 per cent (Nielsen and Toft 2008). Use of ELISAs which are designed for high sensitivity at the expense of lower specificity may have led to an increased number of false positive test results (Köhler and others 2008a) and, therefore, are not reliable.

From the marked differences in relative sensitivity of ELISAs among the subgroups of MAP positives, we concluded that the assessment of the diagnostic value of ELISAs requires data about composition of the test panel regarding the level of shedding. If the test panel includes mainly high shedders or clinically diseased individuals, high values for sensitivity will result, and a high proportion of low shedders will lead to a low sensitivity, respectively. These results are consistent with those of former studies (Whitlock and others 2000, Sweeney and others 2006, Gierke 2010), which demonstrated a significant decrease in the frequency of positive ELISA results in low shedders compared to heavy shedders.

To the author's knowledge, this is the first study which substantiates changes in the agreement of diagnostic tests according to the progress of a control programme and changes of the within-herd prevalence in a herd-level survey. The longer the establishment of the control programme in a herd, the higher the estimated means of the agreement between faecal culture and ELISA test result (Table 4). This increasing agreement can be explained by the rising number of faecal culture-negative individuals, which are mostly negative in serological tests, too, and therefore, have a high impact on the agreement percentage.

In high-prevalence herds, we found lower estimates of the agreement than in low-prevalence herds. We suppose that the prevalence influences the agreement in the same way as the control programme duration. If the prevalence decreases further below five per cent, the diagnostic sensitivity of the faecal culture drops, because the isolation of MAP from faeces of animals in early stages of disease is less sensitive than from clinically diseased individuals (Socckett and others 1992, Ristow and others 2007, Gierke 2010), and therefore, depends on the within-herd prevalence (Collins and others 1990). In this situation, with diminished sensitivity of faecal culture and low sensitivity of the ELISA tests (Table 5), the uncertainty of the test results increases, and thereby agreement decreases. This confirms the results of Sweeney and others (2006) and Gierke (2010), who found in one herd with stringent implementation of control measures including the rapid selection of MAP shedders, a lower sensitivity of ELISA tests compared with a herd without control measures.

The increasing agreement in higher lactations may depend on the rising number of MAP-infected, antibody-positive cows, which are positive both in faecal culture and ELISA test. Results of serological tests depend on the age of tested individual: Older infected animals show more frequently positive ELISA test results than younger ones (van Schaik and others 2003, Nielsen and Toft 2006, Hinger and others 2008, Gierke 2010, Küpper and others 2012).

We conclude, that in addition to the known factors 'age' and 'level of shedding', the duration of the implemented control measures and the within-herd prevalence significantly influence the performance of ELISA tests, measured as agreement to the faecal culture test result. Because of the agreement between the four ELISA tests, the perceptible effects of the epidemiological situation and the composition of the study population, we suppose that factors which are independent of the test itself can be of importance to the sensitivity of ELISA tests. This should be taken into account for test validation and interpretation of given sensitivity and specificity values for a particular ELISA test. Because of the good agreement of the ELISA tests, a sequential serological testing using a combination of the presently available commercial

ELISA test kits would not improve the performance of testing. A serial testing with an ELISA as screening test, and faecal culture, or PCR, as appeal test, is hampered by the low sensitivity of the ELISA tests.

Acknowledgements

The present study is part of the 'Paratuberculosis control programme in Thuringian dairy herds' of the Thuringian Ministry of Social Welfare and Health, which is financed by the Thuringian Animal Disease Compensation Fund. The authors would like to thank Ute Schau and her team for doing the faecal culture and the ELISA tests and Julia Küpper, Elke Kaiser and Annela Soschinka for their assistance.

References

- BEAUDEAU, F., BELLARD, M., LJOLY, A. & SEEGERS, H. (2007) Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Veterinary Research* **38**, 625–634
- BOETTCHER, J. & GANGL, A. (2004) *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-combined serological testing and classification of individual animals and herds. *Journal of Veterinary Medicine Series B, Infectious diseases and Veterinary Public Health* **10**, 443–448
- CHIODINI, R. J. & HERMON-TAYLOR, J. (1993) The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **5**, 629–631
- CHIODINI, R. J., VAN KRUIJNINGEN, H. J. & MERKAL, R. S. (1984) Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell University College of Veterinary Medicine* **74**, 218–262
- COLLINS, M. T., KENEFFICK, K. B., SOCKETT, D. C., LAMBRECHT, R. S., MCDONALD, J. & JORGENSEN, J. B. (1990) Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 2514–2519
- COLLINS, M. T., WELLS, S. J., PETRINI, K. R., COLLINS, J. E., SCHULTZ, R. D. & WHITLOCK, R. H. (2005) Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**, 685–692
- COUSSENS, P. M. (2004) Model for immune response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infection and Immunity* **72**, 3089–3096
- DONAT, K., SCHAU, U., SOSCHINKA, A. & KÖHLER, H. (2012) Herd prevalence studies of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in cattle using serological tests: opportunities, limitations and costs. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* **125**, 361–370
- ENGLUND, S., BALLAGI-PORDÁNY, A., BOELSKE, G. & JOHANSSON, K. E. (1999) Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* **33**, 163–171
- FELLER, M., HUWILER, K., STEPHAN, R., ALTPETER, E., SHANG, A., FURRER, H., PYPFFER, G. E., JEMMI, T., BAUMGARTNER, A. & EGGER, M. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* **9**, 607–613
- FRIEDRICH-LÖFFLER-INSTITUT (FLI) (2010) Amtliche Methodensammlung des Friedrich-Löffler Instituts. 271–285. www.fli.bund.de/fileadmin/dam_upload/publikationen/Methodensammlung_2010-07-07.pdf
- GIERKE, F. (2010) Detection of Factors Influencing the Intra Vitam Diagnosis of Paratuberculosis [in German]. Berlin, Mensch & Buch Verlag
- GROUVEN, U., BENDER, R., ZIEGLER, A. & LANGE, S. (2007) The kappa coefficient [in German]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **132**(Suppl 1), 65–68
- HAMMER, P., KIESNER, C., WALTE, H. G., KNAPPSTEIN, K. & TEUFEL, P. (2003) Heat resistance of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **54**, 275–303
- HENDRICK, S. H., KELTON, D. E., LESLIE, K. E., LISSEMORE, K. D., ARCHAMBAULT, M. & DUFFIELD, T. F. (2005) Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **227**, 1302–1308
- HINGER, M., BRANDT, H. R., ERHARDT, G. (2008) Heritability estimates for antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in German Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* **91**, 3237–3244
- HOMUTH, M. (2002) Diagnostik der Paratuberkulose. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **109**, 516–519
- KALIS C. H., BARKEMA, H. W., HESSELINK, J. W., VAN MAANEN, C. & COLLINS, M. T. (2002) Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **14**, 219–224
- KÖHLER, H., BURKERT, B., PAVLIK, I., DILLER, R., GEUE, L., CONRATHS, F. J. & MARTIN, G. (2008a) Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine serum. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* **121**, 203–210
- KÖHLER, H., GIERKE, F. & MOEBIUS, P. (2008b) Paratuberculosis – current concepts and future of the diagnosis. *Magyar Allatorvosok Lapja* **130**(Suppl 1), 67–69
- KUDAHL, A. B., NIELSEN, S. S. & ØSTERGAARD, S. (2008) Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *Journal of Dairy Science* **91**, 4599–609
- KÜPPER, J., BRANDT, H., DONAT, K. & ERHARDT, G. (2012) Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* status of German Holstein cows tested by fecal culture. *Journal of Dairy Science* **95**, 2734–2739
- MARCÉ, C., BEAUDEAU, F., BAREILLE, N., SEEGERS, H. & FOURICHON, C. (2009) Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology* **71**, 807–816

- MCKENNA, S. L. B., KEEFE, G. P., TIWARI, A., VAN LEEUWEN, J. A. & BARKEMA, H. W. (2006b) Johne's Disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors and control programs for dairy producers. *Canadian Veterinary Journal* **47**, 1089–1099
- MCKENNA, S. L. B., SOCKET, D. C., KEEFE, G. P., MCCLURE, J., VAN LEEUWEN, J. A., BARKEMA, H. W. (2005) Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **17**, 463–466
- MCKENNA, S. L. B., VAN LEEUWEN, J. A., BARKEMA, H. W., JANSEN, J. T., HAUER, G., HENDRICK, S. H., COTE, G., SALSBERG, E. B. & EMPRINGHAM, R. E. (2006a) Proposed Canadian Voluntary National Johne's Disease Prevention and Control Program. *Canadian Veterinary Journal* **47**, 539–541
- NIELSEN, S. S. (2008) Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. *Veterinary Microbiology* **132**, 274–82
- NIELSEN, S. S. & TOFT, N. (2006) Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *Journal of Dairy Science* **89**, 569–579
- NIELSEN, S. S. & TOFT, N. (2008) Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and fecal culture techniques. *Veterinary Microbiology* **129**, 217–235
- PINEDO, P. J., RAE, D. O., WILLIAMS, J. E., DONOVAN, G. A., MELENDEZ, P. & BUERGELT, C. D. (2008) Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transboundary and Emerging Diseases* **55**, 125–133
- PRADHAN, A. K., VAN KESSEL, J. S., KARNS, J. S., WOLFGANG, D. R., HOVINGH, E., NELEN, K. A., SMITH, J. M., WHITLOCK, R. H., FYOCK, T., LADELY, S., FEDORKA-CRAY, P. J. & SCHUKKEN, Y. H. (2009) Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science* **92**, 1811–1825
- RAIZMAN, E. A., ESPEJO, L. A. & WELLS, S. J. (2011) Long-Term Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples obtained from naturally infected cows and stored at -18°C and -70°C. *Veterinary Medicine International* **2011**, 341691.
- RAIZMAN, E. A., FETROW, J. P. & WELLS, S. J. (2009) Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* **92**, 4929–4936
- RISTOW, P., MARASSI, C. D., RODRIGUES, A. B., OELEMANN, W. M., ROCHA, E., SANTOS, A. S., CARVALHO, E. C., CARVALHO, C. B., FERREIRA, R., FONSECA, L. S. & LILENBAUM, W. (2007) Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **17**, 432–434
- SOCKETT, D. C., CARR, D. J. & COLLINS, M. T. (1992) Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research* **56**, 148–153
- STABEL, J. R. (1997) An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **9**, 375–380
- SWEENEY, R. W., WHITLOCK, R. H., MC ADAMS, S. & FYOCK, T. (2006) Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **18**, 2–6
- THRUSFIELD, M., ORTEGA, C., DE BLAS, I., NOORDHUIZEN, J. P. & FRANKENA, K. (2001) WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record* **148**, 567–572
- VAN SCHAIK, G., ROSSITER, C. R., STEHMANN, S. M., SHIN, S. J. & SCHUKKEN, Y. H. (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. *American Journal of Veterinary Research* **64**, 479–484
- VAN WEERING, H., VAN SCHAIK, G., VAN DER MEULEN, A., WAAL, M., FRANKEN, P. & VAN MAANEN, K. (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. *Veterinary Microbiology* **125**, 49–58
- WELLS, S. J. (2005) The prospects for herd level control of paratuberculosis – a scientists view. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark: The International Association for Paratuberculosis, August 14 to 17, 2005. pp 174–181. www.paratuberculosis.info/images/stories/pdfs/137
- WHITLOCK, R. H. & BUERGELT, C. (1996) Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **12**, 345–356
- WHITLOCK, R. H., WELLS, S. J., SWEENEY, R. W. & VAN TIEM, J. (2000) ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology* **77**, 387–398



2.3 Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit und die Wirtschaftlichkeit in Milchviehherden

2.3.1 Donat K, Soschinka A, Erhardt G, Brandt HR (2014): Paratuberculosis: Decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* depends on within-herd prevalence. *Animal* 8: 852–858 (Studie 7)

Paratuberculosis: decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* depends on within-herd prevalence

K. Donat^{1†}, A. Soschinka^{1a}, G. Erhardt² and H. R. Brandt²

¹Animal Health Service, Thuringian Animal Diseases Fund, Victor-Goerttler-Str. 4, D-07745, Jena, Germany; ²Institute of Animal Breeding and Genetics, Justus-Liebig-University, Ludwigstraße 21b, D-35390, Gießen, Germany

(Received 4 April 2013; Accepted 4 February 2014; First published online 4 March 2014)

*Paratuberculosis impairs productivity of infected dairy cows because of reduced milk production and fertility and enhanced risk of culling. The magnitude of the milk yield depression in individual cows is influenced by factors such as parity, the stage of the disease and the choice of test used. The objectives of this case–control study were to substantiate the influence of the different levels of the within-herd prevalence (WHP) on individual milk yield of fecal culture (FC)-positive cows (FC+) compared with FC-negative herd-mates (FC–), and to estimate the magnitude of the deviation of the milk yield, milk components and somatic cell count (SCC) in an FC-based study. Of a total of 31 420 cows from 26 Thuringian dairy herds tested for paratuberculosis by FC, a subset of 1382 FC+ and 3245 FC– with milk recording data were selected as cases and controls, respectively. The FC– cows were matched for the same number and stage of lactation (± 10 days in milk) as one FC+ from the same herd. Within a mixed model analysis using the fixed effects of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) status, lactation number, days in milk, prevalence class of farm and the random effect of farm on milk yield per day (kg), the amount of fat and protein (mg/dl) and lactose (mg/dl) as well as the SCC (1000/ml) were measured. On the basis of least square means, FC+ cows had a lower test-day milk yield (27.7 ± 0.6 kg) compared with FC– (29.0 ± 0.6 kg), as well as a lower milk protein content and a slightly diminished lactose concentration. FC status was not associated with milk fat percentage or milk SCC. In FC+ cows, reduction in milk yield increased with increasing WHP. An interaction of FC status and farm was found for the test-day milk yield, and milk protein percentage, respectively. We conclude that the reduction in milk yield of FC+ cows compared with FC– herd-mates is significantly influenced by farm effects and depends on WHP class. Owners of MAP-positive dairy herds may benefit from the reduction in WHP not only by reducing number of infected individuals but also by diminishing the individual losses in milk production per infected cow, and therefore should establish control measures.*

Keywords: paratuberculosis, within-herd prevalence, dairy cow, milk yield

Implications

Paratuberculosis causes economic losses in dairy herds: depending on the stage of disease, infected animals may show decreased milk production, reduced fertility, enhanced risk of culling and, finally, untreatable diarrhea. Presently, the high level of effort needed to eradicate is the main obstacle to farmers taking part in control strategies. This study implies that individual milk production is less diminished in herds with a low prevalence of infected cows than in herds with a high prevalence. Hence, prevalence reduction

may be a goal better accepted and more achievable by farmers than disease eradication.

Introduction

Paratuberculosis, or Johne's disease, is caused by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). The true herd prevalence in dairy herds in the United States of America was estimated to be larger than 90% in 2007 (Lombard *et al.*, 2013), and for Europe the estimates appeared to be >50% (Nielsen and Toft, 2009).

Therapy-resistant aqueous diarrhea and formation of edema because of hypoproteinemia are cardinal symptoms of the end stage of clinical paratuberculosis. A characteristic

^a Present address: Hagenow Veterinary Practice, Hagenstraße 32, D-19230, Hagenow, Germany

[†] E-mail: kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

thickening of the intestinal mucosa, which can be observed during pathological examination, is pathognomonic; as a result, the absorption of nutrients decreases. Milk yield is reduced and the risk of being culled increases in subclinically and clinically infected animals (Tiwari *et al.*, 2006). Economic losses in MAP-infected cattle herds are significant and could threaten the existence of dairy farmers. Losses in milk yield caused by the disease were proved by surveys based on comparisons between Holstein dairy cows testing positively or testing negatively for MAP (Merkal *et al.*, 1975; Collins and Nordlund, 1991; Raizman *et al.*, 2009). These were supported by studies based on modeling (Ott *et al.*, 1999; Chi *et al.*, 2002).

The long incubation period of up to 10 years (Whitlock and Buergelt, 1996), resulting in a latent, a subclinical and a clinical stage of disease (Coussens, 2001), is a general challenge in studies on the effect of MAP infections. Decreased milk yields have been well documented in cows with clinical paratuberculosis (Beaudeau *et al.*, 2007; Raizman *et al.*, 2007a). The decrease in milk production in subclinically infected cows depends on the stage of subclinical infection, characterized by the level of shedding (Raizman *et al.*, 2007a; Smith *et al.*, 2009) or the magnitude of the serological response (Sorge *et al.*, 2011; Villarino *et al.*, 2011) and parity (Wilson *et al.*, 1993; Kudahl *et al.*, 2004; Beaudeau *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2010; Sorge *et al.*, 2011). Furthermore, the choice of the diagnostic test used influences the estimation of the milk yield deviations because of the MAP infection (Beaudeau *et al.*, 2007; Gonda *et al.*, 2007).

Owing to the complexity of factors involved, the outcomes of the studies have been inconsistent. Most of the studies report that subclinically infected cows produce less milk than their negatively tested herd-mates (Wilson *et al.*, 1993; Beaudeau *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2010), whereas others report no differences (Johnson *et al.*, 2001; Pillars *et al.*, 2011) or even a positive association of positive serological test results with higher milk yield beyond 2 years of age (McNab *et al.*, 1991). Similar inconsistencies were observed concerning the milk components where MAP-infected cows produced less fat and protein per lactation (Gonda *et al.*, 2007) or did not (Pillars *et al.*, 2011). Furthermore, associations between high somatic cell count (SCC) and antibodies to MAP were demonstrated (McNab *et al.*, 1991; Baptista *et al.*, 2008) or were not found (Gonda *et al.*, 2007).

The sensitivity and specificity of the test chosen by a researcher influences the estimation of the milk yield deviations between test-positive and -negative cows. Most studies used either antibody ELISA or fecal culture (FC) or both to identifying MAP-infected cows. When compared with necropsy, the sensitivity of ELISA and FC as the tests most commonly used in living animals are estimated to be ~30% or 60%, respectively (Sweeney *et al.*, 2012). If the applied diagnostic method shows a low sensitivity, infected animals could be classified as negative and the comparison value decreased (McKenna *et al.*, 2006), which is why FC-positive (FC+) cows demonstrated consistently larger effects on milk

yield, milk components and SCC than ELISA-positive cows (Gonda *et al.*, 2007). In contrast, the use of a high-sensitivity diagnostic method may identify cows as infected in an earlier stage of disease with a less pronounced milk yield depression, which may lead to lower estimates of the milk yield difference for the FC method (Aly *et al.*, 2010).

Owing to the higher test sensitivity and the test specificity (>99%), studies on subclinical impacts, as determined by identification of the organism, are less susceptible to misclassification bias than those using identification on antibody response (McKenna *et al.*, 2006). At present, in FC-based studies on milk yield reduction because of paratuberculosis (Wilson *et al.*, 1993; Raizman *et al.*, 2007a; Smith *et al.*, 2009; Pillars *et al.*, 2011), the number of FC+ cases ranges from 25 to 97, coming from 1 to 4 herds, or was not documented (Beaudeau *et al.*, 2007). Some of these studies were able to demonstrate individual influences such as stage of disease or parity on the magnitude of the milk yield depression in subclinically infected cows, but further studies are needed to identify effects at the herd level, such as farm management, or at regional level.

In contrast to the farm management factor, which is very difficult to categorize, the within-herd prevalence (WHP) factor is an objective and easy-to-categorize trait on the herd level. There are marked differences between herds in WHP, and control programs are able to diminish the WHP within several years (Collins *et al.*, 2010). Therefore, the objective of our study was to demonstrate the effect of the WHP as a herd-level factor on the individual milk yield reduction in FC+ compared with FC-negative (FC-) herd-mates. These herd-mates were matched by parity and days in milk (DIM) to minimize the effects of lactation curve and age at the individual level and farm management on the herd level. We hypothesized that WHP influences the individual differences in milk production and SCC of FC+ and FC-.

Material and methods

Study population

All herds included in this study joined the 'Paratuberculosis Control Program in Thuringian Cattle Herds,' which is organized by the Thuringian Animal Health Service. The program includes, among other measures, annual screenings of the herd's cows for MAP by FC, where those cows are tested that have none or negative previous test results. If a cow is detected as FC+, it will not be retested the other year, and culling is recommended as outlined by Sweeney *et al.* (2012). Of a total of 31 420 cows from 26 Thuringian dairy herds tested for paratuberculosis by FC, a subset of 4627 German Holstein-Friesian cows (1382 FC+, 3245 FC-; Supplementary Table S1) were involved in this survey, which took part within monthly milk recording and possessed a valid milk recording data set. The subset included cases and controls selected as follows:

- a) Cases: all FC+ with a test-day in the time frame of 25 days before or after fecal sampling.

- b) Controls: all FC– in the same parity and stage of lactation (± 10 DIM) as one case with a milk recording data set at the same test-day as the case.

Fecal samples were collected between January 2008 and June 2011 and tested for MAP by FC. The average number of cows per herd tested was 1208 (211 to 3757). The WHP used in this study was calculated from the results of the annual testing of the cows between January 2008 and June 2011, by dividing the number of FC+ cows by the number of all cows tested as described above (Supplementary Table S2).

The average herd size was calculated from the number of cattle older than 24 months that was reported to the Thuringian Animal Diseases Fund in the years 2009 and 2010 (Supplementary Table S2).

Sample handling

Samples were transported to the laboratory of the Thuringian Animal Health Service by a courier service within 24 h and stored until culturing at -20°C . The identification of each animal was assured by a barcode system. FC was conducted according to the accredited method published in the procedure manual of the Friedrich-Loeffler-Institute (2012). Briefly, 3 g feces were mixed with 30 ml of a 0.75% hexadecyl pyridinium chloride solution (Acros Organics, Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Germany) for decontamination. After sedimentation of coarse material for 5 min, 20 ml of the supernatant were decanted, shaken for 30 min at 200 r.p.m. and subsequently incubated for 24 to 48 h at room temperature. Then, the supernatant was discarded and 0.2 ml of the sediment were inoculated onto a commercial Herrold's Egg Yolk Culture Medium with Mycobactin J, Amphotericin B, Nalidixic acid and Vancomycin (ANV; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany). After culture for 7 days under aerobic conditions at 37°C , tubes were locked airtight and incubated for another 11 weeks. After the 5th week of incubation, the samples were examined for mycobacterial growth every 2 weeks. Differentiation of characteristic colonies was done by Ziehl–Neelsen staining and an IS900-PCR (Englund *et al.*, 1999).

Test-day data

The test-day data records were gathered using two different sources:

- a data backup of the internal management software (HerdeW; dsp Agrosoft GmbH, Ketzin, Germany), supplied by the farmer, or
- a herd-specific data retrieval from the central German database for animal breeding (Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w. V. (VIT), Verden, Germany), permitted by the farmer.

We used the test-day recording within 25 days after or, if not available, before the date of the fecal sampling. The data set included milk yield per day (kg), the percentage of fat, protein and lactose (%) as well as the SCC (1000 cells/ml), the number of lactation and the DIM.

Statistical analysis

Within a mixed model analysis using the mixed and GLM procedures in SAS version 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) the fixed effects of FC status, lactation number, DIM, WHP class of farm and the random effect of farm within WHP class on the milk yield, the milk components and the SCC were analyzed. The lactation number was analyzed using three classes with lactation number 1, number 2 and all other lactations in class 3. To consider the effect of the lactation curve on milk yield, milk components and the SCC, the DIMs were summarized in 8 classes (0 to 30, 31 to 50, 51 to 100, 101 to 150, 151 to 200, 201 to 250, 251 to 300 and >300) and included as fixed effect in the model. Considering the WHP, three prevalence classes were built (Supplementary Table S1):

- low: WHP up to 5%,
- medium: WHP between 5% and 10% and
- high: WHP above 10%.

In the first model the 26 farms were included as random effect class within WHP, which resulted in the following model:

$$Y_{ijklmn} = \mu + \text{WHP}_i + \text{DIM}_j + \text{LN}_k + \text{MAP}_l + (\text{WHP} \times \text{MAP})_{il} + (\text{DIM} \times \text{LN})_{jk} + f(\text{WHP})_{im} + e_{ijklmn}$$

where Y_{ijklmn} is the trait measurement; μ the overall mean of trait; WHP_i the fixed effect of prevalence class ($i = 1$ to 3); DIM_j the fixed effect of class for DIM ($j = 1$ to 8); LN_k the fixed effect of class of lactation number ($k = 1$ to 3); MAP_l the fixed effect of FC status (positive or negative); $(\text{WHP} \times \text{MAP})_{il}$ the fixed interaction between WHP class and FC status ($\text{DIM} \times \text{LN})_{jk}$ the fixed interaction between DIM and lactation; $f(\text{WHP})_{im}$ the random effect of farm nested within WHP class; e_{ijklmn} the random residual effect.

To analyze a possible interaction between farm and FC status, a second model was used excluding the effect of WHP class and including the farm as fixed effect as well as the interaction between farm and FC status. For this analysis, all farms with <50 observations (8 of 26) were excluded (Supplementary Table S3). In this subset, 4381 records remained in the analysis.

Results

WHP

Of the 31 420 cows, in the 26 herds included in this study, 3001 FC+ were detected during January 2008 and June 2011. The resulting WHP ranged from 1.4% to 53.2% with a mean WHP of 9.6%. In relation to their WHP, 11 herds were classified as 'low,' 7 as 'medium' and 8 as 'high' (Supplementary Table S2).

Mixed model analysis: association of MAP status and prevalence class

The FC status had a significant influence on the milk yield. Milk yield was lower in FC+ cows compared with FC– cows.

Table 1 Least square (LS) means for recorded test-day data of fecal culture (FC)-positive and FC-negative cows

Parameter	LS mean FC- (n = 3245) ¹	LS mean FC+ (n = 1382) ²	r.s.d.	P ³
Milk yield (kg)	29.0	27.7	7.140	< 0.001
Milk fat (%)	4.16	4.20	0.704	0.174
Milk protein (%)	3.44	3.41	0.289	0.016
Lactose (%)	4.76	4.73	0.197	< 0.001
Log (SCC ⁴) (1000 cells/ml)	4.66 ⁵	4.65 ⁶	1.176	0.814

¹*Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) FC-negative cows.

²MAP FC-positive cows.

³Mixed model with random farm effect and fixed effects of MAP status, lactation number, days in milk, prevalence class of farm and interaction between MAP status and prevalence class, and interaction between days in milk and lactation.

⁴Log transformed somatic cell count (SCC).

⁵Back-transformed LS mean of FC- cows' SCC: 46 000 cells/ml.

⁶Back-transformed LS mean of FC+ cows' SCC: 45 000 cells/ml.

Table 2 Effects of individual MAP status and prevalence class on milk yield, milk fat percentage, milk protein percentage and lactose percentage in milk in fecal culture (FC)-positive and FC-negative cows

WHP class ¹	Low		Medium		High		P ²		
	FC- ³	FC+ ⁴	FC-	FC+	FC-	FC+	MAP status	Prevalence class	Interaction ⁵
n	1219	305	1055	335	971	742			
Milk yield (kg)	30.0	29.7	28.1	26.4	29.1	27.2	< 0.001	0.205	0.011
Milk fat (%)	4.09	4.08	4.26	4.29	4.14	4.23	0.173	0.111	0.265
Milk protein (%)	3.39	3.44	3.45	3.36	3.47	3.44	0.016	0.228	0.733
Lactose (%)	4.72	4.75	4.76	4.73	4.75	4.72	< 0.001	0.381	0.449

¹Within-herd prevalence (WHP) class: low, prevalence up to 5%; medium, prevalence 5% to 10%; high, prevalence above 10%.

²Mixed model with random farm effect and fixed effects of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) status, lactation number, days in milk, prevalence class of farm and interaction between MAP status and WHP class, and interaction between days in milk and lactation.

³MAP FC-negative cows.

⁴MAP FC-positive cows.

⁵Interaction between MAP status and WHP class.

Moreover, FC+ (3.41%) had a lower ($P = 0.016$) milk protein percentage than FC- (3.44%). There was no significant association between FC status and milk fat percentage. Lactose concentration was lower in FC+ cows compared with FC- cows (Table 1).

The magnitude of the milk yield depression on individual cows increased with an increasing WHP ($P = 0.011$). No association was found between WHP and milk components. In the WHP classes 'Medium' and 'High' lower mean milk yields were estimated for FC+ cows (Table 2).

Mixed model analysis: association of MAP status and farm

Regarding farm, a significant interaction of FC status and farm was found for the test-day milk yield ($P = 0.004$) and milk protein percentage ($P = 0.007$), respectively. In four herds (B, D, J and P), FC status was associated with milk yield ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P = 0.001$ and $P = 0.035$, respectively; Supplementary Table S3; Figure 1).

In five herds (A, C, F, M and W), FC status was associated with milk yield ($P = 0.029$, $P = 0.033$, $P = 0.006$, $P = 0.020$ and $P = 0.015$, respectively; Figure 2). The interaction of FC status and farm tended to influence lactose percentage ($P = 0.055$), and there was no significant association with milk fat percentage ($P = 0.265$).

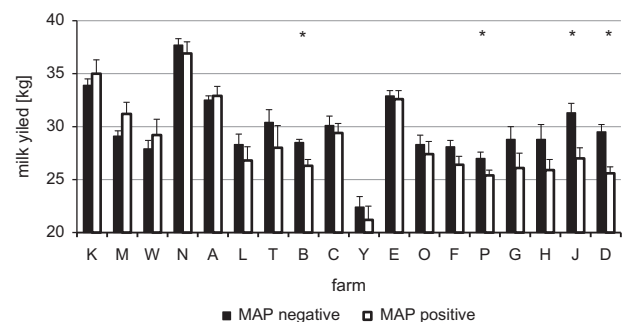


Figure 1 Least square mean (LS) mean \pm s.e. of test-day milk yield of fecal culture (FC)-positive and FC-negative cows in 18 herds with more than 50 observations. Significant different LS means of FC-positive and FC-negative cows ($P < 0.05$) marked with *; farms ordered from left to right according to increasing within-herd prevalence.

Discussion

In the present study, milk yield data comprised FC+ and FC- cows from 26 dairy herds. Using a mixed model with fixed interaction between WHP class and FC status and random effect of farm nested within WHP, we were able to substantiate an influence of WHP on the reduction in milk yield: whereas FC+ cows from herds with medium or high

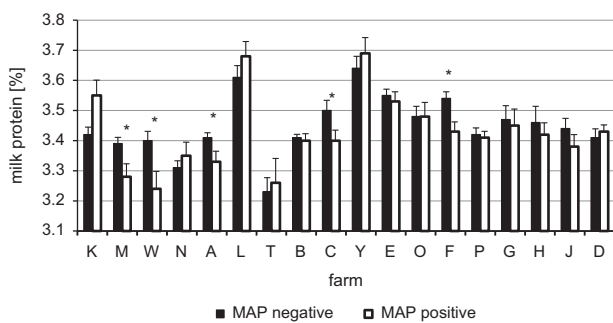


Figure 2 Least square mean (LS mean) \pm s.e. of test-day milk protein percentage of fecal culture (FC)-positive and FC-negative cows in 18 herds with more than 50 observations. Significant different LS means of FC-positive and FC-negative cows ($P < 0.05$) marked with *; farms ordered from left to right according to increasing within-herd prevalence.

WHP showed a pronounced reduction in milk yield, there was nearly no difference in milk yield between FC+ and FC- cows in herds with low WHP.

This finding is of significant importance for the implementation of control measures in affected dairy herds, because the majority of existent control programs in different countries and regions act on a voluntary basis, with farmers basing their decision to participate primarily on the expected economic benefit. Most of the benefit can result from the prevention of a milk yield depression in infected cows. In this study, we found 1.3 kg lower mean milk yield in FC+ compared with FC- cows. This effect is more pronounced in herds with high WHP where FC+ cows showed a milk yield depression of 1.9 kg or 7%. Our results show that a large impact on milk yield, and thus improved economic efficiency, in MAP-positive dairy herds can be achieved through the reduction in WHP rather than the eradication of the disease. This is a much more realistic goal and is achievable in a shorter time. Collins *et al.* (2010) reported a significant reduction in WHP from 11.6% at the beginning of their longitudinal study to 5.6% after 6 years. Communicating to farmers that economic goals may be more achievable by a focus on WHP reduction may motivate them to implement control measures against paratuberculosis in their herds.

Therefore, our study is the first one that shows a significant influence of WHP on the milk yield reduction in a large-scale study with 1382 FC+ cases. Previous culture-based studies characterizing milk yield reduction in Holstein herds have been conducted in one to four American herds with far less numbers ($n \leq 97$) of FC+ cases (Johnson *et al.*, 2001; Raizman *et al.*, 2007a; Smith *et al.*, 2009; Pillars *et al.*, 2011). In the study by Raizman *et al.* (2007a), the use of bovine somatotrophin (bST) from 60 to 90 day *postpartum* to 200 days post-conception definitely influenced the milk production. In contrast, our investigation included a total of 26 German Holstein herds without any application of bST. Whereas existing studies did not question herd-level impact factors, our study enabled the examination of WHP on the milk yield reduction.

A possible explanation why a different WHP is associated with variations in milk yield may be the infection pressure: in

high-prevalence herds calves are exposed to a higher amount of MAP owing to more cows shedding the infectious agent. Therefore, the probability to become infected increases as well as the amount of ingested bacteria, which probably leads to a more rapid progression of the disease, resulting in an earlier outcome of clinical signs. This thesis is supported by the results of Mortier *et al.* (2013) who found in calves infected with a higher dose of MAP more severe histologic and macroscopic lesions than in calves infected with a low dose. Ott *et al.* (1999) and Chi *et al.* (2002) integrated this suspected connection between WHP and the decrease of milk yield into models for calculating the paratuberculosis-based economic losses. This approach is now confirmed by the results from our field study, which can be used to refine existing models in due consideration of the method-dependent determination of WHP.

The strength of our study is, first, the number of involved herds and individuals, and second the specific selection of the negative herd-mates: the selected subset of 3245 controls of 24 486 FC- included only those cows that were in the same parity and the same stage of lactation (± 10 DIM) as the FC+ case, and all cows were German Holstein-Friesian. This way we minimized the complex effects of lactation, feeding, rearing, climate or genetics on milk yield. This is a critical advantage compared with previous studies that analyzed production losses because of MAP infection. In contrast to Pillars *et al.* (2011), who matched their control animals only by age, our matching referred to parity and DIM, which are two of the main factors influencing the milk yield within a herd. Therefore, our case-control study provides a selection of the controls that enabled us to substantiate a significant difference in milk yield in MAP-positive cows. This is in line with the results of other culture-based studies (Wilson *et al.*, 1993; Raizman *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

Furthermore, a significant interaction of the FC status and farm was found for the test-day milk yield and milk protein proportion when excluding the effect of WHP class and including the farm as fixed effect, as well as the interaction between farm and FC status. These findings support our field experiences in the framework of the 'Paratuberculosis Control Program in Thuringian Cattle Herds,' where differences between farms concerning the milk yield reduction were obvious. The results are in line with those from Nordlund *et al.* (1996), who demonstrated similar effects to those detected in our study in 23 dairy herds with 147 ELISA-positive and 1506 ELISA-negative cows with herd-specific differences in the milk yield deviation.

As the interaction between farm and FC status is significantly associated with milk yield, this clearly demonstrates the influence of farm-management practices on the impact of paratuberculosis in herd performance. Whereas a significant association was found in four herds, the other herds showed no differences in milk yield between FC+ and FC- cows. To some extent, this may be caused by the high variability of this trait (Table 1) and the reduced sample size for the within-herd calculation. In various herds (A, K, M, W), FC+ cows

had apparently higher least square (LS) means of milk yield than the FC− (Figure 1). The influences of farm management on milk yield are very complex, and this study did not aim to analyze aspects of farm management on milk yield traits. We tried to exclude these effects by use of FC+ and FC− from the same farm in the same parity and in the same stage of lactation.

Milk protein percentage was only lower in the MAP-infected cows that were housed in a herd with a percentage of cows shedding >5% (Table 2). Presumably, this association is caused by the MAP-characteristic pathological processes in the intestinal mucosa, resulting in a diminished nutrient absorption. The milk protein percentage was significantly reduced in five of our herds (A, C, F, M, W) with the largest difference of 0.16% in farm W. Remarkably, three of these five herds with reduced milk protein percentage belonged to the herds with higher LS means for milk yield in FC+ (A, M, W). For reasons currently unknown, in these herds, FC+ were able to maintain milk synthesis at the same level as FC−, but failed to produce milk protein at the same extent compared with the FC−.

In our study, no difference in milk fat percentage was found. This agrees with the results of Nordlund *et al.* (1996) and Lombard *et al.* (2005). In both these studies, MAP infections affected neither fat percentage nor fat yield. In contrast, Gonda *et al.* (2007) reported a decrease in fat yield in FC+ and ELISA-positive Holsteins compared with negative controls.

Furthermore, an association between the individual MAP status and the SCC was not detectable. This is in line with the results of Hendrick *et al.* (2005), Raizman *et al.* (2007b) and Gonda *et al.* (2007). In contrast, another study suggested that the occurrence of MAP antibodies, and thereby cows with advanced MAP infections, is associated with a high SCC (Baptista *et al.*, 2008).

Our results show that loss of milk yield in FC+ increases with an increasing MAP WHP. Considering the significant farm effects, dairy farmers may benefit from the reduction of WHP not only by the reduced number of infected individuals, but also by diminishing the individual losses in milk production per infected cow. For a more exact description of the link between WHP and production losses more extensive studies are needed. However, the well-documented reduction in milk yield should motivate dairy farmers to stamp out paratuberculosis in their herds or, at least, reduce WHP. Although in most of the herds eradication of the infection in a short term is not possible, our results show that even if control measures do not result in eradication of paratuberculosis in a herd, reduction in MAP prevalence will significantly reduce the losses in milk yield.

Acknowledgments

The present study is a part of the 'Paratuberculosis control program in Thuringian dairy herds' of the Thuringian Ministry of Social Welfare and Health, which is financed by the Thuringian Animal Disease Compensation Fund. The authors would thank Ute Schau and her team for conducting the fecal culture, Timo

Leimbach for the excellent database queries, the veterinarians of the Animal Health Service for collecting the database backups, Grant Morseth for improving the English style, and Elke Kaiser and Katharina Schlotter for their assistance.

Conflicts of Interest

None.

Supplementary material

To view supplementary material for this article, please visit <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731114000305>

References

- Aly SS, Anderson RJ, Adaska JM, Jiang J and Gardner IA 2010. Association between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and milk production in two California dairies. *Journal of Dairy Science* 93, 1030–1040.
- Baptista FM, Nielsen SS and Toft N 2008. Association between the presence of antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and somatic cell count. *Journal of Dairy Science* 91, 109–118.
- Beaudeau F, Belliard M, Ljoly A and Seegers H 2007. Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in dairy cows. *Veterinary Research* 38, 625–634.
- Chi L, VanLeeuwen JA, Weersink A and Keefe GP 2002. Direct production losses and treatment costs from Bovine Viral Diarrhoea Virus, Bovine Leukosis Virus, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Preventive Veterinary Medicine* 55, 137–153.
- Collins MT and Nordlund K 1991. Milk production levels in cows ELISA positive for serum antibodies to *M. paratuberculosis*. Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis, 28 September–2 October, Orlando, FL, USA, pp. 401–409.
- Collins MT, Eggleston V and Manning EJ 2010. Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. *Journal of Dairy Science* 93, 1638–1643.
- Coussens PM 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Animal Health Research Reviews* 2, 141–161.
- Englund S, Ballagi-Pordaný A, Boelska G and Johansson KE 1999. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 33, 163–171.
- Friedrich-Loeffler-Institut 2012. Amtliche Methodensammlung des Friedrich-Loeffler-Instituts. Retrieved November 21, 2012, from http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Amtliche_Methodensammlung/Methodensammlung_201204.pdf
- Gonda MG, Kirkpatrick BW, Shook GE and Collins MT 2007. Identification of a QTL on BTA20 affecting susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Animal Genetics* 38, 389–396.
- Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M and Duffield TF 2005. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 1302–1308.
- Johnson YT, Kaneene JB, Gardiner JC, Lloyd JW, Sprecher DJ and Coe PH 2001. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84, 2188–2194.
- Kudahl A, Nielsen SS and Sørensen JT 2004. Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. *Preventive Veterinary Medicine* 62, 119–134.
- Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ and Wagner BA 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 1975–1981.
- Lombard JE, Gardner IA, Jafarzadeh SR, Fossler CP, Harris B, Capsel RT, Wagner BA and Johnson WO 2013. Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 108, 234–238.

- McKenna SL, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J and Barkema HW 2006. Johne's disease in Canada part II: disease impact, risk factors, and control programs for dairy producers. *Canadian Veterinary Journal* 47, 1089–1099.
- McNab WB, Meek AH, Martin SW and Duncan JR 1991. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Canadian Journal of Veterinary Research* 55, 356–361.
- Merkal RS, Larsen AB and Booth GD 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research* 36, 837–838.
- Mortier RA, Barkema HW, Bystrom JM, Illanes O, Orsel K, Wolf R, Atkins G and De Buck J 2013. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Veterinary Research* 44, 94.
- Nielsen SS and Toft N 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine* 88, 1–14.
- Nordlund KV, Goodger WJ, Petetier J and Collins MT 1996. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208, 1872–1876.
- Ott SL, Wells SJ and Wagner BA 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine* 40, 179–192.
- Pillars RB, Bolton MW and Grooms DL 2011. Case-control study: productivity and longevity of dairy cows that tested positive for infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* as heifers compared to age-matched controls. *Journal of Dairy Science* 94, 2825–2831.
- Raizman EA, Fetrow JP and Wells SJ 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 92, 4929–4936.
- Raizman EA, Fetrow JP, Wells SJ, Godden SM, Oakes MJ and Vazquez G 2007a. The association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 78, 179–195.
- Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Fetrow JP and Oakes MJ 2007b. The association between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Preventive Veterinary Medicine* 80, 166–178.
- Smith RL, Grohn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, Wolfgang DR and Schukken YH 2009. A longitudinal study on the impact of Johne's disease status on milk production in individual cows. *Journal of Dairy Science* 92, 2653–2661.
- Sorge US, Lissimore K, Godkin A, Hendrick S, Wells S and Kelton D 2011. Associations between paratuberculosis milk ELISA result, milk production, and breed in Canadian dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94, 754–761.
- Sweeney RW, Collins MT, Koets AP, McGuirk SM and Roussel AJ 2012. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26, 1239–1250.
- Tiwari A, Van Leeuwen JA, McKenna LB, Keefe GP and Barkema HW 2006. Johne's disease in Canada part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian Veterinary Journal* 47, 874–882.
- Villarino MA, Scott HM and Jordan ER 2011. Influence of parity at time of detection of serologic antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on reduction in daily and lifetime milk production in Holstein cows. *Journal of Animal Science* 89, 267–276.
- Whitlock RH and Buergelt C 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 12, 345–356.
- Wilson DJ, Rossiter C, Han HR and Sears PM 1993. Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 54, 1851–1857.

