

CHRIS PICKRODT

Paratuberkulose in Milchziegenhaltungen

Ermittlung von Infektionsquellen mit Relevanz für
das Tiergesundheitsmanagement im Bestand



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

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

1. Auflage 2024

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2024

© 2024 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde

Betreuer: apl. Prof. Dr. Karsten Donat

Paratuberkulose in Milchziegenhaltungen

—

Ermittlung von Infektionsquellen mit Relevanz für das Tiergesundheitsmanagement im Bestand

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Chris Pickrodt

Tierärztin aus Erfurt

Gießen 2024

Mit der Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: apl. Prof. Dr. Karsten Donat
Prof. Dr. Walter Grünberg

Tag der Disputation: 16. April 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	5
2.1 Erreger, Erkrankung und Epidemiologie	5
2.1.1 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	5
2.1.2 Vorkommen und Verbreitung	6
2.1.3 Klinische Symptomatik und Erkrankungsstadien	8
2.1.4 Pathologie und Pathogenese	10
2.1.5 Infektionswege	11
2.2 Bedeutung und Bekämpfung	13
2.2.1 Auswirkungen auf die Lebensmittelproduktion, die Betriebsökonomie und die öffentliche Gesundheit	13
2.2.2 Methoden der Paratuberkulose-Diagnostik	15
2.2.3 Strategien und Maßnahmen zur Bekämpfung und Prävention	17
3 Eigene Untersuchungen	21
3.1 Studiendesign	21
3.2 Eigene Publikationen	23
3.2.1 Studie 1	23
3.2.2 Studie 2	42
4 Diskussion	55
4.1 Diskussion der Fragestellung	55
4.2 Diskussion der Methode	58
4.2.1 Allgemeines Studiendesign	58
4.2.2 Studie 1	59
4.2.3 Studie 2	63

4.3	Diskussion der Ergebnisse	66
4.3.1	Wie ist MAP in der Stallumgebung einer infizierten Milchziegenherde verbreitet und können hierbei räumliche sowie zeitliche Unterschiede festgestellt werden?	66
4.3.2	Welche Risiken birgt das Saugen der Ziegenlämmer an der Mutter im Vergleich zum Vertränken von ermolkenem Kolostrum hinsichtlich der Übertragung von MAP?	74
4.3.3	Schlussfolgerungen für die Unterbrechung von Infektketten in Milchziegenhaltungen	79
5	Zusammenfassung.....	87
6	Summary.....	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Abbildungsverzeichnis	111
9	Publikationsverzeichnis	112
9.1	Publikationen mit Peer-Review-Verfahren.....	112
9.2	Publizierte Abstracts.....	112
10	Danksagung.....	114
11	Selbstständigkeitserklärung	115

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
C _t	englisch: cycle threshold
ELISA	englisch: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	lateinisch: et alii
EU	Europäische Union
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
KbE	Koloniebildende Einheiten
NRL	Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
ml	Milliliter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion / englisch: polymerase chain reaction
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion / englisch: real-time quantitative polymerase chain reaction

1 Einleitung

Im Jahr 2015 überschritt die Gesamtzahl der weltweit gehaltenen Ziegen erstmals die Milliardengrenze. Im Zuge dieser Entwicklung ist auch im deutschen Ziegenbestand eine Erhöhung der Einzeltierzahl pro Betrieb zu beobachten (Statistisches Bundesamt 2021; Food and Agriculture Organization of the United Nations 2023). Neben der Landschaftspflege gewinnt die Produktion von Ziegenmilch und -fleisch an Bedeutung. Aus betriebswirtschaftlichen Gründen haben sich insbesondere große Milchziegenbestände etabliert, verbunden mit einer Intensivierung des Tierhandels zwischen verschiedenen Betrieben. Gleichzeitig mit dem Tierverkehr erhöht sich das Risiko der Einschleppung und Verbreitung von Tierseuchen (Fèvre et al. 2006; Sherman 2011).

Die Verknüpfung von Herdenmanagement und tierärztlicher Bestandsbetreuung gewinnt daher, insbesondere in Großbeständen, zunehmend an Bedeutung. Tiergesundheitsliche Problematiken, die eine größere Anzahl von Tieren betreffen - hervorgerufen durch Infektionserreger oder sogenannte Faktorenerkrankungen - haben im Gegensatz zu individuellen Einzeltierkrankungen oft maßgebliche Auswirkungen auf die Herde und damit das Betriebsergebnis. Eine ausschließlich symptomatische Behandlung einzelner Tiere führt nur selten zur Beseitigung des zugrundeliegenden Problems. Dadurch besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass auch in der Zukunft erneute Fälle auftreten werden.

Ein Exempel für eine Infektionskrankheit, die oft initial durch den Handel mit infizierten Tieren eingeschleppt wird und das Potenzial hat, die Tiergesundheit in Wiederkäuerbetrieben deutlich zu beeinträchtigen, ist die Paratuberkulose (Sweeney 1996; Whittington und Sergeant 2001; Rangel et al. 2015).

In der Europäischen Union (EU) ist die Paratuberkulose gemäß dem Tiergesundheitsrechtakt gelistet und stellt somit eine Krankheit von öffentlichem Interesse dar. Sie ist als eine Seuche kategorisiert, für die innerhalb der EU ein Monitoring erforderlich ist (Kategorie E) (Europäische Kommission 2018). Dies ist auf die unmittelbaren Auswirkungen auf die Tiergesundheit und die wirtschaftlichen Einbußen für die betroffenen Tierhaltungen zurückzuführen.

Pathologisch betrachtet handelt es sich bei der Paratuberkulose um eine chronisch progressive granulomatöse Form der Enteritis, die durch eine Infektion mit

Einleitung

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) verursacht wird. Im Verlauf der mehrjährigen Inkubationszeit kommt es aufgrund der Veränderungen der Darmmukosa zu einer zunehmenden Nährstoffmalabsorption und einem Proteinmangel (Chiodini et al. 1984; Whitlock et al. 1986; Tiwari et al. 2006). Dies führt im weiteren Krankheitsverlauf bei den meisten Tieren zu einer reduzierten Milchleistung (McAloon et al. 2016), fortschreitender Abmagerung und infolgedessen zu einem verringerten Schlachterlös (Kudahl und Nielsen 2009). Aufgrund der chronischen Natur der Erkrankung ist eine vollständige Rekonvaleszenz von Tieren im klinischen Stadium nicht möglich. Die Krankheit kann letztendlich zum Tod des betroffenen Tieres führen (Fecteau und Whitlock 2011; Idris et al. 2022). Die erhöhte Abgangsrate aufgrund des Ausscheidens von leistungsschwachen Tieren erfordert eine verstärkte Remontierung aus der betriebseigenen Nachzucht oder den Zukauf aus anderen Betrieben. Neben diesen direkten Verlusten entstehen dem Tierhalter weitere Kosten für Diagnostik sowie durchgeführte Bekämpfungs- und Sanierungsmaßnahmen (Hasonova und Pavlik 2006; Khol et al. 2019; Idris et al. 2022).

Um die weitere Ausbreitung der Paratuberkulose in einem betroffenen Bestand zu verhindern und die Gesundheit sowie die Leistungsfähigkeit der Tiere zu fördern, ist die Prävention von Neuinfektionen von entscheidender Bedeutung. Dieser Aspekt ist ein wesentlicher Bestandteil vieler Sanierungsprogramme (Sweeney 1996; Whittington et al. 2019). Verfahren, die ausschließlich auf die Identifizierung und Entfernung infizierter Tiere ausgerichtet waren („Test-and-Cull“-Prinzip), haben nicht die gewünschten Erfolge erzielt (McKenna et al. 2006; Windsor 2015; Whittington et al. 2019). Um das Ziel einer Bestandssanierung zu erreichen, ist es daher von entscheidender Bedeutung, genaue Kenntnisse über die verschiedenen möglichen Übertragungswege von MAP und damit einhergehend potenzielle Infektionsquellen zu haben. Nur so können effektive Maßnahmen in das Herdenmanagement implementiert werden, um die Paratuberkulose-Prävalenz im Bestand nachhaltig zu senken (Groenendaal et al. 2002; Whittington et al. 2019).

Die konsequente Unterbindung des Kontaktes zwischen Jungtier und Erreger ist aufgrund der hohen Empfänglichkeit dieser Altersgruppe für eine Infektion ein wesentlicher Faktor bei der Verhinderung von Neuinfektionen (Sweeney 1996;

Einleitung

Windsor und Whittington 2010). Es gibt verschiedene potenzielle Übertragungswege für MAP, wobei der fäkal-oralen Route die größte Bedeutung zugeschrieben wird (Sweeney 1996; Doré et al. 2012). MAP konnte bereits mehrfach in Einstreu und Staub aus Rinderställen sowie in deren Futter, Wasser und im Kolostrum nachgewiesen werden (Pillars et al. 2009; Eisenberg et al. 2010a; Stabel et al. 2014). Hingegen mangelt es an vergleichbaren Untersuchungen in Ziegenhaltungen, welche die genauen Übertragungswege der Paratuberkulose in diesen Betrieben besser zu verstehen helfen. Dies umfasst die Identifizierung möglicher Infektionsquellen und Übertragungsmechanismen von MAP, da epidemiologische Unterschiede zwischen Ziegen und Rindern nicht ausgeschlossen werden können (Barkema et al. 2018). Hierbei ist die Rolle von infizierten Tieren, von Vektoren, von Infektionswegen und möglichen Umweltreservoirs, in denen der Erreger persistiert, zu klären. Die Bedeutung von stark mit MAP belasteten Stallbereichen sowie das vom Saugen am Euter der Mutterziege ausgehende Risiko für das Lamm sind dabei von besonderem Interesse.

Zum gegenwertigen Zeitpunkt existieren Empfehlungen für Hygienemaßnahmen bei der Haltung von Wiederkäuern in Bezug auf die Paratuberkuloseprävention ausschließlich für Rinder (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2014). Des Weiteren werden Ziegen in nur einem der zehn regionalen Paratuberkulose-Bekämpfungsprogramme in deutschen Bundesländern explizit berücksichtigt (Sächsisches Staatsministerium für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt und Sächsische Tierseuchenkasse 2022), und auch hier lediglich im Sinne eines verstärkten Krankheitsmonitorings. Es ist vor allen Dingen aus betriebsstrukturellen und -ökonomischen Gründen nicht möglich, sämtliche für Rinderhaltungen ausgesprochene Empfehlungen auf Ziegenbestände zu projizieren. Außerdem kann die Wirksamkeit dieser Maßnahmen zur Infektionsprävention in Ziegenhaltungen nur geschätzt werden, da bisher eine Evaluierung der Übertragbarkeit der Erkenntnisse über das Vorkommen und die Übertragung von MAP von Rinder- auf Ziegenbestände fehlt.

Die Entwicklung und Verbesserung von diagnostischen Verfahren zum Nachweis von MAP auch außerhalb infizierter Tiere ist notwendig, um aussagekräftige und zuverlässige Ergebnisse für diese Fragestellung zu erhalten. Standardisierte und hinsichtlich ihrer Testcharakteristika, insbesondere der minimalen Nachweisgrenze,

Einleitung

evaluierte Nachweismethoden müssen etabliert und nachfolgend in der praktischen Anwendung untersucht werden.

Die Erforschung der genannten Aspekte kann dazu beitragen, die Übertragung der Paratuberkulose in Milchziegenherden besser zu verstehen und effektivere Strategien zur Prävention, Kontrolle und Sanierung dieser Erkrankung zu entwickeln. Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse sollen dabei helfen, für Ziegenbestände angepasste Empfehlungen für Maßnahmen zur Unterbrechung von Infektketten der Paratuberkulose abzuleiten.

Daher befasst sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

- Wie ist MAP in der Stallumgebung einer infizierten Milchziegenherde verbreitet und können hierbei räumliche sowie zeitliche Unterschiede festgestellt werden?
- Welche Risiken birgt das Saugen der Ziegenlämmer an der Mutter im Vergleich zum Vertränken von ermolkendem Kolostrum hinsichtlich der Übertragung von MAP?

2 Literaturübersicht

Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Paratuberkulose erstmals durch den deutschen Veterinärmediziner Heinrich Albert Johne bei einem Rind beschrieben (Johne und Frothingham 1895) und ist heute weithin auch als Johnesche Erkrankung (englisch: Johne's disease) bekannt. Einige Zeit später folgte die Dokumentation natürlicher Infektionen bei Schafen und Ziegen (M'Fadyean und Seather 1916). Erst mehr als zehn Jahre nach der ersten Fallbeschreibung gelang Twort und Ingram (1912) die Anzucht von MAP aus Proben eines klinisch erkrankten Rindes.