2.3.2 Donat K, Erhardt G, Soschinka A, Brandt HR (2014): Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* shedding in German Holstein cows. *Vet Rec* 174: 408 (Studie 8)

Paper

Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* shedding in German Holstein cows

K. Donat, G. Erhardt, A. Soschinka, H. R. Brandt

Using well established metabolic parameters, this study aimed to substantiate differences in protein and energy metabolism between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) positive and negative dairy cows tested by faecal culture. A total of 227 MAP-positive and 239 MAP-negative German Holstein cows kept in 13 MAP-positive dairy herds were selected for metabolic testing. The serum concentrations of total protein (TP), bilirubin, cholesterol and betahydroxybutyrate were measured as well as the activities of Glutamate-Dehydrogenase (GLDH) and Aspartate-Aminotransferase. MAP-positive cows were characterised by a decreased mean TP (66.5 g/l) compared to the MAP-negative controls (73.2 g/l). Mean log₁₀ GLDH activities tended to be higher in MAP-positive than MAP-negative cows. Concerning TP, there was a significant interaction between MAP status and farm. Within four farms, the difference between MAP-positive and MAP-negative animals differed significantly, while in the other farms this difference was not significant. It is concluded that a decreased TP and an increased GLDH indicate alterations in protein metabolism. These findings suggest an enhanced liver cell turnover in MAP-positive cows. The results contribute to an understanding of the metabolic alterations in MAP-positive dairy cows.

Introduction

Paratuberculosis (Johne's disease) is a progressive enteritis in ruminants, which causes high economic losses on affected farms by a reduction in milk yield (Beaudeau and others 2007, Raizman and others 2009), and a threefold higher risk of premature culling (Hendrick and others 2005). Furthermore, a zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) as a presumed agent in the pathogenesis of Crohn's disease is discussed (Feller and others 2007). Evidence for its association with this human disease is strong, with a moderate strength of evidence to be causative (Sweeney and others 2012).

Paratuberculosis is caused by MAP. After oral infection from a contaminated environment or through contaminated milk, forage or water, MAP enters the intestinal mucosa through specialised absorptive M-cells which are primarily located in the ileum (Momotani and

others 1988). Histamine secretion as an outcome of an antigen-antibody reaction causes thickening and oedema of intestinal mucosa as well as diarrhoea. After a period of latency and a long subclinical stage of disease, intermittent treatment-resistant diarrhoea and wasting of the animal develops (Sweeney 1996). As a result, the absorption of nutrients decreases (Bendixen 1978). Therefore, hypoproteinemia is considered as a consequence of reduced intestinal nutrient absorption in ruminants suffering from paratuberculosis (Fecteau and Whitlock 2010). The advanced stage of disease is characterised by aqueous diarrhoea, hypoproteinemia and resulting intermandibular oedema (Tiwari and others 2006). Hypoproteinemia in late stages of disease was assessed by the studies of Raizman and others (2007a, b) which confirmed that the total protein (TP) serum concentration, measured using a manual refractometer after sera extraction, was reduced in cows culled because of clinical signs of paratuberculosis and in heavy MAP-shedders.

With regard to the subclinical stage of disease, only Szilágyi and others (1989) and Körmendy and others (1990) described a decrease of TP studying young bulls.

For the early detection of metabolic disorders, metabolic tests have been used as well as the analysis of milk production data and body condition scoring (Le Blanc 2010). Regarding to what extent metabolic parameters are influenced by a MAP infection only limited data are currently available. This may lead to a misinterpretation of the results of metabolic test profiles. Because paratuberculosis occurs in many cattle herds, it should be known if and to what extent betahydroxybutyrate (BHBA) concentration, the activity of glutamate dehydrogenase (GLDH, Enzyme code (EC) 1.4.1.2), the activity of aspartate aminotransferase (AST, (EC) 2.6.1.1), bilirubin (BILI), cholesterol (CHOL) and TP concentration change depending on the stage of infection. We

Veterinary Record (2014)

doi: 10.1136/vr.101957

K. Donat, Dr. med. vet.

A. Soschinka, Veterinary Surgeon,
Thuringian Animal Diseases Fund,
Animal Health Service,
Victor-Goerttler-Str. 4,
Jena D-07745, Germany

G. Erhardt, Prof. Dr. med. vet.

H. R. Brandt, apl. Prof. Dr. agr.
Institute of Animal Breeding and
Genetics, Justus Liebig University,
Ludwigstraße 21b, Gießen D-35390,
Germany

A. Soschinka,

Hagenow Veterinary Practice,
Hagenstraße 32,
Hagenow D-19230,
Germany;

E-mail for correspondence:

kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

Provenance: Not commissioned;
externally peer reviewed

Accepted January 26, 2014

expected a MAP infection to adversely influence protein and energy metabolism as well as liver function which may cause a decrease in TP and an increase in BHBA, BILL, CHOL, GLDH and AST, respectively. Therefore, this study aimed to determine the influence of the MAP infection on the parameters mentioned above. The survey was based on faecal culture. MAP-positive and MAP-negative individuals from affected herds were compared to test the influence of MAP infection on metabolic traits.

Material and methods

Animal selection and herd characteristic

Thirteen dairy herds from Thuringia, Germany enrolled in the 'Paratuberculosis control program in Thuringian cattle herds' participated in this study. They were classified as 'MAP positive' because at least one cow showed a positive result in faecal culture. The herd size ranged from 198 to 1159 cows per herd (Table 1).

Among other measures, the Thuringian control programme includes annual faecal culture-based MAP screenings of all cows in the participating herds. According to the results of these screenings, the within-herd prevalence for paratuberculosis was calculated as the number of animals with a positive result in faecal culture divided by the total number of animals cultured between January 2008 and June 2011. Estimated for the herds enrolled in this survey, it ranged from 2.3 per cent to 53.2 per cent (Table 1).

Out of the MAP-positive cows, 227 individuals (4–48 cows per herd) were selected that had not been culled until the results of faecal culture were available, and were at least 30 days in milk (DIM). Blood samples were taken from these animals shortly after the final assessment of the faecal culture. The MAP status of 204 cows was not only determined qualitatively, but also semiquantitatively at the end of the incubation period. According to these results, animals were characterised as 'low' (155), 'moderate' (24) or 'heavy' (25) shedders (see Table 1).

Additionally, 239 MAP-negative herd-mates were sampled as control animals (1) kept on the same farm, (2) having the same parity and stage of lactation as the positive animals and (3) according to the selection conditions of Küpper and others 2013, descending from the same sire (1–50 animals per herd). Considering these selection criteria in a hierarchical manner, we included approximately the same number of MAP-positive and MAP-negative cows per herd into the study.

The number of individuals sampled in each of the herds is shown in Table 1. The average number of selected cows was 35, ranging from a minimum of nine to a maximum of 98 animals.

The milk yield on the test day before blood sampling and the DIM at this time, were drawn from the monthly milk recording data supplied by the managers of each herd.

Faecal sampling and culture for MAP

Faeces from each tested cow was removed from the rectum with a separate glove and peeled off into a sterile plastic cup allocated by the

laboratory. The identification of each animal was assured by recording the number of its ear tag and affixing the barcode doublet which was pasted on all plastic containers onto an EDV-readable form.

Faecal culturing was done according to the official manual of diagnostic procedures published by the Friedrich-Loeffler-Institut, the German Federal Research Institute of Animal Health, in 2010 (Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) 2010), modified as follows for routine herd screenings:

- After transportation to the laboratory of the Thuringian Animal Health Service by a courier service within 24 hours after sampling, all faecal samples were stored at -20°C until cultured to avoid undesired bacterial and fungal growth, and to ensure a consistent sample handling.
- The regular decontamination period of 24 hours was extended to 48 hours when a high amount of undesired bacterial and fungal growth was expected due to the experience from former samples of cows from the same herd, and for samples in which culture had to be repeated due to contamination.
- Due to the high number of samples given (approximately 30,000 per year for routine annual screenings), the inoculation was limited to one Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) slant initially, followed by one or more repeated cultures when bacterial and fungal growth of contaminants was suspected of causing overgrowth and reduced interpretability of the culture.

Briefly, 3 g of faeces was mixed thoroughly with 30 ml of a 0.75 per cent hexadecyl pyridinium chloride solution (Acros Organics, ordered from Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Germany) for decontamination. After sedimentation of coarse material for 5 minutes, 20 ml of the supernatant was transferred to a new tube, shaken for 30 minutes at 200 rpm and subsequently incubated for 24–48 hours at room temperature. Then the supernatant was discarded and 0.2 ml of the sediment were inoculated onto a commercially available HEYM with Mycobactin J, Amphotericin B, Nalidixic acid and Vancomycin (ANV, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany). For further suppression of bacterial and fungal growth, additionally 0.04 ml ANV (in-house-production) was drizzled over the inoculated medium surface. The half-open screw-cap tubes were incubated for seven days under aerobic conditions at 37°C in the dark in a slant position and with the medium surface horizontal. After that they were locked airtight, arranged upright and incubated for another 11 weeks as described above. Beginning the fifth week of incubation the samples were examined for mycobacterial growth every two weeks. Colony counts were recorded every two weeks for 12 weeks, and final results were reported as negative, light (1–9 colonies/tube (CPT)), moderate (10–50 CPT), heavy (>50 CPT) and missing (contamination allows diagnosis but no counting). Differentiation of characteristic colonies was done by Ziehl-Neelsen staining and an IS900-PCR (Englund and others 1999).

TABLE 1: Herd size, within-herd prevalence, sample size and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) status of sampled individuals

Herd	Herd size (n)	Within-herd prevalence (per cent)*	Sampled animals† (n)	MAP positive† (n)	Level of shedding (n)				MAP negative† (n)
					Low	Moderate	Heavy	Missing	
A	732	19.3	79	38	32	3	3	0	41
B	198	2.3	9	4	2	0	0	2	5
C	812	3.7	9	5	4	0	1	0	4
D	443	9.9	17	11	5	0	0	6	6
E	940	3.9	33	20	17	3	0	0	13
F	870	5.2	27	14	13	1	0	0	13
G	454	4.4	51	26	14	2	5	5	25
H	296	4.2	14	8	6	0	2	0	6
I	424	8.54	10	9	0	0	0	9	1
J	391	12.3	63	29	23	1	5	0	34
K	1159	9.1	37	8	7	0	0	1	29
L	406	53.2	98	48	28	13	7	0	50
M	538	21.7	19	7	4	1	2	0	12
Total	7663		466	227	155	24	25	23	239

*Proportion of all MAP-positive cows in relation to all cows tested for MAP in the herd between January 2008 and June 2011

†Subset of cows selected for metabolic testing

Serum extraction and analyses of different parameters of metabolism

Blood sampling was done by the veterinarians of the Thuringian Animal Health Service during regular visits. Whole blood of each cow was taken from the caudal tail vein and collected in a sterile plastic tube without any anticoagulants (Vacutainer, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany). The tubes were capped, transported to the laboratory of the Thuringian Animal Health Service within five hours and immediately centrifuged for 30 minutes at 840×g (Rotana TR 440, Fa. Hettich, Tuttlingen, D). Serum was taken off and transferred into 2 ml plastic containers (CKW GmbH, Leinatal-Catterfeld, Germany).

Serum activities of the AST (nano katal (nkat)/l), GLDH (nkat/l) and the concentration of BILI (µmol/l) were measured as parameters of liver damage (Kraft 2005). To monitor changes in the protein and energy metabolism, samples were analysed as reported by Füll (2005) for the serum concentration of TP (g/l), CHOL (mmol/l) and BHBA (µmol/l). All parameters were analysed in the laboratory of the Thuringian Animal Health Service using the photo spectrometer Synchron CX 5 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany) in a semiautomatic procedure according to the methods stated in the handbook of the analyser.

Analyses of AST, GLDH and BHBA were done according to the reference method of the 'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine' (IFCC). The conversion of the enzyme substrates resulted in an alteration of extinction, which was detected by the analyser (Synchron CX 5, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany). For measuring CHOL (IFCC reference method) the difference in extinction was caused by an enzymatic conversion of CHOL esters into a chromatic phenol. To measure BILI, we used the method of Jendrossik and Gröf (1938). According to the handbook of the Synchron CX, TP was measured using the Biuret's method, where the extinction shift in sera is caused by the reaction of the proteins with copper-ions to coloured complexes in an alkaline solution.

Reference ranges and statistical analyses

Threshold values were used according to Füll (2005, 2013) (Table 3).

Descriptive statistics (test for normality, analysis of means and variances) were done with the SPSS software for Windows (SPSS, Illinois, Chicago, USA) and analytical statistics with SAS GLM procedure (analysis of variance) for quantitative variables and SAS FREQ procedure (Fisher's exact test) for frequencies (SAS Institute, Cary, USA). All parameters approximately showed a normal distribution except GLDH, which was therefore transformed to \log_{10} (GLDH) for statistical analysis. A linear model was used that included the MAP status (positive or negative), the farm, and the interaction between MAP status and farm as fixed effects. Additionally, the fixed effect of the level of shedding and the DIM, classified into three groups (≤ 100 , 101–200, >200) and the milk yield as covariant were included in the model. Fisher's exact test was used to analyse possible differences in the percentage of animals within or without the reference ranges.

Results

MAP-negative individuals had a significantly higher least square mean (\pm se) of TP (72.5 \pm 1.2 g/l) than MAP positives (66.6 \pm 1.1 g/l, Table 2). Least square means diminished according to the level of shedding (low: 67.1 \pm 1.6 g/l, moderate: 64.8 \pm 3.2 g/l, heavy: 61.9 \pm 3.1 g/l), but these differences did not reach significance levels (Fig 1).

Frequency and percentage of MAP-positive and MAP-negative animals within or without the reference ranges of certain parameters are given in Table 3. A decrease of TP below the reference range was detected in 197 out of all 466 animals (42.3 per cent). Out of all 227 MAP-positive individuals, 114 cows (50.2 per cent) had TP concentrations below the threshold, whereas a significantly lower ($P<0.01$) number of 83 MAP-negative animals (34.7 per cent) were found.

GLDH least square mean (\pm se) in MAP-positive cows (421 \pm 30 nkat/l) was significantly higher than in the individuals that tested negative (341 \pm 32 nkat/l, Table 2). Additionally, there were no significant differences among the subgroups of shedders (low: 407 \pm 46 nkat/l, moderate 356 \pm 89 nkat/l, heavy: 475 \pm 87 nkat/l).

Elevated serum GDLH activities were measured for 126 individuals (27.0 per cent). Seventy-one (31.3 per cent) MAP-positive and 55 (23.0 per cent) MAP-negative animals exceeded the threshold. This difference was significant ($P<0.05$, Table 3).

For the other metabolic parameters, no significant differences between MAP-positive and MAP-negative animals were found.

For all parameters, the effect of farm was highly significant. The interaction between MAP status and farm was significant only for TP ($P<0.001$). Within four farms, the TP serum concentration between MAP-positive and MAP-negative animals differed significantly ($P<0.05$), while in the other farms this difference was not significant (Fig 2).

The effect of milk yield was significant ($P<0.05$) for AST, CHOL and \log_{10} (GLDH), but not for BILI, BHBA and TP, respectively. DIM had significant effects only on CHOL and \log_{10} (GLDH).

Discussion

The results of our study substantiate hypoproteinemia in MAP-positive dairy cows compared with MAP-negative herd-mates. This is evident not only in high shedders and cows with clinical signs of paratuberculosis (Raizman and others 2007a) but, to a lower extent, also in moderate and low shedders. Furthermore, elevated GLDH activities in MAP-positive cows indicate an increased liver cell turnover in these animals. With respect to the use of metabolic parameters in internal medicine, where the relevant outcome of those test is whether the measured value is within or without the reference range, both results of the quantitative analysis were confirmed by frequencies analysis of individuals that exceeded the threshold values of the reference range or not. Since the outcome of this confirmatory analysis depends on the threshold value used, it has a considerable influence on the results. Therefore, we used such threshold values which are well established for metabolic profile testing in German Holstein cows kept in large dairy farms (Füll 2005). The use of other threshold values may lead to other outcomes in qualitative analysis.

TABLE 2: Effect of individual *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) status on serum concentration of metabolic parameters

Parameter	Dimension unit	MAP-positive animals (n=227)		MAP-negative animals (n=239)		Sign.†
		LS means‡	se	LS means‡	se	
Alanine aminotransferase	nkat/l§	1259	43	1233	45	n. s.
Glutamate dehydrogenase	nkat/l§	421	30	341	32	*,¶
Total protein	g/l	66.6	1.1	72.5	1.2	***
Cholesterol	mmol/l	4.3	0.1	4.6	0.1	n. s.
Bilirubin	µmol/l	3.9	0.2	3.5	0.2	n. s.
β-hydroxybutyrate	µmol/l	739	18	714	19	n. s.

†Significance: n.s.=not significant, * $P\leq 0.05$, *** $P\leq 0.001$

‡Least Square means

§Catalytical activity, nano katal/l

¶Analysed using the \log_{10} transformation

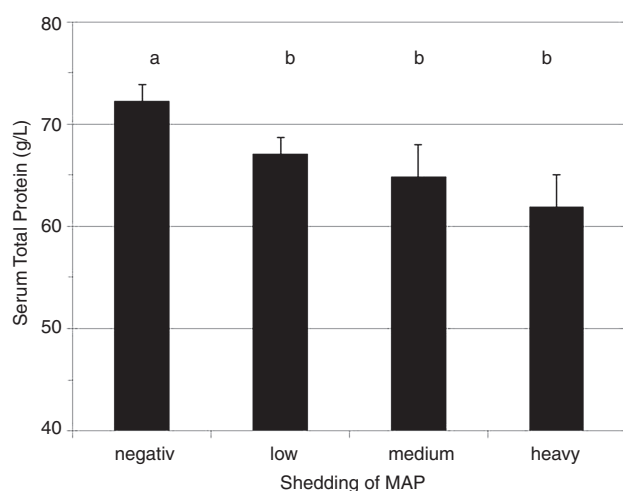


FIG 1: Least square means (\pm se) for serum total protein for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) negative and positive animals with respect to the level of shedding. Significant differences ($P<0.05$) are marked with different letters

As milk yield and DIM at the time of sampling had no influence on TP, we can exclude these factors as confounders concerning TP. On the other hand, the influence of milk yield on GLDH was significant; increasing milk yield was associated with increasing GLDH. Therefore, the slightly higher GLDH activity in MAP shedders should be interpreted with caution because we cannot differentiate whether milk yield or MAP status influenced the GLDH activity.

Our study involved 227 MAP shedding cows. The animals were kept in commercial dairy farms that performed paratuberculosis control for several years in the framework of the voluntary paratuberculosis control programme in Thuringia, federal state of Germany. The low number of heavy shedders is linked to the implemented culling rules of the Thuringian control programme. Farmers are advised to slaughter MAP-positive cows as soon as possible after they receive the test result.

According to Tiwari and others (2006) we assumed that low and moderate shedding is linked to the subclinical stage of disease, whereas heavy shedding occurs some months before and during the clinical stage of paratuberculosis. In our study, MAP-positive cows with less than 10 CPT in faecal culture were classified as low shedders, and we assumed that they are in the subclinical stage of the disease. Hence, this study demonstrates a clear hypoproteinemia in MAP-positive cows even if they are low shedders. To our knowledge, this is the first

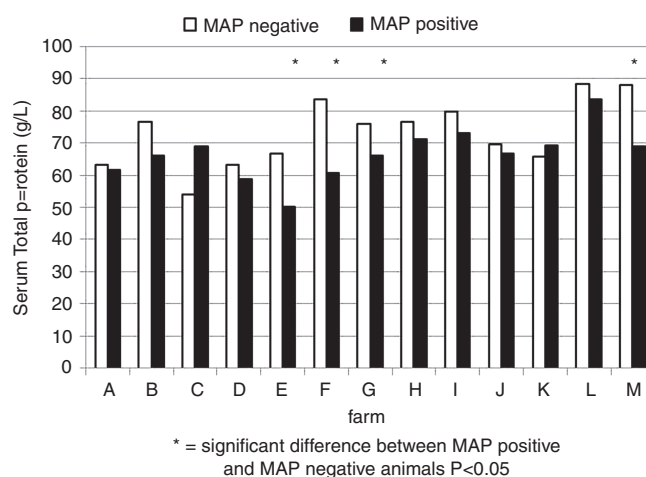


FIG 2: Least square means for serum total protein for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) positive and MAP-negative animals within farms

case-control study showing a decrease of the serum concentration of TP in culture-positive cows that are still not in the advanced clinical stage of disease. This is in accordance with the results of Raizman and others (2007a, b), who demonstrated a slight but significant decrease of TP in cows with clinical signs of paratuberculosis and in heavy shedders. It confirms their assumption that TP levels are already reduced prior to onset of clinical signs. Furthermore, our results are in line with the findings of Szilágyi and others (1989), who had found a decrease in serum TP in young bulls at day 400 postinfection, in comparison with day 160 postinfection.

In cows with clinical paratuberculosis (Patterson and others 1968), and infected sheep with severe intestinal lesions (Allen and others 1974), the protein synthesis rate in the liver is enhanced. This may be due to the decreased intestinal uptake of amino acids. At least in Holstein Friesian dairy cows, it is very likely that paratuberculosis is an enteropathy associated with protein wasting. Degradation of muscle protein may compensate for this lack of essential nutrients, and the organism uses these amino acids after transamination by the liver and the udder cells to assure the synthesis of functional and milk proteins. This leads to the hypothesis of an increased protein turnover in infected cows also in a subclinical stage of the disease. The obvious decline in TP in relation to the increase of shedding, although not significant, supports this assumption. This may, at least in part, explain the drop in milk yield which is evident already in the early stage of

TABLE 3: Frequencies of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) positive and MAP-negative animals with serum concentrations of metabolic parameters within or without reference ranges

Parameter	Dimension unit	Reference range†	Individual MAP status				Sign.‡	Total	
			Positive		Negative			n	Per cent
			n	Per cent	n	Per cent			
Alanine aminotransferase	nkat/l§	≤1334 >1334	140 87	61.7 38.3	149 90	62.3 37.7	289 177	62.0 38.0	
Glutamate dehydrogenase	nkat/l§	≤500	156	68.7	184	77.0	340	73.0	
		>500	71	31.3	55	23.0	126	27.0	
Total protein	g/l	<68¶	114	50.2	83	34.7	197	42.3	
		>68¶	113	49.8	156	65.3	269	57.7	
Cholesterol	mmol/l	≥2	219	96.5	232	97.0	451	96.8	
		<2	8	3.5	7	2.9	15	3.2	
Bilirubin	µmol/l	<5	197	86.8	216	90.4	413	88.6	
		>5	30	13.2	23	9.62	53	11.4	
β-hydroxybutyrate	µmol/l	≤600	57	25.1	64	26.8	121	26.0	
		>600	170	74.0	175	73.2	345	74.0	

†According to Füll (2005)

‡Significance: n. s.=not significant, * $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$

§Catalytic activity, nano katal/l

¶According to Füll (2013)

disease, and more pronounced in later stages (Beauudeau and others 2007, Raizman and others 2007b). As a complementary hypothesis on the pathogenesis of wasting due to mycobacterial infections, the macrophage release of tumour necrosis factor α is discussed to be one mechanism of fat tissue and skeletal muscle protein degradation (Juste and others 1992). On the other hand, tumour necrosis factor α signalling is not assumed to be involved in macrophage activation at sites of the MAP infection, and its expression may be specifically limited by the infection through as-yet-unknown mechanisms (Buza and others 2003, Coussens 2004). Despite the ambiguous role of tumour necrosis factor α , malabsorption may not be the only cause of hypoproteinaemia in MAP-infected dairy cows.

Within the individual herds, we found various levels of significance between mean TP values of MAP-negative or MAP-positive cows. Significant within-herd differences could be shown in only four out of 13 herds (Fig 2). To some extent, this may be explained by the reduced sample size for the within-herd calculation. Furthermore, this may be caused by different management and feeding conditions. The influences of farm management on metabolic parameters are very complex, and this study did not aim to analyse aspects of farm management on these traits. We tried to exclude these effects by use of MAP shedders and MAP-negative herd-mates from the same farm in the same parity, and by including the stage of lactation as DIM classes as well as the milk yield into the model. A presumed cause for the different level of significance within herds may be the dietary protein supply. To stimulate milk production, various feeding strategies are characterised by an excessive protein supply, mostly using an enhanced proportion of rumen-undegradable protein. In MAP-negative cows, this results in an increased intestinal amino acid absorption which sufficiently meets the requirements for maintenance, milk protein synthesis and serum protein synthesis as well. In herds that are fed with a high proportion of rumen-undegradable protein (eg, soy protein) and less rumen-degradable protein (eg, grass protein), the nitrogen supply for the ruminal synthesis of microbial protein which is of the highest biological value, may be insufficient. Hence, the reduced intestinal supply of microbial protein and the disturbed jejunal absorption may potentiate each other in MAP-positive cows, resulting in a significantly decreased serum protein concentration. Similarly, other nutritional factors or differences in the herd management may influence the protein metabolism and the serum TP concentrations. Furthermore, in those herds with no differences in TP concentration regarding MAP status, one reason could be a generally insufficient dietary protein supply. This impairs amino acid absorption in all cows. This is presumed in herds A, C, D and E, where the TP mean concentration of the MAP-negative herd-mates is below the threshold value of 68 g/l. In herds B, H, I, J, K and L, other factors may limit milk synthesis, and therefore, the needs of amino acids for milk protein synthesis. In this case, serum protein synthesis is not limited, and the mean serum TP concentration remains in the normal range.

For MAP-infected dairy cows, an enhanced negative energy balance because of the reduced nutrient absorption could be assumed. This may affect the constitution, fitness and immunity of high-yielding cows at the beginning of lactation. However, in the present study, BHBA as a specific indicator of negative energy balance was not increased in MAP-positive cows relative to MAP-negative herd-mates. Furthermore, other indicators of high metabolic load as BILI or CHOL did not differ between positive and negative animals. Hence, there is no indication for a more distinct negative energy balance in MAP-positive cows compared to MAP-negatives. This is in line with other studies which failed to identify a relationship between a MAP infection and subclinical ketosis (Raizman and others 2007b). We assume that energy supply via short-chain fatty acids, mainly absorbed via the rumen mucosa, sufficiently compensate for the lack caused by reduced glucose uptake at the intestinal level, where normally some degree of glucose absorption in ruminants occur.

Serum concentrations of GLDH are frequently used to monitor liver cell turnover in lactating cows (Stengärde and others 2010). The present study shows an increase of GLDH serum activity as an indicator of liver cell death in culturally MAP-positive cows. However, the rise was only moderate and did not exceed the reference value of 500 nkat/l. Furthermore, we did not find a more distinct increase in

heavy shedders compared to low shedders. Our results suggest that the elevated GLDH measured in the MAP shedding animals indicated an enhanced metabolic stress on liver cells, which may be due to a higher protein synthesis. Assuming this, the elevated serum GLDH activity would support the hypothesis of the increased protein turnover in the liver as a mechanism compensating for the intestinal protein loss. Diminished availability of amino acids, which is caused by the disturbed intestinal uptake, may cause hypoproteinaemia on the one hand and diminish milk protein synthesis in the udder cells on the other hand, which subsequently reduces milk yield.

The MAP infection significantly influences the metabolic parameters TP and GLDH. Hence, the interpretation of these parameters in metabolic profile tests could be improved if the MAP status of the animal is considered: for instance by excluding MAP positives from sampling.

We conclude that MAP-infected dairy cows suffer from hypoproteinaemia already in the early stage of the disease which is characterised by low faecal shedding of MAP and the absence of clinical signs. This is accompanied by an increased GLDH activity which indicates an elevated liver cell turnover probably caused by the enhanced endogenous protein turnover. Because the MAP infection significantly influences serum concentrations of TP and GLDH, both metabolic parameters may be considered as indirect indicators for paratuberculosis and should receive attention when interpreting laboratory results in internal medicine.

MAP status had no effect on parameters of the energy metabolism in dairy cows. Therefore, alterations in protein metabolism are likely to be the main metabolic pathway that induces body weight loss and reduced milk yield in MAP-infected dairy cows.

Acknowledgements

The present study is a part of the 'Paratuberculosis control program in Thuringian dairy herds' of the Thuringian Ministry of Social Welfare and Health and the Thuringian Animal Diseases Fund. The authors thank both institutions for their support. Furthermore the authors would like to thank Ute Schau and her team for doing the faecal culture, Erika Menzer for the biochemical analysis, Katharina Schlotter for her assistance and Grant Morseth for improving the English style.

References

- ALLEN, W. M., PATTERSON, D. S. & SLATER, T. F. (1974) A biochemical study of experimental Johne's disease. III. Protein metabolism in sheep and mice. *Journal of Comparative Pathology* **84**, 391–398
- BEAUDEAU, F., BELLARD, M., LJOY, A. & SEEGERS, H. (2007) Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis (Map) infection in dairy cows. *Veterinary Research* **38**, 625–634
- BENDIXEN, P. H. (1978) Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nordisk Veterinær Medicin* **30**, 63–168
- BUZA, J. J., MORI, Y., BARI, A. M., HIKONO, H., AODON-GERIL, HIRAYAMA, S., SHU, Y. & MOMOTANI, E. (2003) *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection causes suppression of RANTES, monocyte chemoattractant protein 1, and tumor necrosis factor alpha expression in peripheral blood of experimentally infected cattle. *Infection and Immunity* **71**, 7223–7227
- COUSSENS, P. M. (2004) Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle. *Infection and Immunity* **72**, 3089–3096
- ENGLUND, S., BALLAGI-PORDÁNY, A., BOELSKE, G. & JOHANSSON, K. E. (1999) Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* **33**, 163–171
- ECTEAU, M. E. & WHITLOCK, R. H. (2010) Paratuberculosis in cattle. In *Paratuberculosis. Organism, Disease, Control*. Eds M. A. BEHR, D. M. COLLINS. CAB International, pp 144–156
- ELLER, M., HUWILER, K., STEPHAN, R., ALTPETER, E., SHANG, A., FURRER, H., PFYFFER, G. E., JEMMI, T., BAUMGARTNER, A. & EGGER, M. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* **9**, 607–613
- FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT (FLI) (2010) Amtliche Methodensammlung des Friedrich-Löffler Instituts; 271–285. www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Methodensammlung_2010-07-07.pdf
- FÜLLM, M. (2005) Spezielle Untersuchungen beim Wiederkäuer. In *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Eds W. Kraft & M. U. Dürr. Schattauer, pp 444–474
- FÜLLM, M. (2013) Referenzbereiche Rind. www.vetmed.uni-leipzig.de/ik/wmedizin/labor/diagnostik/referenzwerte/rind.htm
- HENDRICK, S. H., KELTON, D. F., LESLIE, K. E., LISSEMORE, K. D., ARCHAMBAULT, M. & DUFFIELD, T. F. (2005) Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **227**, 1302–1308

- JENDRASSIK, L. & GRÓF, P. (1938) Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. *Biochemische Zeitschrift* **297**, 81–89
- JUSTE, R. A., ADURIZ, G., BRAVE, M. V., GONZALEZ, L. & OREGUI, L. (1992) A comparative study of digestibility in paratuberculosis and other wasting diseases in sheep. In Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. Eds R. J. CHIODINI & J. M. KREEGER. Providence, USA: *International Association for Paratuberculosis*, p 21
- KÖRMENDY, B., SZILÁGYI, M., SURI, A., TUBOLY, S. & NAGY, G. (1990) Some diagnostic features of the pathogenesis of bovine paratuberculosis (Johne's disease) and serum biochemical changes after oral reinfection. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* **37**, 229–235
- KRAFT, W. (2005) Leber. In *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Eds W. KRAFT & M. U. DUERR, W. KRAFT, U. M. DÜRR. Schattauer, pp 145–169
- KÜPPER, J., BRANDT, H. R. & ERHARDT, G. (2013) Genetic association between CARD15 polymorphism and infection status by *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in German Holstein cattle. *Animal Genetics*, **45**, 114–116
- LE BLANC, S. J. (2010) Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction Development* **56**(Suppl), 29–35
- MOMOTANI, E., WHIPPLE, D. L., THIERMANN, A. B. & CHEVILLE, N. F. (1988) Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology* **25**, 131–137
- PATTERSON, D. S. P., ALLEN, W. M., BERRETT, S. & SWEASEY, D. (1968) The chemical composition and capacity for protein synthesis of the liver of cattle suffering from clinical Johne's disease. *Journal of Medical Microbiology* **1**, 137–143
- RAIZMAN, E. A., FETROW, J. P. & WELLS, S. J. (2009) Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* **92**, 4929–4936
- RAIZMAN, E. A., FETROW, J. P., WELLS, S. J., GODDEN, S. M., OAKES, M. J. & VAZQUEZ, G. (2007b) The association between *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* **78**, 179–195
- RAIZMAN, E. A., WELLS, S. J., GODDEN, S. M., FETROW, J. P. & OAKES, M. J. (2007a) The association between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fecal shedding and the diagnose of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Preventive Veterinary Medicine* **78**, 166–178
- STENGÄRDE, L., HOLTENIUS, K., TRAVEN, M., HULTGREN, J., NISKANEN, R. & EMANUELSON, U. (2010) Blood profiles in dairy cows with displaced abomasum. *Journal of Dairy Science* **93**, 4691–4699
- SWEENEY, R. W. (1996) Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America* **12**, 305–312
- SWEENEY, R. W., COLLINS, M. T., KOETS, A. P., MC GUIRK, S. M. & ROUSSEL, A. J. (2012) Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and other Susceptible Species. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **26**, 1239–1250
- SZILÁGYI, M., KOERMENDY, B., SURI, A., TUBOLY, S. & NAGY, G. (1989) Experimental paratuberculosis (Johne's disease)-studies on biochemical parameters in cattle. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* **43**, 463–470
- TIWARI, A., VAN LEEUWEN, J. A., MC KENNA, L. B., KEEFE, G. P. & BARKEMA, H. W. (2006) Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal* **47**, 874–882



2.4 Einflüsse auf den Erfolg der Paratuberkulosebekämpfung

- 2.4.1 Donat K, Schmidt M, Köhler H, Sauter-Louis C (2016): Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. J Dairy Sci 99: 3744-3752 (Studie 9)



Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds

Karsten Donat,^{*1} Mandy Schmidt,[†] Heike Köhler,[‡] and Carola Sauter-Louis[§]

^{*}Animal Health Service, Thuringian Animal Diseases Fund, Victor-Goertler-Straße 4, 07775 Jena, Germany

[†]Animal Health Service, Saxon Animal Diseases Fund, Löwenstraße 7a, 01099 Dresden, Germany

[‡]Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany

[§]Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, 17493 Greifswald–Insel Riems, Germany

ABSTRACT

Improvement of hygiene and herd management to reduce the contact of calves with adult cow feces to prevent new infections is one of the basic strategies to manage paratuberculosis-affected dairy herds. Control programs should recommend an evidence-based selection of factors that demonstrably reduce the transmission of the infectious agent and decrease the prevalence of infected cattle to improve acceptance and implementation of the recommended measures among farmers. This study aimed to assess the influence of several management measures on control success in a longitudinal study in 28 large dairy herds with a median size of 415 cows in Thuringia, Germany. The cumulative incidence of cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) per year was determined by individual fecal culture of all cows during 5 consecutive years. Relevant management practices as well as herd size, milk yield, and purchase of cattle were recorded by on-farm risk assessment. Mean holding time of MAP shedders within the herd was calculated from individual data of each shedding cow. Using multiple regression models, separate calving pens for shedders and disinfection of the pen after use were identified as significant risk factors that reduced the cumulative incidence of MAP shedders per year on the herd level. The results provide evidence that, in addition to other factors, calving hygiene and management of the calving pens are crucial for paratuberculosis control, particularly in large dairy herds. Considered together with the outcome from other studies, these results might be important to weight various risk factors and to avoid overburdening and overwhelming farmers and keeping them committed.

Key words: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, control measure, management practice, risk factor

INTRODUCTION

Paratuberculosis, or Johne's disease, is caused by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). The majority of new infections probably occur in newborn calves and youngstock, because they are believed to be the most susceptible animals in the herd, and the direct fecal–oral route is generally considered the most important transmission route (Sweeney et al., 2012). In utero infections occur in 20 to 60% of fetuses from clinically affected cows (Whittington and Windsor, 2009), whereas these infections are seldom observed in calves born to cows shedding low numbers of MAP (Adaska and Whitlock, 2012). In addition, bio-aerosols such as dust from the barn should be considered as transmission routes, as recent experiments have shown that inhalation of MAP can result in infection (Eisenberg et al., 2011). The infection causes a chronic granulomatous enteric disease, predominantly of ruminants, that is characterized by a long incubation period, therapy-resistant aqueous diarrhea, and formation of edema due to hypoproteinemia (Tiwari et al., 2006). Decreased milk production occurs even in cows without clinical symptoms (Raizman et al., 2007a; Smith et al., 2009; Donat et al., 2014a). Premature culling (Smith et al., 2010) and increased susceptibility to other diseases (Raizman et al., 2007b) reduce the farmer's income (Wolf et al., 2014). Furthermore, a link between Crohn's disease, a human inflammatory bowel disease, and MAP has been noted and therefore a role of MAP as a potential zoonotic pathogen is suspected (Over et al., 2011; Sweeney et al., 2012). Considering the economic impact of paratuberculosis and the potential risk for human health, control measures should be implemented in MAP-positive herds.

Effective paratuberculosis control programs involve 3 main objectives: first, to prevent new infections by bios-

Received November 11, 2015.

Accepted January 17, 2016.

¹Corresponding author: kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

security and hygiene management; second, to reduce the number of infected animals that may shed MAP (test and cull strategies); and third, to improve resistance to paratuberculosis through vaccination or genetic selection (Sweeney et al., 2012). Purchase and introduction of animals are important risk factors associated with the introduction of the infectious agent into the herd (Künzler et al., 2014; Rangel et al., 2015). Usually, improving management practices and the standard of hygiene to reduce calf exposure to infected manure is highly recommended in many control programs, as it is cost-effective in reducing MAP transmission as well as other diseases transmitted by the fecal-oral route in most operations (McKenna et al., 2006).

In MAP-positive herds, calves are presumably exposed to feces from cattle that shed the infectious agent. Ingestion of the bacteria from the environment is important because MAP can persist in the environment at 5°C for more than 9 mo, at 15°C for at least 3.5 mo, and in a dry, fully shaded environment for up to 55 wk (Lovel et al., 1944; Jørgensen, 1977; Whittington et al., 2004). In manure stored in lagoons, viable MAP was found after 8 wk and MAP DNA after 175 d (Grewal et al., 2006). Transmission of the agent is believed to be stopped most effectively by preventing newborn calves and youngstock from contact with any matter that may contain feces from adult cattle, be it milk or colostrum, water, feed, dust, or other sources (Doré et al., 2012). Although studies have shown evidence for an age-dependent susceptibility, with a high risk of infection when exposure to the infectious agent occurs at birth (Windsor and Whittington, 2010), calves up to 12 mo of age are susceptible to infection (Mortier et al., 2013). This is particularly important if the dam is infected or the environment is highly contaminated. Because of the many possible ways in which calves can become exposed to MAP, numerous recommendations for decreasing the risk of new infections in dairy herds have been published and summarized (McKenna et al., 2006; Sweeney et al., 2012) and adopted as guidelines. Trying to cover the majority of infection routes, these guidelines have become complex and may overwhelm and overburden farmers. Furthermore, producers consider most of the recommended measures expensive and difficult to implement and maintain (Campe et al., 2014). Due to the long interval between exposure to the infectious agent and detectable disease and because of the various transmission routes, it is difficult to quantify the significance of recommendations related to minimizing calf exposure to the infectious agent, and there appears to be a lack of published knowledge concerning this question (McKenna et al., 2006). Doré et al. (2012) reviewed 23 studies, published between

1950 and 2010, concerning risk factors associated with MAP transmission to dairy calves. Most of the studies were cross-sectional and based on ELISA testing. Five of these studies referred to a case definition based on detection of the organism, and only one of those, which was conducted in a Dutch dairy herd, had a longitudinal design and referred to new cases or incidence. The contact of calves with adult cow feces was found to be the most important risk factor.

In addition, studies published between 2010 and 2014 have been reviewed. Pillars et al. (2011) found the exposure to adult cows other than the dam at birth and feeding colostrum from one cow to multiple calves to be significant risk factors. Furthermore, in 226 Canadian dairy herds grouped on milk ELISA results, the purchase of cattle during the last 20 yr and the number of calves with diarrhea were significant risk factors for a herd to be MAP positive, and monensin feeding to cows and high frequency of feeding of pooled colostrum were associated with increasing numbers of cows being positive by milk ELISA (Sorge et al., 2012). In a longitudinal study in 21 Canadian dairy herds on the effect of changing management practices, no hygiene-related factors were identified that influenced the incidence rate of MAP shedders (Arango Sabogal et al., 2014). A cross-sectional study in Brazil identified not using a maternity pen as a risk factor (Vilar et al., 2015), and a Swiss case-control study found several factors related to contamination of the youngstock area with manure from adults and the management of the calving area to be associated with within-herd prevalence (Künzler et al., 2014). A study in 3 Minnesota dairy herds provided evidence that calves born in an individual calving pen had a lower hazard ratio for testing MAP positive in subsequent years compared with cows born in group calving pens (Pithua et al., 2013).

Therefore, the objective of this study was to assess the influence of management practices and hygiene measures on the incidence of cows shedding MAP in a longitudinal study of herds participating in the Thuringian control program. We hypothesized a significant influence of several management practices on the reduction of MAP shedder's incidence within a 5-yr control period.

MATERIALS AND METHODS

Study Herds and Cumulative Incidence

Since 2003, voluntary paratuberculosis control programs have been offered to dairy farmers in the German federal states of Thuringia and Saxony. Both programs include, among other measures, annual screening of

all cows for MAP by fecal culture (**FC**) on Herrold's egg yolk medium as described previously (Donat et al., 2014b). Cows that are MAP positive are scheduled to be culled as outlined by Sweeney et al. (2012), who recommend immediate culling of heavy shedders and an elimination of low shedders at the end of the lactation or in case of other health problems. The MAP-positive cows that were kept within the herd were not retested in the following year. This procedure implied that only new cows (first lactation or purchased cows) and previously negative cows were scheduled for testing. Cumulative incidence (**CumInc**) was calculated from the new FC MAP-positive cows over the mean number of cows kept within the herd in each year.

Twenty-eight Holstein MAP-positive dairy herds enrolled in the paratuberculosis control programs in Thuringian and Saxon cattle herds between 2008 and 2012 were selected for this study. All herds were housed in freestalls. Descriptive statistics of the herd size and the CumInc of cows shedding MAP within each herd are given in Table 1. Because the number of cows kept within each herd varied slightly during the study period, the average number of cows kept during the years 2008 to 2012 was calculated and reported as herd size.

On-Farm Management and Hygiene Assessment

From 2003 through 2007, animal health service veterinarians advised the owners of the herds enrolled in the control program to improve farm and hygiene management. To evaluate the implementation of these recommendations, a questionnaire-based risk assessment tool was developed by the veterinarians of the Thuringian Animal Health Service (Jena, Germany). The questionnaire covered 32 on-farm management practices (Supplementary Table S1; <http://dx.doi.org/jds.2015-10625>) that were related to current knowledge concerning management recommendations to improve

hygiene management in the context of paratuberculosis control strategies (Sweeney et al., 2012). In short, the questionnaire included the following aspects:

- calving hygiene (questions 1–12): location of the calving pen within the barn; separate calving pen for MAP shedders; average number of cows in a calving pen; kind of litter; separation, cleaning, and disinfection of the calving pen; disinfection of calving pens for known MAP shedders after use; average time span between calving and separation of newborn calves from their dam; cleanliness/cleaning of cows before introduction into the calving pen; cleaning of neonates after calving; cleaning and disinfection of obstetric instruments;
- colostrum management (questions 13–20): cleanliness of milking colostrum; source of colostrum used for first feeding and traceability/documentation; average time span between calving and first feeding of colostrum; storage of colostrum for first feeding; cleanliness of drinking vessels; use of milk from known MAP shedders to feed calves;
- calf and youngstock rearing (questions 21–32): location of pens for calves and youngstock within the barn; cleaning and disinfection of calf pens; personal hygiene of calf keepers; cleanliness of feeding barns; feeding of mixed colostrum/tank milk to calves; quality of roughage (hay, haylage, silage) for calves in the first 2 mo; cleanliness of tools, equipment, and machines used in handling calves; cleaning and disinfection of calf pens after occupancy; pasturing of calves together with cows.

Furthermore, herd size, milk yield (average 305-d milk production, kg), and purchase of cattle (own restocking, sporadic or general purchase) were recorded. The response categories for all questions had scores from 1 to 3, increasing with assumed increased risk of

Table 1. Herd size, cumulative incidence of cows with fecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) within the years 2008 to 2012, and holding days of MAP shedders

Variable	Minimum	First quartile	Median	Third quartile	Maximum
Average herd size ¹ (no.)	35	196	415	635	1,050
Average milk yield ² (kg)	6,268	8,709	9,100	9,345	11,169
Cumulative incidence within each herd (%)					
2008	1.8	4.8	8.1	15.5	46.9
2009	0.5	3.8	5.5	14.4	67.7
2010	2.3	3.5	5.2	13.6	41.3
2011	1.1	3.1	5.0	11.1	37.6
2012	1.4	2.4	3.6	6.1	25.4
Average holding days of MAP shedders ³ (d)	15	115	232	284	433

¹Average number of cows kept within the herd between 2008 and 2012.

²Average 305-d milk production in the year of the risk assessment (i.e., period of the DHI test).

³Average holding days of MAP shedders within the herd after reporting the test result.

spreading MAP within the herd. Response category 2 represented the common situation in herds participating in the control program as perceived by the animal health service veterinarian (standard). For each trait, the management practices presumed to minimize the spread of MAP better than the standard were categorized as 1 (better), and those that may have increased the risk of MAP spreading as 3 (worse). Therefore, we presumed that the response category scores were a fair representation of a reduced or enhanced risk of spreading MAP through this management practice.

The risk assessment was conducted in 2010 or 2011 by 6 animal health service veterinarians in 55 control program herds in Thuringia and Saxony; from those, the 28 study herds were selected as described above. During these on-farm visits, owners of the study herds were advised not to change their management practices during the study period. They were told they would obtain further information on how to improve management once the analysis of the study was finished. As they had previously improved their management considering paratuberculosis control to an extent they could afford and manage permanently, they were content with this agreement and, in general, management practices were not modified during the study.

For each MAP-positive cow, the time span between the date when the test result was reported to the owner and the date of culling or slaughtering was calculated. The date of reporting the test result was retrieved from the laboratory databases of the laboratories involved (laboratory of the Thuringian Animal Health Service, Jena, Germany; Saxon state laboratory, Dresden, Germany). The date of culling or slaughtering was extracted from the German database of animal origin (HI-Tier, administered by the Bavarian Ministry of Food, Agriculture and Forestry, Munich, Germany). The arithmetic mean of holding days calculated from all MAP-positive cows was calculated for each herd. We used this herd-level variable as an estimate for compliance of the owner to cull MAP-positive cows.

Risk Factor Analysis

All computations were made using SPSS for Windows (version 19; IBM, Armonk, NY), and the significance level was set at $\alpha = 0.05$. As a correlate of control measures success, the shifting of the CumInc from 2008 to 2012 was used. To account for the different initial levels of CumInc in a particular herd, the relative shifting of CumInc ($\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$) was calculated as follows:

$$\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}} (\%) = \frac{[\text{CumInc}_{2012} (\%) - \text{CumInc}_{2008} (\%)]}{\text{CumInc}_{2008} (\%)},$$

where $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$ = relative shifting of CumInc during the study; CumInc_{2008} = CumInc in 2008; and CumInc_{2012} = CumInc in 2012.

To identify risk factors associated with $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$, a multiple linear regression model was used. All variables were tested in a univariable analysis against $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$ using the Kruskal-Wallis test procedure, where 3 classes were used according to the response categories of the risk factor analyses. In case of low frequencies (≤ 5) in one class, classes were merged with one of the other classes according to meaningful practical aspects and analyzed using the Mann-Whitney U-test. Because of the large number of variables and the limited effective sample size, only those variables that had a P -value ≤ 0.1 in the univariable analysis were included in the model. One herd with an extreme relative shifting of CumInc was identified as an outlier and excluded from the regression analysis. Through stepwise regression with backward elimination, only predictors with $P \leq 0.05$ remained in the final linear model.

The formula of the linear regression model used was

$$\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}} = a + b_1 (\text{CP}_{\text{sep}}) + b_2 (\text{CP}_{\text{dis}}) + b_3 (\text{col}_{\text{source}}) + b_4 (\text{pers}_{\text{hyg}}),$$

where $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$ = relative shifting of cumulative incidence during the study; CP_{sep} = separate calving pen for MAP-positive cows; CP_{dis} = disinfection of MAP shedder's separate calving pens; $\text{col}_{\text{source}}$ = source of colostrum for first feeding; pers_{hyg} = staff hygiene in calf and youngstock holdings; a = constant; and b_1, \dots, b_4 = model coefficients relating to $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$ in the regression model.

Parameters were tested for multicollinearity. Only the correlation between the parameter "disinfection of MAP shedder's separate calving pen" and the parameter "staff hygiene routine when entering calf area" showed correlation ($r = 0.539$), thus the model was calculated once omitting the parameter "disinfection of MAP shedder's separate calving pen" and a second time omitting the parameter "staff hygiene routine when entering calf area." Pairwise interactions were investigated. The fit of the model was assessed using the adjusted coefficient of determination and Schwarz's Bayesian information criterion (BIC).

For further analysis, herds were classified as "effective" if $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$ was less than or equal to -50% and "not effective" if $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$ was greater than -50% . Concerning management practices as influencing factors of interest, their relation to the dichotomized $\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}}$ category (effective or not effective) was assessed using a logistic regression model. Contingency tables and the Mann-Whitney U-test procedure were

used for univariable analysis. Classes of low frequencies were combined with other classes on biological reasoning. Variables with $P \leq 0.1$ were included into the multivariable logistic model. By starting a stepwise regression with backward elimination, only those predictors with $P \leq 0.05$ remained in the final model.

The formula of the logistic model used was

$$\text{logit}(P_{\text{eff}}) = a + b_1(\text{CP_sep}) + b_2(\text{CP_dis}) + b_3(\text{pers_hyg}),$$

where P_{eff} = probability of effective control ($\Delta\text{CumInc}_{\text{rel}} \leq -50\%$); CP_sep = separate calving pen for MAP-positive cows; CP_dis = disinfection of MAP shedder's separate calving pen; pers_hyg = staff hygiene in calf and youngstock holdings; a = constant; and b_1, \dots, b_3 = model coefficients relating to P_{eff} in the logistic regression. The model fit was assessed using Nagelkerke's pseudo R-square.

RESULTS

Cumulative Incidence

The average CumInc of MAP shedders in the 28 study herds decreased within the period of the study from 8.1% in 2008 to 3.6% in 2012. There was a wide range from 1.8 to 46.9% at beginning of the study. During the study period, CumInc exceeded 30.0% in only 2 herds. The distribution of the CumInc per herd and year is given in Table 1. For 13 herds that were classified as effective regarding the effect of the control measures, a relative shift of CumInc of less than or equal to -50% was achieved, whereas 15 herds did not reach that level of reduction and were classified as not effective.

Univariable Analysis

In the univariable analysis, 4 variables were identified with a P -value < 0.1 ("separate calving pen for MAP-positive cows," "disinfection of MAP shedder's separate

calving pen," "source of colostrum for first feeding," and "staff hygiene in calf and youngstock holdings"). These 4 variables were selected for the multiple regression models. Regarding the variables "use of colostrum from MAP-positive cows for calf feeding" and "nonsaleable milk fed to calves," most of the herds had implemented the recommendations concerning hygiene improvement, as 24 herds discarded colostrum of MAP shedders and 4 herds used it after pasteurization but not for first feeding. Nonsaleable milk was not fed to calves kept for restocking in 21 herds, used after pasteurization in 6 herds, and fed without pasteurization in only 1 herd. The average number of cows in a calving pen exceeded 3 cows in 13 herds. Only 4 herds managed separate calvings for each cow (Supplementary Table S1; <http://dx.doi.org/jds.2015-10625>).

Regarding the herds with a relative shift of the CumInc of less than -50% (i.e., effective control), 6 herds had separate staff in calf and youngstock holdings compared with 2 in the "not effective" control farms. In contrast, 5 of the latter did not implement any measures to ensure good personal hygiene of calf and youngstock keepers (Supplementary Table S1).

Multiple Linear Regression

Four variables with a P -value < 0.1 were included in the multiple regression model. Using stepwise regression with backward elimination including all 4 variables or using 3 variables and omitting 1 of the correlated variables resulted in the same final model, with only one predictor variable remaining—the separate calving pen for MAP-positive cows (Table 2). Although this single variable explained 16.8% of the variation, the outcome indicates that this variable is a significant predictor of lowering the CumInc.

Multiple Logistic Regression

To distinguish herds where control measures effectively reduced the CumInc from those where control measures were not as effective, we used a logistic regression

Table 2. Final multiple linear regression model for risk factors associated with the relative shifting of cumulative incidence of cows with fecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in 28 study herds during 5 consecutive years¹

Variable	Coefficient	SE	95% CI		Standardized coefficient	P	R	Adjusted R ²	SE R ² (%)
Separate calving pen for MAP shedders	56.2	22.1	10.8	101.8	0.45	0.017	0.446	0.168	50.7
Constant	-105.7	29.3	-165.8	-45.6		0.001			

¹95% CI = 95% confidence interval for the nonstandardized coefficient; P = P -value of the standardized coefficient; R = multiple regression coefficient.

Table 3. Final logistic regression model for risk factors associated with the category (“effective” or “not effective”) of the relative shifting of the cumulative incidence of cows with fecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in 28 study herds during 5 consecutive years¹

Variable	β	SE (β)	Wald	<i>P</i>	Exp (β)	95% CI [Exp (β)]		R ² Nagelkerke
Disinfection of separate calving pen for MAP shedders after use	-1.838	0.927	3.935	0.047	0.159	0.026	0.978	0.203
Constant	0.452	0.483	0.874	0.35	1.571	—	—	

¹ β = coefficient; *P* = *P*-value of the coefficient; Exp (β) = odds ratio; 95% CI [Exp (β)] = 95% CI of the odds ratio; R² Nagelkerke = Nagelkerke’s pseudo-R square.

model. The only predictor that was significant in the final model was the disinfection of the separate calving pen for MAP shedders after use. Using Nagelkerke’s pseudo R-square, the percentage of variance explained by the model was estimated to be approximately 20% (Table 3). A separate calving pen for MAP shedders was found in each of the 13 herds with a relative shift of the CumInc of less than -50%, but in only 6 of the 12 “not effective” control farms. However, this variable was not significant in the logistic regression model.

DISCUSSION

This study established 2 predictors of successful paratuberculosis control in dairy herds: the installation of a separate calving pen for MAP shedders and its effective disinfection. These findings complement the set of recommendations to manage MAP-positive dairy herds as outlined by Sweeney et al. (2012) and provide additional evidence that MAP infection is associated with the immediate neonatal environment, as reviewed by Doré et al. (2012). Our results emphasize management practices that are particularly important in medium-sized to large dairy farms, which are represented by the herds included in this study. To a much greater extent than small dairy farms, larger operations have the opportunity to create and use such a facility. If the average number of calvings per day is >1, a dairy farm needs more than one calving pen to enable regular cleaning of this area and professional disinfection using disinfectants suitable for inactivation of MAP, such as cresols, organic acids, and peroxides. Improving the calving pen’s hygiene affects animal health in general and helps specifically in limiting transmission of MAP to newborn calves. The lack of personnel in dairy farms, driven by the high economic pressure of low-priced milk and the scarcity of skilled workers in dairy farming, make it difficult to guarantee a good level of hygiene for each calving throughout the year. Therefore, particular care should be taken when a special risk for MAP transmission is expected: the calving of a MAP

shedder. The Danish paratuberculosis control program recommends that “red cows” (2 positive milk ELISA results) should be slaughtered before next calving so that they do not enter the calving area (Nielsen and Toft, 2011). In Germany, slaughter of pregnant cows is no longer appropriate for animal welfare reasons. Even Danish farmers state that more than 85% of the farmers will allow calving of some or most “red cows.” In this situation, special emphasis should be given to calving of MAP shedders. A highly practical approach to implement this is to mark shedders and to let them calve in a separate place that will be professionally cleaned and disinfected afterward.

Our findings are in line with the results of a cross-sectional study in Brazil, which identified not using a maternity pen as a risk factor (Vilar et al., 2015), and a Swiss case-control study, where the absence of a calving pen in freestalls were associated with higher prevalence of Johne’s disease than separate boxes with deep straw bedding and calving in a tethered stable (Künzler et al., 2014).

Furthermore, it is generally agreed that preventing contact between calves and cow feces is a crucial factor to reduce the risk of MAP transmission (Doré et al., 2012). This is supported by the recent findings that herds with higher manure contamination of animals, pens, and feeders have an increased risk (1.31 times) of having at least one positive environmental sample (Adaska and Whitlock, 2012; Sweeney et al., 2012). Furthermore, exposure at birth to adult cows other than the dam is a risk factor for these calves, once they are cows later on, for testing positive for MAP (Pillars et al., 2011). Therefore, MAP shedders should be removed from the herd as soon as possible after detection. Although the mean holding time of MAP shedders after their identification was not a significant variable in our study (Supplementary Table S1; <http://dx.doi.org/jds.2015-10625>), the immediate culling of MAP shedders is an effective measure to control the spread of MAP within herds (Kudahl et al., 2011).

Generally, identifying the most important recommendations to improve hygiene management and reduce

the transmission of MAP within a herd is an important issue and a challenge. The importance results from the fact that usually a long and unranked list of knowledge-based measures is recommended that may overwhelm and overburden farmers. Therefore, numerous studies have shown that distinct factors are risk factors for paratuberculosis transmission. Despite the differences in internal and external validity regarding study design, numbers of involved animals and herds, herd selection, case definition, diagnostic tests, and potential biases, most studies have identified none, one, or a few risk factors. A systematic review (Doré et al., 2012) showed that most of the risk factors were closely related to fecal contamination and hygiene, whereas source of colostrum (for first feeding) or milk (waste or tank milk) appeared to be of less relevance. Moreover, these variables were not found as risk factors in later studies (Pillars et al., 2011; Sorge et al., 2012; Wolf, 2014) nor in our study. However, these practices are biologically plausible and should not be neglected in paratuberculosis control. Neither should hygiene of calf rearing be neglected, as a recent study provided evidence that infected calves can excrete the infectious agent (Wolf et al., 2015).

Therefore, the value of our study is to provide evidence for the significance of the separate calving pen and its disinfection for the successful control of paratuberculosis, but not to exclude other factors as risk factors. For example, nonsaleable milk was not fed to calves kept for restocking in 21 out of 28 herds in our study; hence, the variability of this factor was not sufficient to find significant associations. Although the number of included herds in our study is a limitation, to the best of our knowledge, it is the first study to use the shift of CumInc of MAP shedders within a time span of 5 consecutive years as a dependent variable. The strength of this study is its design as a retrospective cohort study, the diagnostic test used, and the period covered. Applying FC as diagnostic test to each individual cow each year allows calculation of the CumInc without any selection bias or bias caused by pooling, resulting in a precise identification of new shedders in the respective herd. Another retrospective cohort study, with the herd as the study unit, used data from 137 Australian herds, focused on ELISA-positive and clinical cases, and identified calving in paddocks and feeding of "antibiotic milk" as risk factors (Ridge et al., 2010). The results of that study and our own results demonstrate that, regardless of the diagnostic test used, cohort studies are appropriate to identify risk factors for MAP transmission within a herd. Furthermore, the outcome of any risk factor analysis is influenced by the categorization of the recorded variables. In our

study, the original data indicated that the location of calf pens within the barn and the cleanliness of tools and equipment used in areas for calves and youngstock may be important in reducing CumInc. Both variables were deemed significant when using all 3 categories of the risk assessment questionnaire (Supplemental Table S1; <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10625>). Two herds kept calves together with cows, and in 3 herds, tools and equipment used in the calf area were soiled with manure from cows. After merging these categories with other categories of those variables, significance disappeared and the variables were omitted from further analysis. Nonetheless, although the management situation in dairy herds is complex, highly variable, and differs in relation to herd size and business conditions, evidence for a specific number of risk factors could be established.

The management factors "source of colostrum for first feeding," "cleanliness of tools and equipment used in youngstock area," and "staff hygiene routine when entering calf area" are indicators for the implementation of control measures in involved herds. In our study, diversity between herds concerning these traits was only marginal and, therefore, the association was no longer significant when classes were merged or the original data slightly missed the level of significance. Nonetheless, attention should be paid to these factors when on-farm risk assessments are done in practice and farmers are advised regarding the control of paratuberculosis. For example, the cleanliness of tools and equipment used in the calf area and the personal hygiene of calf and youngstock keepers are good indicators of the general hygiene level on a farm, and the significance of these variables lead to the hypothesis that the general hygiene level of farm management may be a good predictor for reduction in MAP incidence. Second, the source of colostrum for first feeding, a factor that slightly missed the significance level in our study ($P = 0.075$), is a biologically plausible risk factor, as previously reported (Diéguez et al., 2008) and is considered one of high importance (Sweeney et al., 2012).

The results of this study lead us to conclude that, at least in medium-sized to large, well-managed dairy herds, a separate calving pen for MAP shedders and its professional hygiene management influence the success of paratuberculosis control. Other management practices such as colostrum management, general hygiene (tools and personnel), and immediate culling of shedders are identified as good candidates for measures of high importance. More research, mainly in longitudinal studies, is needed to determine the impact of distinct management factors on the effectiveness of paratuberculosis control in cattle.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was part of the “Paratuberculosis control program in Thuringian dairy herds” of the Thuringian Ministry of Social Welfare, Family and Health (Erfurt, Germany), which is financed by the Thuringian Animal Diseases Fund (Jena, Germany). The work was complemented by data from dairy farms in Saxony that were supplied by the Saxon Animal Diseases Fund (Dresden, Germany) and the Saxon State Laboratory (Dresden, Germany). The authors thank these organizations for their support. The authors also thank the veterinarians of the Animal Health Services of the Saxon Animal Diseases Fund (Dresden, Germany), Karin Eulenberger and Rene Pützschel, as well as those of the Thuringian Animal Diseases Fund (Jena, Germany), Andreas Ahrens, Katja Hruschka, Wolfram Siebert, and Stefanie Söllner-Donat, who did the on-farm risk assessment together with the authors.

REFERENCES

- Adaska, J. M., and R. H. Whitlock. 2012. Low rate of detectable in utero transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24:153–155.
- Arango Sabogal, J. C., O. Labrecque, J. Paré, G. Côté, J. Roy, S. Buczinski, V. Wellemans, and G. Fecteau. 2014. Impact of changing management practices on the incidence of fecal excretion [FE] of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* [MAP] in dairy herds enrolled in the Québec voluntary prevention and control program (QVPCP). Page 104 in Proc. 12th Int. Colloq. Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Providence, RI.
- Campe, A., H. Köhler, and K. Donat. 2014. Approaches to controlling paratuberculosis in Germany—conditioned by voluntariness and federalism. Pages 31–40 in Proc. 4th Paratuberculosis Forum. European Food Safety Authority, Parma, Italy.
- Diéguez, F. J., I. Arnaiz, M. L. Sanjuán, M. J. Vilar, and E. Yus. 2008. Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet. Rec.* 162:614–617.
- Donat, K., K. Schlotter, G. Erhardt, and H. R. Brandt. 2014b. Prevalence of paratuberculosis in cattle and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. *Vet. Rec.* 174:119.
- Donat, K., A. Soschinka, G. Erhardt, and H. R. Brandt. 2014a. Paratuberculosis: Decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* depends on within-herd prevalence. *Animal* 8:852–858.
- Doré, E., J. Paré, G. Côté, S. Buczinski, O. Labrecque, J. P. Roy, and G. Fecteau. 2012. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: A systematic review. *J. Vet. Intern. Med.* 26:32–45.
- Eisenberg, S. W., A. P. Koets, M. Nielsen, D. Heederik, R. Mortier, J. De Buck, and K. Orsel. 2011. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 42:117.
- Grewal, S. K., R. Rajeev, R. Sreekumari, S. Sreevatsan, and F. C. Michele. 2006. Persistence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing and liquid storage of dairy manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:565–574.
- Jørgensen, J. B. 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.* 29:267–270.
- Kudahl, A. B., S. S. Nielsen, and S. Ostergaard. 2011. Strategies for time of culling in control of paratuberculosis in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 94:3824–3834.
- Künzler, R., P. Torgerson, S. Keller, M. Wittenbrink, R. Stephan, G. Knubben-Schweizer, B. Berchtold, and M. Meylan. 2014. Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Swiss dairy and beef herds. *BMC Vet. Res.* 10:132.
- Lovel, R., M. Levi, and J. Francis. 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Pathol.* 54:120–129.
- McKenna, S. L., G. P. Keffe, A. Tiwari, J. VanLeeuwen, and H. W. Barkema. 2006. Johne's disease in Canada part II: disease impact, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can. Vet. J.* 47:1089–1099.
- Mortier, R. A., H. W. Barkema, J. M. Bystrom, O. Illanes, K. Orsel, R. Wolf, G. Atkins, and J. De Buck. 2013. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Vet. Res.* 44:94.
- Nielsen, S. S., and N. Toft. 2011. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *J. Dairy Sci.* 94:1849–1857.
- Over, K., P. G. Crandall, C. A. O'Bryan, and S. C. Ricke. 2011. Current perspectives on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, Johne's disease, and Crohn's disease: A review. *Crit. Rev. Microbiol.* 37:141–156.
- Pillars, R. B., D. L. Grooms, J. C. Gardiner, and J. B. Kaneene. 2011. Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 98:10–18.
- Pithua, P., L. A. Espejo, S. M. Godden, and S. J. Wells. 2013. Is an individual calving pen better than a group calving pen for preventing transmission of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in calves? Results from a field trial. *Res. Vet. Sci.* 95:398–404.
- Raizman, E. A., J. Fetrow, S. J. Wells, S. M. Godden, M. J. Oakes, and G. Vazquez. 2007a. The association between *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* faecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 78:179–195.
- Raizman, E. A., S. J. Wells, S. M. Godden, J. Fetrow, and J. M. Oakes. 2007b. The association between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* faecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Prev. Vet. Med.* 80:166–178.
- Rangel, S. J., J. Paré, E. Doré, J. C. Arango, G. Côté, S. Buczinski, O. Labrecque, J. H. Fairbrother, J. P. Roy, V. Wellemans, and G. Fecteau. 2015. A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. *Can. Vet. J.* 56:169–177.
- Ridge, S. E., C. Heuer, N. Cogger, A. Heck, S. Moor, I. M. Backer, and S. Vaughan. 2010. Herd management practices and the transmission of Johne's disease within infected dairy herds in Victoria, Australia. *Prev. Vet. Med.* 95:186–197.
- Smith, R. L., Y. T. Grohn, A. K. Pradhan, R. H. Whitlock, J. S. Van Kessel, J. M. Smith, D. R. Wolfgang, and Y. H. Schukken. 2009. A longitudinal study on the impact of Johne's disease status on milk production in individual cows. *J. Dairy Sci.* 92:2653–2661.
- Smith, R. L., R. L. Strawderman, Y. H. Schukken, S. J. Wells, A. K. Pradhan, L. A. Espejo, R. H. Whitlock, J. S. Van Kessel, J. M. Smith, D. R. Wolfgang, and Y. T. Grohn. 2010. Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 93:3513–3524.
- Sorge, U. S., K. Lissemore, A. Godkin, J. Jansen, S. Hendrick, S. Wells, and D. F. Kelton. 2012. Risk factors for herds to test positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-antibodies with a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Ontario and western Canada. *Can. Vet. J.* 53:963–970.
- Sweeney, R. W., M. T. Collins, A. P. Koets, S. M. McGuirk, and A. J. Rousel. 2012. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J. Vet. Intern. Med.* 26:1239–1250.

- Tiwari, A., J. A. VanLeeuwen, S. L. McKenna, G. P. Keffe, and H. W. Barkema. 2006. Johne's disease in Canada. Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet. J.* 47:874–882.
- Vilar, A. L., C. S. Santos, C. L. Pimenta, T. D. Freitas, A. W. Brasil, I. J. Clementino, C. J. Alves, C. S. Bezerra, F. Riet-Correa, T. S. Oliveira, and S. S. Azevedo. 2015. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 121:49–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.003>.
- Whittington, R. J., D. J. Marshall, P. J. Nicholls, I. B. Marsh, and L. A. Reddacliff. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2989–3004.
- Whittington, R. J., and P. A. Windsor. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* 179:60–69.
- Windsor, P. A., and R. J. Whittington. 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184:37–44.
- Wolf, R. 2014. Control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on Western Canadian dairy farms: Prevalence, diagnostics and risk factors. PhD Thesis. University of Calgary, Calgary, AB, Canada.
- Wolf, R., F. Clement, H. W. Barkema, and K. Orsel. 2014. Economic evaluation of participation in a voluntary Johne's disease prevention and control program from a farmer's perspective—The Alberta Johne's Disease Initiative. *J. Dairy Sci.* 97:2822–2834.
- Wolf, R., K. Orsel, J. De Buck, and H. W. Barkema. 2015. Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms. *Vet. Res.* 46:71.

2.4.2 Donat K (2016): The Thuringian bovine paratuberculosis control programme – results and experiences. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129: DOI 10.2376/0005-9366-129-15129 (Studie 10)

Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129,
(2016)
DOI 10.2376/0005-9366-129-15129

© 2016 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

Eingegangen: 30.11.2015
Angenommen: 19.02.2016

Online first: 07.04.2016
[http://vetline.de/open-access/
158/3216/](http://vetline.de/open-access/158/3216/)

Summary

Zusammenfassung

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2016/129 \$ 15.00/0

Thuringian Animal Diseases Fund (public-law institution), Animal Health Service,
Jena, Germany

The Thuringian bovine paratuberculosis control programme – results and experiences

Das Thüringer Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderherden – Ergebnisse und Erfahrungen

Karsten Donat

This study aimed at evaluating the results achieved in voluntary paratuberculosis control in cattle herds in Thuringia, a federal state of Germany, between 2008 and 2014. A total of 76 dairy herds and 29 beef cow-calf herds were involved in the analysis. Cumulative incidence (CI) was used to monitor the control progress; new cases were detected by means of annual testing of the herd's cows by individual faecal culture for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Herds with at least one positive test result were classified as MAP-positive, while herds without any detection of MAP during three consecutive years were certified as MAP-non suspect. Compared to the MAP-positive ones, herds tested negative at the beginning of the program had a higher chance of achieving this certification by 2014. 13 out of 67 initially MAP-positive herds (19.4%) were certified according to the control programme. In a subset of 25 MAP-positive dairy herds that had been involved since 2008, CI decreased significantly from 14.0 to 5.6% in 2014. Regarding the initial situation in 2008, control progress was significantly higher in herds with CI > 5% compared to herds with CI < 5% as shown by two-way ANOVA. The results support the hypothesis that control of paratuberculosis is feasible at herd level. A herd monitoring based on faecal culture tests and a certification period of three years seem to be adequate to justify the status MAP non-suspect. Once herds achieve a low level of CI, control efforts should be intensified.

Keywords: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, herd certification status, MAP-non suspect, faecal culture, cumulative incidence

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, die Ergebnisse des freiwilligen Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Thüringer Rinderherden im Zeitraum 2008 bis 2014 auszuwerten. In die Analyse waren 76 Milchviehherden und 29 Mutterkuhherden einbezogen. Der Sanierungsfortschritt wurde anhand der neu auftretenden Fälle (kumulative Inzidenz, CI) beurteilt, die im Rahmen der jährlichen Untersuchungen der Kühe des Bestandes auf der Basis kultureller Untersuchungen individueller Kotproben festzustellen waren. Herden mit Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in einer Probe galten als MAP-positiv. Herden, in denen drei Jahre in Folge keine neuen Fälle festgestellt werden konnten, erhielten die Anerkennung als Paratuberkulose-unverdächtiger Rinderbestand. Im Vergleich zu MAP-positiven Herden hatten Herden mit MAP-negativer Ausgangssituation eine größere Chance bis 2014 diese Anerkennung zu erreichen. 13 von 67 MAP-positiven Beständen (19,4 %) wurden entsprechend des Kontrollprogramms als Paratuberkulose-unverdächtig anerkannt. In einer Untergruppe von 25 MAP-positiven und seit 2008 teilnehmenden Milchviehherden wurde ein signifikanter Rückgang der CI von 2008 (14,5 %) bis 2014 (5,6 %) nachgewiesen. In Bezug auf die Ausgangssituation war der Bekämpfungsfortschritt in Herden mit CI > 5 % größer als in Herden mit CI < 5 %. Die

Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine Tilgung der Paratuberkulose auf Bestandesebene möglich ist. Die Herdenuntersuchung mittels Kotkultur und die dreijährige Anerkennungsperiode scheinen für die Anerkennung eines Bestandes als Paratuberkulose-unverdächtig angemessen und ausreichend zu sein. Sobald eine niedrige CI erreicht ist, sollte die Intensität der Bekämpfungsmaßnahmen erhöht werden.

Schlüsselwörter: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Bestandsstatus, Paratuberkulose-unverdächtig, Kotkultur, kumulative Inzidenz

Introduction

Paratuberculosis, a granulomatous enteritis of ruminants, occurs worldwide, is an O.I.E.-listed terrestrial animal disease (O.I.E., 2015), and is caused by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). Animals infected with MAP may suffer from intermittent diarrhoea, excessive weight loss, protein deficiency and oedema after an incubation period of several years, and finally die (Tiwari et al., 2006). Therapy is not available for affected animals. Relevant economic losses already occur in the subclinical stage of the disease as a result of decreases in milk yield (Donat et al., 2014a) and fertility (Marcé et al., 2009). Currently, aims and strategies of monitoring and control of the disease are the subject of some controversy. In Sweden, Japan and Austria paratuberculosis is a notifiable disease subject to official control measures. Culling with compensation is applied to MAP-positive animals with clinical symptoms in Austria, and in Sweden to the whole herd if MAP is detected (Baumgartner und Khol, 2008). Participation is high in nationwide voluntary control programmes in Denmark (Kudahl et al., 2008) and the Netherlands. The Dutch dairy industry bans milk delivery from dairy herds that are not involved in the programme (Weber and Lam, 2012). A nationwide voluntary control programme supported by the dairy industry and the farmers' association exists in Belgium (Mintiens, 2014). The efforts of the dairy industry to take action with regard to paratuberculosis result from the need to maintain and improve the market position of dairy products. Here the assumption is taken into account that the pathogen of paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, could be involved in the aetiology of granulomatous enteritis in humans (Feller et al., 2007). In other countries such as France (Fourichon und Guatteo, 2014) and Canada (Kelton et al., 2014), paratuberculosis control is organized on a regional level and depends on public funding. The approaches differ in terms of diagnostic tools, culling scheme, availability of vaccines and the recommendations to improve hygiene and management within a herd. Despite all this, a broad consensus regarding the main pillars of a paratuberculosis control strategy has existed for many years: Biosecurity and trade control to prevent introduction into a herd, appropriate hygiene and management to prevent new within-herd infections, diagnosis and culling of MAP shedders to reduce the infective pressure, and reduction of the host's susceptibility by vaccination or genetic selection (Sweeney et al., 2012; Bastida and Juste, 2011).

In Germany, paratuberculosis is notifiable if the infectious agent is detected; 484 cases in cattle and 16 cases in sheep and goats were reported in 2014 (Köhler and Möbius, 2014). A nationwide prevalence study using

a standardized diagnostic approach has yet to be carried out in Germany. Regional studies were reviewed by Campe et al. (2014), reporting a faecal culture-based MAP shedder prevalence of 5 to 14% and an apparent sero-prevalence of 4 to 45%. Apparent herd-level prevalence was between 11 and 54% in faecal culture-based studies and 2–42% when specific ELISA tests were applied. At the moment, regional voluntary control programmes are effective in North Rhine-Westphalia, Thuringia, Saxony and Brandenburg (Gierke and Köhler, 2009), and under preparation in Mecklenburg-Western Pomerania. The programme in Lower Saxony was abandoned in 2012 due to funding cuts and a continued lack of success in tackling the disease. Recently, the Federal Ministry of Food and Agriculture published nationwide recommendations on hygiene for keeping ruminants, replacing the paratuberculosis guidelines published in 2005 (BMEL, 2014).

The Thuringian control programme has been effective since 2003 and was updated in 2008 (TMSFG, 2008) and 2015 (TMASGFF, 2015). The most recent update accounts for current knowledge about how to control paratuberculosis as well as the federal recommendations (see Material and Methods).

This study aimed at analysing the control success during the second control period in Thuringia, i. e. from 2008 to 2014, and at drawing conclusions for further control measures.

Material and Methods

Thuringian control programme

The "Programme to control paratuberculosis in Thuringian cattle herds", published on 26 March 2008 (TMSFG, 2008), comprised the following principles:

- identification and culling of MAP shedders to reduce infective pressure,
- prevention of new infections by improving hygiene,
- consideration of paratuberculosis status of the herd of origin when introducing new animals into the herd,
- certification of herds as "MAP-non suspect" and control of status at regular intervals.

The programme recommended an annual testing of all animals older than 24 months in each herd, so approximately all cows and breeding bulls, by faecal culture to ensure the detection of a high proportion of MAP shedders in the subclinical stage of the disease. Samples were taken either at one occasion from all cows of the herd or in a continuous manner where the testing schedule is often linked to other herd management measures like e. g. pregnancy checking. This ensures sampling of all cows that are likely to stay in the herd for another lactation.

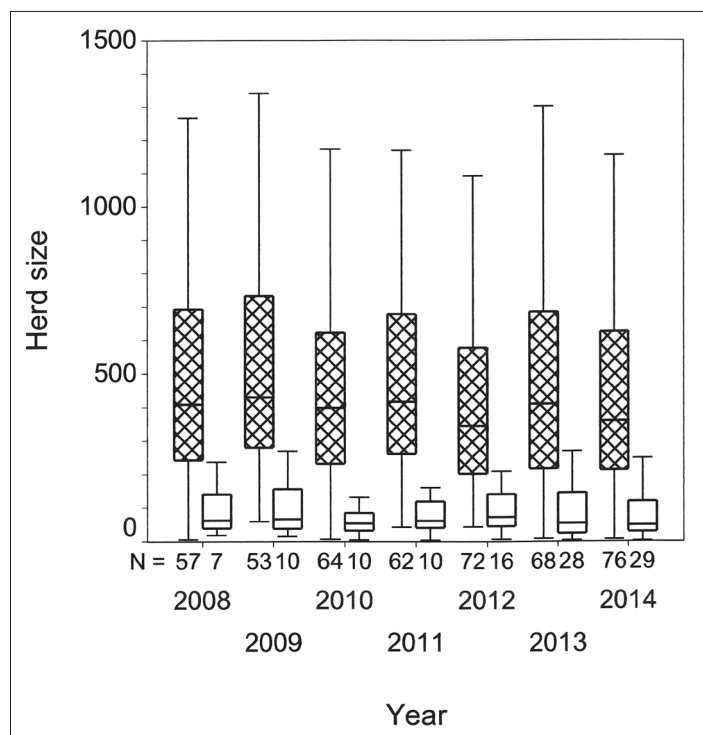


FIGURE 1: Number of enrolled herds (N) and herd size (number of cattle older than 24 months as reported in the respective year) of the dairy herds (hatched boxes) and beef cow-calf herds (open boxes) participating in the Thuringian Paratuberculosis Control Programme during 2008 and 2014 (bar: median value; boxes: 50% of values, whiskers: 95% of values).

Animals that tested positive were not retested in the following year. Farmers were advised to cull them as soon as possible. MAP shedders showing clinical signs of paratuberculosis had to be culled immediately. Provided that MAP shedders displayed no clinical symptoms, farms with a high within-herd prevalence were advised not to inseminate their positive cows and to cull them at the end of lactation.

Specialized veterinarians from the Animal Health Service recorded hygiene and management of the herd using a purpose-made questionnaire that serves as a data record and the basis of discussing the herd-specific control measures. Farmers were consulted in order to establish measures for adoption in daily work.

The most recent update of the control programme implemented the recommendations of the German Federal Ministry of Food and Agriculture that established different levels of control according to the diagnostic method used:

- Level 1: environmental sampling,
- Level 2: antibody detection,
- Level 3: detection of the organism.

Improvement of farm management and hygiene as well as immediate testing of cattle showing clinical symptoms of paratuberculosis and prompt culling of MAP shedders are recommended for each level. In addition, the Thuringian control programme introduced level 4 for a low prevalence herd (< 3%) that binds farmers to remove MAP shedders from the herd within one month after detection. Furthermore, the programme update enforces

the implementation of management and hygienic measures like trade control, calving hygiene, management of colostrum for first feeding and not saleable milk and staff hygiene in calf and youngstock area within three months after enrolment.

Herds enter the “certification phase” if no MAP shedder has been identified for twelve months and can be certified as “MAP-non suspect” if no MAP shedders were identified in the annual testing during three consecutive years. These herds were then retested biannually (“maintenance of status”).

Due to the limited diagnostic sensitivity of animal-level tests (Collins et al., 2006; Köhler et al., 2008a, Donat et al., 2014b), farmers were advised to focus on the paratuberculosis status of the herd of origin when purchasing animals. The Thuringian Animal Health Service certified a herd as “MAP-non suspect” if no MAP shedders were identified in the annual testing during three consecutive years. These herds were then retested biannually.

Study population

105 farms were enrolled in the programme at the end of the period under review (31 December 2014). Their distribution regarding year and farm type is given in Figure 1. The size of each herd was drawn from the annual report to the Animal Diseases Fund on the reference date, January 3 of each year. As calves and young stock were not included in the testing, the focus was on cattle older than 24 months. Only herds in which 50% or more of cattle older than 24 months were tested annually were considered for further analysis. In 2014, these herds accounted for 33 614 cattle older than 24 months. This involves nearly 20% of the cattle population in Thuringia.

Herds were classified as MAP-negative if no MAP shedders were detected in a herd in 2008. A herd was considered MAP-positive if at least one MAP shedder was detected within the herd and remained MAP-positive until it successfully passed the three-year certification procedure. Due to the triannual certification period, MAP-positive herds without shedders were overrepresented among them. To analyse the progress of control in dairy herds, a subset of 25 MAP-positive herds was selected as follows:

- dairy herds,
- enrolment in 2008 or earlier,
- never reached certification level during 2008–2014 (i. e. CI > 0 in each year).

Only two beef cow-calf herds met these criteria. This analysis was therefore omitted for this herd type.

Collection of faecal samples and MAP testing of faecal cultures

For every cow to be tested, a faecal sample was taken rectally with an unused examination glove and wiped off into a sterile plastic container, supplied by the laboratory and equipped with a bar code, which was then sealed and sent to the examination laboratory within 24 to 48 h by a courier.

The individual faecal cultures were tested on a Herrold’s Egg Yolk Medium (HEYM), according to the culture method published in the official Friedrich-Loeffler-Institut (FLI, 2010) collection of methods, as of April 2010, modified for the annual herd tests as follows:

- a) All samples were frozen immediately after arrival at the laboratory and stored at -20°C until testing. After initially extracting 3 g of faeces per sample, the samples were frozen again and stored as retained samples until the completion of testing.
- b) Due to the high number of samples in the herd test (about 30 000 samples per year) the inoculum was applied to a HEYM tube after decontamination. As soon as rampant growth of undesired accompanying flora was detected, another culture was prepared immediately from the retained sample (repetition sample).
- c) A longer decontamination period of 48 h was applied for repetition samples or samples from herds that had shown overgrowth in samples in the past.

From the fifth week of incubation at 37°C , the macroscopic evaluation of the bacteria growth was performed every two weeks. Suspicious colonies were differentiated via Ziehl-Neelsen-staining, subculture (testing the mycobactin-dependent growth) and/or an IS900-PCR (Englund et al., 1999). The results were registered in terms of quality with a SQL database (Fa. Agro Data EDV Service GmbH & Co. KG, Cottbus, GER). Bar code labels were attached to all sample tubes, expendable materials and the culture tubes in order to ensure the correct assignment of the marked animals to the respective samples and results.

Cumulative incidence

The cumulative incidence (CI) based on the following calculations comprises all animals from which samples were sent to the laboratory in the respective year and in which MAP was identified. As determined in the control programme, animals that had been tested positive in the previous year would not be tested and examined again. Therefore, samples from programme farms came from animals that had tested negatively before or animals that were being examined for the first time. The CI for the respective year represents the quotient from the number of new cases per year and the number of animals sampled in the reference year. In rare cases MAP shedders known from previous years were sampled again (altogether ~60 out of ~1200 shedders per year) accounting for a minor overestimation of CI.

Statistical evaluation

The collection and preparation of the data extracted with the lab software of the Thuringian Animal Diseases Fund (Agro Data EDV Service GmbH & Co. KG, Cottbus, GER) as well as the presentation of figures were performed using the spreadsheet software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, US). The statistics software SPSS 11.5 for Windows (SPSS Inc., Illinois, Chicago, US) was used for all other calculations. The level of significance was determined to be $p < 0.05$.

The frequency distributions of the farms after achieving the level of control in 2014 and the respective herd status regarding paratuberculosis were tested with reference to the initial status of the herd (MAP-positive or MAP-negative) with Fisher's exact test. The stratified evaluation per farm type (dairy farm or beef cow-calf) was conducted following Mantel and Haenszel, and the homogeneity of the odds ratio of the individual strata was tested with the Breslow-Day test.

TABLE 1: Initial status and state of control achieved by 2014 in the dairy and beef cow-calf herds participating in the Thuringian Paratuberculosis Control Programme

Control program phase achieved in 2014 ¹⁾	Dairy herd		Beef cow-calf herd		Total	
	MAP-positive ²⁾	MAP-negative ³⁾	MAP-positive	MAP-negative	MAP-positive	MAP-negative
Control phase (level 1–3)	24	0	5	0	29	0
Control phase (level 4)	17	1	5	0	22	1
Certification phase	4	3	2	4	6	7
Certified as MAP-non suspected	9	18	1	12	10	30
Total	54	22	13	16	67	38

¹⁾ According to the "Recommendations of the Federal Ministry of Food and Agriculture on hygiene for keeping ruminants" (BMEL, 2014)

²⁾ Herds with MAP-positive animals in the first faecal culture based herd testing after enrolment in the control program

³⁾ Herds without MAP-positive animals in the first faecal culture based herd testing after enrolment in the control program

A single factor ANOVA (SPSS package ANOVA with repeated measures data) was applied to analyse the CI between 2008 and 2014 in the 25 selected dairy herds. Since there was no normal distribution of the CI of the herds in the individual years, the values were converted into their decadic logarithm. Normal distribution was examined with one-sample Kolmogorov-Smirnov tests. Because in the Mauchly test sphericity was violated by the principal factor, a Greenhouse-Geisser correction of the degrees of freedom was applied. In order to compare herds with either a good ($CI < 0.05$) or a bad ($CI > 0.05$) initial situation, similarly to the procedure described a two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was applied.

Results

From 2008 to 2014 the mean herd size (mean \pm standard deviation) of the dairy herds (479 ± 327 vs. 466 ± 336) and the beef cow-calf herds (97 ± 82 vs. 87 ± 94) did not change.