Im Laufe des letzten Jahrhunderts hat sich die Erkrankung zu einer ernstzunehmenden globalen tiergesundheitslichen und ebenso wirtschaftlich relevanten Problematik in kommerziellen Wiederkäuerhaltungen entwickelt. Dabei ist das speziesspezifische Wissen über die Paratuberkulose für Ziegen deutlich geringer als für Rinder und Schafe. Dies ist unter anderem auf das wirtschaftliche Interesse und in diesem Zusammenhang auf die zur Verfügung stehenden Forschungsgelder zurückzuführen (Windsor 2015). Viele Sachverhalte werden trotz teilweise bereits bekannter bestehender Unterschiede, beispielsweise in der klinischen Ausprägung der Erkrankung, in Ermangelung entsprechender Untersuchungen bei Ziegen auf diese übertragen (Stehman 1996; Barkema et al. 2018). Inzwischen hat sich die Forschung aber auch dieser bisher unterrepräsentierten Gattung verstärkt zugewandt.

2.1 Erreger, Erkrankung und Epidemiologie

2.1.1 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

Der Erreger der Paratuberkulose ist ein schwach gram-positives, säurefestes, stäbchenförmiges Bakterium (Clarke 1997; Chiodini et al. 1984). Zugeordnet zur Gruppe der nicht-tuberkulösen Mykobakterien ist MAP vom *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex, welcher unter anderem die tiermedizinisch relevanten Erreger *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium caprae* beinhaltet, abzugrenzen.

MAP wächst aerob, zeigt jedoch im Vergleich zu anderen Mykobakterien ein charakteristisch langsames Wachstum. Selbst unter optimalen Wachstumsbedingungen liegt die Generationszeit bei über 24 Stunden (Twort und Ingram 1912; Lambrecht et al. 1988). Dieses Charakteristikum wird teilweise auch zur Abgrenzung von meist apathogenen, schnell wachsenden

Mykobakterien herangezogen. Ein weiteres Differenzierungsmerkmal stellt die Notwendigkeit der Zugabe von Mycobactin bei der Kultivierung von MAP dar. Dies ist erforderlich, da MAP aufgrund einer Genmutation im Gegensatz zu anderen Mykobakterien nicht in der Lage ist, das für den Eisentransport in die Zelle notwendige Siderophor selbst zu synthetisieren (Merkal und Curran 1974; Li et al. 2005).

Wie für Mykobakterien typisch, weist auch MAP eine komplexe hydrophobe Zellwandstruktur auf. Deren hoher Lipidgehalt ist nicht nur für die Säurefestigkeit verantwortlich, sondern trägt auch maßgeblich zur Resistenz gegenüber wasserlöslichen Desinfektionsmitteln und Antibiotika bei (Chiodini et al. 1984; Jarlier und Nikaido 1994; Clarke 1997; Rowe und Grant 2006).

MAP zeigt mit einer Überlebensfähigkeit in der Umwelt von bis zu 55 Wochen auf schattig-trockenem Untergrund auch außerhalb eines Wirtes eine hohe Tenazität. Umwelteinflüsse wie ultraviolette Strahlung, Feuchtigkeit und ein niedriger pH-Wert des Bodens scheinen die Lebensfähigkeit des Erregers nur geringfügig zu beeinflussen. Dagegen wirken sich tageszeitliche Temperaturunterschiede und damit verbunden die Einwirkung von Infrarotstrahlung negativ aus (Whittington et al. 2004; Elliott et al. 2015). MAP zeigt dennoch eine hohe Resistenz gegenüber Temperaturextremen. Weder eine Pasteurisierung noch ein mehrmonatiges Einfrieren bei -70 °C führen zu einer Abtötung aller Erreger in den jeweiligen Probenmaterialien (Grant et al. 1998; Raizman et al. 2011).

2.1.2 Vorkommen und Verbreitung

Die Hauptwirtsspezies für MAP stellen sowohl Haus- als auch Wildwiederkäuer dar. Eine Isolation gelang darüber hinaus auch aus zahlreichen anderen Vertebratenarten, einschließlich dem Menschen (Ayele et al. 2001; Kennedy und Benedictus 2001; Waddell et al. 2016). Die Paratuberkulose ist weltweit verbreitet. Konkrete Daten zur Prävalenz, insbesondere differenziert nach Wiederkäuerspezies, liegen jedoch nur aus wenigen Ländern vor. Dies ist eine Konsequenz der Bedeutung, die der Erkrankung in den jeweiligen Staaten beigemessen wird, und den damit einhergehenden Maßnahmen zu ihrer Überwachung. Zusätzlich erschwert die Komplexität der Identifizierung infizierter Tiere sowie die Verwendung unterschiedlicher diagnostischer Methoden die Evaluation und den Vergleich existierender Daten aus verschiedenen Untersuchungen. Die wahre Prävalenz der Paratuberkulose kann daher stets nur

Literaturübersicht

annähernd geschätzt werden (Whittington und Sergeant 2001; Tiwari et al. 2006; Nielsen und Toft 2008; Barkema et al. 2018).

Die Paratuberkulose-Prävalenz variiert in Abhängigkeit von geographischen Regionen, Rassen und Haltungsformen (Sorge et al. 2011; Stau et al. 2012; Whittington et al. 2019; de Lacerda Roberto et al. 2021; Eisenberg et al. 2022). Länder mit bedeutender Milchwirtschaft sowie intensive Tierhaltungen mit großen Tierzahlen weisen vermehrt hohe Prävalenzen auf. Dabei wird die Verbreitung bei Milchrindern höher eingeschätzt als bei Fleischrindern (Ayele et al. 2001; Barkema et al. 2018; Whittington et al. 2019). Dies verdeutlicht den direkten Einfluss individueller Betriebscharakteristika.

Auch in Deutschland konnten bei Milchrindern signifikante regionale Unterschiede hinsichtlich der Paratuberkulose-Prävalenz auf Herdenebene festgestellt werden. Dabei lag der Anteil positiver Bestände im Osten mit 50,1 % deutlich über dem im Norden (14,8 %) und Süden (3,6 %) des Landes. Die Ursache für diese Ungleichheit ist wahrscheinlich auf die von Region zu Region deutlich voneinander abweichenden Haltungs- und Managementbedingungen der Herden zurückzuführen (Eisenberg et al. 2022). Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Verbreitung der Paratuberkulose bei kleinen Wiederkäuern in Deutschland variieren je nach Studie erheblich. Hierbei stehen deutschlandweit ermittelte Herdenprävalenz von 65 % positiver Schaf- und 71 % positiver Ziegenbestände (Stau et al. 2012) aktuellen regionalen Angaben von 22 % beziehungsweise 18 % gegenüber (Moog et al. 2023). Aus den momentan vorliegenden Ergebnissen kann daher die tatsächliche Verbreitung nur eingeschränkt beurteilt werden.

Der Tierhandel trägt in besonderem Maße zur Ausbreitung der Paratuberkulose bei. Die Ersteinschleppung in beziehungsweise die Übertragung zwischen verschiedenen Beständen erfolgt in erster Linie durch den Zukauf subklinisch infizierter Tiere (Sweeney 1996; Rangel et al. 2015; Wolf et al. 2016). Da MAP bereits während dieser asymptomatischen Erkrankungsphase ausgeschieden werden kann, ist eine unbemerkte Ausbreitung in einer naiven Herde und deren Umgebung möglich. Zwischen dem initialen Eintrag und dem Auftreten erster klinischer Symptome respektive der ersten Diagnosedstellung können mehrere Jahre vergehen. Oft lassen sich deshalb bei anschließend durchgeführten Gesamtbestandsuntersuchungen hohe

Intraherden-Prävalenzen feststellen (Harris und Barletta 2001; Whittington und Sergeant 2001; Tiwari et al. 2006).

Ohne die Einführung von flächendeckenden Kontroll- und Sanierungsprogrammen für alle Wiederkäuerspezies ist mit einer weiteren Ausbreitung der Erkrankung zu rechnen (Kennedy und Benedictus 2001; Whittington et al. 2019)

2.1.3 Klinische Symptomatik und Erkrankungsstadien

Allen Wiederkäuern gemeinsam ist eine langsam fortschreitende Abmagerung trotz zumeist unbeeinträchtigter Futteraufnahme, hervorgerufen durch eine digestive Dysfunktion (Clarke 1997). Insbesondere Rinder entwickeln häufig eine anfangs intermittierende, später permanente, therapieresistente wässrige Diarrhoe (Whitlock und Buergelt 1996; Tiwari et al. 2006). Dieses oft als Kardinalssymptom beschriebene Krankheitszeichen wird bei kleinen Wiederkäuern nur sporadisch in bis zu 20 % der klinischen Fälle beobachtet. Das dominierende klinische Symptom bei infizierten Schafen und Ziegen ist der progressive Gewichtsverlust (Stehman 1996; Stewart et al. 2006; Windsor 2015; Idris et al. 2022). Im finalen Stadium führen die zunehmende Entkräftung und Dehydratation zum Festliegen der Tiere und schließlich zu deren Tod (Collins et al. 1984; Whitlock und Buergelt 1996). Ähnlich wie bei Rindern (Whitlock und Buergelt 1996; Tiwari et al. 2006) können die verminderte Resorption und der erhöhte enterale Verlust von Proteinen ebenso bei Ziegen und Schafen zu einer Hypoproteinämie und, durch die damit verbundene Senkung des onkotischen Drucks, zur Ausbildung von mandibulären Ödemen führen (Stehman 1996; Idris et al. 2022). Darüber hinaus können bei allen Wiederkäuern eine Austrocknung der Haut, eine Aufrauhung des Fells oder Alopezien auftreten (Chiodini et al. 1984; Whitlock und Buergelt 1996; Stewart et al. 2006; Idris et al. 2022).

Differentialdiagnostisch ist die insbesondere in der Frühphase der Infektion sehr unspezifische Symptomatik von anderen ätiologischen Ursachen abzugrenzen. Chronisch progressiver Gewichtsverlust kann ebenso durch Endoparasitismus, andere bakterielle oder virale Darmerkrankungen, Malnutrition sowie durch eine eingeschränkte Futteraufnahme aufgrund von Zahn- oder Kieferproblemen verursacht werden (Stehman 1996; Greig 2000; Smith et al. 2022).

Allgemein anerkannt ist die Einteilung des Krankheitsverlaufs in verschiedene Stadien anhand der Manifestation klinischer Symptome und des Vorliegens einer

Literaturübersicht

Erregerausscheidung. Das latente Stadium beginnt unmittelbar nach der Infektion, während der langsamen Replikation und Dissemination von MAP im Organismus. In dieser Phase erscheinen die betroffenen Tiere klinisch unauffällig. Es findet keine oder eine derart geringe Erregerausscheidung statt, dass diese mit den zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden nicht nachgewiesen werden kann. Nach einer tierindividuellen Zeitspanne kommt es mit dem Übergang in das subklinische Stadium zu einer intermittierend nachweisbaren Erregerausscheidung. Erst während der darauffolgenden klinischen Phase der Erkrankung beginnen sich allmählich die typischen sichtbaren Symptome zu entwickeln. Bis zum Tod des Tieres im finalen Stadium der Erkrankung können jedoch noch mehrere Monate vergehen (Whitlock und Buergelt 1996; Mortier et al. 2014; Windsor 2015).

Die Häufigkeit der Erregerausscheidung sowie deren Konzentration steigen im Krankheitsverlauf kontinuierlich an. Für Rinder wurden in Abhängigkeit vom MAP-Gehalt im Kot die Kategorien ‚schwacher Ausscheider‘, ‚moderater Ausscheider‘, ‚starker Ausscheider‘ und ‚Super-Ausscheider‘ definiert, wobei letztere mehr als 10.000 koloniebildende Einheiten (KbE) pro Gramm ausscheiden (Whitlock et al. 2005).

Das für die Diagnostik und Bekämpfung der Paratuberkulose bedeutendste Charakteristikum ist die lange Inkubationszeit, die bei natürlich infizierten Tieren zwischen zwei und mehr als zehn Jahren betragen kann. Diese Tatsache kann dazu führen, dass einige Tiere zu keinem Zeitpunkt ihres Produktionslebens klinisch auffällig werden. Aus diesem Grund wird die tatsächliche Prävalenz der Erkrankung in der Herde häufig unterschätzt (Collins et al. 1984; Clarke 1997; Whittington und Sergeant 2001). Es wird davon ausgegangen, dass sich je Tier im fortgeschrittenen klinischen Stadium der Paratuberkulose bis zu 25 weitere latent oder subklinisch infizierte Tiere in der Herde befinden (Whitlock und Buergelt 1996). Das Alter zum Zeitpunkt der Infektion, die initiale Infektionsdosis sowie die Expositionshäufigkeit werden als mögliche Faktoren angesehen, die die Dauer der latenten und subklinischen Erkrankungsphase beeinflussen können (Sweeney 1996; Windsor und Whittington 2010; McGregor et al. 2012; Mortier et al. 2014). Des Weiteren kann Stress, ausgelöst durch die Geburt, die Laktation oder die Eingliederung in eine neue Herde, eine unzureichende Nährstoffversorgung des Tieres oder eine Immunsuppression durch andere Krankheiten, den Eintritt in das klinische

Stadium beschleunigen oder induzieren (Tiwari et al. 2006; Windsor und Whittington 2020; Smith et al. 2022).