Ten herds (14.9%) of 67 MAP-positive herds in the first year were certified as "MAP-non suspect" and six herds (7.5%) had entered the certification phase at the end of 2014. In these herds, zero to ten shedders had been detected before. 37 of the 38 herds in which MAP had not been detected (MAP-negative) by 2008 or in the year they entered the programme, have now been certified as MAP-non suspect. In three of these herds, evidence of MAP was detected in the meantime, but all of these infections originated from newly purchased animals. Within the observation period, two herds were able to achieve certification or to re-enter the certification phase again. Taken together herds in the certification phase and the herds certified as MAP-non suspect, 53 (50.4%) of 105 farms included in the programme have reached the point where no infectious agent was found in samples from the farms' cows anymore (Tab. 1).

For both farm types it was shown that significantly more herds that had been tested MAP-negative in 2008 achieved the herd status "MAP-non suspect" until 2014 than those that had been tested MAP-positive in 2008

TABLE 2: Development of the cumulative incidence of the dairy herds (n = 25) included in the ANOVA model

Herds	Year of control	Mean [%]	Standard-error [%]	Confidence interval of 95% [%]	
				Lower boundary	Upper boundary
All (n = 25)	1	14,50 ^{ab1)}	3.58	7.11	21.88
	2	10.70 ^{abc}	2.74	5.03	16.36
	3	9.27 ^{ab}	1.94	5.28	13.27
	4	9.55 ^{ab}	2.01	5.40	13.70
	5	8.37 ^{abc}	1.96	4.32	12.42
	6	6.41 ^c	1.25	3.84	8.99
	7	5.57 ^c	1.26	2.98	8.17
CI > 5% (n = 15)	1	22.14	3.99	13.88	30.40
	2	15.51	3.25	8.79	22.24
	3	13.41	2.16	8.94	17.87
	4	13.69	2.27	8.99	18.40
	5	11.96	2.30	7.20	16.72
	6	8.81	1.44	5.82	11.79
	7	7.69	1.50	4.58	10.80
CI < 5% (n = 10)	1	3.03	4.89	Not specified	13.14
	2	3.47	3.98		11.71
	3	3.07	2.64		8.54
	4	3.33	2.79		9.09
	5	2.99	2.82		8.82
	6	2.82	1.77		6.48
	7	2.39	1.84		6.20

¹⁾ Different letters mark statistically different means; values that are indexed with the same letter are not statistically different

TABLE 3: Results of the two-way ANOVA of the cumulative incidence of MAP shedders in 25 Thuringian dairy herds regarding year (with repeated measures data) and initial situation with Greenhouse-Geisser correction of the degrees of freedom

	Degrees of freedom	F value	P value
Year	3.6	5.98	< 0.0001
Initial situation	1	21.87	< 0.0001
Year * initial situation	3.6	1.80	0.142

(p < 0.0001). The stratified analysis per farm type of the MAP status in 2014 compared to the initial status in 2008 showed this significant correlation in the same way. The joint odds ratio was 32.9 (confidence interval of 95%: 9.8–110.1).

A significant influence of the duration of control measures in years (p < 0.0001) was shown among the dairy herds that were included in the ANOVA model (n = 25). The CI mean value (± standard error, SE) of these 25 herds in 2008 (14.50% ± 3.58), when compared with that of 2014 (5.57% ± 1.26), is significantly different (p = 0.004). The mean values (± SE) for all years, including the confidence intervals of 95%, are displayed in Table 2.

Comparing herds with either a good (CI < 0.05) or a bad (CI > 0.05) initial situation, the individual factors “year” and “initial situation” have a significant influence in the overall model, although the interaction between the two does not (Tab. 3). In herds with a bad initial situation, the CI mean value of 22.14% ± 1.26 is reduced to 7.69% ± 1.50 in 2014. Due to the small sample size and high variance, this difference is insignificant. In herds with a good initial situation, the mean value hardly changes:

from 3.03% ± 4.89 to 2.39 ± 1.84. Due to the high variance in herds with a good initial situation, these have negative lower limits of the confidence intervals at 95% (Tab. 2).

Discussion

This study shows that cumulative incidence can be decreased by the measures which are prescribed by the Thuringian paratuberculosis control programme. This resulted in the certification of ten previously MAP-positive cattle herds within a six years’ period. Furthermore, another six herds reached the certification level. If herds that were MAP-negative in 2008 are taken into account as well, it was possible to transfer more than half (50.4%) of the herds involved in the process to a status where no MAP shedder was found during the last herd screening. This verifies that it is possible to reduce prevalence under the detection limit and keep this status for at least three years. The standard applied in Thuringia, so the proof of the absence of MAP shedders over a period of three consecutive years, fulfils the same requirements as the uniform standard for the voluntary bovine Johne’s disease control programmes in the US (USAD, 2010) and the regulations in Australia (Jubb and Galvin, 2004). The fact that no further spread of the infection via non-registered shedders was detected in the Thuringian herds beyond the date of certification is further proof of the sustainable character of the certification status assigned in Thuringia. The fact that new MAP shedders were detected in two of the herds was attributable to uncontrolled or rather uncritical acquisitions of new animals or transfers of animals to other herds at the same farm. This small proportion of herds with reinfections shows that the relatively strict certification procedure carried out in Thuringia since 2008 guarantees a high level of security, and that an uncontrolled further development of the infection within the herd or the transmission from one herd to another by undiscovered shedders is avoided to the greatest possible extent. This observation from current control practice corresponds with certain models showing that most herds initially rated as “MAP-negative” become certified as MAP-free if highly specific tests are performed, and that they are also able to keep that status (Ezanno et al., 2005).

Those MAP-positive herds that were certified as MAP-non suspect until 2014 all were herds with a low initial prevalence. The possible lowering of prevalence to zero as demonstrated in this control practice in Thuringia can also be shown in appropriate epidemiological models for herds with an initial prevalence of 5%, provided the hygiene and management measures established in the herd are suitable to effectively break the chain of infection between the MAP shedder and the receiving animal (Kudahl et al., 2008). The successful minimization of MAP-shedders in herds with low prevalence shows that early detection of MAP infections in cattle herds is of great importance: The lower the prevalence at the time of detection, the faster the control of the infection at herd level. A significant reduction of detected MAP shedders from 14.5% to 5.6% was observed in the remaining MAP-positive herds over the six-year period. This development is in line with the results of other studies. In a six-year study of six dairy herds in Minnesota, US, it was possible to reduce the average apparent within-herd prevalence determined by faecal culture from 10.4% to

5.6% (Ferrouillet et al., 2009) and from 17.0% to 9.5% in young cows from nine dairy herds in Wisconsin (Collins et al., 2010). In a study from North Rhine-Westphalia, Germany, apparent prevalence on farms involved in the control programme was reduced from over 3% to under 1% (vom Schloss, 2000; Luyven et al., 2002). When it comes to prevalence-based data, it is important to keep in mind that these might be subject to distortion because culling, as part of the control measures, directly affects prevalence. To a much lesser degree, this applies to analyses based on the number of new cases, as is the case with this study. Therefore, reduction of CI reflects to a higher degree the effectiveness of control measures over time than changes in prevalence.

The reduction of the amount of MAP shedders within the herd or within the population, be it by lowering the rate of new infections or targeted culling of the affected animals, is a pivotal element of the control progress, because it leads to less environmental contamination of susceptible animals in the cattle barn with infectious agents and it lowers the risk of undetected MAP-infected animals transmitting the disease from one herd to another (Ezanno et al., 2005).

The development of the CI within herds with high initial prevalence in our study was significantly different to that in herds with a low share of infected animals in 2008. While the herds with a high initial prevalence showed a drastic CI reduction from an average of 22.2% to 7.7%, those with a low initial CI stagnated around 3%. There are no findings so far regarding the reasons for this difference, but some assumptions can be made. It is possible that the control measures that had been established before 2008 limited the transmission of the infectious agent to a certain extent resulting in a low percentage of new cases, which had a calming effect on the prevalence within the herd and on the farmer's motivation to consistently apply the control measures. Our own research showed that milk yield depression, one of the main problematic effects in herds with high prevalence, is almost imperceptible in herds with a within-herd prevalence of less than 5% (Donat et al., 2014a). Apart from this it can be assumed that clinical cases either considerably drop in numbers or do not even appear anymore. One possible explanation is that, when the number of shedders is small, the risk of infection decreases, and along with it the severity of lesions of the intestinal mucosa (Mortier et al., 2013), meaning the intestinal infection disseminates at a lower speed. If regular tests are carried out then, MAP shedders are detected at an earlier subclinical stage and do not reach the clinical stage by the time they are culled. The motivation to continue to uphold consistent hygiene and culling practices disappears along with this, and the quality of control stagnates. A cohort study of Saxon and Thuringian programme farms showed that hygiene, e. g. the effective cleaning and disinfection of the calving pen after use by MAP shedders (Donat et al., 2016), as well as the mean holding time of MAP shedders after receiving the laboratory report had an influence on reducing the CI in the herds (Donat et al., 2014c). These findings, however, are contrary to the results of the simulation models by Kudahl et al. (2008) and Weber et al. (2008), who considered rapid culling to be of no additional advantage, but correspond with the findings of Eisenberg et al. (2013, 2015). It could be concluded that the focus of consultations in the next step of the Thuringian

paratuberculosis control programme will have to be on herds with a low CI. More inspections regarding the implementation of hygiene measures will have to take place and the mean holding time of shedders per herd will have to be monitored so that the supervising Animal Health Service can intervene in the case of deviations from the prescribed measures. In addition to these measures, a culling subsidy for every single shedder that leaves the herd within one month after receiving the laboratory report (in the case of pregnant cows: within one month from calving) will be paid to all farms which commit in writing to the aim of eradicating the infectious agent from the herd and which achieve a CI of less than 3%. A modelling study on the persistence of the paratuberculosis infection in a herd showed that, contrary to spontaneous fadeout, persistence of paratuberculosis infection within a herd is closely linked to the presence of animals with clinical symptoms in the herd. Therefore, the early detection and removal of affected animals is a critical factor to avoid the persistence of paratuberculosis in dairy herds (Marcé et al., 2011).

A large proportion of German dairy farmers remain hesitant or even reluctant to adopt paratuberculosis control measures. This reluctance is often justified with the argument that existing tests fall short of offering a reliable basis for consistent control and that the available tests still do not offer the necessary sensitivity and specificity. The data presented in this study clearly show that it is possible to take control of the disease even with the existing tests. A control programme that is based only on the improvement of hygiene standards may result in comparably good prevalence reductions, as seen in the simulation by Kudahl et al. (2008), but only under the assumption of an optimum interruption of the infection chain. However, practical experience of paratuberculosis control in Thuringia has shown that perfect hygiene management is hard to keep up in the long run. Therefore, reducing the infective pressure in the cattle barn environment by detection and removal of MAP shedders before they reach the clinical stage (Marcé et al., 2011) is of great importance for successful control.

Multi-stage control programmes exist both in the US (USDA, 2010) and the Netherlands (Franken, 2005); they have been recommended for Canada (McKenna et al., 2006) and Austria (Khol und Baumgartner, 2012). The recommendations issued by the Federal Ministry of Food and Agriculture in 2014 as well as the Thuringian control programme, which is based on these recommendations and has been effective since 1 July 2015, provide for a control period that is divided into various steps. The first step of this programme is the establishment of appropriate hygienic measures in connection with herd monitoring via environmental faecal samples. This is a way to begin control measures in MAP-positive herds and a cost-saving means of maintaining active monitoring efforts. However, the fact that human resources are becoming increasingly scarce in the dairy industry, it doesn't seem particularly promising or even practical to focus only on perfect hygiene. In order to effectively reduce the number of new cases and to eventually eradicate the infectious agent, individual diagnostics will be indispensable. The best results in terms of sensitivity and specificity of the testing procedure so far are guaranteed by direct identification in individual faecal samples via faecal culture testing or molecular biological methods (Köhler et al., 2008b).

Conclusion

The results described herein show that a reduction of prevalence is feasible at herd level. Therefore, the control phase of the Thuringian programme now includes a level four of the control phase aimed at eradicating infection from the herd.

As soon as the control measures in a herd have led to a certain success, in this case 3% new cases per year, the accompanying measures of consulting and hygienic control have to be intensified.

Acknowledgement

The author wishes to thank the cattle farmers involved for their active participation in the programme as well as the colleagues of the Thuringian Animal Diseases Fund for carrying out the technical laboratory screenings, consulting the cattle farmers and helping in evaluating data and compiling the manuscript. Georg Siebert and Matthew Romney are acknowledged for improving the English style.

Conflict of interest

There are no protected financial, professional or other interests in a product or a company that could affect the contents or opinions stated in this publication.

References

- Bastida F, Juste RA (2011):** Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ther Vaccines* 9: 8.
- Baumgartner W, Khol JL (2008):** Paratuberculosis – potentials and limits of surveillance programs. *Magyar Allatorv Lapja* 130 Suppl. I: 7–10.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL, 2014):** Empfehlungen des Bundeslandwirtschaftsministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern. Banz. AT 01.08.2014 B1, 1–17.
- Campe A, Köhler H, Donat K (2014):** Approaches to Controlling Paratuberculosis in Germany – Conditioned by Voluntariness and Federalism. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma, Italy 2014, 31–39.
- Collins MT, Gardner IA, Garry FB, Roussel AJ, Wells SJ (2006):** Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 229: 1912–1919.
- Collins MT, Eggleston V, Manning EJ (2010):** Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. *J Dairy Sci.* 93: 1638–1643.
- Donat K, Soschinka A, Erhardt G, Brandt HR (2014a):** Paratuberculosis: Decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* depends on within-herd prevalence. *Animal* 8: 852–858.
- Donat K, Schlotter K, Erhardt G, Brandt HR (2014b):** Prevalence and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. *Vet Rec* 174: 5.
- Donat K, Schmidt M, Köhler H. (2014c):** Paratuberculosis control in Germany – Conclusions from five years' voluntary control in Thuringia and Saxony. In: Proceedings of the 12th International Colloquium on Paratuberculosis. Parma Italy 2014, 219.
- Donat K, Schmidt M, Köhler H, Sauter-Louis C (2016):** Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *J Dairy Sci*, doi: 10.3168/jds.2015-10625.
- Eisenberg SW, Chuchaisangrat R, Nielen M, Koets AP (2013):** Relationship between presence of cows with milk positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay and viable *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in dust in cattle barns. *Appl Environ Microbiol* 18: 5458–5464.
- Eisenberg SW, Rutten VP, Koets AP (2015):** Dam *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection status does not predetermine calves for future shedding when raised in a contaminated environment: a cohort study. *Vet Res* 46: 70.
- Englund S, Ballagi-Pordány A, Bölske G, Johansson KE (1999):** Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33: 163–171.
- Ezanno P, van Schaik G, Weber ME, Heesterbeek JA (2005):** A modelling study on the sustainability of a certification-and-monitoring program for paratuberculosis in cattle. *Vet Res* 36: 811–826.
- Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M (2007):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9: 607–613.
- Ferrouillet C, Wells SJ, Hartmann WL, Godden SM, Carrier J (2009):** Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. *Prev Vet Med* 88: 128–137.
- Fourichon C, Guatteo R (2014):** Control of Paratuberculosis in Cattle in France: Components of National and Regional Voluntary Programs and their Application. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma Italy 2014, 27–30.
- Franken P (2005):** Paratuberculosis control in the Netherlands – The target and an overview of the activities. In: Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark: August 14–17, 2005. Providence: International Association for Paratuberculosis, 2006, 16–19. [quoted on 24 August, 2015]: <http://www.paratuberculosis.info/images/stories/pdfs/119>.
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit (2010):** Amtliche Methodensammlung, as of April 2010, Paratuberkulose [quoted on 4 May, 2011]: 277–208, <www.fli.bund.de/de/startseite/publikationen/amtliche-meth-odensammlung.html>
- Gierke F, Köhler H (2009):** Tenazität, Ausscheidung und Übertragungswege des Paratuberkuloseerregers – Konsequenzen für die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen. *Praktischer Tierarzt* 90: 1169–1178.
- Jubb TF, Galvin JW (2004):** Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992–2002. *Aust Vet J* 82: 228–232.
- Kelton DF, Barkema HW, Keefe GP, Fecteau G, Barker RA (2014):** Johne's Disease Control in Canada – 2010–2013 – Successes and Challenges. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma Italy 2014, 115–122.

- Khol JL, Baumgartner W (2012):** Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. *Jpn J Vet Res* 60 Suppl: 1–7.
- Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, Martin G. (2008a):** 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, Gierke F, Möbius P (2008b):** Paratuberculosis – current concepts and future of the diagnosis. *Magyar Allatorv Lapja* 130 Suppl. I: 67–69.
- Köhler H, Möbius P (2014):** Paratuberkulose In: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit (Hrsg.), Tiergesundheitsjahresbericht 2013. Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald Insel Riems, 92–95.
- Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S (2008):** Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *J Dairy Sci* 91: 4599–4609.
- Luyven G, vom Schloß A, Saßerath M (2002):** Paratuberkulose-sanierung in Nordrhein-Westfalen. *Dtsch Tierärztl Wschr* 109: 524–527.
- Marcé C, Ezanno P, Seegers H, Pfeiffer DU, Fourichon C (2011):** Predicting fadeout versus persistence of paratuberculosis in a dairy cattle herd for management and control purposes: a modelling study. *Vet Res* 42: 36.
- Marcé C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H, Fourichon C (2009):** Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology*. 71: 807–816.
- McKenna S, Van Leeuwen JA, Barkema HW, Jansen JT, Hauer G, Hendrick SH, Cote G, Salsberg EB, Empringham RE (2006):** Proposed Canadian Voluntary National Johne's Disease Prevention and Control Program. *Can Vet J* 47: 539–541.
- Mintiens K (2014):** Paratuberculosis in Belgium. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma Italy 2014, 15–18.
- Mortier RA, Barkema HW, Bystrom JM, Illanes O, Orsel K, Wolf R, Atkins G, De Buck J (2013):** Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Vet Res* 44: 94.
- O.I.E. – World Organisation for Animal Health (2015):** OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014 [quoted on 17th March 2015]: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015>
- Sweeney RW, Collin MT, Koets AP, McGuirk SM, Roussel AJ (2012):** Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Intern Med* 26: 1239–1250.
- Thüringer Ministerium für Soziales, Familie und Gesundheit (TMSFG, 2008):** Thüringer Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen. *ThürStAnz*. Nr. 16/2008; 556–559.
- Thüringer Ministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie (TMSGFF, 2015):** Thüringer Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen. *ThürStAnz*. Nr. 26/2015; 1087–1093.
- Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL) (2015):** Entwicklung der Tierzucht in Thüringen, Berichtsjahr 2014. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena, 2015.
- Tiwari A, van Leeuwen JA, McKenna LB, Keefe GP, Barkema HW (2006):** Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J* 47: 874–882.
- United States Department of Agriculture (USDA). Animal and Plant Health Inspection Service (2010):** Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program, as of 1 September 2010, Herd classification, 19–24 [quoted on 27 February, 2014]: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/downloads/johnes-ups.pdf
- Vom Schloß A (2000):** Auswertung eines Sanierungsverfahrens zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen in Nordrhein-Westfalen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- Weber MF, Lam T (2012):** Milk quality assurance for paratuberculosis in The Netherlands: achievements of 2006 to 2011. Abstract book of the XXVIIth World Buiatrics Congress, Lissabon Portugal 2012, 25.
- Weber MF, Nielen M, Velthuis AG, van Roermund HJ (2008):** Milk quality assurance for paratuberculosis: simulation of within-herd infection dynamics and economics. *Vet Res* 39: 12.
- Whitlock RH, Hutchinson LT, Merkal RS (1985):** Prevalence and economic consideration of Johne's disease in the north-eastern U.S. *Proc US Anim Health Assoc* 89: 484–490.

Address for correspondence:

Dr. Karsten Donat
 Thüringer Tierseuchenkasse
 Victor-Goerttler-Str. 4
 07745 Jena
 Germany
kdonat@thueringertierseuchenkasse.de

3 Übergreifende Diskussion

Die in dieser Arbeit zusammengefassten Studien betrachten Fragestellungen zur Anwendung diagnostischer Tests in der Praxis als auch Untersuchungen zur Auswirkung der Infektion mit MAP auf die Tiergesundheit in der Herde und zur Wirksamkeit der Bekämpfungsmaßnahmen im Sinne einer Reduktion der Zahl neuer Fälle. Diese Fragestellungen haben sich aus der Beratungstätigkeit im Rahmen des Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen (TMSFG, 2008) ergeben. Insbesondere die Neuausrichtung des eingesetzten diagnostischen Verfahrens zur Einzeltierdiagnostik als kulturelle Untersuchung individueller Kotproben brachte neue Herausforderungen mit sich. Diese bestehen in der weitaus höheren Zahl der als infiziert erkannten Tiere und in den höheren Aufwendungen für die Diagnostik. Es war somit die Frage zu beantworten, ob die wirtschaftlichen Verluste durch Paratuberkulose soweit gesenkt werden können, dass der aus der Bekämpfung resultierende wirtschaftliche Nutzen die Aufwendungen hierfür rechtfertigt. Die Chancen bestanden darin, dass nunmehr Ergebnisse kultureller Untersuchungen in größerem Maßstab zur Verfügung standen. Die höhere Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsmethode erlaubte somit eine genauere Charakterisierung der Tiere und damit eine Neubewertung offener Fragen zur Bekämpfung der Paratuberkulose, die in den bisherigen Studien nicht geklärt werden konnten. Eine weitere Motivation zur Durchführung der Studien waren die Fragen, welche in der seit 2010 geführten Diskussion zu den Empfehlungen des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft zu den hygienischen Anforderungen an das Halten von Rindern (BMEL, 2014) aufgeworfen wurden. Diese betrafen die Validität von Umgebungskotproben zur Diagnostik auf Herdenebene und die Wertigkeit und Umsetzbarkeit bestimmter Hygieneempfehlungen im Bestand.

Die Untersuchungen verfolgen in der Regel einen epidemiologischen Ansatz und sind in Praxisbetrieben in Thüringen durchgeführt worden. In einigen Studien wurden zusätzlich Bestände aus Sachsen, Hessen oder Rheinland-Pfalz in die Untersuchungen einbezogen

3.1 Anwendung von Umgebungskotproben zur Diagnostik der Paratuberkulose auf Bestandsebene

Die Erstbeschreibung der Anwendung von Proben aus der Umgebung der Tiere zur Feststellung des Infektionsstatus einer Rinderherde bezüglich Paratuberkulose reicht zurück in die frühen 1990er Jahre. Damals wurden etwa 50 Proben je Bestand untersucht, wobei in ungefähr 3 % der Proben MAP nachgewiesen wurde (ROSENBERGER et al., 1991). In einer größeren Studie wurde dieser Ansatz erstmals im Rahmen des freiwilligen Programms zur Paratuberkulosebekämpfung in Minnesota (USA) geprüft, wobei 80 als MAP-positiv bekannte Herden und 28 als MAP-negative eingestufte Herden getestet wurden (RAIZMAN et al., 2004). In den Folgejahren sind Umgebungskotproben in den Vereinigten Staaten von Amerika in mehreren Studien zur Diagnostik der Paratuberkulose auf Bestandsebene validiert worden (LOMBARD et al., 2006; BERGHAUS et al., 2006, PILLARS et al., 2009; ALY et al., 2009). Seit 2010 sind sie Bestandteil des einheitlichen Standards für freiwillige Programme zur Bekämpfung der Paratuberkulose des Rindes in den USA und werden dort als Einstiegsuntersuchung angewendet. Dabei wird empfohlen, je Bestand jeweils sechs Sammelproben mit multiplen Unterproben zu entnehmen, und zwar von Stellen mit hohem Kuhverkehr wie z. B. Treibwege, Wartehöfe, Stellen mit intensiver Kotablagerung und -durchmischung wie Faltschieber, Vorfluter u. ä. und von Güllelagerstätten wie Lagunen oder Güllehochbehälter (USDA, 2010).

Bezüglich des allgemeinen Hygienestandards in Milchviehhaltungen wurden Unterschiede zwischen amerikanischen und europäischen Milchviehhaltungen vermutet. Daher bestanden Zweifel an der Übertragbarkeit der amerikanischen Ergebnisse auf Betriebe in Deutschland. Hinzu kam, dass im Ergebnis der amerikanischen Untersuchungen das primäre Dunglager (Güllebehälter oder Festmistlager) als ein geeigneter Ort der Probennahme empfohlen wurde. Gegen eine solche Beprobung bestanden in Deutschland zunächst Bedenken bezüglich des Arbeitsschutzes, da nach eigener Einschätzung eine Probennahme in Güllebehältern wegen der schwierigen Zugänglichkeit und der potentiellen Gefahr für den Probennehmer als risikobehaftet angesehen wurde.

Aus diesem Grunde wurden insgesamt 31 bekanntermaßen MAP-positive und 15 MAP-negative Milchviehherden aus Thüringen im Jahr 2010 mit Hilfe von Umgebungskotproben untersucht (Studie 1). Alle Herden waren am Programm zur Be-

kämpfung der Paratuberkulose in Thüringer Rinderbeständen (TMSFG, 2008) beteiligt und es lag mindestens eine individuelle Untersuchung der Kühe mittels Kotkultur vor. Von den infizierten Herden wiesen acht eine sehr niedrige ($> 0 - 2\%$), 14 eine niedrige ($> 2 - 5\%$), vier eine mittlere ($> 5 - 10\%$) und fünf eine hohe ($> 10\%$) IHP der MAP-Ausscheider auf. In den Beständen wurden Umgebungskotproben von vordefinierten Stellen entnommen: dem Laufbereich der laktierenden Kühe, dem Melkbereich, dem Krankenbereich, dem Abkalbebereich und den Übergängen zum Kälberbereich. In dieser Untersuchung wurde aus Gründen des Arbeitsschutzes bewusst auf eine Probennahme im Bereich Güllelager verzichtet. Im Ergebnis konnten alle Bestände mit einer IHP der MAP-Ausscheider von über 5% mittels Umgebungskotproben als MAP-positiv erkannt werden. In diesen Beständen hätte bereits die Beprobung von Melkbereich und Laufbereich genügt. Bestände mit einer IHP unter 5% wurden mit abnehmender Sicherheit erkannt.

Im Schrifttum lag bisher nur eine Untersuchung zur Validierung von Umgebungskotproben vor, in der die IHP der MAP-Ausscheider mittels individueller Kotkultur ermittelt wurde. Diese ergab, dass bei Ansteigen der IHP auf Werte über 2% die Erkennungsrate mit Umgebungskotproben aus den Laufbereichen der Kühe und dem Güllelager 75% beträgt (PILLARS et al., 2009). Studie 1 zeigte, dass Herden mit einer IHP über 2% mit einer Sicherheit von 87% erkannt wurden. Damit konnten die Ergebnisse der amerikanischen Studien bestätigt werden und es zeigte sich, dass der Verzicht auf die Beprobung der Güllelagerstätte die Sensitivität des Verfahrens nicht grundsätzlich beeinträchtigt. Die ausschließlich MAP-negativen Umgebungskotproben aus den Beständen ohne MAP-Ausscheider belegen die hohe Spezifität dieses Verfahrens in Verbindung mit der kulturellen Untersuchung zum MAP-Nachweis.

Das Evidenzniveau für die Nutzung von Umgebungskotproben in Milchviehherden wird als stark bewertet (SWEENEY et al., 2012). Gleichwohl bestehen auf Grund der begrenzten Sensitivität, die sich auch in Studie 1 zeigte, Zweifel bezüglich der Nutzung in Herden mit niedriger IHP (SMITH et al., 2011). Daraus ergab sich die Zielstellung, den Zusammenhang zwischen der IHP und der Nachweissicherheit dieses Probenahmeverfahrens in Herden mit niedriger IHP zu untersuchen und in einem logistischen Regressionsmodell zu schätzen (Studie 2). Ausgewählt wurden 14 Herden aus dem Thüringer Bekämpfungsprogramm mit einer aus dem Vorjahr bekannten IHP unter 5% , ergänzt um drei Herden mit einer höheren IHP und um drei MAP-

negative Herden. Es wurden die Stellen in der Stalleinheit beprobt, die sich in Studie 1 bewährt hatten. Die Probennahme erfolgte zweimal im Abstand von ca. 4 Monaten, einmal in einer kühleren Jahreszeit (zeitiges Frühjahr) und einmal bei warmem Wetter im Sommer. Damit sollten auch Effekte einer mehrmaligen Beprobung auf die Sensitivität und Spezifität des Verfahrens erfasst werden. Zur Anwendung kam hier neben der kulturellen Untersuchung eine neu auf dem Markt etablierte qPCR-Methode zum direkten Nachweis von MAP (TaqMan® MAP (Johnes) Reagents Kit; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) aus Kot nach vorheriger DNA-Extraktion mit Hilfe von Magnetpartikeln (MagMax™ Total Nucleic Acid isolation Kit; Life Technologies GmbH). Damit war es möglich, ohne vorherigen Kultivierungsschritt die Kotprobe zu untersuchen. Beim MAP-Nachweis in den Umgebungskotproben war sowohl für die semiquantitative Koloniezahl der kulturellen Untersuchung als auch für den ct-Wert der qPCR eine hochsignifikante Korrelation zur IHP gegeben. Insgesamt wurde in den Proben aus dem Melkbereich, von Triebwegen und aus Gruppen der laktierenden Kühe am häufigsten MAP nachgewiesen, in den Proben aus der Kalbebucht oder der Krankenbucht seltener. Letzteres entspricht den Ergebnissen einer Auswertung von über 5500 Umgebungskotproben in kanadischen Milchviehherden, in der Proben in diesen Bereichen sowie aus der Bucht der Trockensteher mit geringerer Wahrscheinlichkeit MAP-positiv getestet wurden. Eine Ursache dafür könnte die häufigere Reinigung und Desinfektion in Kalbe- und Krankenbuchten sein, welche die Erregermenge in diesen Bereichen reduziert. Ein weiterer Grund könnte das als Einstreu verwendete Stroh sein, welches die Entnahme und die Bearbeitung der Probe erschwert (WOLF et al., 2015b).

In der Studie 2 fand sich die beste Korrelation zwischen dem ct-Wert der qPCR und der semiquantitativen Koloniezahl der kulturellen Untersuchung, wenn die Proben aus Melkbereich, Triebwegen und Gruppen der laktierenden Kühe berücksichtigt wurden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit denen von ALY et al. (2009), die ebenfalls eine gute bis exzellente Übereinstimmung von PCR und Kultur bei der Untersuchung von Umgebungskotproben fanden. Letztendlich ergab die qPCR bei einer größeren Zahl Umgebungskotproben positive Befunde: Von den 200 Proben waren 60 positiv in der PCR und 25 in der Kotkultur. Insbesondere aus den im Sommer entnommenen Proben war häufig wegen starker Begleitflora eine kulturelle Untersuchung nicht möglich. Im Ergebnis war sowohl für die kulturelle Untersuchung als auch für den MAP-Nachweis mit PCR ein Zusammenhang in Form einer logistischen

Regressionsfunktion ermittelbar. Das erlaubte die Kalkulation von Grenzwerten der IHP, bei denen die Erkennung der Herden als MAP-positiv mit Umgebungskotproben möglich ist. Für die kombinierte Untersuchung mit Kultur und qPCR und bei Nutzung von drei Proben aus dem Melkbereich, Triebwegen und Gruppen der laktierenden Kühe liegt dieser bei $6,2 \pm 1,6$ % für 90 % Erkennungssicherheit und bei $2,9 \pm 1,0$ % für 50 % Erkennungssicherheit bei einmaliger Untersuchung. Letztgenannter Wert ist insbesondere deshalb von Interesse, weil er den Wendepunkt der logistischen Funktion darstellt und daher am stabilsten geschätzt werden kann, also den kleinsten Fehler hat. Für die Betrachtung aller fünf Proben bzw. für die zweifache Beprobung ergaben sich in dieser Studie keine bessere Sensitivität der Methode. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von LAVERS et al. (2013), die beim Einsatz von Umgebungskotproben in kanadischen Milchviehherden eine klare Abhängigkeit von der Zahl der Beprobung feststellten. In deren Studie erhöhte sich die Sensitivität auf Herdenebene von 71 % (95%iges Konfidenzintervall: 49 % – 86 %) bei einmaliger Beprobung auf 90 % (95%iges Konfidenzintervalle: 62 % – 98 %) bei sechsmaliger Probennahme.

Die Ergebnisse der Studie 2 zeigten auch, dass es nicht darauf ankommt, möglichst viele Proben je Termin der Probennahmen zu entnehmen. Die Beschränkung auf die drei wichtigsten Probennahmeorte führte zur gleichen Erkennungswahrscheinlichkeit wie Proben von fünf verschiedenen Lokalisationen. Es macht folglich mehr Sinn, von geeigneten Orten weniger Proben häufiger zu entnehmen als einmalig viele Orte im Betrieb zu beproben (KHOL et al., 2009; LAVERS et al., 2013; WOLF et. al, 2016a).

In Studie 2 hatte die hohe Ausfallrate der kulturellen Untersuchung im Sommer wegen Überwucherung das Ergebnis des zweiten Untersuchungsganges beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wurden in einer Studie im kanadischen Bundesstaat Alberta im Sommer höhere Nachweisraten erzielt als im Winter, was mit der schlechteren Zugänglichkeit von Probenahmeorten im Winter begründet wurde (WOLF et al., 2015a). Dieses Problem besteht jedoch in den deutschen Milchviehhaltungen weniger. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass der Sommer in Deutschland bezüglich Temperatur und Luftfeuchte wärmer und schwüler ist als in Alberta und damit die Anreicherung der störenden Begleitflora mehr gefördert wird. Für diese Proben könnte die PCR die geeignetere Untersuchungsmethode sein, da diese nicht von der

Kultivierbarkeit der MAP-Bakterien abhängt und hier die Begleitflora nicht zur Störgröße wird.

Die bisher diskutierten Untersuchungen wurden ausnahmslos in Milchviehherden, bevorzugt in solchen mit Laufstallhaltung, durchgeführt. Für Herden mit Anbindehaltung und für Mutterkuhhaltungen können die hier vorgestellten Ergebnisse nicht ohne Weiteres übernommen werden. Bei Anbindehaltung haben eventuell vorhandene Ausscheider nur einen geringen Bewegungsspielraum. Zudem ist hier Stroh das am häufigsten verwendete Einstreumaterial. Erfahrungen aus Kanada zeigten, dass dies offensichtlich sowohl bei der Probenahme als auch bei der labortechnischen Aufbereitung der Proben störte (WOLF et al., 2015b; 2016a).

Für Mutterkuhhaltungen ist das bisherige Evidenzniveau für die Untersuchung von Umgebungskotproben gering (SWEENEY et al., 2012). In dieser Produktionsrichtung ist bei der meist üblichen Weidehaltung mit einer verminderten Anreicherung von MAP in der Umgebung und daher mit geringeren Nachweisraten zu rechnen. Daher waren für Mutterkuhhaltungen gesonderte Untersuchungen erforderlich (Studie 3). Insgesamt waren 20 Herden aus Rheinland-Pfalz (6), Sachsen (4) und Thüringen (10) in die Untersuchung einbezogen. Es handelte sich um Herden, die Kühe der Rassen Fleckvieh, Limousin oder Charolais bzw. Kreuzungstiere hielten. Die Herdengröße variierte zwischen 30 und 515 (Median: 195) Kühen. Die Entnahme der Umgebungskotproben erfolgte am Ende der Winterhaltungsperiode in der dafür genutzten Stallumgebung. In allen Herden wurde die IHP der MAP-Ausscheider durch kulturelle Untersuchung aller Kühe ermittelt, die in geringem zeitlichem Abstand zur Umgebungskotprobenentnahme stattfand. Entsprechend der errechneten scheinbaren IHP wurden sechs Herden in die Klasse mit hoher IHP ($> 5\%$) und acht in die Klasse mit niedriger IHP ($\leq 5\%$) gruppiert. Sechs Herden waren nach dem „Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderherden in Thüringen“ (TMSFG, 2008) oder auf ähnliche Weise in den anderen Bundesländern als „paratuberkulose-unverdächtig“ anerkannt und dienten als negative Kontrollherden. Die Ergebnisse zeigten, dass auch in den Mutterkuhherden die Ergebnisse der Untersuchung von Umgebungskotproben mit der IHP signifikant korreliert waren. Alle sechs Herden mit IHP $> 5\%$ wurden als positiv identifiziert. Damit kommt Studie 3 in Mutterkuhherden zu ähnlichen Resultaten wie die Studien 1 und 2 in Milchviehherden. Von den Mutterkuhherden mit IHP $\leq 5\%$ hatten 50 % einen positiven MAP-Befund in

der Umgebungskotprobe, was ebenso den Ergebnissen in Milchviehherden entspricht. Damit ist prinzipiell bestätigt, dass sich unter den in Deutschland vorherrschenden klimatischen Bedingungen die Entnahme von Umgebungskotproben in Mutterkuhherden in ähnlicher Weise wie in Milchviehherden eignet, um einen ersten Eindruck zur Paratuberkulose-Situation in der Herde zu erlangen. Es ist also relativ sicher möglich, Mutterkuhherden mit einer IHP > 5 % von anderen Herden zu unterscheiden. Das Verfahren war in dieser Studie hochspezifisch, das heißt, in keiner der negativen Kontrollherden wurde ein MAP-positiver Befund erhoben.

Im Rahmen der Studiendurchführung stellte sich heraus, dass eine vorherige Standardisierung der Probennahmeorte auf Grund der hohen Vielfalt der Aufstallungsformen, betrieblichen Bedingungen und Haltungskompartimente nicht so gut möglich war wie im Milchviehbestand. Die Zahl der entnommenen Proben variierte stark in Abhängigkeit von der Zahl der Haltungskompartimente, der Gruppenbildung in der Herde, den technischen Möglichkeiten der Probennahme und der Verfügbarkeit von Kot an den bestimmten Orten. Weiterhin beeinflusste wahrscheinlich auch die Beimischung von Erde oder Stroh zur Kotprobe den MAP-Nachweis, so wie dies bereits für Proben aus Milchviehherden beschrieben wurde (WOLF et al., 2016a). Es bleibt daher weiteren Studien vorbehalten, in Mutterkuhhaltungen die geeigneten Probennahmeorte genauer zu spezifizieren. Die meisten der in Studie 3 MAP-positiven Proben stammten von Orten mit hohem Kuhverkehr wie Futtergänge, Tränkeplätze oder Haltungsgruppen. Aber auch aus den in Krankbuchten entnommenen oder von der Stiefelsohle abgekratzten Proben gelang relativ häufig der MAP-Nachweis.

Dieser MAP-Nachweis von der Stiefelsohle motivierte zusammen mit den vielversprechenden Ergebnissen mit Sockentupfern (EISENBERG et al., 2013b) die Durchführung der Studie 4. Deren Ziel war es, die Nutzung von Sockentupfern, so wie sie in der Salmonella-Diagnostik von Geflügelbeständen genutzt werden, zur Entnahme von Umgebungskotproben zu verwenden. Der offensichtliche Vorteil ist die gute Durchmischung des anhaftenden Kots bei jedem Schritt und die Vereinigung der in den vorherigen Studien 1 und 2 als gut geeignet bestätigten Probennahmeorte Melkbereich, Triebwegen und Gruppen der laktierenden Kühe in einer Probe. Die Idee bestand darin, den Weg einer frischlaktierenden Kuh von ihrer Haltungsgruppe zum Melkstand mit dem Sockentupfer abzuschreiten und damit Kot aus der Haltungsgruppe, vom Triebweg und vom Vorwarte Hof am Sockentupfer zu binden. Für die

Studie wurde eine Schrittzahl von 100 bis 200 Schritten empirisch festgelegt. Unter Berücksichtigung der Studienergebnisse aus Kanada (WOLF et al., 2015b) und Amerika (PILLARS et al., 2009) wurde zusätzlich zum Sockentupfer eine Güllemischprobe entnommen. Für die Studie standen 77 Milchviehherden aus Hessen (8), Sachsen (10) und Thüringen (59) mit einer durchschnittlichen Herdengröße von 356 Kühen zur Verfügung. Neunzehn dieser Herden waren im Rahmen der freiwilligen Bekämpfungsprogramme in Sachsen (1) und Thüringen (18) als „Paratuberkulose-unverdächtig“ anerkannt worden und dienten als negative Kontrollherden. Von den 58 MAP-positiven Herden waren die Herden aus Sachsen (9) und Thüringen (41) am Bekämpfungsprogramm beteiligt, sodass die scheinbare IHP der MAP-Ausscheider am Tag der Probennahme von Sockentupfer und Gülleprobe aus vorliegenden Untersuchungsbefunden geschätzt werden konnte. Da die hessischen Herden nicht in eine solche regelmäßige Überwachung einbezogen waren, wurden deren Kühe zusammen mit der Entnahme der Umgebungskotproben individuell untersucht. In dieser multizentrischen Studie wurden gleichzeitig entnommene Sockentupferproben und Güllemischproben aus jedem Bestand in drei verschiedenen Laboren mit der jeweils dort etablierten Kultur- und PCR-Methode untersucht. Dabei wurden die Kultur in allen drei Laboren auf HEYM-Festnährböden durchgeführt und entsprach damit den Vorgaben der amtlichen Methodensammlung des FLI (2012). Die Labore nutzten jedoch unterschiedliche PCR-Methoden. Dabei handelte es sich um eine konventionelle real time PCR, die nach vierwöchiger Kultivierung mit abgeschwemmten Kulturmaterial durchgeführt wurde (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2008; FAWZY et al., 2015), und zwei kommerzielle qPCR-Kits. Analog zu Studie 2 wurde mit einem logistischen Regressionsmodell ein Grenzwert der scheinbaren IHP geschätzt, ab dem mit einer bestimmten Erkennungswahrscheinlichkeit die Herden als MAP-positiv erkannt wurde, und zwar mit Sockentupfer oder Güllemischprobe oder der gleichzeitigen Nutzung beider Proben, die mit Kultur, PCR oder in Kombination beider Proben untersucht wurden.

Die besten Ergebnisse, also die niedrigsten Grenzwerte der IHP wurden für die gleichzeitige Nutzung beider Proben und deren Untersuchung mit Kultur und PCR erzielt. Es entspricht den Ergebnissen anderer Studien, dass die Untersuchung mehrerer Proben zu einer höheren Sensitivität der Umgebungskotprobenuntersuchung führt (LAVERS et al., 2013; WOLF et al., 2015a). Gleichzeitig kann eingeschätzt werden, dass mit diesen beiden Proben eine Gesamtsensitivität des Untersuchungs-

schemas erreicht wird, die es erlaubt, Herden mit einer IHP der MAP-Ausscheider von ca. 4 % mit 90%iger Sicherheit bei einer einzigen Untersuchung zu erkennen. Sofern nur Sockentupfer genutzt werden, erhöht sich der Grenzwert auf ca. 6 % bei simultaner Untersuchung in qPCR und Kultur und auf ca. 9 % bei alleiniger Nutzung der PCR. Auch andere Studien fanden bei alleiniger Nutzung des Sockentupfers eine schlechtere Sensitivität im Vergleich zu einem Set mehrerer Umgebungskotproben (WOLF et al., 2016b).

In einem ähnlichen Studiendesign wie in Studie 2 und 3 wurde kürzlich die Sensitivität des Antikörpernachweises in Tankmilchproben untersucht. Für die Untersuchung von Pools aus 50 Milchproben mit vier verschiedenen ELISA-Testsystemen ergaben sich nach Optimierung des cut-offs Grenzwerte der Intrapoolprävalenzen von 9 – 16 % für 50 % und von 17 – 32 % für 90 % Erkennungswahrscheinlichkeit (KÖHLER et al., 2016). Anders ausgedrückt, bei ca. 9 % MAP-Ausscheiderprävalenz erkennt der beste MAP-Antikörper-ELISA bei Untersuchung von Milchpools etwa 50 % der Fälle als positiv, während ein Sockentupfer in 90 % der Fälle ein positives Resultat ergibt. Damit ist die Untersuchung eines Sockentupfers in diesem Prävalenzbereich verglichen mit der Tankmilchuntersuchung nahezu doppelt so sensitiv. Zudem kann die Tankmilchuntersuchung in Abhängigkeit vom verwendeten ELISA-Testsystem auch Spezifitätsprobleme aufweisen (GEUE et al., 2007), die bei der Erregerdiagnostik aus Umgebungskotproben nicht zu erwarten sind. In Kanada werden die ursprünglich zur Herdendiagnostik eingesetzten Tankmilchuntersuchungen nicht mehr durchgeführt. Die geringe Validität der Testergebnisse beeinträchtigte die Effizienz der Bekämpfungsmaßnahmen und hob die vermeintliche Kostenersparnis auf (KELTON et al., 2014; Dr. DAVID KELTON, persönliche Mitteilung, 21. Juni 2014).

Insgesamt eignet sich das Beprobungsprotokoll mit Umgebungskotproben sehr gut für Studien zur Feststellung des Anteils der von Paratuberkulose betroffenen Herden einer Region (Prävalenzstudien). Das entspricht den Ergebnissen und Schlussfolgerungen anderer Autoren (PILLARS et al., 2009), die aus den Ergebnissen ihrer Studie schlussfolgern, dass ein Set aus zwei Proben (Fußboden in den Gruppenbuchten der laktierenden Kühe und Güllelagerstätte) mit 75%iger Sicherheit die Herden mit einer IHP über 2 % identifiziert. Die in Studie 4 ermittelte Schätzfunktion weist für 2 % IHP nur eine Sicherheit von ca. 60 % aus. Bei diesem Vergleich ist zu berücksichtigen, dass die Studie von PILLARS et al. (2009) nur auf sieben Herden beruht, Stu-

die 4 dagegen auf der zehnfachen Zahl. Daraus resultiert eine stabilere Schätzung des funktionalen Zusammenhangs. Auch eine serologische Untersuchung von individuellen Milchproben aller Kühe eines Bestandes hatte in einer kanadischen Studie eine ähnliche Sensitivität (56 – 63 %), jedoch eine schlechtere Spezifität (80 – 96 %) auf Bestandesebene (LAVERS et al., 2014) für Herden mit einer IHP über 2 %.

Die Kenntnis dieser Testcharakteristika ist wichtig, um diese in Prävalenzstudien zu berücksichtigen. Sofern die Testeigenschaften Sensitivität und Spezifität bekannt sind, lässt sich aus der scheinbaren Prävalenz die wahre Prävalenz schätzen (ROGAN & GLADEN, 1979; BRANSCUM et al., 2004; 2005; WOLF et al., 2014). In einer landesweiten amerikanischen Studie ergab das Ergebnis der Schätzung der wahren Prävalenz MAP-positiver Herden, dass 91,1 % (95%iges Konfidenzintervall: 81,6 bis 99,3 %) der Milchviehherden von Paratuberkulose betroffen sind (LOMBARD et al., 2013). Dabei gingen die Autoren von einem Schätzwert der Sensitivität auf Herdenebene von 77,2 % aus. In Sachsen und Thüringen wurde eine solche Studie unter Nutzung von Sockentupfern durchgeführt, wobei basierend auf den Ergebnissen der Studie 4 eine wahre Prävalenz von 56 % (95 %iges Konfidenzintervall: 42 % bis 70 %) für Thüringen und von 34 % (95 %iges Konfidenzintervall: 20 % bis 48 %) für Sachsen geschätzt wurde (PÜTZSCHEL et al., 2016). Dies wäre eine Option für eine deutschlandweite Prävalenzstudie.

Als weiteres Anwendungsgebiet kommt zweifelsohne die Erkennung MAP-positiver Herden in Frage. Hierfür gelten die Ausführungen zu den Studien 1 bis 3 in analoger Weise.

Inwieweit mit einem Probennahmeprotokoll aus Sockentupfern und Gülleproben künftig auch MAP-negative Herden überwacht werden können, müssen künftige Untersuchungen belegen. Folgende theoretische Überlegung, die auf den Ergebnissen der Studie 4 fußt, führt zu dem Schluss, dass die dafür notwendige Sicherheit erreicht werden könnte, wenn mehrfach beprobt wird: Geht man von dem für eine Erkennungswahrscheinlichkeit von 50 % geschätzten IHP-Grenzwert von 1,5 % aus, berücksichtigt eine fünfmalige Beprobung und unterstellt Unabhängigkeit der Untersuchungsergebnisse, so würde man damit Herden mit 1,5 %iger IHP mit einer Sicherheit von 96,9 % erkennen. Es würde in Herden mit 66 Kühen oder weniger eine MAP-positive Kuh mit 95%iger Sicherheit gefunden. Unter Feldbedingungen ist die Validität dieser Annahme begrenzt, weil die Untersuchungsergebnisse nicht vollstän-

dig unabhängig voneinander sein können (gleiche Herde, gleicher Probenehmer u. ä.) und mehrfaches Testen in der Gesamtbetrachtung die Spezifität negativ beeinflusst. Für praktische Zwecke erscheint die angenommene Sensitivität jedoch als ausreichend und die Spezifität dürfte aufgrund der hohen Spezifität des Einzeltests wenig beeinträchtigt werden. Das Verfahren wäre kostengünstiger als die zurzeit praktizierte individuelle Untersuchung jedes Tieres im Abstand von zwei Jahren. Aufgrund der guten Spezifität des Verfahrens hätte man nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit mit falsch positiven Ergebnissen zu rechnen. Weiterhin ist das Ergebnis der Umgebungskotprobe unabhängig von der probenehmenden Person und deren Erfahrung mit der Beprobungstechnik, sofern standardisierte Protokolle verwendet werden (ALY et al., 2009).

Bei der Durchführung der Studie 4 war die Entnahme der Güllemischproben in den rinderhaltenden Betrieben in der Regel möglich. Die meisten Landwirte besaßen ein System zur Entnahme einer gut durchmischten und damit repräsentativen Probe aus dem Güllebehälter, da solche Proben für Bestimmung des Nährstoffgehalts der Gülle und deren fachgerechten Einsatz als organischen Dünger benötigt werden. Auch zeigten andere Studien, dass die Bedenken bezüglich des Arbeitsschutzes nicht überbewertet werden sollten und es Möglichkeiten gibt, geeignetes Material aus Güllebehältern zu gewinnen (WOLF et al., 2016a). Problematisch war lediglich der Zeitaufwand für das Durchmischen des Güllebehälters und die nicht immer ausgeprägte Bereitschaft der Landwirte, die Probenahme zu sicherzustellen.

Insgesamt erwiesen sich in den Studien 1 – 4 Umgebungskotproben als ein geeignetes Probenmaterial zur Feststellung des MAP-Status einer Rinderherde. Sie sind geeignet

- zur Schätzung der Prävalenz betroffener Herden in einer Region
- zur Erstuntersuchung von Herden mit einem klinischen Verdacht auf Paratuberkulose
- als Einstiegsuntersuchung in ein Bekämpfungsprogramm, z. B. in Stufe 1 der Kontrollphase nach den Empfehlungen des BMEL (BMEL, 2014).

Trotz der signifikanten Korrelation zwischen dem ct-Wert der real time PCR oder der semiquantitativen Koloniezahl auf den Kulturmedien mit der Intraherdenprävalenz ist eine Schätzung dieser aus diesen Messwerten bisher nicht geprüft und sollte nicht

kritiklos erfolgen. Hierzu sind weitere Studien erforderlich. Ebenso ist die Anwendung der Umgebungskotproben zur Prüfung der Effektivität von Hygienemaßnahmen bisher nicht untersucht worden. Auch die Nutzung von Umgebungskotproben für die Überwachung MAP-unverdächtiger Bestände bedarf weiterer Untersuchungen.

Für die praktische Anwendung ergeben sich folgende Empfehlungen:

- In Milchviehherden sollten mindestens Proben von folgenden drei Orten entnommen werden:
 - Vorwarte Hof oder andere geeignete Bereiche am Melkstand
 - Haupttriebwege
 - Gruppenbuchten laktierender Kühe
- Die Beprobung dieser drei Bereiche kann auch durch Abschreiten mit einem Sockentupfer erfolgen.
- In Mutterkuhhaltungen sollten die Orte mit hohem Kuhverkehr vor Ort ausgewählt werden. Auch hier kann ein Abschreiten mit einem Sockentupfer eine sinnvolle Alternative sein.
- In Beständen mit Güllelager (Milch- oder Mutterkühe) sollte das Probenset um eine Güllemischprobe ergänzt werden.
- Die Beprobung sollte nicht an schwülwarmen und, wenn Beprobung im Außenbereich erforderlich ist, nicht an Frosttagen erfolgen.
- Gut mit Stroh eingestreute Bereiche (Kalbebucht, Krankbuchten, Anbindehaltungen) eignen sich weniger für die Entnahme von Umgebungskotproben.
- Für den Erregernachweis sind sowohl die mykobakteriologische Kultivierung als auch PCR-Methoden mit direkter Extraktion der DNA aus Rinderkot geeignet. Die simultane Verwendung beider Testverfahren erhöht die Sensitivität.
- Ein schneller Transport der Proben in das Untersuchungslabor ist sicherzustellen. Alternativ können die Proben bei -20 °C gelagert werden.
- Der positive Erreger- oder Genomnachweis sagt mit hoher diagnostischer Sicherheit aus, dass die untersuchte Herde von Paratuberkulose betroffen ist.

- Aus einem negativen Befund einer Herdenuntersuchung mit Umgebungskotproben kann nicht geschlussfolgert werden, dass die Herde nicht von Paratuberkulose betroffen ist. Erst durch mehrfache Wiederholung des Verfahrens über einen längeren Zeitraum kann die Sicherheit für diese Aussage erhöht werden.

3.2 Eignung serologischer Untersuchungsverfahren zur Beurteilung der Paratuberkulosesituation einer Rinderherde

In der ersten Phase des Thüringer Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose ab 2003 waren serologische Untersuchungen aller Kühe der Herde zur Anwendung gekommen und im Jahr 2008 durch individuelle kulturelle Untersuchungen ersetzt worden. In den Folgejahren waren die serologischen Untersuchungen weiterhin als Einstiegsuntersuchung zur Erstbeurteilung des Herdenstatus vorgesehen. Zudem war festzustellen, dass in Thüringen und in anderen deutschen Bundesländern dieses Untersuchungsverfahren von praktizierenden Tierärzten und Untersuchungslaboratorien gern genutzt wurde, weil sich die ursprünglich für die Überwachung anderer Tierseuchen entnommenen Blut- oder Milchproben sehr gut auch für die serologische Untersuchung auf MAP-Antikörper nutzen ließen (BÖTTCHER & GANGL, 2004; KOMOROWSKI, 2009; SÖLLNER, 2009). Es ergab sich die Frage nach den Möglichkeiten, Grenzen und Kosten serologischer Untersuchungen zur Beurteilung der Paratuberkulosesituation in Rinderbeständen. Unter Berücksichtigung der Sensitivität und Spezifität der in Deutschland zugelassenen ELISA-Testsysteme wurde die erforderliche Stichprobengröße berechnet, um Herden mit einer Prävalenz von mehr als 10 % MAP-Ausscheidern (Designprävalenz) zu erkennen. Dies erfolgte mit Hilfe einfacher und frei verfügbarer Software (Freecalc 2.0; <http://www.ausvet.com.au>; CAMERON, 2001), die auf den von CAMERON und BALDOCK (1998) entwickelten Algorithmen für die Verwendung imperfekter Tests beruhen. Die Sensitivitäten und Spezifitäten der ELISA-Tests wurden dafür aus einem Datensatz von 460 kulturell positiven Rindern und 344 kulturell negativen Rindern neu berechnet. Diese Nachevaluierung war notwendig geworden, da die von KÖHLER et al. (2008) publizierten Textcharakteristika auf einer Testpopulation mit 27 % MAP-positiven Kühen beruhen, die viele klinisch kranke Tiere einschloss. Eine solche Population war nicht mehr

repräsentativ für die Herden, die bereits mehrere Jahre dem Thüringer Bekämpfungsprogramm angeschlossen waren.

Die in Studie 5 einbezogenen 344 MAP-negativen Rinder stammten zu etwa gleichen Anteilen aus sieben historisch paratuberkulose-freien Herden. Diese Herden waren jeweils seit mehreren Jahren im Untersuchungsprogramm und hatten noch nie einen kulturell MAP-positiven Befund. Zusätzlich wurde geprüft, dass die Tiere den Bestand niemals verlassen hatten. Ein aktueller MAP-negativer kultureller Befund zu jeder Kuh lag vor. Aufgrund dieser zusätzlichen epidemiologischen Eigenschaften kann mit sehr hoher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um Kühe handelte, die keinen Kontakt zu MAP hatten. Auf der anderen Seite waren 460 kulturell positive Rinder aus 16 Beständen in die Untersuchung eingegangen. Wegen der hohen Spezifität der MAP-Kotkultur besteht eine große Sicherheit bezüglich der Richtigkeit des MAP-positiven Befundes. Mit diesem prästratifizierten Ansatz konnte der Nachteil der begrenzten Sensitivität der Kotkultur ausgeglichen werden, welche deren Eignung als Goldstandard in dieser Untersuchung sonst in Frage gestellt hätte. Die Spezifität der kulturellen Untersuchung mit nachfolgender Speziescharakterisierung über ein IS900-PCR wird mit 100 % angegeben (WHITLOCK et al., 2000; BERGHAUS et al., 2006), die passive passagere Erregerausscheidung wie sie in einer experimentellen Studie festgestellt wurde (SWEENEY et al., 1992), kann unter Praxisbedingungen vernachlässigt werden (GIERKE & KÖHLER, 2009).

Die im Rahmen der jährlichen Kontrolluntersuchungen festgestellte Ausscheiderprävalenz dieser 16 Herden entsprach mit 9,5 % weitestgehend der Annahme für die Designprävalenz dieser Studie. In Studie 5 hatten die bewerteten vier ELISA-Testsysteme in Relation zur Kotkultur als Quasi-Goldstandard diagnostische Sensitivitäten zwischen 23,3 % und 32,2 % sowie diagnostische Spezifitäten zwischen 96,8 % und 98,6 %. Es zeigte sich, dass die geforderte 99%ige Spezifität tatsächlich nur für einen ELISA annähernd erreicht werden konnte. Die Sensitivitäten bewegen sich um ~30 %, entsprechen damit den aus internationalen Studien abgeleiteten Orientierungswerten (COLLINS et al., 2006) und sind aus den oben genannten Gründen für die Verwendung in der Population der Thüringer Kontrollprogrammherden mit nahezu ausschließlich subklinisch infizierten Rindern besser geeignet als die von KÖHLER et al. (2008a) publizierten Werte. Es bestätigte sich, dass Kontroll-

maßnahmen, wie die schnelle Entfernung starker Ausscheider, einen großen Einfluss auf die Testsensitivitäten hatten (SWEENEY et al., 2006; GIERKE, 2009).

Unter Verwendung dieser Testcharakteristika wurde für den ELISA-Test mit der höchsten Spezifität eine notwendige Stichprobengröße von 610 Tieren kalkuliert. Daraus zeigt sich, dass nur sehr große Herden überhaupt mit serologischen Untersuchungen mit hinreichender Sicherheit bewertet werden können. Dabei ist zu berücksichtigen, dass auch in tatsächlich MAP-freien Herden rein testbedingt 23 falsch positive Rinder in dieser Stichprobe auftreten können. Dem steht gegenüber, dass bei einer tatsächlichen Seroprävalenz von 3,7 % auch 23 serologisch positive Tiere auftreten würden. Es sind folglich nur die Herden bewertbar, die in der Stichprobe von 610 Tieren entweder ausschließlich negative Testergebnisse haben – diese sind als Herden mit weniger als 10 % MAP-Ausscheidern zu bewerten – oder mehr als 23 positive Befunde ergeben – diese sind als Herden mit mehr als 10 % MAP-Ausscheidern einzuordnen. Auf Grund dieser technischen Limitationen ist die Eignung der serologischen Tests für die Bewertung des MAP-Status auf Herdenebene in Kontrollprogrammherden mit niedriger IHP und einen hohen Anteil subklinisch infizierter Tiere zu hinterfragen.

Es ist möglich, dass sich in bisher nicht bearbeiteten Herden mit hoher IHP und mehr klinisch kranken Tieren ein anderes Bild ergibt. Hier erscheinen die Testcharakteristika von KÖHLER et al. (2008a) geeigneter, denn in Beständen mit einer größeren Anzahl an Ausscheidern finden sich auch mehr starke Ausscheider in fortgeschrittenen Krankheitsstadien mit intensiverer humoraler Immunreaktion und einer höheren Wahrscheinlichkeit, im ELISA positiv zu reagieren (GIERKE, 2009). Unter Nutzung der Testcharakteristika von KÖHLER et al. (2008a) würde man für dieselbe angestrebte Sicherheit von 95 % eine Stichprobe von mindestens 88 Tieren (zwei falsch positive Reagenten möglich) benötigen und könnte ab drei positiven Befunden die oben genannte Aussage treffen. Um eine niedrigere IHP auszuschließen, sind größere Stichproben notwendig. Die Kalkulation von Studie 5 zeigt auch, dass eine serologische Stichprobenuntersuchung von 30 Tieren, wie sie von manchen Autoren empfohlen wird (SIBLEY & ORPIN, 2016), unabhängig von der vermuteten Prävalenz wenig Aussagekraft besitzt. Demgegenüber hatte in Studie 5 eine Stichprobe von 30 Tieren, von denen Kotproben kulturell untersucht wurden, dieselbe Aussagekraft wie die serologische Untersuchung von 610 Tieren. Die dafür kalkulierten Kosten erga-

ben somit auch bei etwa vierfachen Kosten für die kulturelle Einzeluntersuchung einen klaren wirtschaftlichen Vorteil für die Stichproben auf Basis der Kotkultur. Die Kalkulation der Kosten für eine Herdenprävalenzstudie ergab, dass eine solche auf der Basis serologischer Untersuchungen durch die größeren Stichprobenumfänge etwa dreimal so teuer wäre wie bei Anwendung kultureller Untersuchungen in kleineren Stichproben.

Im Ergebnis der Studie 5 und unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren können serologische Untersuchungen auf MAP-Antikörper mit den verfügbaren ELISA-Testsystemen nur unter folgenden Voraussetzungen für die Bewertung eines Herdenstatus bezüglich Paratuberkulose verwendet werden:

- Verwendung spezifischer Testsysteme
- Untersuchung großer Bestände mit entsprechend großer Stichprobenzahl
- vermutete hohe IHP der MAP-Ausscheider, z. B. wegen Vorhandensein von Tieren mit klinischen Symptomen

Die Eignung serologischer Testverfahren in der Einzeltierdiagnostik wird von den Ergebnissen der Studie 5 nicht berührt.

Die Frage nach den Einflussfaktoren auf das Ergebnis der serologischen Untersuchungen von Einzeltieren sollte in Studie 6 beantwortet werden. In die Studie waren 1021 Kühe aus 14 Beständen einbezogen; gegenüber Studie 5 wurden zwei Bestände wegen zu geringer Tierzahlen ausgeschlossen. Zudem waren auch MAP-negative Tiere aus den MAP-positiven Beständen berücksichtigt. Diese MAP-negativen Vergleichstiere stammten jeweils aus derselben Herde, hatten die gleiche Laktation und, falls verfügbar, denselben Vater wie das MAP-positive Tier. Es wurden sowohl die Übereinstimmung der Testergebnisse mittels Kappa-Statistik (GROUVEN et al., 2007) als auch in einem gemischten varianzanalytischen Modell tierspezifische Einflüsse (Laktationszahl) und herdenspezifische Faktoren (IHP, Dauer der Teilnahme am Kontrollprogramm) auf die Übereinstimmung der Testergebnisse geprüft. Die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Kotkultur und den serologischen Untersuchungen zeigte nur ein niedriges Niveau der Übereinstimmung mit Kappa-Koeffizienten zwischen 0,19 und 0,24. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit demjenigen anderer Studien (PINEDO et al., 2008; PRADHAN et al., 2009) und ist durch die begrenzte Sensitivität der ELISA-Tests bedingt, die in Studie 6 in Abhän-

gigkeit von der Intensität der Kotausscheidung (semiquantitative Koloniezahl auf dem HEYM-Nährmedium) näher beschrieben wurde. Es zeigte sich in Übereinstimmung mit den Resultaten anderer Studien eine signifikant höhere Sensitivität der ELISA-Tests bei aktuell starker Kotausscheidung (WHITLOCK et al., 2000; SWEENEY et al., 2006; GIERKE, 2009) und für Starkausscheider wurde eine hohe Sensitivität ermittelt (VAN WERRING et al., 2007).

Mit Studie 6 konnte zum ersten Mal ein signifikanter Einfluss sowohl der Beteiligung an einem Bekämpfungsprogramm, als auch der Veränderung der IHP auf Testeigenschaften der ELISA-Testsysteme auf Herdenebene bestätigt werden. Je länger die Herden an einem Bekämpfungsprogramm beteiligt sind, insbesondere an einem kotkulturbasierten, umso höher werden die Übereinstimmungswerte zwischen Kotkultur und ELISA. Die Ursache dafür wird darin vermutet, dass im Verlauf der Bekämpfung die Zahl der kulturell negativen Tiere in der Herde zunimmt, und diese sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch serologisch negativ.

Auf die Übereinstimmung zwischen Kultur und den ELISA-Tests hatte die Laktationszahl einen signifikanten Einfluss, wobei Tiere höherer Laktationen eine größere Übereinstimmung zeigten. Dieses Ergebnis zeigt, dass kulturell MAP-positive Tiere in höherem Alter von den ELISA-Tests besser als positiv erkannt werden, also die Sensitivität mit der Laktation zunimmt. In gleicher Weise zeigen andere Studien, dass ältere Tiere häufiger ELISA-positive Ergebnisse haben als jüngere (VAN SCHAİK et al., 2003; HINGER et al., 2008; KÜPPER et al., 2012).

Die Übereinstimmung zwischen den verschiedenen ELISA-Tests war dagegen hoch. Die Kappa-Koeffizienten lagen zwischen 0,74 und 0,90. Diese hohe Übereinstimmung zwischen den ELISA-Testsystemen steht im Gegensatz zu den Resultaten anderer Studien (MCKENNA et al, 2005; GIERKE, 2009), die schlechtere Übereinstimmungen feststellten. Das kann darin begründet sein, dass in Deutschland mittlerweile nur die vom nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose am FLI zugelassenen Testsysteme eingesetzt werden. Die Zulassung setzt eine hohe Spezifität (> 99 %) voraus. Das wird in der Regel durch einen Vorabsorptionsschritt mit *Mycobacterium phlei* erreicht, um unspezifische Reaktionen zu minimieren. Es ist zu vermuten, dass das Zulassungsverfahren für die Untersuchungsmethoden in Deutschland die Übereinstimmung der Testsysteme verbessert hat.

In Ergänzung zu den in Studie 6 diskutierten Einflüssen auf die blutserologische Untersuchung sei an dieser Stelle angemerkt, dass auch das Ergebnis der milchserologischen Diagnostik weiteren Einflüssen unterliegt, die bei der Anwendung in der Praxis Beachtung finden sollten. So ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven milchserologischen Befundes bei hohen Tagesmilchleistungen, wahrscheinlich durch den Verdünnungseffekt, verringert (GIERKE, 2009; EISENBERG et al., 2015a). Es sind also vermehrt falsch negative Befunde möglich. Daraus resultiert auch ein Einfluss der Laktationsphase auf Sensitivität und Spezifität der ELISA-Tests bei milchserologischen Untersuchungen (GIERKE, 2009), bedingt durch die höhere Milchmenge (EISENBERG et al., 2015a). Dieser ist bei blutserologischen Untersuchungen nicht ausgeprägt (GIERKE, 2009).

Für die praktische Anwendung von ELISA-Tests zur Einzeltierdiagnostik ergeben sich aus den Ergebnissen der Studie 6 folgende Schlussfolgerungen:

- Bei Kühen mit starker MAP-Ausscheidung ist die Übereinstimmung zwischen kulturellem und serologischem Befund besser, daher ist der Einsatz von ELISA-Tests zur Auffindung dieser Tiere sinnvoll.
- Da bei Starkausscheidern auch die Spezifität und damit in Herden mit höherer IHP die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit des positiven Befundes gut sind, kann auf der Basis dieses Ergebnisses die Merzung des Tieres erfolgen, ohne dass ein kultureller Bestätigungstest mit Erregernachweis (Kultur oder PCR) erfolgen muss.
- In Herden mit niedriger IHP sollte auf den alleinigen Einsatz von serologischen Testverfahren auf Grund der schlechten Sensitivität und der abnehmenden Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit des positiven Befundes verzichtet werden.
- Im Rahmen von Bekämpfungsmaßnahmen auf der Basis der Empfehlungen des BMEL sollte der Übergang von Stufe 2 (serologische Diagnostik) in Stufe 3 (bakteriologische Diagnostik) spätestens dann erfolgen, wenn eine kulturell ermittelte IHP von ca. 5 % unterschritten wird, was einer serologischen IHP von etwa 1,5 % (~ 2 %) entspricht.
- Auf Grund der hohen Übereinstimmung der gegenwärtig verfügbaren serologischen Tests führt eine sequentielle serologische Untersuchung mit mehreren

ELISA nicht zu einer möglicherweise erhofften Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Untersuchung.

- Ein serielles Testen mit einem ELISA als Screeningmethode und einer Methode zum Erregernachweis (Kultur oder PCR) als Bestätigungstest wird durch die schlechte Sensitivität der ELISA-Tests beeinträchtigt.

Bei der Interpretation der Testergebnisse spielt der bestandsbetreuende Tierarzt eine Schlüsselrolle. Häufig gelangen die Befunde über ihn zurück an den Rinderhalter (KELTON et al., 2014). Somit kann der Tierarzt dem Landwirt helfen, die Befunde zu werten und die richtigen Schlussfolgerungen zu ziehen.

3.3 Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit und die Wirtschaftlichkeit in Milchviehherden

Von den in Kapitel 1.3.4 dargestellten Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Tiergesundheit sollten zwei Aspekte näher untersucht werden: das Auftreten subklinischer metabolischer Störungen (Studie 7) und die Auswirkungen auf die Milchleistung und die Milchinhaltsstoffe (Studie 8).

In einer früheren Untersuchung in sächsischen Milchviehbeständen (SPREER, 2006) ergaben sich Hinweise, dass bei Tieren mit positivem Nachweis von MAP-Antikörpern subklinische metabolische Störungen auftreten könnten. Bei serologisch positiven Kühen konnten im Vergleich zu MAP-negativen Tieren erhöhte Blutspiegel an freien flüchtigen Fettsäuren und erniedrigte Selen-Blutspiegel festgestellt werden. Studie 7 verfolgte die Zielstellung, in einer Untersuchung mit 227 kulturell MAP-positiven Tieren und 239 MAP-negativen Stallgefährten aus 13 Herden mit einer Größe von 198 bis 1159 Kühen Unterschiede bei klinisch-chemischen Parametern zu finden. Veränderungen im Protein- und Energiestoffwechsel sowie Leberschädigungen sollten dabei durch Bestimmung der Serumkonzentrationen bzw. -aktivitäten von Gesamteiweiß, Bilirubin, Cholesteron, Betahydroxybutyrat, GLDH und Aspartat-Aminotransferase nachgewiesen werden. Die Auswahl der Parameter fußte auf den Ergebnissen bisheriger Studien (RAIZMAN et al., 2007a), Literaturangaben (FÜRLL et al., 2014; NEUMANN et al., 2014) und den Erfahrungen aus der Stoffwechsellagnostik in Thüringer Rinderbeständen (DONAT et al., 2016). Die Auswertung verfolgte zwei Ansätze: Zunächst wurden in einem linearen varianzanalytischen Modell

unter Berücksichtigung der Faktoren „Herde“, „MAP-Status“ und „Interaktion von Herde und MAP-Status“ als fixe Faktoren die quantitativen Messwerte betrachtet. Zusätzlich wurden die Merkmale „Ausscheidungsintensität“ (semiquantitative Beurteilung der Koloniezahl auf dem HEYM-Nährmedium), „Laktationsstand“ (klassifiziert in ≤ 100 , 101-200 bzw. > 200 Tage) als fixe Faktoren und „Milchmenge“ als Kovariate in das Modell eingeschlossen. Der zweite Ansatz beruht darauf, die Anzahl der Tiere mit Normwertabweichung der Anzahl derer gegenüberzustellen, bei denen der gemessene Wert innerhalb des Normbereichs (FÜRLL, 2014) war. Hierfür wurde der exakte Test nach Fisher verwendet.

Die MAP-positiven Kühe zeigten im Unterschied zu den MAP-negativen Stallgefährten niedrigere mittlere Serumkonzentrationen an Gesamteiweiß und signifikant häufiger Normwertunterschreitungen. In einer Studie in zwei amerikanischen Milchvieherden war Gesamteiweiß lediglich bei Starkausscheidern und klinisch kranken Kühen vermindert (RAIZMAN et al., 2007a). Studie 7 erbrachte damit den Nachweis, dass dies auch für mittlere und schwache Ausscheider gilt. Das bestätigt die Hypothese, dass die Serumkonzentration an Gesamteiweiß schon im subklinischen Stadium weit vor dem Auftreten klinisch sichtbarer Anzeichen vorhanden ist. Damit geht das Ergebnis konform mit dem einer ungarischen Studie bei Jungbullen (SZILÁGYI et al., 1989). Die Milchmenge und der Laktationsstand hatten darauf keinen Einfluss und können als Störfaktoren (Konfounder) ausgeschlossen werden.

Ein Einfluss der Ausscheidungsintensität deutete sich an, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. Für den Nachweis der quantitativen Abhängigkeit der Serumkonzentration von Protein von der Ausscheidungsintensität wäre eine weitere, breiter angelegte Studie erforderlich.

Für alle Parameter war der Effekt der Herde hochsignifikant. Damit wird offenkundig, dass Studien zum Zusammenhang metabolischer Parameter mit anderen Einflussgrößen ohne Berücksichtigung des Faktors „Herde“ nicht zielführend sind. Die Interaktion „MAP-Status * Herde“ war nur für Gesamteiweiß signifikant. In vier Herden konnte innerhalb des Bestandes ein signifikanter Unterschied für Gesamteiweiß ermittelt werden, in den anderen nicht. Gründe dafür sind einerseits die auf Bestandsebene zu geringen Stichprobengrößen, zum anderen unbekannte Faktoren, die im Fütterungs- und Herdenmanagement begründet liegen. Wahrscheinlich ist die reduzierte intestinale Aufnahme von Aminosäuren Ursache für die erniedrigte Serumkon-

zentration an Protein. Der damit schon in frühen Krankheitsstadien zu vermutende chronische Mangel an Aminosäuren für die Proteinsynthese würde auch erklären, warum bereits bei Tieren im subklinischen Stadium der Paratuberkulose der Abbau der Körpersubstanz beginnt und die Milchleistung sinkt. Ergänzend dazu wird vermutet, dass an der Pathogenese von Gewichtsverlust und Abmagerung auch eine verstärkte Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor α beteiligt sein könnte, die hier in ähnlicher Weise wie bei Krebserkrankungen den Abbau von Fettegebe und Skelettmuskelprotein beschleunigt (JUSTE et al., 1992).

Die GLDH-Aktivität wird häufig genutzt, um den Leberzell-Turnover bei laktierenden Kühen zu überwachen (STENGÄRDE et al., 2010). Ein Einfluss des Faktors „MAP-Status“ auf die GLDH-Serumaktivität wurde sowohl in der quantitativen Analyse als auch in der Häufigkeitsanalyse festgestellt. Studie 7 zeigt somit einen möglichen Zusammenhang zwischen der MAP-Infektion und einem erhöhten Leberzelluntergang. Diese erhöhte Leberbelastung könnte ihre Ursache auch im verstärkten Umbau der für die Proteinsynthese benötigten und intestinal nicht resorbierten Aminosäuren haben. Auch kanadische Autoren erkannten in ihrer Studie an MAP-infizierten Jungbullen Hinweise auf einen verstärkten Protein-Turnover (DE BUCK et al., 2014). Der in Studie 7 gemessene Unterschied bei GLDH war jedoch moderat und die MAP-Ausscheidungsintensität schien darauf keinerlei Effekt zu haben. Es sind also weitere Untersuchungen notwendig, um diesem Zusammenhang nachzugehen. Zudem war in Studie 7 die GLDH-Serumkonzentration auch von der Milchmenge als Konfunder beeinflusst. Daher muss der hier ermittelte geringe Unterschied bezüglich GLDH mit Vorsicht interpretiert werden, denn es kann nicht unterschieden werden, welcher Einfluss vom MAP-Status und welcher von der Milchmenge ausgeht.

Die ursprüngliche Hypothese, dass es bei den MAP-positiven Kühen als Folge verminderter Nährstoffaufnahme und resultierender negativer Energiebilanz zu verstärkter Fettmobilisation und subklinischer Ketose kommt, ließ sich in Studie 7 wie auch in anderen Untersuchungen (RAIZMAN et al., 2007a) nicht bestätigen. Die BHB-Serumkonzentration, spezifischer Indikator für eine subklinische Ketose, unterschied sich nicht bei MAP-positiven und MAP-negativen Tieren. Das trifft auch auf andere Indikatoren einer hohen metabolischen Belastung zu, wie die Serumkonzentrationen von Bilirubin oder Cholesterol. Es gibt also keine Hinweise auf eine verstärkte negative Energiebilanz bei MAP-positiven Tieren im Vergleich zu den MAP-negativen Stall-

gefährten. Daher wird vermutet, dass die Energiebereitstellung über kurzkettige Fettsäuren, die über die Pansenschleimhaut resorbiert werden, in ausreichender Weise die möglicherweise verminderte intestinale Glukoseresorption kompensieren kann. Im Gegensatz dazu fanden andere Autoren bei experimentell mit MAP infizierten Jungbulln Unterschiede in der Serumkonzentration von Isobutyrat, Glukose, Zitronensäure und Azeton und sahen darin Hinweise auf eine verminderte Energieaufnahme und einen erhöhten Fettstoffwechsel (DE BUCK et al., 2014).

In der Studie 7 konnten mit Hilfe eines epidemiologischen Ansatzes Hypothesen für pathogenetische Mechanismen generiert werden. Die Untersuchung von kausalen Zusammenhängen bleibt jedoch Folgestudien vorbehalten. Ein weiterer Aspekt wäre die Nutzung metabolischer Profile für die Erkennung, eventuell sogar die Frühdiagnostik infizierter Tiere. Aus den Ergebnissen der Studie 7 kann man ableiten, dass sich dafür die Gesamteiweißkonzentration im Serum eignen könnte (RAIZMAN et al., 2007a). Mit dem Refraktometer stünde ein praxistauglicher Schnelltest zur Verfügung. Dieser Ansatz sollte in künftigen Studien überprüft werden. Erfolgversprechender ist es möglicherweise, wenn man verschiedene Parameter kombiniert. Bei Jungbulln erwies sich eine Kombination aus 16 metabolischen Parametern als geeignet, um unabhängig von der Infektionsdosis und weitestgehend unabhängig vom Alter infizierte und nicht infizierte Jungbulln voneinander zu unterscheiden (DE BUCK et al., 2014). Parallel dazu wurden immunologische Biomarker untersucht, welche die Hemmung verschiedener Abwehrmechanismen in Makrophagen betreffen (DAVID et al., 2014). Zudem zeigten Untersuchungen in exhalierter Atemluft und im Luftraum von Kotproben Unterschiede im Spektrum volatiler Substanzen bei MAP-infizierten und nicht infizierten Tieren (PURKHART et al., 2011), die bei MAP 28 verschiedene Stoffe betreffen (BERGMANN et al., 2015); auch in vitro ändern sich Profile volatiler Substanzen in der Luft über MAP-Kulturen (KÜNTZEL et al., 2016). Diese innovativen diagnostischen Ansätze bedürfen zwar noch der Validierung im Feld, scheinen jedoch Potential für die künftige Nutzung zur frühzeitigen Erkennung MAP-infizierter Tiere zu haben.

Ziel der Studie 8 war es, anhand von Daten aus Thüringer Milchviehbetrieben, die am Paratuberkulose-Programm beteiligt waren, eine Analyse zum Unterschied in der Milchleistung zwischen kulturell MAP-positiven und MAP-negativen Tieren durchzuführen. Die im internationalen Schrifttum dazu vorliegenden Studienergebnisse sind

sehr heterogen. Abgesehen von zwei eigenen Pilotstudien in einem bzw. zwei Thüringer Milchviehbeständen (EBERT et al., 2007; STIER, 2008) ist keine deutsche Studie zu diesem Thema bekannt.

Die in der Milchleistungsprüfung festgestellte Tagesmilchmenge von 1382 kulturell MAP-positiven Kühen der Rasse Deutsch Holstein aus 26 Thüringer Milchvieherden wurde mit der ihrer Stallgefährten in einem gemischten varianzanalytischen Modell verglichen. In das Modell gingen nur die Stallgefährten ein, die in derselben Laktation den gleichen Laktationsstand erreicht hatten (± 10 Tage). Durch diese Paarauswahl wurde einerseits die Veränderung der Milchmenge im Laufe der Laktation und damit ein wichtiger Konfounder berücksichtigt. Zudem konnten damit auch Fütterungs- und Managementunterschiede innerhalb der Herde weitestgehend kontrolliert werden, da in großen Herden Tiere gleichen Laktationsstandes in derselben Gruppe gehalten und gefüttert werden. Die Kotproben wurden zwischen Januar 2008 und Juni 2011 entnommen und die Milchleistung derjenigen Milchleistungsprüfung berücksichtigt, die am nächsten am Probenahmetag lag. In das Modell waren als fixe Effekte der „kulturelle MAP-Status der Kuh“, die „Laktationszahl“ in drei Klassen (1, 2, > 2), der „Laktationsstand“ in acht Klassen und die „IHP“ in drei Klassen ($\leq 5\%$, 5 bis $\leq 10\%$, > 10 %) einbezogen. Im ersten Modell war die „Herde“ als Zufallsfaktor einbezogen. Um die Unterschiede auf Herdenebene darzustellen, war in einem zweiten Modell die „Herde“ ein fixer Faktor. Ausgewählt wurden dafür alle Bestände mit mehr als 50 Beobachtungen. In gleicher Weise wie für die Milchleistung wurden beide Modelle für die Analysen zu Fettgehalt und Eiweißgehalt der Milch sowie zur somatischen Zellzahl angewendet.

Im Ergebnis des ersten Modells zeigte sich eine signifikante Reduktion der Milchleistung bei kulturell MAP-positiven Tieren von 1,3 kg/Kuh und Tag. Dieser Effekt war in den Herden mit hoher IHP signifikant deutlicher ausgeprägt (1,9 kg/Kuh und Tag bzw. 7 %). Es war eine signifikante Interaktion von MAP-Status und Herde in der Beziehung zur Tagesmilchleistung festzustellen. Im zweiten Modell war in vier Herden der MAP-Status signifikant mit der Milchleistung assoziiert. In den anderen Herden war diese Beziehung auf Grund der kleineren Stichprobengröße auf Herdenebene oder wegen bisher unbekannter Fütterungs- und Managementfaktoren nicht signifikant.

Neuere Studien ermittelten einen Einfluss der Laktationszahl und des Laktationsstandes auf das in Studie 8 untersuchte Merkmal Milchleistung: Kühe, die zu einem späteren Zeitpunkt in der Laktation serologisch positiv werden, haben zunächst eine höhere Milchleistung als serologisch negativ getestete Tiere, fallen jedoch später – mit zunehmenden Fortschreiten der Krankheit – deutlich unter das Niveau der serologisch negativen Stallgefährten ab (SMITH et al., 2016). Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass die später milchserologisch positiven Kühe in ihrer ersten Laktation eine höhere Milchleistung haben als die zu diesem Zeitpunkt negativen Kühe. Ab der dritten Laktation wiesen die serologisch positiven Kühe eine signifikant geringere Tagesmilchleistung auf. Das zeigt eine klare Interaktion zwischen dem ELISA-Status der Kuh und der Laktationsnummer, die nicht parallel verläuft (MARTINS et al., 2016). Dem entsprechen auch eigene Ergebnisse aus einer Fall-Kontroll-Studie in Thüringer Milchviehbetrieben, die zeigte, dass erst ab der zweiten Laktation ein Milchleistungsunterschied statistisch nachweisbar war (KÜPPER et al., 2013). Interessanterweise gibt es auch eine Interaktion zwischen dem serologischen MAP-Herdenstatus und der Laktationsnummer, die darauf hindeutet, dass die Empfänglichkeit gegenüber MAP von Produktionseigenschaften abhängen könnte: Die im ELISA MAP-positiven Herden hatten eine höhere Milchleistung als die MAP-negativen. Welche Faktoren Einfluss nehmen, ist bisher noch nicht untersucht (KÜPPER et al., 2013). Dieses Ergebnis stützt jedoch die eigene Hypothese, dass im Herdenmanagement begründete Faktoren erheblich die infektionsbedingten Milchleistungsminderungen modifizieren. Hinzu kommt, dass auch die Infektionsprävalenz diesen Einfluss auf die Produktionsleistung beeinflusst, wie die Ergebnisse der Studie 8 zeigten. In Herden mit einer hohen Prävalenz an MAP-Ausscheidern ist die Milchleistungsminderung signifikant stärker ausgeprägt als in Herden mit niedrigerer Prävalenz. Studie 8 ist bisher die einzige, die diesen Effekt in einer Felduntersuchung zeigen konnte. Als Erklärung für diese Beobachtung kann die Tatsache dienen, dass die diagnostische Sensitivität der kulturellen und der serologischen Untersuchung mit fortschreitendem Krankheitsstadium ansteigt. Somit wäre in der Population der testpositiven Tiere in einer Herde mit hoher IHP ein höherer Anteil Tiere in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium vertreten als in Herden mit niedriger IHP.