2.1.4 Pathologie und Pathogenese

Eine Infektion mit MAP führt im Rahmen einer Paratuberkuloseerkrankung zu einer granulomatösen Enteritis (Stehman 1996; Corpa et al. 2000a; Tiwari et al. 2006). Makroskopisch sichtbare Läsionen entstehen vorrangig im Bereich des Ileums und des Jejunums. Im Verlauf der Erkrankung können sich die Veränderungen vom Primärherd progressiv auf weitere Darmabschnitte, das Lymphsystem und andere Organe ausbreiten (Pérez et al. 1996; Clarke 1997; Pavlik et al. 2000; Corpa et al. 2000a; Storset et al. 2001).

Nach der zumeist oralen Aufnahme des Erregers (Sweeney 1996) überwindet MAP die Barriere der Darmmukosa im Bereich des Dünndarms. Dieser initiale Schritt zur Infektion erfolgt via Transzytose durch M-Zellen, modifizierte Epithelzellen, die oberhalb der Peyer'schen Platten lokalisiert sind. Anschließend phagozytieren intra- und subepitheliale Makrophagen den eingedrungenen Erreger (Momotani et al. 1988; Chiodini 1996). Ebenso wie andere pathogene Mykobakterien umgeht MAP das Immunsystem des Wirtes, indem es die normale Reifung und Ansäuerung des erregerhaltigen Phagosoms sowie dessen Fusion mit einem Lysosom verhindert. Durch die auf diesem Weg erreichte Persistenz innerhalb der Wirtszelle kann sich MAP der Immunabwehr entziehen und intrazellulär replizieren (Zurbrick und Czuprynski 1987; Kuehnel et al. 2001). Die Freisetzung der Erreger erfolgt durch eine induzierte Apoptose des Makrophagen, wodurch die Infektion einer Vielzahl weiterer Zellen in der unmittelbaren Umgebung ermöglicht wird (Bannantine und Stabel 2002).

Wie die Verbreitung von MAP im Organismus erfolgt, konnte bisher nicht eindeutig belegt werden. Prinzipiell wird von einer hämatogenen oder lymphatischen Streuung ausgegangen. Insbesondere die Migration erregerhaltiger Makrophagen über die Lymphgefäße in regionale Lymphknoten (vor allem die *Lymphonodi mesenterici*) und mit Fortschreiten der Erkrankung auch in entferntere Organsysteme einschließlich der Milchdrüse ist denkbar (Sweeney et al. 1992b; Koenig et al. 1993; Chiodini 1996). Für verschiedene Gewebe wird zudem eine direkte Kolonisierung diskutiert. Diese Annahme basiert auf frühzeitigen Nachweisen des Erregers nach experimenteller

oralen Infektion in den Tonsillen, den Retropharyngeal- und Buglymphknoten sowie in der Leber und den dazugehörigen Lymphknoten (Payne und Rankin 1961; Krüger et al. 2015).

Bereits während der subklinischen Erkrankungsphase können erste makroskopisch sichtbare Veränderungen auftreten. Pathologisch-anatomisch ist eine Verdickung und Ödematisierung, insbesondere der Dünndarmwand, zu beobachten. Dies führt in fortgeschrittenen Stadien zu einer deutlichen transversalen Fältelung der Mukosa. Die tributären serosalen und mesenterialen Lymphgefäße des betroffenen Gebietes können im Rahmen einer Lymphangitis dilatiert und verdickt sein. Regionale Lymphknoten weisen zum Teil eine granulomatöse Lymphadenitis bei partiell zusätzlich vorliegenden verkäsenden Nekrosen und Kalzifizierungen auf. Obwohl klinische Symptome hauptsächlich bei Tieren mit schweren und ausgedehnten Veränderungen beobachtet werden, gilt dies nicht für alle betroffenen Individuen (Corpa et al. 2000a; Storset et al. 2001; Tiwari et al. 2006; Krüger et al. 2015).

Die Empfänglichkeit für eine Infektion mit MAP variiert zwischen den einzelnen Wiederkäuerspezies und intraspezifisch zwischen verschiedenen Altersgruppen. Ziegen wird im Vergleich zu Schafen und Rindern eine höhere Infektionsanfälligkeit zugeschrieben (Stewart et al. 2007). Darüber hinaus gelten Neugeborene weithin als jene Altersgruppe mit der größten Empfänglichkeit. Die erhöhte Permeabilität des Dünndarmepithels in den ersten Lebensstunden ermöglicht die Aufnahme von kolostralen Antikörpern, aber auch von anderen Makromolekülen oder Erregern wie MAP. Adulte Tiere können sich ebenso infizieren, jedoch sind hierfür im Allgemeinen große Infektionsdosen notwendig (Sweeney 1996; McKenna et al. 2006; Windsor und Whittington 2010).

Die minimale Erregerdosis, die notwendig ist, um eine Infektion auszulösen, konnte bisher nicht ermittelt werden. Annahmen gehen von Größenordnungen zwischen 50 und 1.000 KbE aus, wobei theoretisch bereits ein einziges die Darmbarriere überwindendes Bakterium ausreichen könnte (Chiodini 1996; Barkema et al. 2018).

2.1.5 Infektionswege

Durch die Dissemination von MAP im Körper infizierter Tiere wird die Möglichkeit für verschiedene Ausscheidungs- und dadurch multiple Infektionswege geschaffen

(Abb. 1). Die Ausscheidung des Erregers erfolgt vorwiegend fäkal mit dem Kot. Darüber hinaus deutet der Nachweis von MAP in der Milch sowie im Kolostrum auf eine laktogene Ausscheidung hin (Sweeney et al. 1992b; Stabel et al. 2014; Lievaart-Peterson et al. 2019). Die Erregeraufnahme kann durch verschiedene Szenarien erfolgen, wobei sowohl belebte als auch unbelebte Vektoren beteiligt sein können. Die orale Aufnahme von MAP stellt dabei den bedeutendsten Infektionsweg dar (Stehman 1996; Sweeney 1996; Doré et al. 2012; Windsor 2015).

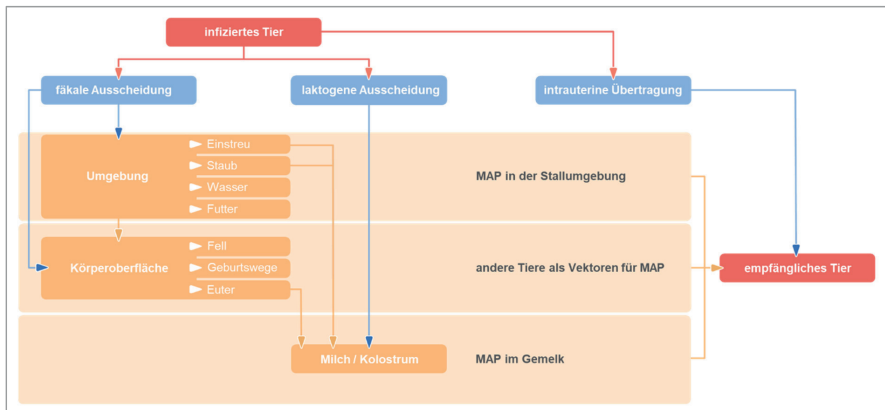


Abbildung 1: Schematische Darstellung potentieller Infektketten für *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Ausscheidungswege des Erregers (blau), mögliche beteiligte Vektoren (orange). In Anlehnung an McAloon et al. (2015).

Der erste Kontakt zwischen Jungtier und MAP kann bereits während der Geburt erfolgen, insbesondere bei mangelhafter Geburtshygiene und entsprechend verschmutzten Geburtswegen. Eine Kontamination der unmittelbaren Umgebung der Tiere und damit auch des Geburtsbereiches mit erregerrhaltigem Kot stellt die nächstliegende Kontaktmöglichkeit dar. Darüber hinaus kann es zum Eintrag des Erregers in vorgelegtes Futter oder Tränkwasser und infolgedessen zur Aufnahme kommen. Denkbar ist dies auch durch das Belecken kotverschmutzter Flächen im Stall (Kennedy und Benedictus 2001). Besonders risikoreich für Jungtiere ist die Erregeraufnahme durch das Belecken eines kotverschmutzten Euters bei der Milchaufnahme vom Muttertier (Sweeney 1996; Pithua et al. 2011). Eine bedeutende Rolle als Vektor wird auch dem Kolostrum respektive der Milch selbst zugesprochen (Nielsen et al. 2008). Abgesehen von einer laktogenen Erregerausscheidung kann

ebenso eine mangelhafte Melkhygiene zum Eintrag von MAP aus der Umgebung und damit zu einer Kontamination des Gemelks führen (Pithua et al. 2011; McAloon et al. 2015).

Die Möglichkeit einer aerogenen Infektion wird auf Basis experimenteller Studienergebnisse diskutiert. Eine intestinale Infektion konnte sowohl durch eine nasale als auch durch eine intratracheale Inokulation ausgelöst werden. Ob die Aufnahme von MAP direkt im Respirationstrakt oder durch das Abschlucken des Erregers nach der mukoziliären Clearance erfolgt, blieb jedoch unklar. Darauf basierend muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass MAP-haltige Bioaerosole, wie beispielsweise Staub im Stallgebäude, als potenzielle Infektionsquellen fungieren können (Eisenberg et al. 2010b; Eisenberg et al. 2011; Barkema et al. 2018).

Zusätzlich zu diesen postnatalen Übertragungswegen konnte MAP ebenso in Fetten von Ziegen, Schafen, Rindern und Wildwiederkäuern nachgewiesen werden. Dabei bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsstadium des Muttertieres und der Wahrscheinlichkeit eines MAP-Nachweises im Fetus. Das Risiko einer fetalen Infektion war bei Rindern sowie Schafen mit klinischer Paratuberkulose deutlich höher als bei Tieren im subklinischen Stadium. Daher ist ein intrauteriner Erregerübergang als weiterer Infektionsweg zu berücksichtigen (Lambeth et al. 2004; Alinovi et al. 2009; Whittington und Windsor 2009).

2.2 Bedeutung und Bekämpfung

2.2.1 Auswirkungen auf die Lebensmittelproduktion, die Betriebsökonomie und die öffentliche Gesundheit

Die Infektion eines wirtschaftlich orientierten Tierbestandes mit jedwedem Krankheitserreger kann weitreichende Auswirkungen auf verschiedene betriebsökonomische Bereiche haben. Zusätzlich zu den Kosten, die durch die Behandlung, den Verlust von Tieren und Handelseinschränkungen entstehen, fallen im weiteren Verlauf Kosten für Diagnostik und Managementmaßnahmen an (Hasonova und Pavlik 2006).

Eine Paratuberkuloseinfektion führt nicht nur zu den bereits beschriebenen klinischen Symptomen, sondern beeinträchtigt auch weitere Leistungsparameter. Der Rückgang der Milchleistung erkrankter Tiere ist vor allem für milchproduzierende Betriebe von

Literaturübersicht

großer Bedeutung. In verschiedenen Studien konnte bei Rindern mit nachgewiesener Erregerausscheidung ein Milchleistungsabfall beobachtet werden, der auf circa 5,9 % beziffert wurde. Trotz der derzeit unzureichenden Datenlage ist davon auszugehen, dass diese Beobachtung auch auf Milchziegen übertragen werden kann (McAloon et al. 2016; Smith et al. 2022). Hinzu kommen im weiteren Krankheitsverlauf ein vermindertes Schlachtgewicht aufgrund des progressiven Gewichtsverlustes (Kudahl und Nielsen 2009). Darüber hinaus kommt es durch verringerte Konzeptionsraten und erhöhte Kosten für die Remontierung von Tieren, die aufgrund einer nachgewiesenen Infektion aus dem Bestand entfernt wurden, zu zusätzlichen finanziellen Belastungen (Hasonova und Pavlik 2006; Raizman et al. 2007; Raizman et al. 2009).

Ziegenherden, die von Paratuberkulose betroffen sind, erzielen im Vergleich zu nicht betroffenen Kontrollherden ein schlechteres betriebsökonomisches Ergebnis. Unter verschiedenen betriebsstrukturellen und managementbezogenen Merkmalen erwies sich die Paratuberkulose-Seroprävalenz als der maßgebliche Einflussfaktor auf das Betriebsergebnis (Sardaro et al. 2017). Schätzungen gehen davon aus, dass die Paratuberkulose für den gesamten Sektor der Milchwirtschaft Verluste und Kosten in mehrstelliger Millionenhöhe verursacht (Losinger 2005; McKenna et al. 2006).