Ein kürzlich publizierter systematischer Review analysierte 76 englischsprachige Studien, die Veränderungen der Milchproduktion bei MAP-positiven Kühen auf Tierenebene untersuchten (MCALOON et al., 2016). Nach Ausschluss einer Reihe von

Studien, welche die Daten nicht detailliert genug darstellten oder bestimmte Konfounder wie Herde, Laktationszahl oder Alter nicht berücksichtigten, werteten die Autoren 33 Studien detailliert aus. Davon zeigten 22 Studien einen negativen Effekt auf die Milchleistung bei testpositiven Tieren und sechs das Gegenteil. In die Metaanalyse zur Milchleistungsänderung fanden letztendlich 20 Studien Eingang. Diese ergab eine Milchleistungsänderung von -1,3 kg (95%iges Konfidenzintervall -1,72 bis - 0,89 kg) für testpositive Kühe. Dieses Ergebnis kam dem aus Studie 8 sehr nahe. Für Kühe mit positiven bakteriologischen Erregernachweis errechnete sich bei Berücksichtigung der Faktoren Laktationszahl und Herkunftsbestand eine mittlere Reduktion der Milchleistung um 1,87 kg bzw. 5,9 % gegenüber den kulturell negativen Stallgefährten. Damit bestätigt die Metaanalyse die Ergebnisse der Studie 8. Es ist zu berücksichtigen, dass Studie 8 unter den acht in die Metaanalyse eingegangenen Studien mit kulturellem Erregernachweis den höchsten Wichtungsfaktor hatte. Für die auf serologischen Untersuchungen beruhenden Studien ergab die Metaanalyse ebenfalls eine signifikante Reduktion der Milchleistung. Jedoch war die Heterogenität der Ergebnisse unter diesen Studien höher als unter den Studien mit kulturellem Erregernachweis. Es zeigte sich in der Metaanalyse kein signifikanter Einfluss auf die Milch Inhaltsstoffe Fett und Eiweiß (MCALOON et al., 2016). In Studie 8 war dagegen eine signifikante, wenn auch gering ausgeprägte Reduktion des Milchproteingehalts bei MAP-positiven Kühen (3,41 %) in Vergleich zu den MAP-negativen Stallgefährten (3,44 %) ermittelt worden. Das würde die These aus Studie 7 stützen, dass die auch im subklinischen Stadium vorhandene Hypoproteinämie dazu führt, dass Eiweißsyntheseprozesse im Organismus nicht mit gleicher Effizienz ablaufen wie bei nicht infizierten Tieren. Auch der Laktosegehalt war signifikant, wenn auch geringfügig vermindert. Ob dies als Hinweis auf eine schlechtere Verfügbarkeit von Glucose für die Synthese von Milchzucker gewertet werden kann, bedarf weiterer Untersuchungen. Andere Untersuchungen in Thüringer Milchviehherden zeigten, dass auch die Lebensereffektivität der MAP-positiven in Abhängigkeit von der Laktationszahl signifikant vermindert ist, und zwar bis 0,81 kg Milch je Lebenstag in den auf die dritte Laktation folgenden Laktationen (KÜPPER et al., 2013).

Studie 8 und die Metaanalyse zu diesem Thema haben damit den Nachweis dafür erbracht, dass durch Paratuberkulose tatsächlich die Milchleistung reduziert wird. Auch wenn offensichtlich bestimmte Managementmaßnahmen diesen Effekt herden-

spezifisch modulieren können, so ist er im Mittel der Herden vorhanden und in jedem Falle bei herdenübergreifenden bzw. volkswirtschaftlichen Betrachtungen zu berücksichtigen. Für den praktizierenden Tierarzt steht damit ein entscheidendes Argument zur Verfügung, um Landwirte davon zu überzeugen, die Paratuberkulose in ihrem Bestand zu bekämpfen. Dieses Argument wird umso stärker, wenn man das zweite wesentliche Ergebnis von Studie 8 berücksichtigt und kommuniziert, dass die Milchleistungsminderung von der IHP abhängt. Eine Senkung der IHP kann also wirtschaftliche Schäden im Bestand mindern. Dagegen nimmt mit steigender IHP diese Leistungseinbuße zu. In der Studie von EBERT et al. (2007) lag dieser Unterschied in einer Herde mit einer IHP von 33 % kulturell positiven Tieren bei 1030 kg Milch je Kuh in der 305-Tage-Leistung oder einer Minderung um 10 % gegenüber den Nichtausscheidern.

In der Diskussion über langfristige Investitionen in die Tiergesundheit – um eine solche handelt es sich bei der Bekämpfung der Paratuberkulose im Rinderbestand – wird der bestandsbetreuende Tierarzt häufig mit der Frage konfrontiert, ob die zu tätigen Aufwendungen in künftigen Jahren einen wirtschaftlichen Nutzen für den Betrieb mit sich bringen würden. Zur Beantwortung dieser Frage wurde auf Basis der Ergebnisse der Studie 8 für die im Jahr 2014 in Thüringen bestehenden Rahmenbedingungen (Durchschnittswerte für Milchleistung, Milchpreis, Schlachterlöse, Zwischenkalbezeiten und Prävalenzentwicklung) in einem deterministischen Modell eine dynamische Wirtschaftlichkeitsberechnung durchgeführt (Anhang, Tabelle 1). Zu diesem Zweck wurde der Deckungsbeitrag der Bekämpfungsmaßnahmen für eine Herde von 50 Milchkühen mit einem Rückgang der Prävalenz gemäß Studie 10 unter Berücksichtigung der prävalenzabhängigen Milchleistungsminderung nach Studie 8, der verlängerten Zwischenkalbezeit nach KÜPPER et al. (2013) und der Minderung der Schlachterlöse je kulturell MAP-positives Tier um 31 % (KJUDAHL & NIELSEN, 2009) berechnet und einem alternativen Szenario ohne Bekämpfung gegenübergestellt. Im Ausgangsjahr ergab sich ein krankheitsbedingter Minderertrag von insgesamt 2467 Euro (ca. 49 Euro je Kuh und Jahr) Euro, der sich nach sechs Jahren Bekämpfung auf 464 Euro reduzieren ließ (ca. 9 Euro je Kuh und Jahr). Damit ergibt sich ein zusätzlicher Deckungsbeitrag aus den Bekämpfungsmaßnahmen von 40 Euro je Kuh und Jahr. Dabei wurde der Unterschied gegenüber dem Ausgangsjahr als Mehrertrag und somit als Nutzen aus den Bekämpfungsmaßnahmen gewertet. Kostenseitig waren 20,00 Euro Diagnostikkosten je Kuh und Jahr in Ansatz gekom-

men, was den gegenwärtigen Kosten für eine kulturelle Untersuchung in Thüringen entspricht. Für 50 Kühe ergaben sich Diagnostikkosten in Höhe von 1000 Euro je Jahr. Kosten und Nutzen wurden auf das Ausgangsjahr abgezinst, wobei der für 2016 gültige kalkulatorische Zinssatz von 1,0 % Verwendung fand. Aufgrund der hohen Volatilität der Milchpreise im Beobachtungszeitraum und der Abhängigkeit des Ergebnisses hiervon, fand ein mittlerer Milchpreis von 0,30 Euro je kg Milch Eingang in die Kalkulation. Der verwendete Schlachtpreis ergab sich aus der Auswertung der Schlachterlöse von 633 Entschädigungsfällen in Thüringen vom 01.01.2016 bis 31.07.2016. Ergebnis dieser Berechnungen war, dass unter den angenommen wirtschaftlichen Bedingungen nach sechsjähriger Bekämpfung Kostendeckung erreicht würde, also der kumulierte und auf das Ausgangsjahr abgezinste Nutzen größer war als die kumulierten und auf das Ausgangsjahr abgezinste zusätzlichen direkten Kosten für die Paratuberkulose-Diagnostik. Ein Alternativszenario ohne Bekämpfung und mit Anstieg der IHP entsprechend der Modellierung von GROENENDAAL et al. (2002) führte nach sechs Jahren bei entsprechender Abzinsung zu einem Minderertrag gegenüber dem Ausgangsjahr von 4453 Euro. Zusammen mit dem bereits im Ausgangsjahr vorhandenen krankheitsbedingten Minderertrag von 2144 Euro würde sich in der Summe der sechs betrachteten Jahre ein Minderertrag von insgesamt 19.021 Euro ergeben. Diese Kalkulation zeigt die der Paratuberkulose direkt zurechenbaren wirtschaftlichen Schäden auf (Anhang, Tab. 2).

Mit dieser Berechnung konnte auf Basis der Daten aus Studie 8 ein realistisches ökonomisches Szenario dargestellt werden, was dem Tierarzt hilft, den Landwirt über die Kosten-Nutzen-Relation der Bekämpfungsmaßnahmen bezüglich Paratuberkulose aufzuklären. In einer anderen Studie wurden mit Hilfe von Simulationsmodellen zum ökonomischen Effekt verschiedener Bekämpfungsstrategien mit 40 - 100 US-Dollar je Kuh und Jahr höhere Deckungsbeiträge aus den Bekämpfungsmaßnahmen berechnet (KUDAHL et al., 2008). Die hier kalkulierten wirtschaftlichen Effekte von 40 Euro je Kuh und Jahr liegen an der Untergrenze dieser Spanne und sind somit realistisch.

Damit lässt sich die Frage, ob man durch Interventionsmaßnahmen die Zahl neuer Fälle in der Herde soweit senken kann, dass die wirtschaftlichen Verluste durch Paratuberkulose gemindert werden und der daraus entstehende wirtschaftliche Nutzen die Aufwendungen für die Bekämpfung als Investition in die künftige Wettbewerbsfähigkeit

higkeit der Rinderhaltung rechtfertigt, grundsätzlich bejahen. Wesentliche Determinanten für die Bekämpfungsdauer bis zum dem Zeitpunkt, an dem der aus der Investition resultierende Nutzen den Aufwand übersteigt, sind der Bekämpfungserfolg und die Stückpreise, also der Aufwand je Kuh und Jahr für die Diagnostik und der Ertrag je Liter Milch bzw. der Schlachtpreis für Kühe. Daher sind die hier vorgestellten Ergebnisse, die auf einem deterministischen Ansatz beruhen, nur für die jeweils angenommenen wirtschaftlichen Rahmenbedingungen gültig. Für allgemeingültigere Aussagen wären stochastische Modelle notwendig, die in künftigen Untersuchungen Verwendung finden sollten.

3.4 Einflüsse auf den Erfolg der Paratuberkulosebekämpfung

In der Beratung von Landwirten zur Paratuberkulosebekämpfung sind Kenntnisse über Einflussfaktoren auf den Bekämpfungserfolg von ausschlaggebender Bedeutung für die Spezifik der Beratungsempfehlungen für den jeweiligen Bestand. Das betrifft nicht nur die Kenntnis darüber, ob ein Faktor einen Einfluss hat oder nicht, sondern auch Informationen über die Einflussstärke des Faktors und die Validität der verfügbaren Daten.

Aufgrund der Spezifik dieser Infektionskrankheit und des sich daraus ergebenden langen Zeitraum, über den Tiere bzw. Bestände verfolgt werden müssten, sind Beobachtungsstudien in einem longitudinalen Ansatz (Kohortenstudien) zu dieser Fragestellung selten. Daher basiert ein hoher Anteil der Publikationen zu diesem Thema auf epidemiologischen Modellierungen (GROENENDAAL et al., 2002; DORSHORST et al., 2006; KUDAHL et al., 2008). Die Modelle zeigen, dass Bekämpfungsstrategien, die nur auf der Identifizierung und Merzung von MAP-Ausscheidern oder serologischen Reagenten beruhen, nicht (GROENENDAAL et al., 2002) oder nur in geringem Maße (KUDAHL et al., 2011) zur Senkung der Prävalenz führen. Vielmehr müssen Hygienemaßnahmen zur Unterbrechung der Erregerübertragung von den ausscheidenden auf die empfänglichen Tiere in der Herde implementiert werden. Die Frage nach den wirksamsten Hygienemaßnahmen ist daher von besonderer Bedeutung, auch weil diese für bestimmte Herden (DORSHORST et al., 2006) und unter bestimmten Bedingungen wie geringere Arbeitslöhne und schlechte Fruchtbarkeitsleistung (KUDAHL et al., 2011) als wirtschaftlichste Strategien beschrieben wurden. Insbesondere die Frage, ob sich unter den Hygienemaßnahmen solche identifizieren

lassen, die einen hohen Einfluss auf den Erfolg der Bekämpfung haben, ist für den bestandsbetreuenden Tierarzt von hohem Interesse.

In einem systematischen Review, der die von 1950 bis 2010 in englischer, französischer und spanischer Sprache publizierten Studien in Zeitschriften mit Gutachtersystem auswertete (DORÉ et al., 2012), gingen die Autoren der Frage nach, welche Beziehungen es zwischen den Umweltbedingungen für das neugeborene Kalb, der Kolostrum- oder Milchaufnahme, der Gruppenhaltung von Kälbern oder den Kontakt zu anderen Kühen und der Erregerübertragung gibt. Unter den 23 letztendlich berücksichtigten Veröffentlichungen zu diesem Themenkreis fanden sich nur zwei longitudinale Studien, von denen eine die Tiere einer Herde beobachtete (BENEDICTUS et al., 2008) und die andere auf ELISA-Testergebnissen basierte (RIDGE et al., 2010).

Studie 9 hat somit sowohl bezüglich des Studiendesign als auch der verwendeten kulturellen Untersuchungsmethode zwei Alleinstellungsmerkmale. Das Studiendesign beruhte auf einer retrospektiven Auswertung der Veränderung des Anteils neu identifizierter MAP-Ausscheider (kumulative Inzidenz, CumInz) je Jahr in 28 Milchviehherden aus Sachsen (5) und Thüringen (23). Die Veränderung dieser Zahl neuer Fälle von 2008 bis 2012 ging als abhängige Variable in die Studie ein. Da somit der real beobachtete Bekämpfungserfolg erfasst wurde und zudem die Untersuchungsmethode Verwendung fand, die zum Studienzeitpunkt bei der Untersuchung lebender Tiere auf Paratuberkulose die beste Sensitivität und Spezifität aufwies, hat die Studie 9 eine vergleichsweise hohe interne Validität. Durch die verwendete Untersuchungsmethode ist die durch Fehlklassifizierung entstehende Verzerrung geringer als beim Einsatz serologischer Verfahren oder bei Verwendung gepoolter Proben. Die Inzidenzentwicklung ist nicht modelliert oder angenommen, sondern beobachtet. Die Erfassung von insgesamt 32 Hygienefaktoren erfolgte durch erfahrene Tierärzte des Rindergesundheitsdienstes vor Ort nach eingehender Schulung zur Bewertung. Damit war auch auf der Seite der unabhängigen Merkmale die Fehlklassifizierung weitestgehend kontrolliert. Zur statistischen Auswertung fanden multivariable Regressionsmodelle Verwendung, in die nur solche Variablen einfließen, die in der univariablen Statistik einen P-Wert 0,1 unterschritten.

In Ergebnis zeigte Studie 9 klar, dass das Management der Kalbebucht für den Erfolg der Paratuberkulosebekämpfung in große Milchviehherden ein kritischer Faktor ist. Die Kalbung der MAP-Ausscheider in einer separaten Kalbebucht kann somit als

Schlüsselfaktor für den Erfolg der Bekämpfungsmaßnahmen bezeichnet werden. Gleiches gilt für die Reinigung und Desinfektion der Kalbebucht nach der Kalbung eines bekannten MAP-Ausscheiders. Das mit 16 % vergleichsweise kleine Bestimmtheitsmaß im linearen Modell und das Pseudo-R² nach Nagelkerke von 20 % im logistischen Modell zeigten, dass ein großer Teil der Variabilität im Bekämpfungserfolg nicht durch diese Merkmale erklärt wurde, also durch andere Faktoren bedingt war. Das war bei einer durch viele Faktoren modulierten Krankheit mit einer Reihe von Übertragungsmöglichkeiten des Erregers nicht anders zu erwarten. Die Bedeutung der durch andere Studien identifizierten und in Kapitel 1.4 aufgeführten Risikofaktoren für die Übertragung von MAP auf empfängliche Tiere ist damit keineswegs in Frage gestellt. Zumindest dann, wenn Studienergebnisse Evidenz für die Relevanz der Faktoren in Bezug auf die Übertragung von MAP ergeben, sollten diese weiterhin Bestandteil der Empfehlungen an die Landwirte bleiben. Das Ergebnis der Studie 9 untermauert vielmehr die Bedeutung der Hygiene um die Geburt für das Management einer MAP-positiven Herde. Es ist folglich wichtig, dass zum Zeitpunkt der Geburt bekannt ist, ob es sich um einen MAP-Ausscheider oder zumindest ein Hochrisikotier handelt, um hier risikobasiert Maßnahmen zu ergreifen. Die hohe Wirksamkeit und Effizienz dieser risikobasierten Vorgehensweise belegen auch die Ergebnisse von Simulationsmodellen (KUDAHL et al., 2008). Ein weiterer Aspekt ist, dass sich für fest etablierte Maßnahmen, wie es die Schaffung einer separaten Kalbebucht darstellte, in großen Herden ein signifikanter Effekt demonstrieren ließ, für solche, die durch gute Arbeit in der Tagesroutine umgesetzt werden müssen (z. B. Kolostrumgabe) jedoch nicht. Auch sind bestimmte Managementmaßnahmen in großen Herden in stärkerem Maße verbreitet als in kleineren, so das Anlegen einer tiefgefrorenen Reserve an Kolostralmilch (KLEIN-JÖBSTL et al., 2015).

Bezüglich der externen Validität der Studienergebnisse ist anzumerken, dass diese zumindest für große Milchviehherden und unter europäischen Hygienestandards Gültigkeit haben sollten. Schlüsselement ist die Vermeidung von Kontakt zum Kot von MAP-Ausscheidern, was auch durch eine Vielzahl anderer Studien als Hauptrisikofaktor identifiziert wurde (DORÉ et al., 2012). Auch spätere Studien belegen die Bedeutung des Kalbebereichs, wobei insbesondere die Einzelabkalbung als Schutzfaktor erkannt wurde (PITHUA et al., 2013; KÜNZLER et al., 2014). Dagegen hatte im Ergebnis einer holländischen Studie der Infektionsstatus des Muttertiers keinen Effekt auf den späteren MAP-Infektionsstatus des Jungrindes im Alter von zwei

Jahren (EISENBERG et al., 2015b). Aus der Tatsache, dass bei Betrachtung von 117 Studientieren aus acht Herden mit hohem Infektionsdruck (ca. 30 % MAP-Ausscheider unter den zwei Jahre alten Färsen) ein Einfluss nicht gefunden wurde, sollte nicht verallgemeinert werden, dass der MAP-Status der Mutter generell ohne Einfluss sei. Die Ergebnisse der Studie 9, die in 32 Herden mit moderatem bis geringem Infektionsdruck durchgeführt wurde, weisen in eine andere Richtung.

Zumindest in der univariablen Analyse von Studie 9 zeigte sich, dass der allgemeinen Hygiene im Bestand ebenso eine Bedeutung zukommt. Die bei Einzelbetrachtung signifikanten Merkmale "getrenntes Personal im Kälber- und Jungrinderbereich" und „getrennte Arbeitsgeräte für Kälberbereich“ waren im multivariablen Modell nicht signifikant oder konnten wegen zu geringer Klassenbesetzung nicht einbezogen werden. Dennoch scheinen diese Faktoren in Großbeständen wichtig zu sein. Auch andere Studien belegen die Bedeutung der allgemeinen Hygiene im Kälberbereich, der Hygiene bei der Fütterung und in Tränkeeinrichtungen sowie der Sauberkeit von Geräten und Maschinen zur Entmistung (WOLF et al., 2016c).

Bezüglich des Merzungsverhaltens (mittlere Standzeit der Ausscheider von weniger als 260 Tagen oder mehr) ergab sich in Studie 9 nur in der univariablen Analyse ein Einfluss. In einer Pilotstudie in Thüringer Milchviehherden zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen Herden mit kurzer und langer Standzeit der Ausscheider (DONAT et al., 2014). Es kann der kleinen Stichprobe geschuldet sein, dass sich in Studie 9 im multivariablen Regressionsmodellen kein signifikanter Einfluss auf den Bekämpfungserfolg nachweisen ließ. Epidemiologische Simulationsmodelle konnten zeigen, dass bei einer Merzung der serologischen Reagenten sofort nach dem wiederholten positiven Untersuchungsbefund eine wirksamere Prävalenzsenkung erreicht wird als beim Warten auf weitere Gründe für Merzungen. Auch andere Strategien, wie Merzung beim Nachlassen der Milchleistung auf 85 % des Erwartungswertes oder drei, sechs bzw. 12 Monate nach dem ersten positiven Testergebnis ergaben keine oder wesentlich schlechtere Prävalenzsenkungen (KUDAHL et al., 2011). Es gibt somit Evidenz dafür, dass eine zügige Merzung der MAP-Ausscheider von Belang für den Bekämpfungserfolg ist. Zudem ist ein Ersatz eines MAP-Ausscheiders umso mehr geboten, je höher die nachhaltige Leistungseinbuße durch die Infektion ist und je geringer der Zuchtwert ist. Dagegen bleibt ein Spitzentier, auch wenn es als

MAP-Ausscheider erkannt ist, häufig länger im Bestand, weil es wirtschaftlicher ist (DE KRUIFF et al., 2007) oder zu sein scheint.

Studie 10 verfolgte in erster Linie das Ziel, den erreichten Bekämpfungserfolg in Thüringen in den Jahren 2008 bis 2014 zu untersuchen und zu dokumentieren. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob der Erreger der Paratuberkulose in einer Herde soweit zurückgedrängt werden kann, dass auch initial MAP-positive Herden den Status Paratuberkulose-unverdächtig erwerben können.

In Studie 10 waren 76 Milchviehherden und 29 Mutterkuhherden einbezogen. Damit umfasste die Auswertung diejenigen Herden, die am 31. Dezember 2014 als Teilnehmer am Thüringer Bekämpfungsprogramm schriftlich registriert waren, mit Ausnahme der 14 Herden, die erst im Verlauf des Jahres 2014 dem Programm beitraten. Weil Kälber und Jungrinder nicht in die Untersuchungen einbezogen wurden, bildeten die Rinder im Alter über 24 Monate für das Programm die wichtigste Teilpopulation. In den in die Auswertung einbezogenen Herden wurden am 3. Januar 2014 (Stichtagsmeldung an die Thüringer Tierseuchenkasse) 33.614 Rinder im Alter über 24 Monate gehalten, davon etwa 31.000 Milchkühe und 2.500 Mutterkühe. Bezogen auf die Zahl der in Thüringen gehaltenen Milchkühe und Mutterkühe (Tab. 2) waren Ende des Jahres 2014 somit ca. 27 % der Milchkühe und ca. 7 % der Mutterkühe in das Programm inkludiert. Der Anteil der Milchkühe war deshalb so hoch, weil sich unter den Programmteilnehmern überwiegend große Milchviehherden befanden. Die mittlere Herdengröße (\pm SD) der betrachteten Herden betrug 467 ± 336 Kühe.

Tab. 2: Rinderbestände in Thüringen am 3. November 2014 (TLL 2015, modifiziert)

Kategorie		Anzahl
Kälber	weniger als 6 Monate alt oder mit Lebendgewicht < 220 kg	74.382
Jungrinder	männlich	8.298
	weiblich	20.067
	Färsen (Zucht und Mast)	72.965
Adulte Rinder	Bullen und Ochsen	2.881
	Milchkühe	113.040
	Mutterkühe	36.226

Die Beteiligung an gut gemanagten freiwilligen Paratuberkulosebekämpfungsprogrammen wird weltweit auf 35 % der Milchviehherden geschätzt (ORPIN & SIBLEY, 2016). Thüringen ist auf dem Weg, diese Beteiligungsquote zu erreichen. In der Lombardei, der rinderreichsten Region Italiens, waren Ende 2015 mehr als 60 % der Milchviehherden in das freiwillige Bekämpfungsprogramm aufgenommen (ARRIGONI et al., 2016). In den Niederlanden nehmen gegenwärtig 99 % der Milcherzeuger entweder am „Programm zur Verbesserung der Milchqualität“ oder am „Intensiven Paratuberkulose-Programm“ teil, was zweifellos damit erreicht wird, dass holländische Molkereien alle nicht beteiligten Milcherzeuger sowie diejenigen in Status C (keine Merzung erkannter MAP-Ausscheider) von der Milchlieferung ausschließen (WEBER et al., 2016). In Frankreich stagniert die Beteiligung auf niedrigem Niveau (BLANQUEFORT, 2016), in Kanada und Australien ist die Beteiligung eher abnehmend (KELTON et al., 2016; BARWELL, 2016). Auch in Dänemark konnte trotz einer intensiven nationalen Initiative seit 2006 eine Beteiligung über 30 % der Milchviehherden nicht erreicht werden; und diese sank bis 2014 auf ca. 27 % (NIELSEN und KROGH, 2014). Im Vergleich dazu ist die stetig zunehmende Beteiligung in Thüringen zufriedenstellend.

In gleicher Weise wie in Studie 9 wurde in Studie 10 der Sanierungsfortschritt an Hand der im jeweiligen Jahr neu identifizierten MAP-Ausscheider (CumInz) beurteilt, die im Rahmen der jährlichen individuellen Kotuntersuchungen festzustellen waren. Herden mit Nachweis von MAP in der Probe eines Tieres galten als MAP-positiv. Entsprechend den Festlegungen des Thüringer Landesprogrammes von 2008 (TMSFG, 2008) erhielten die Herden, in denen drei Jahre in Folge (Anerkennungsphase) keine neuen Fälle festgestellt wurden, den Status „Paratuberkulose-unverdächtiger Rinderbestand“. Sofern bei den im zweijährigen Abstand durchgeführten Kontrolluntersuchungen erneut MAP-Ausscheider gefunden wurden, fielen die Bestände zurück in die Kontrollphase.

Von den 67 MAP-positiven Beständen (19,4 %) wurden 13 entsprechend des Kontrollprogramms als Paratuberkulose-unverdächtig anerkannt. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass eine Tilgung der Paratuberkulose auf Bestandesebene möglich ist (COLLINS, 2016; Dr. HERMAN BARKEMA, persönliche Mitteilung, 24. Juni 2014). Die Herdenuntersuchung mittels Kotkultur und die dreijährige Anerkennungsperiode scheinen für die Anerkennung eines Bestandes als Paratuberkulose-

unverdächtig angemessen und ausreichend zu sein; diese Form des Anerkennungsverfahrens hat Eingang in die Empfehlungen des BMEL zur Bekämpfung der Paratuberkulose gefunden (BMEL, 2014).

In einer Untergruppe von 25 MAP-positiven und seit 2008 teilnehmenden Milchviehherden wurde ein signifikanter Rückgang der CumInz von 2008 (14,5 %) bis 2014 (5,6 %) nachgewiesen. Dieser Rückgang entspricht dem Bekämpfungserfolg, der auch in zwei amerikanischen Studien in vergleichbaren Zeiträumen erreicht wurde. In sieben Milchviehherden in Minnesota war ein Rückgang des Anteils kulturell MAP-positiver Tiere von 10,5 % auf 5,6 % und in neun Herden in Wisconsin von 17,0 % auf 9,5 % zu verzeichnen (FERROUILLET et al., 2009; COLLINS et al., 2010). Es gibt folglich Evidenz dafür, dass es gelingt, bereits in überschaubaren Zeiträumen von 5 - 7 Jahren den Anteil infizierter Tiere in Milchviehherden signifikant und spürbar zu vermindern.

In Studie 10 war in Bezug auf die Ausgangssituation der Bekämpfungsfortschritt in Herden mit CumInz > 5 % größer als in Herden mit CumInz < 5 %. In Herden mit einem geringeren Anteil MAP-Ausscheidern war es schwieriger, diese weiter zu senken. Dieses Phänomen ist nicht spezifisch für Paratuberkulose, sondern war auch in der Endphase der BoHV1-Bekämpfung in Deutschland auf Herdenebene zu beobachten. Auch in der verpflichtenden BVDV-Bekämpfung ist nach dem deutlichen Prävalenzrückgang in den Anfangsjahren 2011 - 2013 (SCHIRRMEIER, 2014) in den Folgejahren eine langsamere Prävalenzsenkung zu verzeichnen (WERNICKE, 2016). Obwohl bei Betrachtung des Mittelwertes der Prävalenz in den zehn Herden mit einer CumInz < 5 % ein sinkender Trend erkennen lässt, war dieser in Studie 10 nicht signifikant. Das war durch die hohen Unterschiede von Herde zu Herde und den sich so ergebenden hohen Standardfehlern zu erklären. Es ist zu vermuten, dass diese Unterschiede auf eine unterschiedliche Motivation der Landwirte, die Bekämpfungsmaßnahmen konsequent und dauerhaft umzusetzen, zurückzuführen waren. Es ist eine allgemeingültige Beobachtung, dass sich Betriebsleiter in ihren Priorisierungen und Motivationen unterscheiden. Daher wird auch die Wahrscheinlichkeit dafür, dass Empfehlungen zur Veränderung des Herdenmanagements umgesetzt werden, zwischen den Betrieben variieren (BARKEMA et al., 2014). Es ist denkbar, dass durch eine auf ein Niveau unter 5 % gesenkte IHP in den Herden kaum noch wirtschaftliche Schäden in Bezug auf Verringerung der Milchleistung fest-

stellbar waren (Studie 7) und somit eine wesentliche Motivation, die Paratuberkulose weiter zu bekämpfen, geringer war als zuvor. Zudem sinkt die Wahrscheinlichkeit, Ausscheider zu finden, weil diese in Herden mit niedriger IHP vorwiegend schwache Ausscheider sind und bei diesen Tieren die Sensitivität von Kotkultur bzw. PCR an ihre Grenzen kommt. Eine Vielzahl von weiteren Gründen ist denkbar. Geplante Herdenvergrößerungen oder höhere Abgänge wegen anderer Krankheiten oder Sanierungsprogramme können das Potential für Merzungen wegen Paratuberkulose reduzieren. Personelle Wechsel im Herdenmanagement können ebenso zu veränderten Strategien führen wie veränderte wirtschaftliche Rahmenbedingungen, z. B. fallende oder steigende Milchpreise. Unabhängig davon deuten die Ergebnisse der Studie 10 darauf hin, dass die Intensität der Bekämpfungsmaßnahmen erhöht werden sollte, sobald eine niedrige CumInz erreicht ist. Dieser Schlussfolgerung wurde in Thüringen Rechnung getragen, indem für die Herden am Ende der Kontrollphase ein zusätzlicher finanzieller Anreiz in Form einer Merzungsbeihilfe von 200 Euro je gemerzter Kuh gewährt wird. Dazu wurde in der Novelle des Bekämpfungsprogramms im Jahr 2015 (TMASGFF, 2015) diese Endphase als Stufe 4 der Kontrollphase definiert. Diese ist offen für alle Bestände, die im Vorjahr eine IHP < 3 % nachweisen konnten und sich schriftlich verpflichten, die neu erkannten MAP-Ausscheider innerhalb eines Monats nach Befundzugang (tragende Tiere: innerhalb eines Monats nach der Kalbung) aus dem Bestand zu entfernen. Der Erfolg dieser Maßnahme wird im Rahmen der nächsten Programmevaluierung analysiert werden. Die Frage, was Rinderhalter motiviert, sich an Programmen zu beteiligen bzw. die empfohlenen Maßnahmen umzusetzen, untersuchte eine kanadische Studie. Landwirte, die von der Bedeutung der Paratuberkulose und der Richtigkeit der empfohlenen Vorbeuge- und Bekämpfungsstrategien überzeugt waren, nahmen häufiger am Programm teil (RITTER et al., 2016). Diese Teilnehmer unterschieden sich dabei von Nichtteilnehmern durch höheres selbst erworbenes Wissen über Paratuberkulose, besseres Verständnis für das Programm bereits vor der Teilnahmeerklärung, größere Herden und die Tatsache, dass sie von ihrem Tierarzt häufiger Informationen über neue Managementpraktiken und Technologien erhielten (RITTER et al., 2015). Das unterstreicht klar die Rolle des bestandsbetreuenden Tierarztes in der Umsetzung von Programmen zur Bekämpfung der Paratuberkulose.

Die Implementierung eines verbesserten Hygienemanagements hängt von der Kenntnis über den Herdenstatus bezüglich der Paratuberkulose, von den jeweiligen

Veränderungsvorschlägen sowie der Dauer der Programmbeteiligung ab (WOLF et al., 2015c). Untersuchungen zu den Hemmnissen bei der Umsetzung von Maßnahmen in Kanada zeigten, dass sowohl physische (z. B. Zeit, Geld, Infrastruktur) als auch intrinsische (z. B. Priorisierung, Verhalten, Motivation) Barrieren bestehen, um solche Veränderungen vorzunehmen. Dabei stellten die Milcherzeuger auch fest, dass einige der empfohlenen Maßnahmen schwierig umzusetzen oder uneffektiv waren. Vorgeschlagen wurde, sowohl äußere (z. B. finanzielle Anreize oder Strafen) als auch innere (z. B. Verantwortlichkeit, Stolz) Formen der Motivation zu nutzen (ROCHE et al., 2016). Die in Thüringen eingeführte Merzungsbeihilfe ist ein solcher finanzieller Anreiz. Gleichzeitig wurden die Teilnehmer informiert, dass künftig der mit der Umsetzung des Programms beauftragte Tiergesundheitsdienst der Tierseuchenkasse verstärkte Kontrollen durchführen wird und bei Nichteinhaltung der vereinbarten Maßnahmen Beihilfekürzungen veranlassen kann („Strafe“). Durch regelmäßige Informationsveranstaltungen soll künftig über den Fortschritt in der Bekämpfung informiert werden („Stolz“). Mit zunehmender Anerkennung Paratuberkulose-unverdächtiger Rinderbestände können immer mehr Tierhalter ihrer Verantwortung im Tierhandel nachkommen und die Paratuberkulose hier nicht weiterverbreiten. Mit der Teilnahme an der Bekämpfung der Paratuberkulose sollte für den Landwirt das Gefühl verbunden sein, das Richtige zu tun und ein gutes Produkt zu liefern: „Nachhaltig produzierte gesunde Milch vom Gras bis zum Glas“ (ROCHE et al., 2016).

Studie 10 konnte zeigen, dass eine erfolgreiche Bekämpfung der Paratuberkulose im Rinderbestand möglich ist. Dies ist eine Schlüsselinformation für den bestandsbetreuenden Tierarzt in der Beratung von Rinderhaltern zur Bekämpfung dieser Infektionskrankheit.

3.5 Ausblick

Die Bekämpfung der Paratuberkulose ist nach wie vor eine der großen Herausforderungen der Wiederkäuermedizin. Auch wenn sie gegenwärtig in Europa die größte Beachtung bei der Tierart Rind und hier beim Milchvieh findet, so zeigen die Bekämpfungsinitiativen gegen Paratuberkulose beim Fleischrind (GAVEY, 2016), bei Schafen (EPPELSTON et al., 2016), bei Ziegen (LINDHEIM et al., 2016) und beim Rotwild (GRIFFIN et al., 2016), dass Bekämpfungsstrategien weltweit auch bei ande-

ren Tierarten erprobt werden und erfolgreich sind. Nachdem in Studie 10 gezeigt werden konnte, dass die Bekämpfung auf Herdenebene soweit erfolgreich sein kann, dass der Erreger aus Kotproben von Tieren nicht mehr nachweisbar ist, bleibt als Aufgabe für die Zukunft, eine Bekämpfungsstrategie gegen Paratuberkulose in den deutschen rinderhaltenden Landwirtschaftsbetrieben zum Allgemeingut zu machen. Die Notwendigkeit dafür resultiert sowohl aus der möglichen zoonotischen Relevanz (WADDELL et al., 2015a) als auch aus der Bedeutung für die Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Tiere (Studien 7 und 8). Trotz der anhaltenden Schwierigkeiten in der Identifizierung subklinischer Infektionen besteht die übereinstimmende Auffassung, dass die Weiterentwicklung der betrieblichen Bekämpfungsprogramme in der Landwirtschaft und in der Verarbeitungswirtschaft bezüglich der betroffenen Produkte Milch und Fleisch einerseits sowie die Bereitstellung öffentlicher Mittel für die Überwachung dieser Krankheit andererseits die beim gegenwärtigen Erkenntnisstand angemessensten und zielführendsten Maßnahmen sind (WADDELL et al., 2015b).

Ansätze für eine Intensivierung der Paratuberkulosebekämpfung in Deutschland können sein:

- Forcierung der bestehenden freiwilligen Bekämpfungsprogramme und Erhöhung der Beteiligung durch Motivation der Landwirte in Verbindung mit der Initiierung dieser Programme in den Bundesländern, die solche bisher nicht aufgelegt haben oder
- die Etablierung marktbasierter Programme und Initiativen der milch- und fleischverarbeitenden Industrie, die über ein Bonus-Malus-System (höhere Preise für Primärerzeugnisse aus beteiligten Betrieben, Liefersanktionen für nicht beteiligte Landwirte) sowohl die Einführung als auch die Umsetzung der Bekämpfungsmaßnahmen motivieren oder
- ein staatliches Überwachungsprogramm im Sinne eines aus öffentlichen Mitteln betriebenen Überwachungsprogramms auf Herdenebene in Verbindung mit der Verpflichtung oder Motivation zur Einführung betrieblicher Bekämpfungsmaßnahmen, sofern die Überwachungsuntersuchung zu einem positiven Ergebnis führt.

Eine amtliche Überwachung der Paratuberkulose unter Verwendung öffentlicher Mittel im Sinne einer aktiven Surveillance, so wie sie von WADDELL et al. (2015b) als

zielführende Maßnahme herausgearbeitet wurde, ist gegenwärtig in Deutschland auf nationaler Ebene nicht geplant; die aktuell vom BMEL empfohlenen Maßnahmen favorisieren den Weg der freiwilligen Aktivitäten auf Herdenebene. Freiwillige Bekämpfungsprogramme, in denen lediglich die Überzeugung des Landwirts, das Richtige zu tun, angesprochen wird, erreichen keine hohe Beteiligung. Zudem hat die freiwillige Phase der BVDV-Bekämpfung in Deutschland gezeigt, dass freiwillige Programme zwar auf Herdenebene effektiv sein können, aber nur in wenigen Bundesländern zu einer Reduktion der Prävalenz im Territorium führten, wie dies z. B. in Sachsen gelang. Die Sicherheit im Tierhandel ist damit nur punktuell erhöht. Dadurch besteht weiterhin ein hohes Reinfektionsrisiko für die MAP-negativen Herden. Der Eintrag in die Lebensmittelkette kann nur partiell beeinflusst werden. Die Motivation über die Argumente „verbesserte Tiergesundheit“ (Studie 6) und „höhere Wirtschaftlichkeit der Milchproduktion“ (Studie 7) greifen, wie Erfahrungen aus Thüringen zeigen (Studie 10), nur bei einem Teil der Landwirte. In dieser Situation ist die Ungleichbehandlung von am Programm beteiligten und nicht beteiligten Rinderhaltern bei der Beschickung von Ausstellungen und Auktionen sowie im Zuchtviehexport ein wesentliches Hemmnis. Es bedarf der Mitwirkung der verarbeitenden Industrie, um eine höhere Beteiligung zu erzielen.

Das Beispiel eines marktbasierten Programms in den Niederlanden belegt, dass eine hohe Beteiligung von ca. 99 % der Milchviehhalter erreichbar ist, wenn die verarbeitende Industrie in Form eines Bonus oder Malus diese motiviert (WEBER et al., 2016). In Deutschland ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein Engagement der milch- oder fleischverarbeitenden Industrie nicht erkennbar. Gleichwohl ist sind sich vor allem die exportorientierten Molkereien der Problematik bewusst (Dr. REINHARD VOGEL-LACKENBERG, persönliche Mitteilung, 16. Oktober 2015, Jena). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist offen, ob ein wesentlich über die Vermarktung von Rohmilch gesteuertes Programm in Deutschland umsetzbar ist.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich angesichts der aktuellen Situation folgende Vorschläge für eine künftige Vorgehensweise in Deutschland:

1. Es sollte ein aktives, teilweise oder vollständig aus öffentlichen Mitteln finanziertes Surveillance-Programm unter Nutzung von Umgebungskotproben (alternativ: Sockentupfer und Gülleprobe) eingeführt werden, in dem jeder Rinderhalter zur Beprobung verpflichtet ist. In Anlehnung an die Salmonellenüberwachung bei Lege-

hennen könnten amtliche Kontrolle und Eigenkontrollen im Wechsel erfolgen. Deren Ergebnisse sollten in der Datenbank HI-Tier zumindest für Behörden einsehbar sein. Das hätte folgende Vorteile:

- Es entstünde keine Ungleichbehandlung von am Programm beteiligten und nicht beteiligten Rinderhaltern im Tierhandel. Im Zuchtviehexport wären diejenigen Tierhalter bevorteilt, deren Bestand nicht von Paratuberkulose betroffen (kein Risiko der Krankheitsverbreitung) oder die die Ausscheiderprävalenz im Bestand soweit gesenkt haben, dass der Erreger mit Umgebungskotproben nicht mehr nachweisbar ist (geringes Risiko).
- Die Meldepflicht der Paratuberkulose würde ihren ursprünglichen Zweck erfüllen und ein valides Bild über die Verbreitung der Krankheit in Deutschland vermitteln.
- Die Befundverwaltung sollte konsequent in der Datenbank HI-Tier erfolgen. Diese Vorgehensweise hat sich in der Bekämpfung der BoHV1- und BVDV-Infektion in Deutschland bewährt und erlaubt die Verfolgung von Rindern im Handel. Zudem wären Basisinformationen über die Paratuberkulose-Situation im Bestand verfügbar. Diese könnten im Tierhandel genutzt werden, sodass einer Weiterverbreitung des Erregers zwischen den Beständen besser vorgebeugt werden könnte als durch bloße Untersuchung der zu verbringenden Tiere.
- Die Kosten für die öffentliche Hand würden überschaubar bleiben (wenige Proben je Bestand und Untersuchungsintervall).
- Risikobasiert könnten Erleichterungen für Klein- oder Kleinstbestände bzw. reine Mastbestände geschaffen werden.
- Die amtliche Probenahme könnte entweder von amtlichen Tierärzten in Verbindung der üblichen Kontrolltätigkeit in den Beständen erfolgen oder, so wie bei anderen tierseuchenrechtlichen Untersuchungen üblich, an die bestandsbetreuenden Tierärzte übertragen werden.

2. Bekämpfungsmaßnahmen im Bestand selbst sollten in Verantwortung des Tierhalters liegen, von dem auch die Kosten der ergriffenen Maßnahmen zu tragen wären. Das würde folgende Vorteile mit sich bringen:

- Es bliebe die Entscheidung des Tierhalters selbst, mit welcher Intensität er das Problem bearbeiten und wie schnell er den in der Datenbank hinterlegten Paratuberkulosestatus verbessern könnte (z. B. kostengünstige Diagnoseverfahren mit geringerer Sensitivität versus aufwändigere Diagnostik bei besserer Sensitivität). Er könnte sich dabei von seinem betreuenden Tierarzt beraten lassen. In die Erarbeitung, Kontrolle und Überwachung der Management- und Hygienemaßnahmen sollten erfahrene Fachtierärzte des Tiergesundheitsdienstes oder eingehend geschulte Tierärzte einbezogen werden, die den jeweils bestandsbetreuenden Tierärzten beratend zur Seite stehen. Das begründet sich damit, dass insbesondere dieser Bereich detaillierte Kenntnisse zum Herdenmanagement und zur Wirksamkeit einzelner Maßnahmen erfordert (Studie 9), die gegenwärtig und wahrscheinlich auch künftig nicht von allen in der Betreuung von Rinderbeständen arbeitenden Tierärzten erwartet werden können. Die vorgeschlagenen Veränderungen des Managements sollten auf die zuvor identifizierten Schwächen im betrieblichen Management orientiert sein. Dazu müsste zunächst die korrekte Bewertung der Risiken im Betrieb erfolgen, um darauf aufbauend zielgerichtete Veränderungen vorschlagen zu können.
- Indem die bestandsbetreuenden Tierärzte mit der Beratung zur Verbesserung des Managements und der Hygiene sowie der Erarbeitung des betriebsspezifischen MAP-Vermindeungsplans betraut würden, können sich die amtlichen Tierärzte auf die Überwachung konzentrieren. Damit würde die Rolle des Betreuungstierarztes gestärkt.
- Die Tierseuchenkassen der Länder können über Beihilfen, z. B. für Diagnostik, Beratung oder Merzung der Ausscheider, die Bekämpfungsmaßnahmen im Bestand unterstützen und über die Gewährung dieser Beihilfe selbst entscheiden. Damit könnte den unterschiedlichen Strukturen der Rinderhaltung in den verschiedenen Bundesländern Rechnung getragen werden. Eine Beihilfegewährung für Paratuberkulose ist im europarechtlichen Sinne wettbewerbskonform und entsprechend den Regelungen der Verordnung (EU) Nr. 702/2014 der Kommission vom 25. Juni 2014 zur Feststellung der Vereinbarkeit bestimmter Arten von Beihilfen im Agrar- und Forstsektor und in ländlichen Gebieten mit dem Binnenmarkt in Anwendung der Artikel 107 und 108 des Ver-

trags über die Arbeitsweise der Europäischen Union (ABl. L 193 vom 1.7.2014, S. 1) freistellbar von der Notifizierung durch die EU-Kommission.