Aufgrund der Ähnlichkeit der klinischen Symptomatik und der pathologischen Veränderungen im Darm von mit Paratuberkulose infizierten Wiederkäuern und an Morbus Crohn erkrankten Menschen kam es zur Hypothese einer gemeinsamen Ätiologie beider Erkrankungen (Dalziel 1913; Patterson und Allen 1972; Waddell et al. 2015). Ein komplexes multifaktorielles Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, einer veränderten intestinalen Mikrobiota und weiteren Umweltfaktoren, das zu einer Dysregulation des Immunsystems führt, wird als Ursache für die humane chronisch-entzündliche Darmerkrankung vermutet. In diesem Zusammenhang wird auch ein mögliches zoonotisches Potential von MAP diskutiert (Baumgart und Sandborn 2012). Insbesondere (Roh-)Milch und daraus hergestellte Produkte wie Käse oder Milchpulver stehen im Fokus einer potenziellen Übertragung. Nicht nur konnte in einer Reihe von Studien MAP in der Milch von Rindern, Schafen und Ziegen nachgewiesen werden (Streeter et al. 1995; Nebbia et al. 2006; Lievaart-Peterson et al. 2019), sondern es wurde kulturell auch eine MAP-Kontamination in verschiedenen Molkereiprodukten wie pasteurisierter Milch (5,3 %)

und Käse (1,1 %) als auch in rohem Rind- und Schaffleisch (3,3 %) festgestellt (Waddell et al. 2016).

Internationale Datenauswertungen kamen ebenso wie das Bundesinstitut für Risikobewertung in Zusammenarbeit mit dem Max Rubner-Institut jedoch zu der Einschätzung, dass zum momentanen Zeitpunkt keine validen wissenschaftlichen Belege für einen epidemiologischen Zusammenhang zwischen MAP und der Entstehung von Morbus Crohn vorliegen. Die gegenwertige Evidenz ist nicht stark genug um ein potentiellies Risiko für die öffentliche Gesundheit durch eine MAP-Exposition zu postulieren. Die Bekämpfung der Paratuberkulose bei empfänglichen lebensmittelliefernden Tierarten, die aus tiergesundheitlichen und wirtschaftlichen Aspekten durchgeführt wird, führt in Verbindung mit den existierenden strengen Hygienemaßnahmen bei der Lebensmittelherstellung zeitgleich zu einer Reduktion des Erregereintrages in die Lebensmittelkette und stellt somit eine präventive Maßnahme im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes dar (Waddell et al. 2015; Bundesinstitut für Risikobewertung 2021).

2.2.2 Methoden der Paratuberkulose-Diagnostik

Eine Diagnosestellung, die ausschließlich auf der klinischen Symptomatik beruht, ist aufgrund der Vielzahl von in Frage kommenden Differentialdiagnosen schwierig. Erschwerend kommt die zum Teil lange Inkubationszeit mit subklinischer Erkrankungsphase hinzu. Aufgrund dessen sind pathologische, direkte mikrobiologische oder indirekte immunologische Nachweisverfahren zu bevorzugen. Die derzeitigen Standards für die unterschiedlichen diagnostischen Verfahren werden im „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals“ der World Organisation for Animal Health beschrieben (World Organisation for Animal Health 2021).

Zum Nachweis einer Paratuberkuloseinfektion stehen zwei diagnostische Ansätze zur Verfügung. Ein direkter Erregernachweis kann im Rahmen einer kulturellen Anzucht oder des Nachweises von MAP-DNA in Kot, Milch und Geweben erfolgen. Der zweite Ansatz basiert auf dem Nachweis einer durch die Infektion hervorgerufenen spezifischen Immunantwort, insbesondere der Produktion von Antikörpern in Serum, Plasma oder Milch. Hierfür können unter anderem Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), Agar Gel Immunodiffusionstests oder

Literaturübersicht

Komplementfixierungsreaktionen eingesetzt werden (Tiwari et al. 2006; Nielsen und Toft 2008; World Organisation for Animal Health 2021).

Die für die *intra vitam* Diagnostik zur Verfügung stehenden Methoden weisen je nach Erkrankungsstadium unterschiedliche Sensitivitäten auf. Insbesondere während der subklinischen Phase können eine intermittierende Erregerausscheidung oder noch nicht stattgefundenene Serokonversion zu falsch-negativen Ergebnissen in der Kotkultur oder im ELISA führen (Whitlock et al. 2000; Whittington und Sergeant 2001; Tiwari et al. 2006; Donat et al. 2015). Mit fortschreitender Erkrankung steigt die fäkale Erregerausscheidung sowie die Antikörperproduktion. Dies erhöht die Sensitivität beider Tests und damit die Wahrscheinlichkeit infizierte Tiere zu identifizieren (Whitlock und Buergelt 1996; Whitlock et al. 2000; Köhler et al. 2008; Nielsen und Toft 2008). Individuelle Schwankungen in der Ausprägung der Immunantwort und/oder der Erregerausscheidung können die Diagnostik jedoch erheblich beeinträchtigen (Köhler et al. 2015).

Die kulturelle Untersuchung von Kotproben gilt als sensitivste Methode zur Identifizierung infizierter Tiere. Sie ist jedoch mit hohen Kosten und langen Kultivierungszeiten verbunden. Erschwerend kommt hinzu, dass insbesondere Schafe mit speziellen MAP-Stämmen infiziert sein können, deren Kultivierung sehr schwierig ist. Inzwischen hat sich auch die Kotuntersuchung mittels Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction; PCR) etabliert und wird beim Schaf häufig der Kultivierung vorgezogen. Die ELISA-Untersuchung ist kostengünstiger und liefert ebenso wie die PCR-Analyse innerhalb kurzer Zeit Ergebnisse, weist aber im Vergleich eine geringere Sensitivität als die Kultur auf (Whitlock et al. 2000; Köhler et al. 2008; Collins 2011; Whittington 2020). Mit den derzeit für die Paratuberkulose-Diagnostik zur Verfügung stehenden Methoden ist es daher nicht möglich, ein phänotypisch gesundes Tier mit absoluter Sicherheit als nicht-infiziert zu klassifizieren.

Die Diagnostik kann entweder als individuelle Einzeltieruntersuchung oder mittels Sammelproben auf Gruppen- beziehungsweise Herdenebene durchgeführt werden. Für Letztere werden hauptsächlich Sammelkot und Tankmilch verwendet. Dieser Ansatz reduziert die Kosten der Bestandsdiagnostik vor allem in größeren Herden erheblich (Wolf et al. 2015; Bauman et al. 2019), kann jedoch insbesondere bei relativ niedrigen Prävalenzen aufgrund eines Verdünnungseffektes zu falsch-negativen Ergebnissen führen (van Schaik et al. 2003; Okura et al. 2012).

Zur Bestimmung des Bestandsstatus und zur Überwachung von Sanierungsmaßnahmen werden immer häufiger Umgebungsproben eingesetzt. Zu den Vorteilen gehören die einfache Zugänglichkeit sowie die Kostenminimierung durch die Verringerung der Anzahl der zu untersuchenden Proben. Insbesondere in Beständen mit niedriger Prävalenz und bei nur einmaliger Probenahme kann die Validität jedoch eingeschränkt sein (Donat et al. 2015; Wolf et al. 2017; Wichert et al. 2022).

2.2.3 Strategien und Maßnahmen zur Bekämpfung und Prävention

Liegt der Schwerpunkt bei Paratuberkulose-freien Betrieben auf der Aufrechterhaltung dieses Status durch die Prävention des Eintrages der Erkrankung, steht in infizierten Beständen hingegen die Verhinderung von Neuinfektionen im Mittelpunkt. Jungtiere sind hierbei, aufgrund der altersabhängigen Suszeptibilität, von besonderer Bedeutung für eine effektive Sanierung (Sweeney 1996; Windsor und Whittington 2010; Whittington et al. 2019).

Die Bekämpfung der Paratuberkulose hat sich als äußerst schwierig und langwierig erwiesen, was auf verschiedene Gründe zurückzuführen ist. Die niedrige Sensitivität aller momentan zur Verfügung stehenden diagnostischen Verfahren kann zu falsch-negativen Untersuchungsergebnissen und damit zu einer Unterschätzung der wahren Verbreitung im Bestand sowie der Fehlklassifikation von Einzeltieren führen. Aber auch die begrenzten wirtschaftlichen Möglichkeiten der Tierbesitzer, empfohlene Bekämpfungs- und Präventionsmaßnahmen umzusetzen, sowie deren Engagement spielen eine entscheidende Rolle (McKenna et al. 2006; Barkema et al. 2018; Roche et al. 2019; Whittington et al. 2019).

Verschiedene Therapieansätze, die auf der Kombination unterschiedlicher Antibiotika, antiinflammatorischer oder immunsuppressiver Medikamente basierten, blieben bisher erfolglos. Eine symptomatische Behandlung kann zur Verbesserung des Krankheitsbildes und zur Verzögerung des Krankheitsverlaufes führen, verhindert jedoch nicht die Ausscheidung von MAP. Aufgrund fehlender Heilungsaussichten und der anhaltenden Gefahr der Erregerübertragung durch das behandelte Tier ist aus Sicht der Tierseuchenbekämpfung jedoch jeder Therapieversuch abzulehnen (Chiodini et al. 1984; Harris und Barletta 2001; Fecteau und Whitlock 2011).

Literaturübersicht

Bestandssanierungskonzepte bei kleinen Wiederkäuern basieren im Wesentlichen auf drei Ansatzpunkten (Windsor 2015; Windsor und Whittington 2020):

- (1) der Implementierung von Managementmaßnahmen zur Minimierung der Übertragung von MAP innerhalb der Herde,
- (2) der Identifizierung und schnellstmöglichen Entfernung infizierter Tiere aus dem Bestand und
- (3) der Impfung der Nachzucht gegen Paratuberkulose.

Hygiene- und Managementmaßnahmen zur Unterbrechung von Infektketten sind im Rahmen der Sanierung unerlässlich. Die Implementierung entsprechender Empfehlungen ist unabhängig von der vorliegenden Prävalenz und somit in jedem Bestand möglich. Derartige Maßnahmen tragen nicht nur zur Sanierung der Paratuberkulose bei, sondern auch zur Prävention und Bekämpfung anderer Erkrankungen und stellen somit einen bedeutenden Bestandteil eines umfassenden Tiergesundheitsmanagements dar (Groenendaal et al. 2002; Ganter et al. 2012b; Nagel-Alne et al. 2014).

Die Trennung von Neugeborenen und adulten Tieren gilt als wesentliche Maßnahme in der Unterbrechung von Infektketten (Groenendaal et al. 2002; Nagel-Alne et al. 2014; Windsor 2015). Die Aufzucht in einer möglichst MAP-freien Umgebung sollte durch wirksame Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in Verbindung mit stallbautechnischen Anpassungen gewährleistet werden (Pithua et al. 2011; Ganter et al. 2012a; McAloon et al. 2015; Windsor 2015; Field et al. 2023). Gleiches gilt für die Verfütterung von erregerefreiem Kolostrum beziehungsweise Milch und anderen Futtermitteln (Nielsen et al. 2008; Ganter et al. 2012a; McAloon et al. 2015; Windsor 2015).

Im Mittelpunkt der Aufrechterhaltung von Infektketten stehen MAP-ausscheidende Tiere. Diese tragen durch die Kontamination der Umgebung, laktogene Erregerausscheidung oder intrauterine Erregerübertragung zur Aufrechterhaltung der zahlreichen Infektionswege bei. Eine frühzeitige Identifizierung dieser Tiere in Verbindung mit ihrer Entfernung aus der Herde reduziert den kontinuierlichen Neueintrag von MAP in die verschiedenen unbelebten Vektoren (Rankin 1962; Sweeney 1996; Whittington und Sergeant 2001). Grundlage für die Umsetzung dieser Maßnahme sind regelmäßig durchgeführte Bestandsuntersuchungen

Literaturübersicht

(Nielsen und Toft 2008; Windsor 2015). Collins (2011) empfiehlt den Einsatz unterschiedlicher Diagnostikmethoden in Abhängigkeit vom Paratuberkulosestatus der Herde. In Ziegenbeständen, die sich im Sanierungsverfahren befinden, kann eine Untersuchung mittels ELISA durchgeführt werden. Insbesondere solange eine hohe Paratuberkulose-Prävalenz vorliegt, steht dieses Vorgehen in einem angemessenen Kosten-Nutzen-Verhältnis. Wird die vollständige Eradikation der Erkrankung angestrebt, sind im weiteren Verlauf der Sanierung kulturelle oder molekularbiologische Kotuntersuchungen vorzuziehen.