Die sich aus diesen Vorschlägen ergebenden Vorstellungen von einer künftigen Paratuberkulosebekämpfung in Deutschland sind in Abb. 1 zusammengefasst.

Die Entwicklung eines nationalen Paratuberkulosebekämpfungsplanes sollte von einer wissenschaftlichen Kosten-Nutzen-Analyse begleitet werden, die eine verantwortungsbewusste Entscheidung ermöglicht, an welchen Punkten die öffentliche Hand Kosten tragen, finanzielle Anreize schaffen oder lediglich eine Infrastruktur bereitstellen sollte, die den Landwirten eine eigenverantwortliche Gestaltung eines Maßnahmenpakets oder Bekämpfungsplanes erlauben würde. Epidemiologische Simulationsmodelle können hilfreich sein, solche Entscheidungen zu treffen. Erste Ergebnisse einer solchen Modellierung zeigten, dass nur eine intensive Vorgehensweise mit einer Kombination verschiedener Managementmaßnahmen (zügige Ausscheidermerzung, Hygiene, Kälbermanagement) in Verbindung mit einem kontrollierten Tierhandel wirksam die Prävalenz auf Herdenebene senken kann (BEAUNÉE et al., 2016). Es bleibt folglich weiterhin ein wichtiges Forschungsgebiet, die Wirksamkeit einzelner Maßnahmen und ihrer Kombinationen zu untersuchen, um künftige Strategien sowohl kostengünstig als auch wirksam zu gestalten. Dabei sollten die verwendeten Modelle auf den in der jeweiligen Region oder dem Land herrschenden wirtschaftlichen Rahmenbedingungen basieren (siehe Abschnitt 3.3) und mit stochastischen Ansätzen auch deren mögliche Veränderung berücksichtigen.

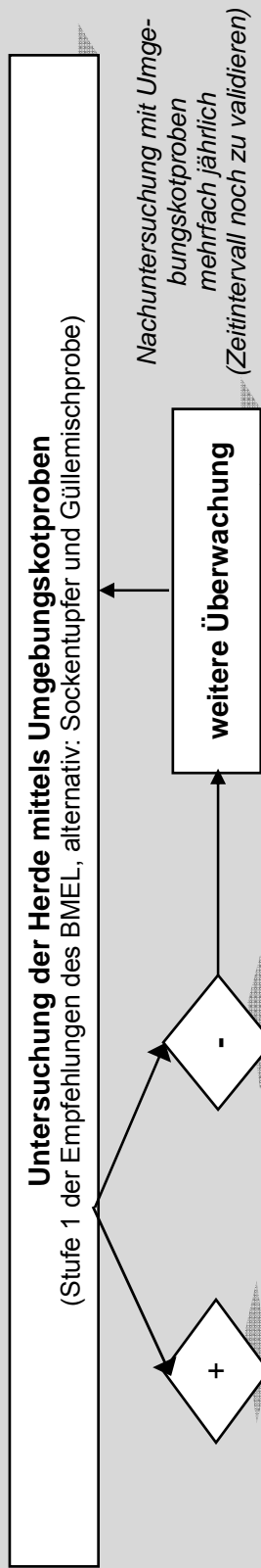
Die in dieser Arbeit zusammengefassten Studien zeigen zudem weiteren Forschungsbedarf bezüglich folgender Fragestellungen auf:

- Eignung der mehrfachen Beprobung mit Umgebungskotproben bzw. einem Probenset aus Sockentupferprobe und Gülleprobe zur
 - Zertifizierung von Rinderherden als paratuberkulose-unverdächtig
 - Überwachung anerkannter paratuberkulose-unverdächtiger Rinderbestände
 - Untersuchung von Mutterkuhherden.
- Schätzung der Prävalenz auf Herdenebene und der Verteilung der Intraherdenprävalenz in verschiedenen Regionen Deutschlands

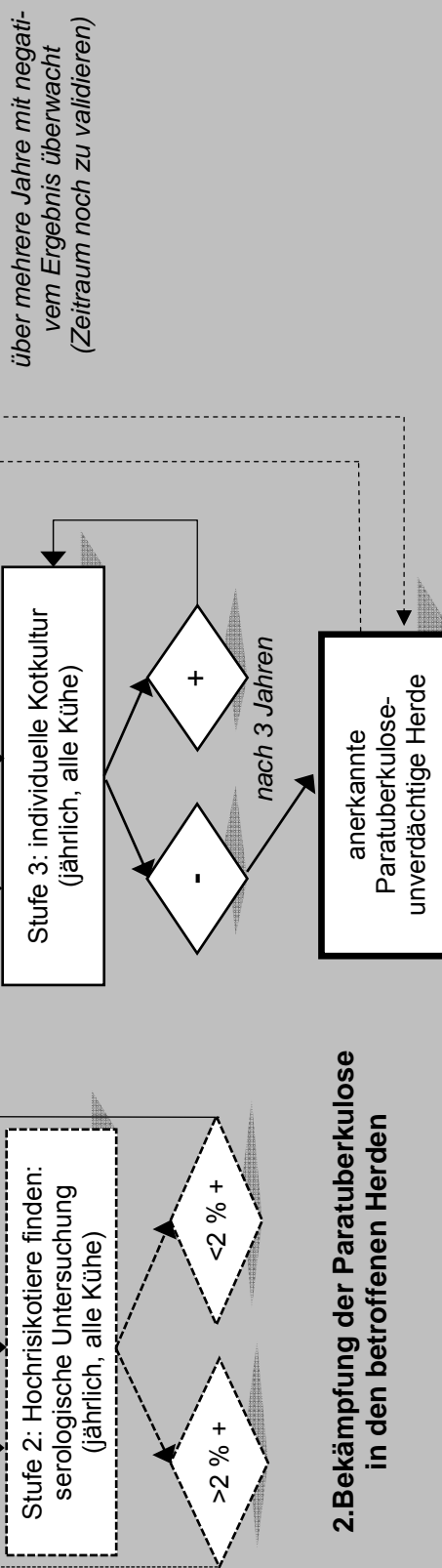
- Auswirkungen der Paratuberkulose im subklinischen Krankheitsstadium auf die allgemeine Gesundheit der Rinder, insbesondere in Bezug auf
 - herdenspezifische Einflussfaktoren auf die Verminderung der Milchleistung, die neben der Intraherdenprävalenz wirksam sind
 - kausale Zusammenhänge hinsichtlich der verminderten Verwertung von Futterprotein und der daraus resultierenden metabolischen Erkrankungen
 - erhöhte Leberbelastungen oder Beeinträchtigungen des Abwehrvermögens
- Nutzung metabolischer Parameter oder Profile für die Frühdiagnostik der Paratuberkulose
- Wichtung einzelner Risikofaktoren für die Verbreitung der Paratuberkulose innerhalb und zwischen Beständen hinsichtlich
 - der Beeinflussung der Prävalenz auf Bestandsebene
 - der Senkung der Intraherdenprävalenz
- Prüfung der Wirksamkeit und Effizienz verschiedener Ansätze zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Bezug auf Prävalenzsenkung und Erregerverdrängung auf Herdenebene, insbesondere hinsichtlich der Anwendung verschiedener Merzungsstrategien von testpositiven Rindern
- Untersuchung der Motivation von Landwirten, sich an der freiwilligen Paratuberkulosebekämpfung zu beteiligen, einschließlich der Möglichkeiten, diese Motivation zu beeinflussen

Mit der Beratung von Tierhaltern in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten eröffnen sich für Tierärzte in der Bestandsbetreuung Möglichkeiten und Chancen, eine an einem Ziel orientierte langfristige Zusammenarbeit zu etablieren, die regelmäßige Beratungsbesuche erfordert und zu einer nachhaltigen Verbesserung der Tiergesundheit beiträgt. Am Beispiel der Paratuberkulose konnte gezeigt werden, dass das Engagement des Betreuungstierarztes nicht nur möglich, sondern auch zwingend notwendig ist, um Infektionskrankheiten in Rinderbeständen erfolgreich bekämpfen zu können.

1. verpflichtende Herdenuntersuchung



Bekämpfungsprogramm für Herde (gemäß den Empfehlungen des BMEL)



2. Bekämpfung der Paratuberkulose in den betroffenen Herden

Abb. 1: Vorschlag für ein zweigliedriges Vorgehen zur Bekämpfung der Paratuberkulose

4 Zusammenfassung

Weltweit ist in den entwickelten Ländern eine deutliche Zunahme der Herdengrößen in der Milchvieh- und Fleischrindhaltung zu verzeichnen, verbunden mit einem Strukturwandel von kleineren diversifizierten Betrieben hin zu größeren spezialisierten Produktionseinheiten. Damit ist die tierärztliche Tätigkeit in Rinderherden einem Wandel von der Gemischtpraxis mit Einzeltierbehandlung zu einer spezialisierten Beratungstätigkeit in tiergesundheitslichen Fragen mit der Fehlersuche und Problembehandlung im Herdenmanagement und in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten auf Herdenebene unterworfen.

Zielstellung dieser Arbeit war es, am Beispiel der Paratuberkulose zu zeigen, welche Ansatzpunkte und Strategien dem bestandsbetreuenden Tierarzt zur Verfügung stehen, um durch Beratungstätigkeit den Rinderhalter im Umgang mit dieser Krankheit zu unterstützen, eine betriebliche Strategie zu entwickeln sowie die etablierten Bekämpfungsmaßnahmen zu begleiten. Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Feststellung, ob eine Herde von Paratuberkulose betroffen ist oder nicht. Daher war es Ziel verschiedener Studien, die Testeigenschaften neuer Ansätze zur Diagnostik auf Herdenebene zu evaluieren. Weiterhin sollte die Beeinträchtigung der allgemeinen Tiergesundheit in Folge der Paratuberkulose untersucht werden, da dies eine wichtige Motivation zur Etablierung von Bekämpfungsmaßnahmen im Bestand ist und bisherige Studienergebnisse bezüglich des krankheitsbedingten Einflusses auf die Milchleistung widersprüchlich sind. Daher war der Einfluss der Paratuberkulose auf den Stoffwechsel der Milchkuh unter Produktionsbedingungen und auf die Milchleistung unter besonderer Berücksichtigung von Herdeneffekten zu untersuchen. Die Wirksamkeit bestimmter Maßnahmen auf den Erfolg der Paratuberkulosebekämpfung in den jeweiligen Herden ist bisher unter Feldbedingungen nicht untersucht. Letztendlich war zu zeigen, ob die Paratuberkulose aus Rinderherden verdrängt werden kann oder nicht bzw. ob eine Senkung der Intraherdenprävalenz innerhalb eines überschaubaren Zeitraumes möglich ist. Mit den Ergebnissen dieser Studien sollten dem Rindertierarzt in der praktischen Beratung nutzbare Informationen über einfach anwendbare Testverfahren, Argumente und Ansätze für die Bekämpfung sowie effektive Strategien an die Hand gegeben werden, um Landwirte zielorientiert beraten zu können.

Alle Studien wurden im Rahmen des freiwilligen Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Thüringer Rinderherden als Felduntersuchungen durchgeführt. Es war ein übergreifendes Merkmal aller Studien, dass die intra vitam-Diagnostik von Paratuberkulose auf dem kulturellen Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in individuellen Kotproben beruhte. Je nach Fragestellung wurde diese durch in Deutschland verfügbare kommerzielle Enzymimmunoassays (ELISA), Nachweisverfahren mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) oder klinisch-chemische Untersuchungen ergänzt. In einzelne Studien waren Herden aus Hessen, Rheinland-Pfalz oder Sachsen einbezogen. Die Zahl der betrachteten Herden variierte zwischen 16 und 105 je nach Zweck der Studie, Bereitschaft der Eigentümer zur Mitarbeit und Verfügbarkeit der benötigten Daten. Die Daten wurden aus den betrieblichen Herdenmanagementprogrammen oder zentralen Datenbanken mit Erlaubnis der Betriebsleiter generiert. Im Wesentlichen wurden multivariable lineare oder logistische Regressionsmodelle genutzt, um die Beziehungen zwischen der Intraherdenprävalenz und den Testeigenschaften zu beschreiben oder Faktoren zu untersuchen, die den Anteil neuer Fälle je Jahr in der Herde beeinflussen. Verschiedene gemischte varianzanalytische Modelle kamen zur Anwendung, um die Beziehungen zwischen der Paratuberkuloseinfektion und der Milchleistung oder den metabolischen Parametern zu beschreiben bzw. um Einflüsse auf die Übereinstimmung von Testergebnissen zu untersuchen.

Im Ergebnis der Untersuchungen konnte die Eignung von Umgebungskotproben für den Einsatz in der Herdendiagnostik bezüglich Paratuberkulose in Milchviehherden mit Laufstallhaltung und für Mutterkuhherden belegt werden. Sowohl die mykobakteriologische Kultivierung als auch die PCR erwiesen sich als geeignet zum Nachweis des Erregers oder seines Genoms in manuell entnommenen Proben aus Bereichen mit hohem Kuhverkehr oder Kotansammlungen sowie in Sockentupferproben und Gülleproben. Dieser Untersuchungsansatz zeigte eine hohe Spezifität. Die Sensitivität der Methodik wurde mit Hilfe logistischer Funktionen beschrieben, wobei die Wahrscheinlichkeit, eine Herde als MAP-positiv zu erkennen mit steigender Intraherdeprävalenz der MAP-Ausscheider zunimmt. Milchviehherden mit einem Anteil von 1,5 % MAP-Ausscheidern unter ihren Kühen werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % als MAP-positiv erkannt, wenn ein Sockentupfer und eine Gülleprobe gleichzeitig kulturell und mit PCR untersucht werden. Erwartet man eine 90%ige Erkennungswahrscheinlichkeit bei einmaliger Beprobung, stieg der

Prävalenzgrenzwert auf 4 %. Die Verwendung von nur einer Probe oder einer Untersuchungsmethode erhöhte den Grenzwert weiter. Wenn die Proben in Milchviehherden manuell gewonnen wurden, erwies sich die Entnahme von drei Proben vom Melkstand einschließlich Vorwarte Hof, vom Haupttreibeweg und aus der Gruppenbucht frischmelkender Kühe als die beste Kombination. Mutterkuhherden mit einer Ausscheiderprävalenz über 5 % wurden mit kultureller Untersuchung von Umgebungskotproben sicher erkannt. Die Kalkulation der notwendigen Stichprobengröße für serologische Untersuchungen von Einzeltieren zur Erkennung von Herden mit einer Ausscheiderprävalenz von 10 % als MAP-positiv ergab in Abhängigkeit vom verwendeten Testkit sehr große Stichprobenzahlen bei größeren Interpretationsschwierigkeiten durch mögliche falsch positive Befunde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Übereinstimmung von serologischer und kultureller Untersuchung mit folgenden Faktoren in Beziehung steht: Intraherdenprävalenz der MAP-Ausscheider, Alter oder Laktationszahl der untersuchten Kühe, Dauer der Beteiligung des Bestandes an einem Bekämpfungsprogramm.

Hypoproteinämie und verminderte Milchleistung wurden als Auswirkungen der Paratuberkulose auf die Gesundheit von Milchkühen auch im subklinischen Krankheitsstadium nachgewiesen, wogegen eine negative Beeinflussung des Energiestoffwechsels nicht festzustellen war. Der Einfluss der Infektion auf die Milchmenge stand mit der Intraherdenprävalenz und anderen herdenspezifischen Faktoren in Beziehung. Die Bereitstellung einer separaten Kalbebucht für MAP-Ausscheider sowie deren Reinigung und Desinfektion nach Belegung mit einem MAP-Ausscheider erwiesen sich als kritische Punkte für den Erfolg der Paratuberkulosebekämpfung in großen Milchviehherden. Die Evaluierung des Thüringer Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderherden für den Zeitraum 2008 - 2014 belegte, dass in insgesamt zehn ursprünglich MAP-positiven Herden der Erreger erfolgreich verdrängt werden und diese als paratuberkulose-unverdächtige Herden anerkannt werden konnten. Die mittlere Zahl neuer MAP-Ausscheider wurde in 15 Milchviehherden mit einer hohen Intraherdenprävalenz innerhalb von sechs Jahren von 14,5 % auf 5,6 % gesenkt, wohingegen in zehn Herden mit weniger als 5 % MAP-Ausscheidern im Jahr 2008 keine signifikante Reduktion der kumulativen Inzidenz festzustellen war.

Der Nachweis von MAP in Umgebungskotproben oder alternativ in Sockentupfern und Gülleproben unterstützt die Diagnostik der Paratuberkulose des Rindes auf Her-

denebene. Damit steht ein einfach durchzuführendes und kostengünstiges Diagnoseverfahren zur Verfügung, das von jedem Rinderpraktiker und beratenden Tierarzt genutzt werden kann. Die hier beschriebenen Testeigenschaften erweitern das Wissen um die Leistungsfähigkeit des Testverfahrens unter verschiedenen Bedingungen und die Einsatzmöglichkeiten in der Rinderpraxis. Serologische Einzeltieruntersuchungen eignen sich gut zur Auffindung von Starkausscheidern, sind jedoch nur begrenzt zur Beurteilung des Herdenstatus einsetzbar. Die Beziehung zwischen der Intraherdenprävalenz und der Beeinträchtigung der Milchleistung eines MAP-Ausscheiders füllt eine Wissenslücke bezüglich der herdenspezifischen Einflüsse auf dieses Merkmal und bietet tierärztlichen Beratern ein starkes Argument, um Landwirte für die Bekämpfung der Paratuberkulose zu motivieren. Daten aus Felduntersuchungen erhärten die Bedeutung des Kalbebereichs als kritischen Kontrollpunkt und bestärken die bestandsbetreuenden Tierärzte sowie die Landwirte, die Kalbung von MAP-Ausscheidern besonders im Auge zu haben, ohne die anderen Maßnahmen zu vernachlässigen. Evidenz bezüglich der Wirksamkeit einzelner Maßnahmen ermöglicht ein risikobasiertes und zielgerichtetes Vorgehen und erhöht die Akzeptanz von Beratungsempfehlungen. Die hier dargestellten Ergebnisse erhärten die Hypothese, dass MAP in einer Herde soweit zurückgedrängt werden kann, dass der Erreger in Kotproben nicht mehr nachgewiesen werden kann. Das ist das Endziel der Bemühungen des Rinderhalters und sollte vom bestandsbetreuenden Tierarzt bestmöglich begleitet und motiviert werden.

5 Summary

Dairy and beef herds are growing markedly in developed countries worldwide. Small sized diversified farms were transformed into larger scale, focused units of production. Veterinary practitioners have to deal with the transition from a mixed animal practice focused on the treatment of individual animals to a specialized consultant in animal health issues and trouble-shooting role in herd management and infectious disease control at herd level.

The aim of this work was to highlight the starting points and strategies that can be utilized by bovine practitioners to support dairy and beef herds farmers in managing bovine paratuberculosis, developing a herd level control strategy and attend established control measures. The first step of this process is the diagnosis whether the herd is affected from paratuberculosis or not. Therefore, the objective of several studies was to evaluate the test characteristics of new approaches for herd level diagnosis of bovine paratuberculosis. Furthermore, the impairment of the general health status and the production level caused by paratuberculosis is of interest because this is an important driver to establish control measures and because present results regarding the influence of the disease on milk production are conflicting. The influence of paratuberculosis on the metabolism of dairy cows in production herds and on milk production had to be investigated, with special emphasis on herd level effects. Furthermore, the efficacy of specific hygienic measures on the success of paratuberculosis control at herd level is not studied under field conditions yet, and had to be elicited. Finally, it was to be answered whether or not paratuberculosis can be eradicated from cattle herds or within-herd prevalence can be reduced within a manageable period. The results of these studies should provide useful information regarding easy-to-use testing approaches, arguments and starting points for control activities and effective strategies to bovine veterinarians for target-oriented counselling of farmers.

All studies were performed under field conditions within the framework of the voluntary paratuberculosis control program in cattle herds in Thuringia. Across all studies, the detection of the infectious agent *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in individual faecal samples was used to diagnose paratuberculosis in living animals. With respect to the aim of the respective study, commercially available enzyme immunoassays (ELISA), polymerase chain reaction (PCR) test kits or metabolic tests were applied in addition. Dairy or beef herds from Hesse, Rhineland-

Palatinate or Saxony were included in several studies. The number of study herds varied between 16 and 105 with respect to the aim of the study, willingness of the owners to participate and the availability of the required data. The data was extracted from the herd management software or central databases with permission of the owner. Generally, multivariable linear or logistic regression models used were to describe test characteristics in relation to the within-herd prevalence associations or to study factors affecting the percentage of new cases per year in a herd. Different mixed model analysis of variance were performed to study the association between infection status and milk yield or metabolic parameters as well as investigate influences on the agreements of different tests.

The fitness for use of environmental sampling in free stall dairy herds and beef herd for the herd level diagnosis of paratuberculosis was demonstrated in several studies. Mycobacteriological cultivation as well as PCR methods were found adequate to detect the infectious agent MAP or its genome in manually collected samples from areas with high cow traffic or manure concentration as well as in sampling socks and in liquid manure samples. This diagnostic approach showed a high specificity. The sensitivity of this method was described using logistic functions with a rising probability to detect a herd as MAP positive when the apparent within-herd prevalence (WHP_{app}) of MAP shedders increased. Dairy herds having a percentage of 1.5% MAP shedders among their cows were detected as MAP positive with a probability of 50% by testing a sampling sock and a liquid manure sample simultaneously by faecal culture and PCR. If 90% probability of detection for a single sampling is requested the prevalence threshold increased to 4.0%. Using only one sample or detection method further increased the WHP_{app} threshold. Three samples from the milking area including waiting pen, the main cow alleyways and a holding pen of fresh cows were the best combination when samples were collected manually in dairy herds. Beef herds with more than 5% MAP shedders were entirely detected as MAP positive using faecal culture applied on environmental samples. A sample size calculation of for individual serological testing to detect a design prevalence of 10% MAP shedders using different test kits resulted in a large sample sizes with a relevant number of possible false positive reactors causing interpretation troubles. Furthermore, a relation between the agreement of serological test results with the detection of infectious agent and following factors was demonstrated in dairy herds: WHP_{app} of MAP shedders, age or lactation number of the tested cows, duration of the herd's participation in a control program.

Hypoproteinaemia and reduced milk yield were substantiated as consequences of paratuberculosis on dairy cows' health also in the subclinical stage of the disease, whereas a negative influence on energy metabolism was not detected. The influence of the infection on milk yield reduction was associated with the WHP_{app} and other herd specific factors. The availability of a separate calving pen for MAP shedders and its cleaning and disinfection after usage by MAP shedders were crucial factors for the success of MAP control in large dairy herds. The evaluation of the Thuringian paratuberculosis control program for the period 2008-2014 substantiated the eradication of MAP from ten originally positive herds and their certification as non suspect herds. The mean percentage of new MAP shedders was reduced from 14.5% to 5.6% in 15 high prevalence dairy herds within six years whereas in ten herds with less than 5% MAP shedders in 2008 the cumulative incidence was not significantly reduced.

Detection of MAP in environmental samples, or alternatively sampling socks and liquid manure samples, facilitates a herd level diagnosis of bovine paratuberculosis. It is an easy-to-use and cost-efficient diagnostic approach that can be used by each bovine practitioner or consultant veterinarian. The test characteristic described here expands our knowledge regarding the test performance under various conditions and the application in bovine practice. Individual serological testing is appropriate for the identification of heavy shedders but has limitation for a herd level diagnosis. The association between WHP_{app} and milk yield reduction in MAP shedders fills a knowledge gap regarding herd level influences on this trait and provides a strong argument for veterinary consultants to motivate farmers for paratuberculosis control. Field data substantiate the calving area as a critical control point and encourage veterinarians and farmers to focus on the calving of MAP shedders without neglecting other measures. Evidence regarding the impact of specific measures allows risk based and targeted approaches which enhances the implementation of the recommended measures. The results provided here substantiate the hypothesis that control of paratuberculosis is feasible in a herd to a level where the MAP is not detectable anymore in faecal samples. This is the ultimate goal of the farmer's efforts and should be supervised and motivated by the consultant veterinarians at their best.

6 Literaturverzeichnis

Abbas B, Riemann HP, Hird WD (1983): Diagnosis of Johne's Disease (paratuberculosis) in Northern California cattle and a note of its economic significance. *Calif Vet* 37: 20–24.

Akineden Ö, Weinrich S, Abdulmawjood A, Failing K, Bülte M (2014): Application of a Fluorescence Microscopy Technique for Detecting Viable *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* Cells in Milk. *Food Analytical Methods* 8, DOI: 10.1007/s12161-014-9918-3.

Alajmi A, Klein G, Greiner M, Grabowski NT, Fohler S, Campe A, Scheu T, Hoedemaker M, Abdulmawjood A (2016): Potential role of real-time PCR for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in chronically diseased milking cows: a case control study. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 129: 304–309.

Aly SS, Anderson RJ, Adaska JM, Jiang J, Gardner IA (2010b): Association between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and milk production in two California dairies. *J Dairy Sci* 93: 1030–1040.

Aly SS, Anderson RJ, Whitlock RH, Fyock TL, McAdams S, Adaska JM, Jiang J, Gardner I (2009): Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on California free-stall dairies. *J Dairy Sci* 92: 3634–3642.

Aly SS, Mangold BL, Whitlock RH, Sweeney RW, Anderson RJ, Jiang J, Schukken YH, Hovingh E, Wolfgang D, van Kessel JAS, Karns JS, Lombard JE, Smith JM, Gardner IA (2010a): Correlation between herrold egg yolk medium culture and real-time quantitative polymerase chain reaction results for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pooled fecal and environmental samples. *J Vet Diagn Invest* 22: 677–683.

Ansari-Lari M., Haghkhah M, Mahmoodi F (2012): Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection with milk production and calving interval in Iranian Holsteins. *Trop Anim Health Prod* 44: 1111–1116.

Anonymus (2006): Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über ein Überwachungsprogramm zur Bekämpfung der klinischen Paratuberkulose bei Wiederkäuern (Paratuberkulose-Verordnung). StF BGBl. II Nr. 48/2006: 1–7.

Anonymus (2016a): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Rinderbeständen [aufgerufen am 6. August 2016]:

<[Anonymus \(2016b\): Biosicherheit in Rinderhaltungen \[aufgerufen am 6. August 2016\]:](http://www.ndstsk.de/index.php?bereich=3&topic_id=948&akk=3&akv=></p></div><div data-bbox=)

<[.](http://www.tknds.de/cms_tknds/media/archive1/leitfadenbiosicherheit/LeitfadenBiosicherheit_ZWEITEAUFLAGE_mitAnlagen.pdf)

Antognoli MC, Garry FB, Hirst HL, Lombard JE, Dennis MM, Gould DH, Salman MD (2008): Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Vet Microbiol* 127: 300–308.

Arrigoni N, Garbarino C, Boldini M, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Gradassi M, Leo S, Paternoster G, Tamba M (2016): Bovine paratuberculosis in Italy: Results after the first two years of application of the national guidelines. Proceedings of the 5th ParaTB-Forum, Nantes, France, 19th June 2016, p. 11–16.

Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S (2014): From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Res* 45: 54.

Atreya R, Bülte M, Gerlach GF, Goethe R, Hornef MW, Köhler H, Meens J, Möbius P, Roeb E, Weiss S (2014): Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Int J Med Microbiol* 304: 858–67.

Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I (2005): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 71: 1210–1214.

Baptista FM, Nielsen SS, Toft N (2008): Association between the presence of antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and somatic cell count. *J Dairy Sci* 91: 109–118.

Barkema HW, Orsel K, Koets A, Rutten VP, Bannantine J, Keefe G, Kelton D, Wells SJ, Whittington R, Mackintosh CG, Manning EJ, Weber MF, Kastelic JP, De Buck J (2014): Bottlenecks in the Prevention and Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Proceedings of the 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma, Italy, p. 111–113.

Barkema HW, van Keyserlingk MA, Kastelic JP, Lam TJ, Luby C, Roy JP, LeBlanc SJ, Keefe GP, Kelton DF (2015): Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *J Dairy Sci* 98: 7426–7445.

Barrett DJ, Mee JF, Mullaney P, Good M, McGrath G, Clegg T, More SJ (2011): Risk factors associated with Johne's disease test status in dairy herds in Ireland. *Vet Rec* 168: 410.

Barwell R (2016): Changes to the Australian National Strategic Plan for Bovine Johne's Disease. Proceedings of the 5th ParaTB-Forum, Nantes, France, 19th June 2016, p. 37–39.

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

Bates A, Wapenaar W, Campbell A, Eggleton R (2016): Them and Us: Understanding How Farm Consultants View the Veterinary Profession. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 138

Baumgartner W, Khol JL (2008): Paratuberculosis – potentials and limits of control programs. *Magyar Allatorv Lapja* 130 Suppl. I: 7–10.

Beaudeau F, Belliard M, Ljoly A, Seegers H (2007): Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Vet Res* 38: 625-634.

Beaunée G, Vergu E, Joly A, Ezanno P (2016): Spread and control of bovine paratuberculosis in an enzootic cattle region: a multi-scale model to evaluate complex strategies combining biosecurity and test-at-purchase. Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France, 2016, p. 127.

Benedictus G, Dijkhuizen AA, Stelwagen J (1987): Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec* 121: 142–146.

Benedictus A, Mitchell RM, Linde-Widmann M, Sweeney R, Fyock T, Schukken YH, Whitlock RH (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 RD, Farver TB, Anderson RJ, Jaravata CC, Gardner IA (2006): Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on large California dairies. *J Dairy Sci* 89: 963–970.

Bergmann A, Trefz P, Fischer S, Klepik K, Walter G, Steffens M, Ziller M, Schubert JK, Reinhold P, Köhler H, Miekisch W (2015): In Vivo Volatile Organic Compound Signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One* 10 :e0123980.

Blanquefort P (2016): A colorful situation in France with regard to Johne's disease control. Proceedings of the 5th ParaTB-Forum, Nantes, France, 19th June 2016, p. 9–10.

Boelske G, Herthnek D (2010): Diagnosis of paratuberculosis by PCR. In: Behr MA, Collins DM (Hrsg): Paratuberculosis, organism, disease, control. Wallingford: CABI; p. 267–283.

Böttcher J, Gangl A (2004): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J Vet Med B* 10, 443–448.

Bouchard E (2016): Dairy Herd Health: a look at the veterinarian's changing role and the future of One Health. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 23–25.

Branscum AJ, Gardner IA, Johnson WO (2004): Bayesian modeling of animal- and herd-level prevalences. *Prev Vet Med* 66: 101–112.

Branscum AJ, Gardner IA, Johnson WO (2005): Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev Vet Med* 68: 145–163.

Biggs HM, Turabelidze G, Pratt D, Todd SR, Jacobs-Slifka K, Drexler NA, McCurdy G, Lloyd J, Evavold CL, Fitzpatrick KA, Priestley RA, Singleton J, Sun D, Tang M, Kato C, Kersh GJ, Anderson A (2016): *Coxiella burnetii* Infection in a Community

Operating a Large-Scale Cow and Goat Dairy, Missouri, 2013. *Am J Trop Med Hyg* 94: 525–531.

Brützke A (2010): Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhoe/Mucosal Disease im Landkreis Kamenz auf freiwilliger Basis -Wege, Erfolge, Grenzen. [Dissertation med.vet.] Leipzig, Universität Leipzig.

Bull T, Linedale R, Vrettou C, McNair J, Strain S, Gilbert H, Hope J (2014): AD5 Prime – MVA Boost HAV vaccine protects calves against MAP Challenge. *Proceedings of the 12th International Colloquium on Paratuberculosis*, Parma, Italy, p. 131.

Bülte M, Schönenbrücher H, Abdulmawjood A (2005): From farm to fork-- *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) as zoonotic agent? *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 118: 377–385.

Bundesverband praktizierender Tierärzte e.V. (BpT) (2009): Leitlinie für die tierärztliche Bestandsbetreuung. Stand: 24.09.2009 [aufgerufen am 20. Januar 2016]: <<https://www.tieraerzteverband.de/bpt/berufspolitik/leitlinien/bestandsbetreuung/leitlinien-bestandsbetreuung.php>>.

Bundesverband praktizierender Tierärzte e.V. (BpT) (2011): Leitlinie für die Durchführung der tierärztlichen Bestandsbetreuung in den Rinderbeständen. Stand: 10.02.2011 [aufgerufen am 20. Januar 2016]: <<https://www.tieraerzteverband.de/bpt/berufspolitik/leitlinien/bestandsbetreuung/leitlinien-bestandsbetreuung.php>>.

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (2014): Empfehlungen des Bundeslandwirtschaftsministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern. Banz. AT 01.08.2014 B1, 1–17.

Büttner S (2013): Möglichkeiten und Grenzen der Paratuberkulose-Schnelldiagnostik mit indirekten (ELISA) und direkten (PCR) Methoden – Erfahrungen in sächsischen Rinderbeständen. [Dissertation med.vet.] Leipzig, Universität Leipzig.

Cameron (2001): FreeCalc Software Version 2 [aufgerufen am 23. März 2011]: <<http://www.ausvet.com.au>>.

Cameron AR, Baldock FC (1998): A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev Vet Med* 34: 1–37.

Campe A, Köhler H, Donat, K (2014): Approaches to Controlling Paratuberculosis in Germany – Conditioned by Voluntariness and Federalism. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma, Italy 2014, 31–39.

Chiodini RJ (1996): Immunology: Resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 313–343.

Christensen J, Gardner IA (2000): Herd-level interpretation of test results epidemiologic studies of animal diseases. *Prev Vet Med* 45: 83–106.

Collins M (2016): Paratuberculosis. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 44–45.

Collins MT, Eggleston V, Manning EJ (2010): Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. *J Dairy Sci* 93: 1638–1643.

Collins MT, Gardner IA, Garry FB, Roussel AJ, Wells SJ (2006): Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 229: 1912–1919.

Constable P (2016): An exciting Future for The Education of Food Supply Veterinarians. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 49–52.

Coussens PM (2001): *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev* 2: 141–161.

Coussens PM (2004): Model for immune response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect Immun* 72: 3089–3096.

David J, Barkema HW, Mortier R, Ghosh S, Guan le L, De Buck (2014): Gene expression profiling and putative biomarkers of calves 3 months after infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 160: 107-117.

De Buck J, Shaykhutdinov R, Barkema HW, Vogel HJ (2016): Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One* 11: e111872.

De Kruif A, R. Mansfeld R, Hoedemaker M (2007): Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. 2. Auflage, Enke-Verlag, Stuttgart: 2007

Deiner C. Ökonomische Rahmenbedingungen in der Rinderpraxis. In: LBH: 8. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 3. Rackwitz R.; Pees M.; Aschenbach J. R., Gäbel G. (Hrsg.): Lehmanns Media GmbH, Berlin, S. 242.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) (2016): 13. Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich, Stand 14. September 2016 [aufgerufen am 4. Oktober 2016]. <<http://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=1793>>.

Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuán ML, Vilar MJ, Yus E (2008): Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet. Rec.* 162: 614-617.

Doherr M (2016). Ist es sinnvoll, Aspekte der Ökonomie im Studium zu vermitteln? In: Rackwitz R, Pees M, Aschenbach JR, Gäbel G (Hrsg.): Leipziger Blaue Hefte, 8. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 3. Berlin: Lehmanns Media GmbH, p. 601–604.

Donat K, Köhler H (2016): Paratuberculosis in Germany - a step forward to control in cattle herds. Proceedings of the 5th ParaTB Forum, Nantes, France, 19th June 2016, p. 24-28.

Donat K, Schmidt M, Köhler H (2014): Paratuberculosis control in Germany – conclusions from five years voluntary control in Thuringia and Saxony. Proceedings of the 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma, Italy, p. 135.

Donat K, Siebert W, Menzer E, Söllner-Donat S (2016): Langfristige Trends im metabolischen Profil von Deutsch Holstein-Milchviehherden in Thüringen. *Tierärztl Prax (G)* 44: 73–82.

Doré E, Paré J, Côté G, Buczinski S, Labrecque O, Roy JP, Fecteau G (2012): Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. *J Vet Intern Med* 26: 32–45.

Dorshorst NC, Collins MT, and Lombard JE (2006): Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Prev Vet Med* 75: 92–122.

Dressel J (2012): Vergleichende Untersuchungen zum Direktnachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Rinderkot. [Diplomarbeit] Zwickau, Hochschule Fresenius, University of Applied Sciences, Idstein.

Ebert MN, Munjal SK, Siebert W, Schau U, Donat K (2007): Investigation of paratuberculosis status based on comparative analysis of serology and faecal culture in a dairy herd in Thuringia (Germany). Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Tsukuba, Japan, p. 200-203.

Eisenberg SW, Koets AP, Nielen M, Heederik D, Mortier R, De Buck J, Orsel K (2011): Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res* 42:117.

Eisenberg S, Rutten V, Koets A (2015b): Dam *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection status does not predetermine calves for future shedding when raised in a contaminated environment: a cohort study. *Vet Res* 46: 70.

Eisenberg SW, Veldman E, Rutten VP, Koets AP (2015a): A longitudinal study of factors influencing the result of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* antibody ELISA in milk of dairy cows. *J Dairy Sci* 98: 2345–2355.

Eisenberg S, Chuchaisanrat R, Nielen M, Koets A (2013a): Relationship between presence of cows with milk positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay and viable *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in dust in cattle barns. *Appl Environ Microbiol* 79: 5458–5464.

Eisenberg SWF, Nielen M, Santema W, Houwers DJ, Heederik D, Koets AP (2010a): Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *J Vet Microbiol* 143: 284–292.

Eisenberg SWF, Koets AP, Hoeboer J, Bouman M, Heederik D, Nielen M (2010b): Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial Dutch dairy farms. *Appl Environ Microbiol* 76: 6310–6312.

Eisenberg T, Wolter W, Rohde M, Schlez K, Zschöck M (2013b): Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) detection. J Dairy Res 80: 1–5.

Eppleston J, Dhand N, Windsor PA, Whittington RJ (2016): Changes in prevalence of ovine paratuberculosis in specific cohorts of vaccinates over five, two-year intervals. Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France, 2016, p. 128.

European Association of Establishment of Veterinary Education (EAEVE) (2016): Annex 2. List of subjects and Day One Competences. In: European System of Evaluation of Veterinary Training (ESEVT), Manual of Standard Operating Procedure. p. 29–30 [aufgerufen am 11. November 2016].

<http://www.eaeve.org/fileadmin/downloads/SOP/ESEVT__Uppsala__SOP_May_2016.pdf>.

Fawzy A, Eisenberg T, El-Sayed A, Zschöck M (2015): Improvement of sensitivity for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in bovine fecal samples by specific duplex F57/IC real-time and conventional IS900 PCRs after solid culture enrichment. Tropical Animal Health and Production. Trop Anim Health Prod 47: 721–726.

Fecteau ME, Whitlock RH (2010): Paratuberculosis in cattle. In: Behr MA, Collins DM (Hrsg.): Paratuberculosis, organism, disease, control. Wallingford: CABI; p. 144-156.

Fecteau ME, Whitlock RH, Buergelt CD, Sweeney R W (2010): Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. Can Vet J 51: 198–200.

Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M (2007): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 9: 607–613.

Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden Ö, Bülte M (2012a): Genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from South American countries de-

terminated by two methods based on genomic repetitive sequences. Trop Anim Health Prod 44: 1123–1126.

Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden Ö, Dräger K, Klawonn W, Bülte M (2012b): Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a regional scale in Germany. Res Vet Sci 93: 776–782.

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

Ferrouillet C, Wells SJ, Hartmann WL, Godden SM, Carrier J (2009): Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. Prev Vet Med 88: 128–137.

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit (2015): Amtliche Methodensammlung, Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*), Stand: 20. Oktober 2015 [aufgerufen am 18. Januar 2016]: <https://openagrar.bmel-forschung.de/servlets/MCRFileNodeServlet/Document_derivate_00005327/TK18_Paratuberkulose-20151020.pdf>

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit (2012): Testcharakteristika der zugelassenen ELISA-Tests für den Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* beim Rind gemessen an den Referenzpanels Serum und Milch des NRL, Stand: Dezember 2012 [aufgerufen am 18. Januar 2016]: <http://www.fli.de/fileadmin/FLI/IMP/Information_NRL_Paratuberkulose.pdf>

Fürll M (2014). Spezielle Untersuchungen beim Wiederkäuer. In: Moritz A (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 7. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2014. p. 726-777.

Garcia AB, Shalloo L (2015): Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. J Dairy Sci. 98: 5019–5039.

Garry F (2011): Control of paratuberculosis in dairy herds. Vet Clin of North Am Food Anim Pract 27: 599–607.

Gavey L (2016): Shifting strategy for paratuberculosis management in Queensland. Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France, 2016, p. 131.

Gay JM, Sherman D M (1992): Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet Med* 87: 1133–1139.

Gehring M (2016): Wie sieht die moderne Rinderpraxis aus? In: Rackwitz R, Pees M, Aschenbach JR, Gäbel G (Hrsg.): Leipziger Blaue Hefte, 8. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 3. Berlin: Lehmanns Media GmbH, p. 243-248.

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

Geuenich K (2011): Stress im Tierarztberuf als Gesundheitsrisiko. *Deutsches Tierärzteblatt* 59: 4–8.

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

Gierke F, Köhler H (2009): Tenazität, Ausscheidung und Übertragungswege des Paratuberkuloseerregers – Konsequenzen für die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen. *Prakt Tierarzt* 90: 1169–1178.

Glanemann B, Schönenbrücher H, Bridger N, Abdulmawjood A, Neiger R, Bülte M (2008): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-Specific DNA by PCR in Intestinal Biopsies of Dogs. *J Vet Int Med* 22: 1090–1094.

Gonda MG, Kirkpatrick BW, Shook GE and Collins MT (2007): Identification of a QTL on BTA20 affecting susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Animal Genetics* 38: 389–396.

Grewal SK, Rajeev R, Sreekumari R, Sreevatsan S, Michele FC (2006): Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing and liquid storage of dairy manure. *Appl Environ Microbiol* 72: 565–574.

Griffin FT, Mackintosh CG, O'Brien R, Liggett S, Brennan L (2016): Composite Immune Biomarkers Associated with Resistance or Susceptibility to Johne's Disease: Data from a Deer Model. Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France, 2016, p. 37.

Groenendaal H, Nielen M, Jalvingh AW, Horst SH, Galligan DT, Hesselink JW (2002): A simulation of Johne's disease control. *Prev Vet Med* 54: 225–245.