Impfstoffe gegen Paratuberkulose beruhen auf inaktivierten Erregern (Totimpfstoffe), nicht-attenuierten oder attenuierten MAP-Stämmen (Lebendimpfstoffe) (Bastida und Juste 2011). Die Impfung sollte zu einem möglichst frühen Zeitpunkt erfolgen, idealer Weise vor dem ersten Erregerkontakt. Jedoch konnten positive Auswirkungen ebenso bei der Anwendung bei adulten Ziegen beobachtet werden (Corpa 2000; Corpa et al. 2000b). Die momentan zur Verfügung stehenden Vakzinen können eine Infektion nicht gänzlich verhindern. Jedoch konnte gezeigt werden, dass geimpfte Tiere den Erreger in geringeren Mengen ausscheiden und sich der Beginn der Ausscheidung verzögert, ebenso wie der Eintritt in die klinische Erkrankungsphase (Corpa et al. 2000b; Reddacliff et al. 2006). Damit leistet diese Maßnahme einen effektiven Beitrag zur Reduktion der Umgebungskontamination sowie Produktionsverlusten. Als unerwünschte Arzneimittelwirkung kann jedoch, insbesondere bei einer intramuskulären Applikation des Impfstoffes, eine teils schwere Nekrose im Bereich der Injektionsstelle beobachtet werden (Windsor 2015; Windsor und Whittington 2020).

Die Impfung gegen Paratuberkulose wird in Australien seit Beginn des Jahrtausends breitflächig erfolgreich bei kleinen Wiederkäuern eingesetzt (Windsor 2015; Windsor und Whittington 2020). In Deutschland ist derzeit kein Impfstoff zugelassen. Eine Anwendung eines in Spanien erhältlichen Präparates für kleine Wiederkäuer wird von der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin in Beständen mit klinischen Fällen sowie einer Ausscheidungsprävalenz von mehr als 30 % empfohlen (Ständige Impfkommision Veterinärmedizin 2022).

Durch diese Bekämpfungsmaßnahmen sollen Infektketten aktiv unterbrochen und die Resistenz der Lämmer gegenüber MAP gestärkt werden. Alle Einzelmaßnahmen sind

Literaturübersicht

geeignet, die Prävalenz der Paratuberkulose zu senken. Allerdings zeigen sie isoliert oftmals nur einen marginalen Effekt. Dieser kann durch ihre Kombination potenziert werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Paratuberkulose sowohl effektiv als auch ökonomisch vertretbar zu bekämpfen (Groenendaal et al. 2002; Reddacliff et al. 2006; Bastida und Juste 2011).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Studiendesign

Um verschiedene mögliche Übertragungswege von MAP bei Ziegen in der Praxis zu untersuchen und hinsichtlich des von ihnen ausgehenden Gefährdungspotentials einzuordnen, wurden die hier dargestellten Studien in den Jahren 2020 bis 2022 in einem mit Paratuberkulose infizierten Milchziegenbestand durchgeführt. Die Herde der Thüringer Wald Ziegen bestand aus etwa 350 bis 400 laktierenden Tieren und der betriebseigenen Nachzucht. Nach der klinischen Verdachtsdiagnose einer vorliegenden Paratuberkuloseinfektion im Bestand wurde MAP 2018 sowohl in Organen mehrerer Sektionstiere als auch in 30,0 % der im Rahmen einer ersten Gesamtbestandsuntersuchung entnommenen Einzeltierkotproben durch das Nationale Referenzlabor für Paratuberkulose (NRL) am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) nachgewiesen. Nach der Feststellung der Erkrankung wurde in Zusammenarbeit mit dem Schaf- und Ziegengesundheitsdienst der Thüringer Tierseuchenkasse ein Sanierungskonzept für den Betrieb erarbeitet. Kernpunkte waren dabei die sukzessive Entfernung klinisch erkrankter sowie MAP-positiver Ziegen aus dem Bestand in Kombination mit der Durchführung einer Impfung des gesamten aktuellen Tierbestandes und fortlaufend der weiblichen Nachzuchtlämmer. Hierfür wurde die zur Anwendung bei kleinen Wiederkäuern zugelassene Inaktivatvakzine Gudair (CZ Vaccines, O Porriño, Spanien) verwendet.

Zur Beurteilung der Verbreitung von MAP in der Stallumgebung wurden in Studie 1 verschiedene Materialien mikro- sowie molekularbiologisch untersucht. Um den Einfluss räumlicher und zeitlicher Parameter auf das Vorkommen des Erregers durch statistische Analysen beurteilen zu können, wurden die Probennahmen wiederholt an zuvor definierten und durch weitere Parameter charakterisierten Stellen im Stallgebäude durchgeführt. Besonders berücksichtigt wurden hierbei jene Stallbereiche, in denen sich neugeborene Lämmer aufhielten. Dazu gehörten der Ablambbereich und die separaten Lämmeraufzuchtboxen, in welche die Jungtiere nach der frühzeitigen Trennung von ihren Müttern verbracht wurden. Durch die wiederholte Probennahme über mehrere Produktionsjahre konnten sowohl die

Eigene Untersuchungen

halbjährliche Weidehaltung als auch die Entwicklung der Paratuberkulose-Prävalenz in der Herde als Faktoren in die Untersuchung einbezogen werden.

Das Risiko einer Infektion mit MAP durch die Kolostrumaufnahme des Lammes durch das Saugen an der Mutter beruht auf zwei Einzelaspekten, die im Rahmen von Studie 2 untersucht wurden. Zum einen die laktogene Ausscheidung von MAP in das Kolostrum, zum anderen eine orale Erregeraufnahme durch Kontakt mit der Euterhaut während des Saugvorgangs. Zur Beurteilung wurden sowohl Kolostrumproben als auch Euterhauttupfer entnommen und auf MAP untersucht. Die im Projektbetrieb praktizierte direkte Trennung der Lämmer von ihren Müttern *post partum* ermöglichte die Entnahme von Proben, die der Kolostrumaufnahme aus dem Euter kurz nach der Geburt entsprachen. Um die im Projektbetrieb angewandte Praxis des Vertränkens von Sammelkolostrum hinsichtlich eines potentiellen Infektionsrisikos beurteilen zu können, wurde auch dieses analysiert. Da keine etablierten Methoden zur Untersuchung von Ziegenkolostrum und Euterhauttupfern auf MAP zur Verfügung standen, sind diese im Vorfeld der Untersuchungen entwickelt und evaluiert worden. So konnte eine minimale Nachweisgrenze ermittelt werden, die für die Einordnung der Ergebnisse wesentlich ist.

Daten aus Studie 1 und 2, die in dieser Dissertationsschrift dargestellt werden, sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht worden.

3.2 Eigene Publikationen

3.2.1 Studie 1

***Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn – Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention**

Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H. (2023): *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn — Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention. *Animals* 13(10): 1688.

DOI: 10.3390/ani13101688.

Darstellung des Eigenanteils an Studie 1:

- Studienplanung: Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H.
- Studiendurchführung
 - Probennahme: Pickrodt C., Moog U., Köhler H.
 - Laboruntersuchungen: Pickrodt C., Köhler H.
 - Datenaufarbeitung: Pickrodt C.
 - Statistische Auswertung: Pickrodt C., Köhler H.
- Manuskripterstellung
 - Visualisierung: Pickrodt, C.
 - Erstellung: Pickrodt C., Köhler H.
 - Revision: Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H.

Eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen Anteile der einzelnen Autoren ist in der Publikation unter „Author Contributions“ angegeben und wurde von allen Autoren mit der Einreichung des Manuskripts bestätigt.

Article

Mycobacterium avium subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn—Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention

Chris Pickrodt ^{1,2} , Karsten Donat ^{2,3} , Udo Moog ³ and Heike Köhler ^{1,*}

¹ Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; chris.pickrodt@fli.de

² Clinic for Obstetrics, Gynaecology and Andrology for Large and Small Animal Science with Veterinary Ambulance, Justus-Liebig-University Gießen, Frankfurter Straße 106, 35392 Gießen, Germany; kdonat@thtsk.de

³ Thuringian Animal Diseases Fund, Victor-Goertler-Straße 4, 07745 Jena, Germany; umoog@thtsk.de

* Correspondence: heike.koehler@fli.de; Tel.: +49-3641-804-2240

Simple Summary: Paratuberculosis is a chronic inflammatory disease leading to emaciation and production losses in ruminants. Important aspects of disease control are the detection of infected herds and environmental areas where contact between animals and the causative pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is possible. Bedding, dust, feed, and water samples were collected from the barn of a paratuberculosis-infected dairy goat herd and analyzed for culturable MAP and MAP DNA. Cultivation was successful in 28 bedding and one dust sample, while MAP DNA was detected in 117 out of 256 samples from all materials. Samples collected from areas of high animal traffic, such as the milking parlor, were more likely to reveal positive results than adult and young goat areas. Positive culture results were also obtained from kidding pens, constituting this barn area as a possible infection site. Overall, environmental sampling may be suitable for the detection of MAP in goat herds and the identification of potential critical areas for pathogen transmission. These results should be taken into account for paratuberculosis control programs in goat herds to improve their efficiency and, thus, animal welfare.

Abstract: Environmental samples are often used to classify the paratuberculosis status of cattle herds. The disease is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), predominantly through oral ingestion during infancy. In this explorative study, the presence of MAP was determined in the barn environment of a paratuberculosis-infected vaccinated dairy goat herd. A total of 256 bedding, dust, feed, and water samples were collected at eight time points and examined using culture and qPCR. Detection rates of both methods were compared, and factors determining MAP confirmation were identified. MAP was cultured from 28 bedding and one dust sample, while MAP DNA was detected in all materials (117/256). Samples from high animal traffic areas and those collected during the indoor season were more likely to yield positive culture and qPCR results. Cultivation of MAP from kidding pens indicated this area as a possible infection site. Dust proved to be the most suitable material for detecting MAP DNA, as bedding was for MAP culture. Environmental sampling was demonstrated to be an effective way to detect MAP in a dairy goat herd. qPCR results could confirm herd infection, while culture results provided insight into crucial areas for MAP transmission. These findings should be considered when designing farm-specific paratuberculosis control plans.

Keywords: small ruminants; Johne's disease; MAP; environmental sampling; bedding; dust; feed; water; transmission; control program



Citation: Pickrodt, C.; Donat, K.; Moog, U.; Köhler, H. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn—Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention. *Animals* **2023**, *13*, 1688. <https://doi.org/10.3390/ani13101688>

Academic Editor: Valentina Virginia Ebani

Received: 28 March 2023

Revised: 11 May 2023

Accepted: 12 May 2023

Published: 18 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Paratuberculosis is a chronic inflammatory intestinal disease of major economic importance in domestic ruminants. It is caused by an infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) which usually occurs in the first days of life. The slow disease progression results in a long incubation period until symptoms such as diarrhea, decreasing milk yield, and emaciation up to death appear. Possible routes of transmission include oral ingestion of the pathogen, inhalation, or in-utero infection [1–6].

MAP is shed with the feces of infected animals and can remain infectious in the environment for almost one year, even outside a suitable host [1,7]. Detection of MAP in samples taken from the immediate environment of the animals can be exploited in two directions. First, when applied in the monitoring of paratuberculosis, this approach can be used for the identification of MAP-positive herds, ensuring a high probability of truly positive results. This is an important aspect of many control programs [8–10]. Environmental sampling for MAP detection, whether molecular biological or cultural, is considered to be cost-effective and highly specific [10–12]. Secondly, this diagnostic approach can identify areas with a high bacterial load that may serve as infection sources for susceptible animals in the herd. This can be valuable information in the framework of veterinary risk assessment within a herd aiming to improve hygiene and management.

Most studies concerning MAP detection in environmental samples have been conducted in cattle farms. Due to the partly considerable differences in the husbandry conditions of cattle and small ruminants, it is not possible to transfer the results obtained to other animal species without further verification. Only one previous study focused on grazing sheep flocks, including some combined herds of sheep and goats [13]. Systematic environmental sampling in dairy goat barns has not yet been conducted.

Different materials have been analyzed for the presence of MAP. As the pathogen is shed with feces, most studies conducted focused on manure samples. However, MAP has also been found in dust, water, feed, and soil samples from in and outside the barn [9–17]. A comparison between different matrices collected in the same barn to determine which is best suited for MAP detection in goat barns has been lacking. Barn areas with high animal traffic, such as alleyways and the milking parlor, revealed the highest incidence of MAP-positive samples in several studies in cattle, whereas calving pens and youngstock areas were less affected [9–12,18]. In this regard, both culture and qPCR appear to be appropriate detection methods and comparable in terms of their performance [14–16]. However, herds with a low prevalence may be misclassified as uninfected due to negative environmental samples caused by intermittent pathogen shedding or dilution as well as dissemination effects [17]. For this reason, repeated collection of multiple environmental samples is recommended to increase sensitivity [9,19,20].

The approach of drawing implications for disease management from environmental sampling results has been rarely investigated in cattle [21] but so far not in goats. The main objective during youngstock rearing should always be to prevent exposure of kids, lambs, and calves to MAP as long as possible. Although the minimal infectious dose has not yet been determined, the later exposure occurs, and the less MAP is taken up, the lower the likelihood for successful infection and/or fast clinical expression may be [1,22,23]. High-risk areas for pathogen transmission should be identified, results critically evaluated, and measures for MAP reduction and contact minimization implemented in every individual farm-level paratuberculosis control plan.