Groenendaal H, Zagmutt FJ (2008): Scenario analysis of changes in consumption of dairy products caused by a hypothetical causal link between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease. *J Dairy Sci* 91: 3245–3258.

Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S (2007): Der Kappa-Koeffizient. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 132 Suppl 1: 65–68.

Hammer P, Knappstein K (1998): *Mycobacterium paratuberculosis* als Zoonoseerreger. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 50: 235–247.

Hammer P, Kiesner C, Walte HG, Knappstein K, Teufel P (2003): Heat resistance of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 54: 275–303.

Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Duffield TF (2005): Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 227: 1302–1308.

Herthnek D, Nielsen SS, Lindberg A, Bölske G (2008): A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Microbiol Methods* 75: 335–40.

Heuer C (2016): Transmission dynamics of MAP in pastoral grazing systems of ruminant livestock in New Zealand. Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France, p. 110-112.

Hinger M, Brandt HR, Erhardt G (2008): Heritability estimates for antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in German Holstein cattle. *J Dairy Sci* 91: 3237–3244.

Höfig A (2015): Untersuchungen zu epidemiologisch relevanten Einflussfaktoren auf die Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) in Thüringer Rinderherden mit BVD-Infektionen im Rahmen der verpflichtenden BVDV-Bekämpfung in Deutschland im Jahr 2011 – Ermittlung von Risikofaktoren und Ansätzen für die Rechtssetzung [Dissertation med.vet.] Leipzig, Universität Leipzig.

Homuth M (2002): Diagnostik der Paratuberkulose. Dtsch Tierärztl Wochenschr 109: 516–519.

Humphry RW, Cameron A, Gunn GJ (2004): A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. Prev Vet Med 65: 173–188.

Jayarao BM, Pillai SRT, Wolfgang DR, Griswold DR, Rossiter CA, Tewari D, Burns CM, Hutchinson LR (2004): Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. Foodborne Path Dis 1: 17–26.

Johnson YT, Kaneene JB, Gardiner JC, Lloyd JW, Sprecher DJ, Coe PH (2001): The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan Dairy cows. J Dairy Sci 84: 2188–2194.

Johnson-Ifeorlundu HJ, Kaneene JB, Sprecher DJ, Gardiner JC, Lloyd JW (2000): The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. Prev Vet Med 46: 171–181.

Juste RA, Aduriz G, Brave MV, Gonzalez L, Oregui L (1992): A comparative study of digestibility in paratuberculosis and other wasting diseases in sheep. Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis, International Association for Paratuberculosis, Providence, USA.

Jørgensen, JB (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord Vet Med 29: 267–270.

Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe G (2014): Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. J Dairy Sci 97: 299–309.

Kalis CHJ, Barkema HW, Hesselink JW, van Maanen C, Collins MT (2002): Evaluation of two absorbent enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixa-

tion test as replacement for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J Vet Diagn Invest 14: 219–224.

Kelton DF, Ritter C, Roche S, Barkema HW (2016): Johne's Disease Control in Canada 2014-2016: Prevalence, Status Program and Communication. Proceedings of the 5th ParaTB-Forum, Nantes, France, 19th June 2016, p. 29–31.

Kelton DF, Barkema HW, Keefe GP, Fecteau G, Barker RA (2014): Johne's Disease Control in Canada – 2010-2013 – Successes and Challenges. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma, Italy 2014, p. 115–123.

Khol JL, Baumgartner W (2012): Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. Jpn J Vet Res 60 Suppl: 1–7.

Khol JL, Vill M, Dünser M, Geisbauer E, Tichy A, Baumgartner W (2009): Environmental sampling, a new approach in diagnosis and surveillance of paratuberculosis in Austrian cattle herds. Wien Tierarztl Monatsschr 96: 279–285.

Khol JL, Wassertheurer M, Sodoma E, Revilla-Fernández S, Damoser J, Österreicher E, Dünser M, Kleb U, Baumgartner W (2013): Long-term detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual and bulk tank milk from a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. J Dairy Sci 96: 3517–3524.

Klein-Jöbstl D, Arnholdt T, Sturmlechner F, Iwersen M, Drillich M (2015): Results of an online questionnaire to survey calf management practices on dairy cattle breeding farms in Austria and to estimate differences in disease incidences depending on farm structure and management practices. Acta Vet Scand 57: 44.

Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, Martin G (2008a): 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, Gierke F, Möbius P (2008b): Paratuberculosis – current concepts and future of the diagnosis. Magyar Allatorv Lapja 130 Suppl. I: 67–69.

Köhler H, Ziller M, Gierke F, Donat K (2016): Within-pool prevalence limits for the identification of paratuberculosis infected herds using antibody detection in pooled

milk samples. Berl Münchner Tierärztl Wochenschr 129, DOI 10.2376/0005-9366-16019.

Komorowski C (2011): Untersuchungen zur Praktikabilität und Effizienz eines Maßnahmenkatalogs zur Sanierung der Rinderparatuberkulose in vier großen Milchviehbetrieben im Land Mecklenburg-Vorpommern. [Dissertation med.vet.] Berlin, Freie Universität, Berlin.

Kreher M (2016): Wirtschaftliche Aspekte der Tierarztpraxis und des Landwirtschaftsbetriebes im Kontext der Reduzierung von Antibiotika. In: Rackwitz R, Pees M, Aschenbach JR, Gäbel G (Hrsg.): Leipziger Blaue Hefte, 8. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 3. Berlin: Lehmanns Media GmbH, p. 601–604.

Kube J (2014): Vergleich verschiedener Methoden zur Identifizierung Paratuberkulose-positiver Rinderherden. [Dissertation med.vet.] Leipzig, Universität Leipzig.

Kudahl AB, Nielsen SS (2009): Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. J Dairy Sci 92: 4340–4346.

Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S (2008): Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. J Dairy Sci 91: 4599–4609.

Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S (2011): Strategies for time of culling in control of paratuberculosis in dairy herds. J Dairy Sci 94: 3824–3834.

Küpper J, Brandt H, Donat K, Erhardt G (2012): Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis status of German Holstein cows tested by fecal culture. J Dairy Sci 95, 2734–2739.

Küpper J, Brandt H, Donat K, Erhardt G (2013): Associations between paratuberculosis status and milk production traits in Holstein cattle under consideration of interaction effects between test result and farm and lactation number. Archiv Tierzucht 94: 924–933.

Küntzel A, Fischer S, Bergmann A, Oertel P, Steffens M, Trefz P, Miekisch W, Schubert JK, Reinhold P, Köhler H (2016): Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. J Breath Res.10: 037103.

Künzler R, Torgerson P, Keller S, Wittenbrink M, Stephan R, Knubben-Schweizer G, Berchtold B, Meylan M (2014): Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss dairy and beef herds. BMC Vet Res 10:132.

Lavers CJ, McKenna SLB, Dohoo IR, Barkema HW, Keefe GP (2013): Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. Can Vet J 54: 1041–1052.

Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe GP (2014): Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. J Dairy Sci 97: 299–309.

Lindheim D, Sølverød L, Lybeck KR (2016): Surveillance and management of paratuberculosis in Norway with a special focus on the Norwegian Healthier Goat Project. Proceedings of the 5th ParaTB-Forum, Nantes, France, 19th June 2016, p. 33–36.

Logar K, Kopinč R, Bandelj P, Starič J, Lapanje A, Ocepek M. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. BMC Vet Res 8: 49.

Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ, Wagner BA (2005): Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 227:1975–1981.

Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry FB, Salman MD (2006): 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.

Lombard JE, Gardner IA, Jafarzadeh SR, Fossler CP, Harris B, Capsel RT, Wagner BA, Johnson WO (2013): Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. Prev Vet Med 108: 234–238.

Lovel R, Levi M, Francis J (1944): Studies on the survival of Johne's bacilli. J Comp Pathol 54: 120–129.

Luyven G, vom Schloß A, Saßerath M (2002): Paratuberkulosesanierung in Nordrhein-Westfalen. Dtsch Tierärztl Wschr 109: 524–527.

Lybeck K, Olsen I, Sjurseth SK, Al-Touama Z, Tollefsen S (2014): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reactive CD4+T cells cultured from blood of goats with naturally acquired paratuberculosis. Proceedings of the 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma, Italy, p. 168.

Mansfeld R, Grunert E (1990): Modell eines EDV-Systems zur tierärztlichen Fruchtbarkeitsüberwachung als Teil einer integrierten Herdenbetreuung. Dtsch Tierärztl Wochenschr 97: 460–465.

Mansfeld R Sauter-Louis C, Martin R (2012): Auswirkung der Länge der Trockenstehzeit bei Milchkühen auf Leistung, Gesundheit, Fruchtbarkeit und Kolostrumqualität. Tierärztl Prax 40 (G): 239–250.

Marcé C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H, Fourichon C (2009): Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection at early stage in Holstein dairy cows. Theriogenology 71: 807–816.

Martins E, Oliveira P, Oliveira B, Mendonca D, Niza-Ribeiro J (2016): Assessment if the effect of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 305ME production and in udder health using HGLM, in Portuguese dairy cows. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 197.

Mastenbroek NJ, Jaarsma AD, Demerouti E, Muijtjens AM, Scherpbier AJ, van Beukelen P (2014): Burnout and engagement, and its predictors in young veterinary professionals: the influence of gender. Vet Rec 174:144.

McAloon CG, Whyte P, More SJ, Green MJ, O'Grady L, Garcia A, Doherty ML (2016): The effect of paratuberculosis on milk yield - a systematic review and meta-analysis. J Dairy Sci 99: 1449–1460.

McKenna SLB, Socket DC, Keefe GP, McClure J, VanLeeuwen JA, Barkema HW (2005): Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Vet Diagn Invest 17: 463–466.

- McKenna SLB, Van Leeuwen JA, Barkema HW, Jansen JT, Hauer G, Hendrick SH, Cote G, Salsberg EB, Empringham RE (2006b): Proposed Canadian Voluntary National Johne's Disease Prevention and Control Program. *Can Vet J* 47: 539–541.
- McKenna SLB, Keefe GP, Tiwari A, Van Leeuwen JA, Barkema HW (2006): Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors and control programs for dairy producers. *Can Vet J* 47: 1089–1099.
- McNab WB, Meek AH, Martin SW, Duncan JR (1991): Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Can J Vet Res* 55: 356–361.
- Mee J (2007): Veterinary involvement in herd fertility – time for a paradigm shift? *Irish Vet J* 60: 337.
- Merle R, Busse M, Rechter G, Meer U (2012): Regionalisierung von Deutschland mit Hilfe von Agrarstrukturdaten. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 125: 52–59.
- Meylan M, Anderegg M (2016): Implementation of control measures for bovine paratuberculosis in Swiss dairy and beef herds. *Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France*, p. 131.
- Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Verbraucherschutz (MLUV) (2016): Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen in Mecklenburg-Vorpommern. *Amtsbl. Meckl.-Vorp.* 2016 Nr. 26: 671–682.
- Mintiens K (2014): Paratuberculosis in Belgium. *Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma Italy 2014*, p. 15–18.
- Möbius P, Hotzel H, Rassbach A, Köhler H (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: 324–33.
- More S, O'Grady L (2016): An epidemiological approach to herd problem-solving. *Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016*, p. 95–96.
- Mortier RA, Barkema HW, Bystrom JM, Illanes O, Orsel K, Wolf R, Atkins G, De Buck J (2013): Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses

of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Vet Res* 44: 94.

Mortier RA, Barkema HW, Negron ME, Orsel K, Wolf R, De Buck J (2014a): Antibody response early after experimental infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy calves. *J Dairy Sci* 97: 5558–5565.

Mortier RAR, Barkema HW, Orsel K, Wolf R, De Buck J (2014b): Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res* 45: 71–80.

Münster P, Völkel I, von Buchholz A, Czerny CP (2013): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by IS900-based PCR assays from an alpaca (*Vicugna pacos*) kept in a German zoological garden. *J Zoo Wildl Med* 44: 176–80.

Nielsen SS (2011): Dairy farmers' reason for participation in the Danish control programme on bovine paratuberculosis. *Prev Vet Med* 98: 279–283.

Neumann S. Leber. In: Moritz A (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 7. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2014. p. 250–275.

Nielsen SS, Krogh K (2014): Developments in the Danish Control Program on Paratuberculosis. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma, Italy 2014, p. 21–26.

Nielsen SS, Toft N (2008): Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol* 129: 217-235.

Nielsen SS, Toft N (2012): Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 149: 6–10.

Nordlund KV, Goodger WJ, Petetier J and Collins MT (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.

Norton S, Heuer C, Jackson R (2009): A questionnaire-based cross-sectional study of clinical Johne's disease on dairy farms in New Zealand. *N Z Vet J* 57: 34-43.

Nusinovici S, Frössling J, Widgren S, Beaudeau F, Lindberg A (2015): Q fever infection in dairy cattle herds: increased risk with high wind speed and low precipitation. *Epidemiol Infect* 143: 3316–3326.

O.I.E. – World Organisation for Animal Health (2015): OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014 [aufgerufen am 17. März 2015]:
<<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>>

Orpin P, Sibley R (2014): A Review on Progress with Johne's Engagement Program in UK Dairy Herds. Proceedings of the 4th ParaTB-Forum, Parma Italy 2014, p. 79–90.

Orpin P, Sibley R (2016): Experiences with developing a commercial solution to Johne's control in UK. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 201–202.

Pickup RW, Rhodes G, Bull TJ, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Hurley M, Hermon-Taylor J (2006): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl Environ Microbiol* 72: 4067–4677.

Pillars RB, Bolton MW, Grooms DL (2011a): Case-control study: Productivity and longevity of dairy cows that tested positive for infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* as heifers compared to age-matched controls. *J Dairy Sci* 94: 2825–2831.

Pillars RB, Grooms DL, Woltanski JA, Blair E (2009): Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Prev Vet Med* 89: 191–196.

Pillars RB, Grooms DL, Gardiner JC, Kaneene JB (2011b): Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds. *Prev Vet Med* 98: 10–18.

Pinedo PJ, Rae DO, Williams JE, Donovan GA, Melendez P, Buergelt CD (2008): Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transbound Emerg Dis* 55: 125–133.

Pithua P, Espejo LA, Godden SM, Wells SJ (2013): Is an individual calving pen better than a group calving pen for preventing transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in calves? Results from a field trial. *Res Vet Sci* 95: 398–404.

Plain K, Marsh IB, Waldron AM, Galea F, Whittington AM, Saunders VF, Begg DG, de Silva K, Purdie AC, Whittington RJ (2014): High-Throughput Direct Fecal PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Sheep and Cattle. *J Clin Microbiol* 52: 745–757.

Pradhan AK, Van Kessel JS, Karns JS, Wolfgang DR, Hovingh E, Nelen KA, Smith JM, Whitlock RH (2009): Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States. *J Dairy Sci* 92: 1811–1825.

Pucken VB, Götz F, Mansfeld R, Moder S, Sauter-Louis C, Straubinger RK, Knubben-Schweizer G (2015): Der Tuberkulin-Hauttest: Literatur, Richtlinie und Umsetzung in der Praxis. *Tierärztl Prax* 43 (G):197–206.

Purkhart R, Köhler H, Liebler-Tenorio E, Meyer M, Becher G, Kikowatz A, Reinhold P (2011): Chronic intestinal *Mycobacteria* infection: discrimination via VOC analysis in exhaled breath and headspace of feces using differential ion mobility spectrometry. *J Breath Res* 5: 027103.

Pützschel R, Einax E, Zoche-Golob V, Donat K (2016): Verbreitung der Infektion mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Rinderbeständen in Sachsen und Thüringen auf Herdenebene. *Berl Münchner Tierärztl Wochenschr* 129, DOI 10.2376/0005-9366-16030.

Raizman EA, Fetrow J, Wells SJ, Godden SM, Oakes MJ, Vazquez G (2007b): 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: 179–195.

Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Fetrow J, Oakes JM (2007a): The associations between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Prev Vet Med* 80: 166–178.

Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Bey RF, Oakes MJ, Bentley DC, Olsen KE (2004): The distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci* 87: 2959–2966.

Raizman EA, Fetrow J, Wells S (2009): Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci* 92: 4929–4936.

Rangel SJ, Paré J, Doré E, Arango JC, Côté G, Buczinski S, Labrecque O, Fairbrother JH, Roy JP, Wellemans V, Fecteau G (2015): A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. *Can Vet J* 56: 169–177.

Regierungspräsidium Gießen (2015): Hessisches Paratuberkulose-Untersuchungsprogramm für Milchvieh- und Mutterkuhbetriebe, Stand 1. Mai 2015 [aufgerufen am 12. November 2016].
<https://lhl.hessen.de/irj/servlet/prt/portal/prtroot/slimp.CMReader/HMULV_15/LHL_Internet/med/b46/b460d9e0-2aa6-d417-9cda-a2b417c0cf46,22222222-2222-2222-2222-222222222222>

Ridge SE, Heuer C, Cogger N, Heck A, Moor S, Backer IM, Vaughan S (2010): Herd management practices and the transmission of Johne's disease within infected dairy herds in Victoria, Australia. *Prev Vet Med* 95: 86–197.

Ritter C, Kwong GP, Wolf R, Pickel C, Slomp M, Flaig J, Mason S, Adams CL, Kelton DF, Jansen J, De Buck J, Barkema HW (2015): Factors associated with participation of Alberta dairy farmers in a voluntary, management-based Johne's disease control program. *J Dairy Sci* 98: 7831–7845.

Ritter C, Jansen J, Roth K, Kastelic JP, Adams CL, Barkema HW (2016): Dairy farmers' perceptions towards improving on-farm Johne's disease prevention and control. *Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis*, Nantes, France, 2016, p. 134.

Roche S, Kelton D, Godkin A (2016): Motivating On-Farm Change for Johne's Disease Control Using Peer Learning and Whiteboard Videos. *Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis*, Nantes, France, 2016, p. 133.

Rogan WJ, Gladen B (1979): Estimating prevalence from results of a screening test. *Am J Epidemiol* 107: 71–76.

Roland L, Drillich M, Klein-Jöbstl D, Iwersen M (2016): Invited review: Influence of climatic conditions on the development, performance, and health of calves. *J Dairy Sci* 99: 2438–2452.

Rosenberger AE, Whitlock RH, Siebert M, Sweeney RW, Hutchinson LJ (1991): Isolation of *M. paratuberculosis* from the environment of dairy farms with a known history of Johne's disease. 3rd International Colloquium on Paratuberculosis 1991 [aufgerufen am 20. Mai 2015]:
<<http://www.paratuberculosis.info/proc3/page440.htm>>

Ruegg P. The Role of Veterinarians in Udder Health Programs. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 107–110.

Saegerman C, Speybroeck N, Dal Pozzo F, Czaplicki G (2015): Clinical indicators of exposure to *Coxiella burnetii* in dairy herds. *Transbound Emerg Dis* 62: 46–54.

Schaper E, Tipold A, Wöhlke A, Kleinsorgen C (2016): Eine Einführung in die tiermedizinische Fachdidaktik. *Tierärztl Umschau* 71: 416–427.

Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R (2013a): Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol* 79: 3027–3032.

Schmid A, Messelhäusser U, Hörmansdorfer S, Sauter-Louis C, Mansfeld R (2013b): Occurrence of zoonotic clostridia and *Yersinia* in healthy cattle. *J Food Prot* 76: 1697–703.

Schönenbrücher, H, Abdulmawjood A, Failing K, Bülte M (2008): New triplex real time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 74: 2751–2758.

Sibley R, Orpin P (2016): The practical implementation of a risk based Johne's disease management programme on large dairy herds. Proceedings of the 29th World Buiatrics Congress, Dublin, World Association for Buiatrics, Ireland, 2016, p. 197.

Schirmeier H (2014): Three years of mandatory BVD control in Germany - Lessons to be learned. Proceedings of the XXVII World Buiatrics Congress, Cairns, Australia, 2014, p. 245–248.

Skov MN, Carstensen B, Tornøe N, Madsen M (1999): Evaluation of sampling methods for the detection of *Salmonella* in broiler flocks. J Appl Microbiol 86: 695–700.

Schillinger S, Bridger PS, Bulun H, Fischer M, Akineden O, Seeger T, Barth S, Henrich M, Doll K, Bülte M, Menge C, Bauerfeind R (2013): Flow cytometric detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific antibodies in experimentally infected and naturally exposed calves. Clin Vaccine Immunol 20: 1457–1465.

Schlotter K, Hotzel H, Ehricht R, Pfeffer M, Monecke S, Donat K (2013): Phänotypisierung und Microarray-basierte Genotypisierung des Antibiotika-Resistenzverhaltens von MRSA und MSSA aus subklinischen Euterinfektionen. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 126: 37–45.

Schlotter K, Huber-Schlenstedt R, Gangl A, Hotzel H, Monecke S, Müller E, Reißig A, Proft S, Ehricht R (2014): Multiple cases of methicillin-resistant CC130 *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* in milk and swab samples from a Bavarian dairy herd. J Dairy Sci 97: 2782–2788.

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

Smith RL, Gröhn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, Wolfgang DR, Schukken YH (2016): The effects of progressing and nonprogressing *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on milk production in dairy cows. J Dairy Sci 99: 1383–1390.

Smith RL, Gröhn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, Wolfgang DR, Schukken YH (2009): A longitudinal study on the impact of Johne's disease status on milk production in individual cows. J Dairy Sci 92: 2653–2661.

Söllner S (2009): Verlauf einer zehnjährigen Paratuberkulosebekämpfung auf der Basis serologischer Untersuchungen in einer Thüringer Fleischrinderherde. Tagungsband des 7. Stendaler Symposium zur BHV-1, BVD, Paratuberkulose und Blauzungenerkrankung des Landesamtes für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt,

Fachbereich Veterinärmedizin in Zusammenarbeit mit der Tierärztekammer Sachsen-Anhalt, 11. bis 13. März 2009, Stendal, Deutschland.

Sorge US, Lissemore K, Godkin A, Jansen J, Hendrick S, Wells S, Kelton DF (2012): Risk factors for herds to test positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* antibodies with a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Ontario and western Canada. *Can Vet J* 53: 963–970.

Sorge US, Lissemore K, Godkin A, Hendrick S, Wells S, Kelton D (2011): Associations between paratuberculosis milk ELISA result, milk production, and breed in Canadian dairy cows. *J Dairy Sci* 94: 754–761.

Spreer S (2006). Auswertung ermittelter Stoffwechselbefunde sächsischer Milchviehbetriebe unter Berücksichtigung der serologischen Paratuberkuloseuntersuchung. [Diplomarbeit] Dresden, Hochschule für Technik und Wirtschaft, Dresden.

Stengärde L, Holtenius K, Tråvén M, Hultgren J, Niskanen R, Emanuelson U (2010) Blood profiles in dairy cows with displaced abomasum. *J Dairy Sci* 93: 4691–4699.

Stier C (2008): Untersuchung zur Auswirkung der Paratuberkulose auf ausgewählte Leistungsparameter in zwei Thüringer Milchviehbetrieben unter Berücksichtigung der Ergebnisse kultureller Paratuberkuloseuntersuchungen. [Diplomarbeit] Dresden, Hochschule für Technik und Wirtschaft, Dresden.

Sting R, Hrubenja M, Mandl J, Seemann G, Salditt A, Waibel S (2014): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time PCR in comparison to culture. *Vet J* 199:138–42.

Sweeney RW (1996): Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 12: 305–312.

Sweeney RW, Whitlock RH, Hamir AN, Herr SA (1992): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am J Vet Res* 53: 1312–1314

Sweeney RW, Whitlock RH, Mc Adams S, Fyock T (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 RW, Collin MT, Koets AP, McGuirk SM, Roussel AJ (2012): Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Intern Med* 26: 1239–1250.
- Szilágyi M, Koemendy B, Suri A, Tuboly S, Nagy G (1989): Experimental paratuberculosis (Johne's disease)-studies on biochemical parameters in cattle. *Arch Exp Veterinärmed* 43: 463–470.
- Tavornpanich S, Muñoz-Zanzi CA, Wells SJ, Raizman EA, Carpenter TE, Johnson WO, Gardner IA (2008): Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in Midwestern US dairy herds. *Prev Vet Med* 83: 65–82.
- Tavornpanich S, Wells SJ, Fossler CP, Roussel AJ, Gardner IA (2012): Evaluation of an alternative method of herd classification for infection with paratuberculosis in cattle herds in the United States. *Am J Vet Res* 73: 248–56.
- Thakur A., Aagaard C, Mikkelsen H, Andersen P, Jungersen G (2014): Post-exposure vaccination with multi-stage vaccine significantly reduces MAP level in tissues without interference in diagnostics. *Proceedings of the 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma, Italy*, p. 128.
- Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL) (2015): Entwicklung der Tierzucht in Thüringen, Berichtsjahr 2014. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena, 2015.
- Thüringer Ministerium für Soziales, Familie und Gesundheit (TMSFG) (2008): Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen. *ThürStAnz.* Nr. 16/2008: 556–559.
- Thüringer Ministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie (TMASGFF) (2015): Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen in Thüringen. *ThürStAnz.* Nr. 26/2015: 1087–1093.
- Tiwari A, Van Leeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Haddad JP, Scott HM, Whiting T (2009): Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Prev Vet Med* 88: 32–41.

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

United States Department of Agriculture (USDA) (2010): Herd classification. In: Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program, as of 1 September 2010, p. 19–24 [aufgerufen am 27. Februar 2014]: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/downloads/johnes-ups.pdf>.

Uzoigwe JC, Khaita ML, Gibbs PS (2007): Epidemiological Evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect* 135: 1057–1068.

Van Roermund HJW, Weber MF, de Koeijer AA, Velthuis AGJ, de Jong MCM (2005): Development of a milk quality assurance program for paratuberculosis: from within- and between-herd dynamics to economic decision analysis. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 2005, p. 51–59.

van Schaik G, Pradenas F M, Mella N A, Kruze VJ (2007): Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Prev Vet Med* 82: 159–65.

van Schaik G, Stehman SM, Schukken YH, Rossiter CR, Shin SJ (2003): Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. *J Vet Diagn Invest* 15: 233–41.

van Weering H, van Schaik G, van der Meulen A, Waal M, Franken P, van Maanen K (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.

Villarino MA, Scott HM, Jordan ER (2011): Influence of parity at time of detection of serologic antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on reduction in daily and lifetime milk production in Holstein cows. *J Anim Sci* 89: 267–276.

Waddell LA, Rajić A, Stärk KD, McEwen SA (2015a): The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol Infect.* 143: 3135–3157.

Waddell LA, Rajić A, Stärk KD, McEwen SA (2015b): The potential Public Health Impact of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: Global Opinion Survey of Topic Specialists. *Zoonoses Public Health* 63: 212–222.

Weber MF, Aalberts M, Schukken YH (2016): An update on Milk Quality Assurance for paratuberculosis in Dutch dairy herds. Proceedings of the 5th ParaTB-Forum, Nantes, France, 19th June 2016, p. 11–16.

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

Weber MF, Lam T (2012): Milk quality assurance for paratuberculosis in The Netherlands: achievements of 2006 to 2011. Abstract book of the XXVIIth World Buiatric Congress, Lissabon, Portugal, 2012, p. 25.

Wells SJ (2005): The prospects for herd level control of paratuberculosis – A scientists view. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 2005, p. 174–181.

Wernicke K (2016): Statistik zur BVD-Bekämpfung in Deutschland. Publikation des nationalen Referenzlabors für BVD/MD, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald Insel Riems, Stand 08.03.2016 [aufgerufen am 8. August 2016]:
<<https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IVD/BVD-Statistik2011-2015.pdf>>

Whan L, Ball HJ, Grant IR, Rowe MT (2005): Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl Environ Microbiol* 71: 7107–7112.

Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J (2000): ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol* 77: 387–398.

Whitlock RH, Buergelt C (1996): Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 345–356.

Whitlock RH, Hutchinson LT, Merkal RS (1985): Prevalence and economic consideration of Johne's disease in the north-eastern U.S. Proc US Anim Health Assoc. 89: 484–490.

Whittington RJ (2010): Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM (Hrsg): Paratuberculosis, organism, disease, control. Wallingford: CABI; p. 244–267.

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

Whittington RJ, Sergeant ESG (2001): Progress toward understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in animal populations. Aus Vet J 79: 267–278.

Whittington RJ, Windsor PA (2009): In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. Vet J 179: 60–69.

Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Orsel K (2015b): Sampling location, herd size and season influence *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* environmental culture results. J Dairy Sci 98: 275–287.

Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Orsel K (2015c): Factors affecting management changes on farms participating in a Johne's disease control program. J Dairy Sci 98: 7784–7796.

Wolf R, Orsel K, De Buck J, Barkema HW (2015a): Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms. Vet Res 46: 71–79.

Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Orsel K (2016c): Dairy farms testing positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* have poorer hygiene practices and are less cautious when purchasing cattle than test-negative herds. J Dairy Sci 99: 4526–4536.

Wolf R, Donat K, Khol JH, Barkema HW, Kastelic J, Wagner P (2016a) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infected cattle herds using environmental samples: A review. Berl Münchner Tierärztl Wochenschr 129, DOI 10.2376/0005-9366-16023.

Wolf R, Orsel K, DeBuck J, Kanevets U, Barkema HW (2016b): Evaluation of sampling socks for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on dairy farms. J Dairy Sci 99: 2950–2955.

Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Slomp M, Flaig J, Hauptstein D, Pickel C, Orsel K (2014): High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling. J Dairy Sci 97: 6250–6259.

7 Darstellung des eigenen Anteils an der wissenschaftlichen Arbeit

Publikation 1

Donat K, Schau U, Soschinka A (2011): Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mit Hilfe von Umgebungskotproben. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 10–17.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat
2. Studiendurchführung: Schau, Donat
3. Auswertung der Ergebnisse: Donat, Soschinka
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Soschinka, Schau
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 2

Donat K, Kube J, Dressel J, Einax E, Pfeffer M, Failing K (2015): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. *Epidemiol Infect* 143: 975–985.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Deutschland

Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Straße 95, 35392 Gießen, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat, Einax
2. Studiendurchführung: Kube, Dressel, Einax, Donat
3. Auswertung der Ergebnisse: Failing, Donat, Kube, Pfeffer
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Pfeffer, Failing, Einax
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 3

Klawonn W, Einax E, Pützschel R, Schmidt M, Donat K (2016): Johne's disease: Reliability of environmental sampling to characterize MAP-infection in beef cow-calf herds. *Epidemiol Infect* 144: 2392–2400.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Referat Tiergesundheit und tierärztliche Umwelthygiene, Mainzer Str. 112, 56068 Koblenz, Deutschland

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Sächsische Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst, Löwenstraße 7a, 01099 Dresden, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat, Klawonn, Einax
2. Studiendurchführung: Klawonn, Einax, Donat, Pützschel, Schmidt
3. Auswertung der Ergebnisse: Klawonn, Donat, Einax, Pützschel, Schmidt
4. Erstellung des Manuskripts: Klawonn, Donat, Einax
5. Korrespondierender Autor: Klawonn

Publikation 4

Donat K, Hahn N, Eisenberg T, Schlez K, Köhler H, Wolter W, Lenz M, Noll I, Pützschel R, Failing K, Zschöck M (2016): Within-herd prevalence threshold for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* positive dairy herds using boot swabs or liquid manure samples. *Epidemiol Infect* 144: 413–424.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL), Abteilung II Veterinärmedizin, Schubertstraße 60, 35392 Gießen, Deutschland

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für molekulare Pathogenese, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Deutschland

Regierungspräsidium Gießen, Dezernat Qualitätssicherung für Öko-, pflanzliche Produkte und Milch, Schanzenfeldstrasse 8, 35578 Wetzlar, Deutschland

Sächsische Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst, Löwenstraße 7a, 01099 Dresden, Deutschland

Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Straße 95, 35392 Gießen, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Zschöck, Donat, Eisenberg, Lenz, Köhler, Failing, Wolter
2. Studiendurchführung: Hahn, Köhler, Lenz, Pützschel, Noll, Eisenberg, Schlez
3. Auswertung der Ergebnisse: Failing, Donat, Hahn, Eisenberg, Köhler, Pützschel
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Köhler, Failing, Eisenberg
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 5

Donat K, Schau U, Soschinka A, Köhler H (2011): Untersuchungen zur Herdenprävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderbeständen mit Hilfe serologischer Testverfahren: Möglichkeiten, Grenzen und Kosten. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 125: 361-370.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für molekulare Pathogenese, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat
2. Studiendurchführung: Donat, Schau
3. Auswertung der Ergebnisse: Donat, Soschinka, Schau
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Soschinka, Köhler
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 6

Donat K, Schlotter K, Erhardt G, Brandt HR (2014): Prevalence and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. Vet Rec 174: 119.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität Gießen, Ludwigstraße 21b, 35390 Gießen, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat, Brandt
2. Studiendurchführung: Donat, Brandt
3. Auswertung der Ergebnisse: Brandt, Donat, Schlotter
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Schlotter, Erhardt, Brandt
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 7

Donat K, Soschinka A, Erhardt G, Brandt HR (2014): Paratuberculosis: Decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* depends on within-herd prevalence. *Animal* 8: 852–858.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität Gießen, Ludwigstraße 21b, 35390 Gießen, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat, Brandt
2. Studiendurchführung: Donat, Brandt
3. Auswertung der Ergebnisse: Brandt, Soschinka, Donat
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Soschinka, Erhardt, Brandt
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 8

Donat K, Erhardt G, Soschinka A, Brandt HR (2014): Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* shedding in German Holstein cows. Vet Rec 174: 408.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität Gießen, Ludwigstraße 21b, 35390 Gießen, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat
2. Studiendurchführung: Donat, Brandt
3. Auswertung der Ergebnisse: Brandt, Donat, Soschinka
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Erhardt, Soschinka, Brandt
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 9

Donat K, Schmidt M, Köhler H, Sauter-Louis C (2016): Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. J Dairy Sci 99: 3744-3752.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für molekulare Pathogenese, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Deutschland

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie, Südufer 10, 17493 Greifswald Insel Riems, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat, Sauter-Louis, Köhler
2. Studiendurchführung: Donat, Schmidt
3. Auswertung der Ergebnisse: Donat, Sauter-Louis, Schmidt
4. Erstellung des Manuskripts: Donat, Sauter-Louis, Köhler
5. Korrespondierender Autor: Donat

Publikation 10

Donat K (2016): The Thuringian bovine paratuberculosis control programme – results and experiences. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129: DOI 10.2376/0005-9366-129-15129.

Folgende Institutionen waren an der Publikation beteiligt:

Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Deutschland

1. Idee und Studienplanung: Donat
2. Studiendurchführung: Donat
3. Auswertung der Ergebnisse: Donat
4. Erstellung des Manuskripts: Donat
5. Korrespondierender Autor: Donat

8. Danksagung

Eine kumulative Habilitationsschrift wie diese ist niemals nur das Ergebnis des Engagements ihres Autors, sondern das Resultat der wissenschaftlichen und praktischen Arbeit vieler Beteiligter. Das verbindende Thema war das Wirken für die Bekämpfung der Paratuberkulose, sei es aus bekämpfungsstrategischer, diagnostischer oder tierzüchterischer Sicht. Es war eine persönliche Freude und wahrhaftige Bereicherung meines beruflichen Wirkens der letzten zehn Jahre, alle diese Kolleginnen und Kollegen kennen und schätzen zu lernen, mit ihnen gemeinsam so manche Herausforderung gemeistert zu haben und dabei einen Beitrag zu leisten, um die Bekämpfung der Paratuberkulose in Thüringen und darüber hinaus voranzubringen.

Herrn Prof. Dr. Axel Wehrend danke ich sehr herzlich für seine konstruktiven Ratschläge, hilfreichen Empfehlungen und die Unterstützung am Fachbereich.

Allen Koautoren, deren Mitarbeit diese wissenschaftliche Arbeit erst ermöglichte, allen voran Frau Dr. Heike Köhler, Herrn Prof. Dr. Georg Erhardt, Herrn apl. Prof. Dr. Horst R. Brandt, Herrn Dr. Klaus Failing, Frau Dr. Carola Sauter-Louis und Herrn Prof. Dr. Martin Pfeffer sei in besonderer Weise gedankt.

Fundament dieser wissenschaftlichen Studien ist die tägliche Arbeit aller Mitarbeiter der Thüringer Tierseuchenkasse und ihres Tiergesundheitsdienstes im Labor, im Außendienst und in der Verwaltung, ohne die keine der Studien möglich gewesen wäre. Ihnen allen gebührt mein höchster Dank und meine Anerkennung für die geleistete Arbeit.

Den Thüringer Rinderhaltern, landwirtschaftlichen Verbänden, Tierärzten und Veterinärbehörden danke ich für die Beteiligung am und Unterstützung des Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Thüringer Rinderbeständen.

Meinen im Rindergesundheitsdienst tätigen Kolleginnen und Kollegen Wolfram Klawonn, René Pützschel, Mandy Schmidt, Karin Eulenberger, Irene Noll, Miriam Rothe und Winfried Wolter sowie den Kollegen des Landesbetriebs Hessisches Landeslabor um Peter-Michael Zschöck und Tobias Eisenberg danke ich für die sehr kooperative Zusammenarbeit im Rahmen länderübergreifender Projekte - es war mir eine Freude!

Ein großes Dankeschön geht an Anneka Soschinka, Stefanie Söllner-Donat, Sarah Hoffmann, Claudia Bloy und Derek Darvill für die kurzfristige und gewissenhafte Durchsicht des Manuskripts.

Mein größter, herzlichster und wärmster Dank gebührt meiner Ehefrau Stefanie und meinen Kindern Christiane, Julius und Luise, sowie meinen Eltern und Schwiegereltern. Ohne die Liebe und Wärme dieser Familie, Eure Geduld, Toleranz und Unterstützung wäre mir das Schreiben nicht möglich gewesen. Seid alle umarmt!

Anhang

Tab. 1: Entwicklung des wirtschaftlichen Verlustes durch Paratuberkulose in einer Herde mit 50 Milchkühen einem Szenario mit Bekämpfung (Milchpreis: 0,30 Euro/kg, Diagnosekosten je Kuh und Jahr: 20,00 Euro) auf Basis der in Thüringen beobachteten Senkung der scheinbaren Intraherdenprävalenz

	Jahr 0	Jahr1	Jahr 2	Jahr 3	Jahr 4	Jahr 5	Jahr 6	kumu- lativ
Entwicklung scheinbarer Prävalenz [%] ¹⁾	14,50	10,70	9,27	9,55	8,37	6,41	5,57	
kulturell MAP-positive Kühe [n]	7,3	5,4	4,6	4,8	4,2	3,2	2,8	
Diagnoseaufwand, Kuh [€]	20	20	20	20	20	20	20	
Diagnoseaufwand, Herde [€]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
Diagnoseaufwand, abgezinst [€] ²⁾	1000	990	980	971	961	951	942	6.795
entgangene Milch/Kuh/Tag nach Prävalenzklasse [kg] ³⁾	1,9	1,9	1,7	1,7	1,7	1,7	0	
Minderertrag Milch /Kuh/Tag [€]	0,57	0,57	0,51	0,51	0,51	0,51	0,00	
Minderertrag Milch/Kuh/305Tage-Laktation [€]	174	174	156	156	156	156	0	
Minderertrag Milch/Herde [€]	1.260	930	721	743	651	499	0	
längere Zwischenkalbezeit (d) ⁴⁾	2	2	2	2	2	2	2	
Minderertrag aus längerer Zwischenkalbezeit/Kuh [€]	4	4	4	4	4	4	4	
Minderertrag aus längerer Zwischenkalbezeit/Herde [€]	29	21	19	19	17	13	11	
mittlerer Schlachterlös/Kuh [€] ⁵⁾	524	524	524	524	524	524	524	
Minderertrag aus Schlachtung [€] ⁶⁾	1.178	869	753	776	680	521	452	
Minderertrag insgesamt [€]	2.467	1.821	1.492	1.538	1.348	1.032	464	
Mehrertrag gegenüber Jahr 0 [€]	0	647	975	930	1.120	1.435	2.004	
Mehrertrag abgezinst [€] ²⁾	0	640	955	902	1.076	1.365	1.887	6.827

1) nach DONAT et al., 2016 (Studie 10)

2) kalkulatorischer Zinssatz: 1,00 % (gültig für 2016)

3) nach DONAT et al., 2014 (Studie 8)

4) nach KÜPPER et al., 2013

5) nach Daten der Thüringer Tierseuchenkasse, mittlere Schlachterlöse bei tierseuchenrechtlichen Entschädigungen im Jahr 2016

6) nach KUDAHL & NIELSEN, 2009: 31 % für kulturell MAP-positive Kühe

Tab. 2: Entwicklung des wirtschaftlichen Verlustes durch Paratuberkulose in einer Herde mit 50 Milchkühen in einem Szenario ohne Bekämpfung (Milchpreis: 0,30 Euro/kg) auf Basis einer modellierten¹⁾ Steigerung der wahren Intraherdenprävalenz

	Jahr 0	Jahr1	Jahr 2	Jahr 3	Jahr 4	Jahr 5	Jahr 6	Kumu- lativ
Entwicklung der wahren Prävalenz [%] ¹⁾	18,0	20,0	22,0	24,0	25,5	27,0	28,5	
Entwicklung der scheinbaren Prävalenz [%] ²⁾	12,6	14,0	15,4	16,8	17,8	18,9	19,9	
kulturell MAP-positive Kühe [n]	6,3	7,0	7,7	8,4	8,9	9,5	10,0	
Diagnoseaufwand [€]	0	0	0	0	0	0	0	
Diagnoseaufwand, abgezinst [€] ³⁾	0	0	0	0	0	0	0	0
entgangene Milch/Kuh/Tag nach Prävalenzklasse [kg] ⁴⁾	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Minderertrag Milch /Kuh/Tag [€]	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57
Minderertrag Milch/Kuh/305Tage-Laktation [€]	174	174	174	174	174	174	174	174
Minderertrag Milch/Herde [€]	1.095	1.217	1.339	1.460	1.552	1.643	1.734	
längere Zwischenkalbezeit (d) ⁵⁾	2	2	2	2	2	2	2	2
Minderertrag aus längerer Zwischenkalbezeit/Kuh [€]	4	4	4	4	4	4	4	4
Minderertrag aus längerer Zwischenkalbezeit/Herde [€]	25	28	31	34	36	38	40	
entgangener Schlachterlös [€] ⁶⁾	524	524	524	524	524	524	524	524
Minderertrag aus Schlachtung [€] ⁷⁾	1.023	1.137	1.251	1.364	1.450	1.535	1.620	
Minderertrag insgesamt [€]	2.144	2.382	2.620	2.858	3.037	3.216	3.394	
Minderertrag insgesamt, abgezinst [€] ³⁾	2.144	2.358	2.569	2.774	2.919	3.060	3.198	19.021
Minderertrag gegenüber Jahr 0 [€]	0	238	476	715	893	1072	1251	
Minderertrag gegenüber Jahr 0, abgezinst [€] ³⁾	0	236	467	694	858	1020	1178	4.453

1) nach GROENENDAAL et al., 2002

2) Umrechnung in scheinbare Prävalenz kulturell positiver Tiere bei angenommener Sensitivität von 70 % und Spezifität von 100 % für die Kotkultur
3) kalkulatorischer Zinssatz: 1,00 % (gültig für 2016)

4) nach DONAT et al, 2014

5) nach KÜPPER et al., 2013

6) nach Daten der Thüringer Tierseuchenkasse, mittlere Schlachterlöse bei tierseuchenrechtlichen Entschädigungen im Jahr 2016

7) nach KUDAHL & NIELSEN, 2009: 31 % für kulturell MAP-positive Kühe



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6644-4



9 783835 196644