Here, we present the results of an explorative study conducted on one dairy goat farm. It focused on MAP detection in environmental samples from a goat barn, as previously shown for cattle and sheep farms. The objective was to evaluate the suitability of different sample materials, sites, seasons, and analysis methods (qPCR and culture) for identifying a paratuberculosis-infected goat herd. In addition, the study aimed at determining crucial barn areas for exposure of kids to MAP to enable their integration into management strategies for effective disease control.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Welfare and Legislation

The study was approved by the Animal Health and Welfare Unit of the Thuringian State Office for Consumer Protection (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103) and carried out in accordance with European and national laws. Every effort was made to minimize suffering.

2.2. Study Herd

The study was conducted in an organic dairy goat farm in Thuringia, Germany, between 2020 and 2022. The herd was affected by paratuberculosis. MAP was first confirmed culturally in 2018 in different tissues of a clinically affected goat after diagnostic necropsy. Because of numerous clinical cases, all adult goats and the annual female youngstock were subsequently vaccinated with an inactivated vaccine (Gudair, CZ Vaccines, O Porriño, Spain), while goats showing severe clinical signs of paratuberculosis were culled.

Young and adult goats were kept in loose housing on deep litter in different open pens within the same building. The rotary milking parlor was located in a separate part of the building attached to the animal husbandry area. The parlor was entered from a passage from the waiting area adjacent to a part of the lactating goat pen. All lactating goats were driven into the waiting pen for milking twice a day.

Kids were raised at the farm for replacement. They were separated from the doe immediately after birth. About 20 age-grouped kids each were kept in temporary detached pens until reaching a body weight of about 15 kg. At about five months of age, the juvenile goats were moved from the group pen in the kid-rearing area to the juvenile goat pen on the opposite side of the building, and the kid pens were deconstructed afterwards. The kid-rearing area was cleaned and disinfected using white hydrated and slaked lime (calcium hydroxide) before new kid pens were built during the next kidding season.

Rotational grazing was performed during the grazing season between May and November. Young goats were turned out to graze after their first kidding. In 2020 and 2021, dried-off goats were grouped in separate pens approximately two months before kidding, whereas no dry goat/kidding pens were set up in 2022. The deep litter was removed from the pens before the end of each grazing season, followed by cleaning and disinfection using slake lime. In between, new bedding material was added every day as necessary to ensure clean udder skins and coats.

2.3. Study Design

Environmental samples were collected at eight environmental sampling events (ES) between 2020 and 2022. ES 1, 2, and 3 were conducted within a six-month interval, while the sampling frequency was enhanced to approximately every three months from ES 4 onwards (Figure 1).

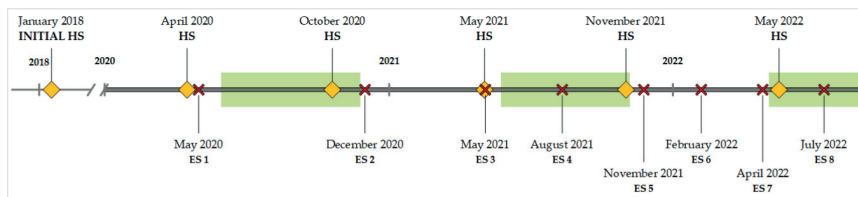


Figure 1. Sampling schedule for fecal and environmental samples between 2018 and 2022. HS = herd sampling (◆), ES = environmental sampling (×). Grazing seasons are marked as green boxes.

Herd sampling to determine fecal shedding of MAP was first conducted in February 2018 and then biannually between 2020 and 2022 (Figure 1).

2.4. Environmental Sample Collection

The following nine sampling sites were defined: entrances to the barn, waiting area in front of the milking parlor, milking parlor, exit of the milking parlor, lactating goat pen (divided into four quadrants: Q1–Q4), dry goat/kidding pen(s), buck pen, juvenile goat pen, and goat kid pen(s). If more than one dry goat/kidding or goat kid pen existed at the same time, each pen was sampled individually. Four different materials (bedding, dust, water, feed) were collected from each site if available. Due to herd management, it was not possible to sample all locations or collect all different sampling materials at each ES. A detailed breakdown of all collected environmental samples ($n = 256$) at the respective ES and sampling sites is provided in Appendix A (Table A1).

Bedding material from approximately five spots within a whole pen or pen quadrant was combined into one composite sample. Deviating from this procedure, four individual samples were collected from kidding pens. Feed samples were collected out of racks or from the ground when forage was offered in front of the respective pen. Each feed and bedding sample was collected manually using a fresh glove. The samples contained between 50 and 250 g of forage or bedding with fecal material. The material was placed in a plastic bag, transferred to the laboratory, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dust samples were scraped from the surface of the barn facilities in a 50 mL tube using a scalpel. Water from drinking troughs was collected using a 1 L vial scooped through the trough. Dust and water samples were transferred to the laboratory and stored at room temperature until further processing.

2.5. Sample Preparation and Analysis

2.5.1. Fecal Samples

Fecal samples from every goat older than one year were examined by bacterial culture according to the official manual of diagnostic procedures published by the Friedrich-Loeffler-Institute [24]. In short, 3 g of feces were decontaminated over 48 h at room temperature using 30 mL of 0.75% hexadecylpyridinium chloride monohydrate solution (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). The supernatants were discarded, and 200 μL of the remainder were transferred on each of three slopes of Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and Amphotericin, Nalidixic acid and Vancomycin (HEYM, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Cultures were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for up to six months. Examination of bacterial growth was conducted every second week, starting after 42 days. The presence of MAP was confirmed by IS900 PCR [25] of characteristic colonies.

2.5.2. Bedding and Feed Samples

Samples were thawed overnight and processed according to Whittington et al. [7], modified as follows: 50 g of each sample was placed in a lockable plastic container. Then, 500 mL of sterile distilled water was added to cover the material completely. After intensively shaking by hand, containers were agitated in a shaking incubator overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 50 rpm. Stepwise, the liquid was poured off and collected in 50 mL vials, followed by centrifugation at 4200 rpm for 20 min. Two aliquots of 3 g each from the obtained pellet were portioned into two vials for further cultural and molecular biological examination. If the total pellet weight was below 6 g, the pellet was divided into two equal parts, and volumes of further additives were adjusted proportionally.

Based on the procedure applied to the fecal samples, the first aliquot of this pellet was processed for bacterial cultivation in the same way as described above using three slopes of HEYM (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Examination of bacterial growth was conducted over six months, and the presence of MAP was confirmed by IS900 PCR [25] of characteristic colonies. Based on the approach of Köhler et al. [26], a colony score (CS) from 0 to 5 was used to estimate MAP growth semi-quantitatively (0 = 0; 1 = 1–10; 2 = 11–20; 3 = 21–50; 4 = 51–100 individual colonies per slope; 5 = bacterial lawn). The week of ap-

pearance (WA) was also documented. For numerical estimation of the MAP concentration in the sample, a growth index (GI) for each slope was calculated using the formula:

$$GI = CS \times 100/WA \quad (1)$$

followed by determination of the mean of all inoculated slopes of the sample.

For qPCR analysis, 20 mL of sterile distilled water was added to the second aliquot of the pellet. After vigorous vortexing, the sample was left in an upright position for 20 min at room temperature for sedimentation. Then, 10 mL of the supernatant was centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min using an ADIAFILTER (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) to concentrate bacteria and remove PCR-inhibiting substances. The resulting pellet was suspended in 500 μ L sterile distilled water. Then, 300 mg zirconia/glass beads (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) were added and the sample was placed in a Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany) for 10 min at 30 Hz to mechanically disrupt contained bacteria and centrifuged at $15,000 \times g$ for 5 min afterwards. DNA extraction was performed from the supernatant using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium), a detection method based on the amplification of the insertion element IS900 of MAP, following instructions provided by the manufacturer. Data were analyzed using QuantStudio Design & Analysis Software, v1.5.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cycle threshold (C_t) values of the duplicates were determined. Values without a specific qPCR signal were assigned to 45.0. The mean C_t values of the duplicates were calculated and used for sample classification. Samples with mean C_t values ≤ 40.0 were considered positive, and values > 40.0 were considered negative.

2.5.3. Dust Samples

A total of 20 mL of sterile distilled water was added to each sample and the tube vigorously vortexed. After overnight incubation at room temperature, the liquid was divided into two aliquots, and each aliquot was centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min using an ADIAFILTER (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). Supernatants were discarded, and the pellets were further used, one for cultural and one for qPCR analysis as described above, with slight modifications. The pellet used for bacterial cultivation was decontaminated with only 5 mL of 0.75% hexadecylpyridinium chloride monohydrate solution (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany).

2.5.4. Trough Water Samples

The whole sample volume of 1 L was stepwise centrifuged in tubes of 50 mL at 4200 rpm for 20 min. The resulting pellet was suspended in 2 mL of sterile distilled water, from which 1 mL was further processed for bacterial cultivation according to the method described for the dust samples.

From samples obtained during ES 1, 2 and 3, 500 μ L of the remaining 1 mL specimen were processed for qPCR analysis as described for the bedding and feed samples. From ES 4 onwards, 9 mL sterile distilled water was added to the remaining 1 mL specimen, and further DNA extraction was performed using the ADIAPURE PARATB MILK kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) according to the manufacturer's instructions to extract MAP DNA by immunomagnetic separation. Subsequently, the extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) under the same conditions as described above.

2.6. Data and Statistical Analysis

The Kappa coefficient was calculated for dichotomized MAP detection results (positive or negative) in environmental samples using culture and qPCR to measure the agreement between both detection methods. The result was classified as described by Landis and Koch [27].

Spearman's rank correlation coefficient was calculated to analyze the relationship between the GI (semi-quantitative culture result) and C_t values from qPCR sample analysis for all analyzed samples as well as each individual material if at least one positive culture result was obtained.

Characteristics listed in Table 1 were recorded for each environmental sample. The sampling sites were assigned to the following sampling locations: adult goat area (lactating goat pen, dry goat/kidding pen, buck pen), high animal traffic area (waiting area in front of the milking parlor, milking parlor, exit of the milking parlor), and youngstock area (juvenile goat pen, goat kid pen). Entrances to the barn were allocated to high animal traffic area during the grazing season and to adult goat area during the indoor season.

Table 1. Overview of recorded characteristics and conditions of environmental samples. (MAP = *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, HS = herd sampling).

Characteristic	Conditions
Material	Bedding
	Dust
	Feed
	Water
Location	Adult goat area
	High animal traffic area
	Youngstock area
Season	Grazing
	Indoor
Percentage of MAP shedders at nearest HS	Number culture-positive fecal samples/number analyzed fecal samples \times 100

Logistic regression models were used to determine the likelihood of a positive environmental culture and qPCR result related to the sample characteristics. The dichotomized result of MAP detection by the respective method was set as the dependent variable. Material, location, and season as categorical, as well as the percentage of MAP shedding goats at the nearest herd examination as a numeric independent variable, were entered into the qPCR model. Because there were no cases in certain characteristic condition groups, the independent variable 'material' was excluded from the culture model. For the same reason, samples from the youngstock area were not included. The fit of the models was assessed using the -2 log-likelihood value.

In general, the statistical significance level was set at $p = 0.05$. Data evaluation and statistical analysis were performed using Microsoft Office Excel version 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and MedCalc version 14.8.1; (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium). Figures were created using MedCalc and Microsoft Visio version 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3. Results

3.1. Herd Examination Using Fecal Culture

Herd examination using fecal culture was conducted six times between 2018 and 2022. Only a small number of the inoculated slants showed fungal growth. However, this did not result in any sample that could not be assessed. The proportion of positive fecal samples dropped from 30.0% (January 2018) to 1.7% (May 2022) over the period of four years, but fecal shedding was present at all time points during the study period (Table 2).

Table 2. Number and culture result of fecal samples collected during six examinations between 2018 and 2022 from goats older than one year.

Herd Examination	Number of Collected Samples	Positive Fecal Culture	
		<i>n</i>	%
2018 January	307	92	30.0
2020 April	286	27	9.4
2020 October	309	16	5.2
2021 May	414	13	3.1
2021 November	382	9	2.4
2022 May	407	7	1.7

3.2. Analysis Results of Environmental Samples

MAP was cultivated out of 28 (25.2%) bedding samples and one (1.8%) dust sample, whereas all water and feed samples were negative for viable MAP. This adds up to cultural MAP detection in 10.5% (29/256) of all environmental samples. Calculated GI ranged from 3.85 to 50.00 (see also Table 4). Fungal growth was partially observed in some dust samples and a few bedding samples, especially towards the end of the cultivation period. Positive culture results were obtained at 7 of 8 sampling time points. In August 2021 (ES4), cultivation of MAP was not possible from any environmental sample (Table A2). Culture-positive samples were obtained from various sites of the goat housing area but not from the youngstock area. Bacterial cultivation succeeded several times from bedding samples from the kidding pen and lactating goat pen as well as the milking area (waiting area, parlor, and exit). This area showed the most culture-positive bedding samples (47.6%), while the milking parlor was the sampling site with the highest proportion of MAP-positive samples (6/8; 75.0%). These sites, grouped together with the barn entrance during the grazing season as areas of high animal traffic, yielded 44.4% (12/27) of the culture-positive bedding samples. Bedding samples from other areas of the lactating goat pen were culturally positive in 38.1% of cases, and thus, this was the sampling site with the second most MAP detections. Kidding pens of adult goats were ranked third with 34.8% (8/23) (Figure 2). The culture-positive dust sample was collected from a kidding pen.

Positive qPCR results were obtained from 37 (64.9%) dust, 55 (49.6%) bedding, 12 (34.3%) water, and 13 (24.5%) feed samples, resulting in MAP DNA detection in 45.7% (117/256) of all environmental samples. The lowest measured C_t value was 27.57, obtained from a water sample. Minimum values of the other matrices were 28.58 (bedding), 31.29 (dust), and 36.11 (feed). The mean C_t value over all positive samples from all matrices was 35.62 (see also Table 4). During every ES, MAP DNA was detected in dust and bedding samples, whereas this was not the case for water and feed specimens (Table A2). In contrast to MAP culture, positive qPCR results were obtained from all areas of the stable, including the area of youngstock rearing and the buck pen (Figure 3).

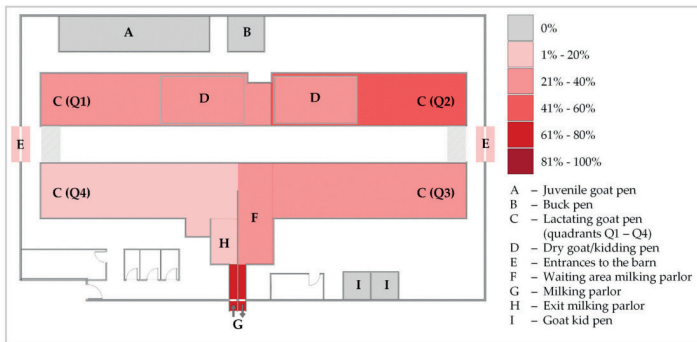


Figure 2. Heatmap indicating the percentage of culture-positive bedding samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the different sampling sites in the dairy goat barn over the study period. Dry goat/kidding pens (D) were set up temporarily within quadrants Q1 and Q2 during the kidding season in 2020 and 2021.

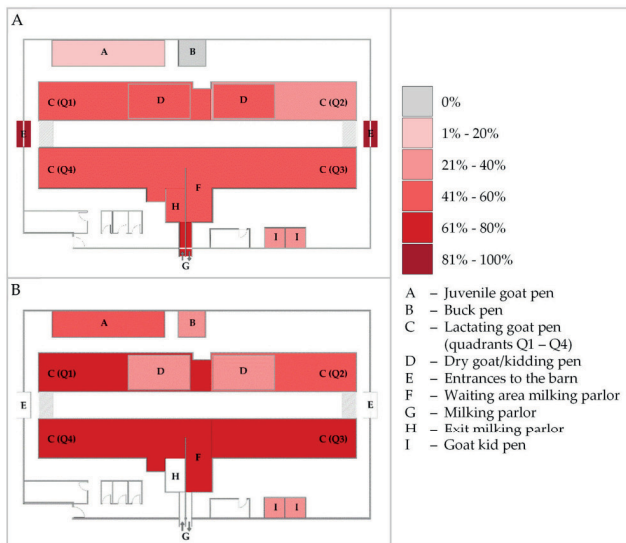


Figure 3. Heatmap indicating the percentage of qPCR-positive bedding (A) and dust (B) samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the different sampling sites in the dairy goat barn over the study period. Dry goat/kidding pens (D) were set up temporarily within quadrants Q1 and Q2 during the kidding season in 2020 and 2021. No dust samples were collected from the barn exits (E), the milking parlor (G), and its exit (H).

3.3. Statistical Analysis

3.3.1. Cohen’s Kappa

A slight agreement ($\kappa = 0.20$, 95% CI 0.11–0.28) [27] was observed between the MAP detection results (positive or negative) from environmental sample analysis by cultivation and qPCR (Table 3).

Table 3. Contingency table of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection results by culture and qPCR from 256 analyzed environmental samples used for Kappa test analysis.

qPCR Result	Culture Result		Σ
	Negative	Positive	
Negative	135 (52.7%)	4 (1.6%)	139
Positive	92 (35.9%)	25 (9.8%)	117
Σ	227	29	256

3.3.2. Spearman’s Rank Correlation

GI (semi-quantitative culture results) for cultivation on HEYM and qPCR C_t values of all environmental samples were significantly negatively correlated, with a corresponding Spearman’s rank correlation coefficient of $\rho = -0.401$ (95% CI -0.499 – -0.293). Bedding samples revealed the strongest correlation ($\rho = -0.529$), followed by dust samples ($\rho = -0.204$). No correlation was calculated for feed and water samples due to complete negative culture results (Figure 4, Table 4).

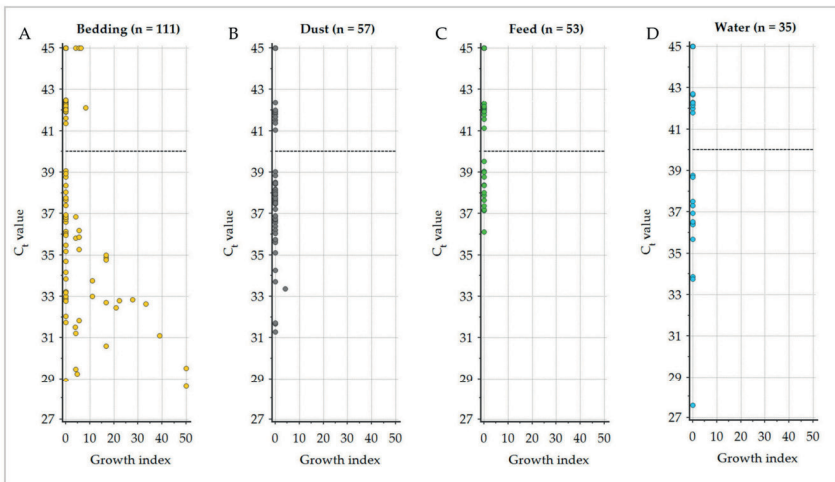


Figure 4. Distribution of the C_t values of qPCR analysis relative to the calculated growth index (semi-quantitative culture results) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the different sampling materials (A): bedding, (B): dust, (C): feed, (D): water displayed with the qPCR classification cut-off (40.0; dashed line).

Table 4. Spearman's rank correlation for growth index (GI) and C_t values of environmental samples tested for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using bacterial culture and qPCR.

Material	ρ	<i>p</i> -Value	Mean GI of Culture Positive Samples (Minimum, Maximum)	Mean C _t of qPCR Positive Samples (Minimum, Maximum)
All	−0.401	<0.001 *	14.64 (3.85, 50.00)	35.62 (27.57, 39.52)
Bedding	−0.529	<0.001 *	15.01 (3.85, 50.00)	34.41 (28.58, 39.08)
Dust	−0.204	0.128	4.17 (4.17, 4.17)	36.52 (31.29, 39.02)
Feed	—	—	—	38.03 (36.11, 39.52)
Water	—	—	—	35.79 (27.57, 38.78)

ρ = Spearman's rank coefficient. *: $p \leq 0.05$.

3.3.3. Logistic Regression

The logistic regression model for positive qPCR results revealed no significant effect of the percentage of MAP-shedding goats on the likelihood of MAP DNA detection ($p = 0.07$). The odds for a positive qPCR result were higher in dust than in any other material, with an odds ratio (OR) of 2.49 compared with bedding as reference and for samples collected during the indoor season with an OR for grazing season of 0.49. Samples from feed had a lower OR (0.385) than bedding. Further, samples collected from areas of high animal traffic were associated with higher odds for MAP DNA detection (OR: 3.03) compared to those from areas where adult goats are kept, while no difference was observed between the latter and samples from youngstock areas ($p = 0.095$) (Table 5).

Table 5. Outcome of the logistic regression model to estimate the relationship of the qPCR results of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to different environmental sample characteristics.

Characteristic	Positive qPCR Result		Negative qPCR Result		β^a	S.E. ^b	<i>p</i> -Value	OR ^c	95% CI ^d (OR)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%						
Material	Bedding	55	49.55	56	50.45	reference	—	—	—	
	Dust	37	64.91	20	35.09	0.913	0.363	0.012 *	2.49	1.22–5.08
	Feed	13	24.53	40	75.47	−0.965	0.399	0.016 *	0.38	0.17–0.83
	Water	12	34.29	23	65.71	−0.359	0.431	0.405	0.70	0.30–1.63
Location	Adult goat area	70	44.87	86	55.13	reference	—	—	—	—
	High animal traffic area	23	71.88	9	28.12	1.109	0.475	0.020 *	3.03	1.20–7.68
	Youngstock area	24	35.29	44	64.71	−0.563	0.338	0.095	0.57	0.29–1.10
Season	Grazing	25	40.32	37	59.68	−0.710	0.342	0.038 *	0.49	0.25–0.96
	Indoor	92	47.42	102	52.58	reference	—	—	—	—
Percentage of MAP shedders at nearest herd sampling					−0.105	0.058	0.069	0.90	0.80–1.01	

^a β : logistic regression coefficient, ^b S.E.: standard error, ^c OR: odds ratio, ^d 95% CI: lower and upper limits of the 95% confidence interval. *: $p \leq 0.05$

Another logistic regression was performed for positive culture results. The sampling location was modified by only distinguishing between high animal traffic areas and adult goat areas because MAP was not cultivated out of any sample collected from the youngstock area. The season and the percentage of MAP-shedding goats in the herd at the nearest herd examination were used in the same way as in the model described above. Of the three variables entered into the regression model, the location and season contributed significantly to the prediction of a positive culture result ($p = 0.029$; $p = 0.034$), while the percentage of MAP-shedding goats showed no significant effect. The odds for MAP cultivation were higher in samples collected from high animal traffic (OR: 3.34) compared

to those from other adult goat areas. In addition, sampling during grazing season revealed a lower likelihood (OR: 0.24) for positive culture results (Table 6).

Table 6. Outcome of the logistic regression model to estimate the relationship of the culture results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to different bedding sample characteristics.

Characteristic	Positive Culture Result		Negative Culture Result		β^a	S.E. β	p -Value	OR ^c	95% CI ^d (OR)	
	n	%	n	%						
	Location	Adult goat area	16	27.12						43
	High animal traffic area	12	44.44	15	55.56	1.025	0.552	0.029 *	3.34	1.13–9.84
Season	Grazing	4	18.18	18	81.82	–1.443	0.681	0.034 *	0.24	0.06–0.90
	Indoor	24	37.50	40	62.50	reference	—	—	—	—
Percentage of MAP shedders at nearest herd sampling					–0.105	0.058	0.069	0.90	0.80–1.01	

^a β : logistic regression coefficient, ^b S.E.: standard error, ^c OR: odds ratio, ^d 95% CI: lower and upper limits of the 95% confidence interval. *: $p \leq 0.05$

4. Discussion

This study was the first to evaluate the presence of MAP in various environmental materials collected from a dairy goat barn. The results allowed us to derive recommendations (1) for suitable sampling sites for the identification of infected goat herds using environmental sampling and (2) for measures to reduce MAP exposure of goat kids by classification of potential high-risk areas in the barn.

Overall, the detection of MAP in environmental samples was possible by both, qPCR and culture. This led to the conclusion that environmental samples are a suitable matrix for paratuberculosis confirmation in dairy goat herds. However, certain limitations must be considered.

MAP was only cultivated from bedding and dust, whereas samples from all materials were MAP DNA-positive. Dust samples had a significantly higher probability for qPCR-positive results than the other sampling matrices, while 96.6% of the culture-positive environmental samples were obtained from bedding. This indicates that the environmental sampling material should be selected depending on the intended analysis method.

The agreement between both detection methods was assessed as slight ($\kappa = 0.20$). This is mainly caused by 93 samples (35.9%) that were qPCR-positive but culture-negative. Fecal shedding of MAP by infected animals leads to the spread of the pathogen in the environment and, thereby, to multiple potential infection sources [5,13]. The first contact material, if present, would be bedding. Drying of the feces in combination with air circulation can lead to dissemination and sedimentary deposition. This sediment, which may or may not contain MAP, can settle on the bedding itself, on feed and water surfaces, or accumulate as dust on diverse objects in the barn [28]. The main factor for higher odds of MAP DNA detection in the dust samples is probably accumulation. Fresh forage is presented twice a day, the water in all troughs is changed daily, and new bedding material is provided when necessary. In contrast, the barn is only cleaned once a year in total, which provides a long period of time for dust to accumulate on the surfaces of barn facilities. In addition, Eisenberg et al. [14] showed that even after a cattle farm was completely destocked and cleaned with a high-pressure cleaner, MAP DNA could be found in analyzed dust samples. MAP can survive outside a suitable host for up to one year if appropriate environmental conditions are present [7]. However, in addition to viable, qPCR methods can also detect non-viable pathogens. Moreover, the existence of dormant or viable but non-cultivable states is confirmed for MAP. Dormancy describes the ability of bacteria to survive as a non-spore-forming cell without replication, mainly induced by unfavorable environmental

conditions [7]. Bacteria in this reversible state may have also been detected by qPCR but caused false negative culture results.

Sample handling might also play a role in the rate of detection of culturable MAP. Freezing environmental manure samples before cultural analysis leads to lower numbers of cultivated colony-forming units per sample compared to direct sample processing [15]. In addition, decontamination during the cultivation process may adversely affect MAP viability. For samples containing small numbers of MAP which may be irregularly distributed, pellet partitioning during sample preparation can lead to false negative results of one or both analytical methods. This is demonstrated by four bedding samples from which MAP could be cultivated while being negative in qPCR. The impact of the environmental sample preparation methods used in this study on the analytical sensitivity of cultural and molecular biological MAP detection was not determined. Principle procedures were based on techniques successfully used in former studies [7,14]. A decrease of 10^2 viable organisms was identified for soil samples spiked with feces from paratuberculosis-infected animals [13], leading to the assumption that low numbers of culturable MAP in the environmental samples may not have been detected, resulting in false negative sample classification. Taking all the mentioned factors into account, an underestimation of the true contamination of the barn environment with viable MAP is likely.

Nevertheless, a negative correlation between the C_t value and the GI was observed. A comparable relationship was reported for environmental manure samples from dairy cow herds in the US [15]. The Spearman's rank correlation coefficient reported by Aly et al. [15] for frozen environmental samples ($\rho = -0.611$) was higher than the one calculated in the current study for all sampling materials ($\rho = -0.401$). However, when only bedding samples, which would be equivalent to the manure samples, were considered, the negative correlation was even stronger ($\rho = -0.529$), demonstrating the influence of the sample material.

Since there are no former studies concerning MAP detection in dairy goat barns, comparisons can only be made with studies conducted in cattle farms. Most of these studies analyzed mixed manure samples and, thus, areas frequented daily by large numbers of adult animals, such as alleyways and the milking parlor. In each study, these areas were identified as having the highest probability for culturable MAP [9–11,17,18]. Similar results were obtained in the goat housing. Here, the milking area, and especially the milking parlor, revealed the most culture-positive bedding samples. Logistic regression results underscore this finding by calculating an OR of 3.34 for the probability of bedding samples from areas of high animal traffic being positive for MAP culture compared to samples from other adult goat areas. However, viable MAP was detected in more than one-third of the bedding samples from the kidding pens of adult goats. Opposing results were reported from cattle farms where MAP was cultivated only occasionally from calving pens (14.3–17%) which were considered a sampling site with lower contamination [9,10,17,18]. The most likely explanation for this finding is the difference in the time span cows and goats normally spend in these pens. Dairy cows are usually dried off and separated from lactating cows approximately six weeks before calving. While separate dry cow and calving pens exist on most cattle farms, goats in the study herd stayed in the same pen until after kidding. In addition, in most dairy cow herds, calving pens are cleaned daily or at short time intervals, whereas in the goat kidding pen, only fresh bedding was added throughout the whole kidding season. This can lead to an accumulation of MAP even if just one shedding doe is present in the pen.

Because the probability of pathogen shedding rises with the age of the animal [5], the lack of detection of culturable MAP from samples from the kid and juvenile goat areas is plausible. Raizman et al. [18] were also unable to cultivate MAP from samples from pre-weaned calf pens, whereas 3% of samples from post-weaned calf areas were MAP-positive. This may be due to early pathogen shedding or, more likely in herds with high paratuberculosis prevalence, an introduction from the adult cow area through common devices, footwear, etc., as also mentioned by Field et al. [21], who detected MAP DNA in

21% of boot swab samples from pre-weaned calf areas. The construction modalities of the goat kid pens at the study farm, which do not require entering under normal circumstances, most likely avoid this route of pathogen entry.

However, MAP DNA was detected at every sampling site in the goat barn. This includes areas that are accessed by adult goats as well as pens where kids and juvenile goats are kept. Other studies reported comparable results for cattle husbandries [12,14]. Environmental samples from areas of high animal traffic had a higher probability of being qPCR positive (OR: 3.03) than those from other adult goat areas. No significant difference was observed between the young and adult goat area, which is in clear contrast to the culture results, where MAP was not cultivated from any sample collected in the youngstock area. Dust was the matrix with the highest proportion of positive MAP DNA results. Because the milking herd and kids are kept in one common air space, airborne distribution of MAP, viable or not, from adult to young goat areas is likely, especially because of the proximity between the milking parlor and the goat kid pens in the studied barn. Higher average C_t values from all materials, in particular bedding, from young compared to adult goat areas support the assumption of directed dissemination between these barn compartments. Eisenberg et al. [14] confirmed airborne distribution of MAP by pathogen detection high above the animal level where fecal contamination was unfeasible. In contrast to samples from the ground of cubicles, there was no difference concerning the likelihood of positive dust samples collected above animal level between stocked and non-stocked barn areas.

Considering the results of qPCR and cultural analysis, the milking parlor is the most recommended sampling site for both analysis methods. The farm management and husbandry conditions of the studied goat herd were very similar to those that can be found in other commercial dairy goat farms in Germany as well as other countries with a commercial dairy industry in goats. However, since samples from only one herd and barn were examined in this explorative study, the current results must be confirmed in a larger comprehensive study, including several dairy goat farms.

Two of the eight ES (ES 4 and 8) were conducted during grazing season when only the juvenile goats were in the barn throughout the whole day. The remaining dairy herd was driven inside twice a day for milking. MAP DNA was detected at every ES, while MAP could be cultivated at 7 of 8 ES. No cultivation out of any sample was possible in August 2021 (ES 4). The logistic regression model for both analysis methods identified the season (indoor vs. grazing) as a significant variable concerning the likelihood of a positive analysis result. In both cases, samples collected during grazing season had a lower probability for MAP detection (qPCR: OR = 0.49; culture: OR = 0.24). Other studies in cattle farms determined no seasonal effect [11] or reported a higher percentage of positive samples during spring and summer in comparison to autumn and winter [9]; however, some frequently positive locations were not sampled at all times of the year in the second study. The studies provide no information concerning pasture use at the farms. The data from the current study indicate that the time animals spend inside the barn is important. Prolonged stays raise the likelihood of defecation and, thereby, the risk of MAP spread by shedding animals. Furthermore, intense animal movement may contribute to dust formation and airborne distribution in the housing [12,28]. Thus, MAP detection in environmental samples will be more successful during time periods when the majority of the herd stays inside the barn continuously.

Eisenberg et al. [14] cultivated MAP from several dust and water samples from a cattle farm. These data contrast with the present study. Firstly, fecal contamination of the trough water was possible in the cattle barn, whereas this was most likely not the case in the studied goat barn. More important, in contrast to the current study, only paratuberculosis-positive cattle which had previously shed MAP were introduced into the barn. Biannual testing of the goat herd showed that during the study period, only between 9.4% and 1.7% of the animals were active shedders of MAP. As intermittent shedding is known to occur during the subclinical disease stage [3] and the herd samplings were not carried out

together with the ES, these numbers only allow an approximate estimation of the precise situation at the particular ES.

Environmental manure or bedding samples are considered to be a form of pooled fecal sample due to the potential composition of feces from several animals. Thus, a dilution effect may lead to false negative results in herds with low disease prevalence [11]. Therefore, different studies tried to evaluate the correlation between MAP-positive environmental samples and disease prevalence. Donat et al. [10] estimated 87% sensitivity for the cultivation of manure samples from herds with a fecal prevalence > 2.0%. Eisenberg et al. [12] detected culturable MAP in settled-dust samples from cattle herds with low (one enzyme-linked immunosorbent-assay positive animal) but more frequently in herds with higher (two or more enzyme-linked immunosorbent assay positive animals) paratuberculosis prevalence. In the present study, logistic regression revealed no association between the number of MAP-shedding goats at the nearest herd sampling and the likelihood of MAP detection in environmental samples by culture or qPCR. A possible explanation for continuously positive qPCR results is that, despite the decreasing number of MAP shedders, the pathogen's DNA persists in the environment for a long time and, as mentioned earlier, is not completely eliminated by normal cleaning and disinfection routines. This assumption is supported by Eisenberg et al. [12], who detected MAP DNA in more than 50% of low- and high-prevalence cattle herds. The amount of MAP shed with the feces can vary with regard to the disease stage and the individual animal [3]. It is conceivable that one high-shedding doe introduces the same number of bacteria into the environment as several light shedders, leading to consistent cultural detection of MAP. Therefore, areas that are passed by each animal are favorable for MAP detection, even in herds with only a few active shedders.

The herd examinations indicate a decreasing number of MAP-shedding goats within the herd during the course of the study. However, the data on MAP detection in environmental samples imply that a small number of active MAP shedders in the herd can sufficiently contaminate the barn environment and, thus, maintain potential infection risks.

In 2018, two years before the first ES was conducted, vaccination was included in herd management as a measure to control paratuberculosis. Despite vaccination, the barn environment was still considerably contaminated with MAP. It has to be assumed that new infections occurred in each birth cohort. The findings of this study point out that vaccination as a single measure in disease control does not lead to a complete prevention of environmental contamination with MAP and, thereby, enables the disease to maintain in the herd.

In addition to demonstrating that MAP can be found in the environment of a paratuberculosis-infected dairy goat herd, the results of the present study also allow the identification of potential risk areas for MAP transmission at the farm level. MAP was detected in dust samples in the kid-rearing area, but only by molecular biological methods. As viable pathogens are needed to cause an infection, this route of exposure is probably less critical for kids. Nevertheless, a clear structural separation of adult and young animals would be preferable in general for a further reduction of airborne MAP dissemination between these groups. However, the successful cultivation of MAP from a dust sample from the kidding area is a cause for concern. Even if one out of 57 samples is still far less than what was detected in studies in cattle farms [12,14], the sampling site is the problematic aspect. In addition to the dust sample, MAP could be cultivated from several bedding samples in this area. If kids are not immediately separated from the does after parturition, as realized using the snatching method [5,29], the likelihood of MAP intake increases over time. To minimize the environmental MAP burden of this sensitive barn area, it is recommended to set up separate kidding pens for known MAP-infected animals, to shorten the cleaning and disinfection intervals, and not to use kids from infected does for replacement.

Bedding samples from the kidding and lactating goat pens revealed a high bacterial load. This is a possible risk for contamination of the udder skin, enabling MAP intake when kids are allowed to suckle from the does. Even though a study to detect MAP on

the udder skin of the goats from this herd revealed only low pathogen prevalence (10.3% qPCR-positive udder swabs) [30], the detection limits of the methods may underestimate the issue. This is another argument for the recommendation of immediate separation of the kids from the does.

The high MAP contamination of the milking parlor only plays a minor role in disease transmission since this area is only accessed by adult animals for a short time. It is assumed that a relatively high dose would be required to infect these animals [5]. In addition, environmental MAP contamination of the milk during the milking process was not detected [30]. However, the present results highlight this location as a suitable sampling site to determine the paratuberculosis-herd status using environmental samples.

Each analysis method has its specific advantages and disadvantages. When decisions about the appropriate method have to be made, the discussed key points, in combination with the objective of the investigation, should be taken into account. qPCR is an appropriate method for the identification of infected herds. Confirmation of MAP in the environment is a strong initial indicator of the presence of infected animals. MAP viability does not influence the analysis results, which increases the probability of pathogen detection. In this study, MAP DNA was detected in 117 out of 256 environmental samples, and thus, if only one sample had been taken, the MAP infection of the goat herd would have been identified in almost half of the instances. The likelihood can be increased if recommendations concerning sampling material, location, and season are considered during sample collection. Cultivation of environmental samples revealed fewer positive results (11.3%). However, MAP could be cultivated from 60.0% of bedding samples collected from high animal traffic areas during the indoor season. Therefore, this analysis method can also be suitable for paratuberculosis status determination and for confirmation of positive qPCR results. The lower limits of the within-herd prevalence of MAP-shedding animals resulting in a positive test outcome using environmental samples still have to be determined. A similarly important application of bacterial culture, however, is the identification of barn areas of high contamination with culturable MAP which serve as possible infection sites.

5. Conclusions

Environmental sampling can be an appropriate method for the identification of MAP-infected dairy goat herds and barn areas with a high bacterial load. To increase the probability of MAP detection, the collection of bedding or dust samples from areas with high animal traffic, especially from the milking parlor, is recommended. The applied analysis method should be chosen depending on the aim of the examination. qPCR is suitable for making a general statement about whether paratuberculosis is present in the herd or whether the direct animal environment is contaminated with MAP. Instead, cultural analysis can confirm that animals are actually shedding MAP, and identify crucial areas where the youngstock is at risk of being exposed to the pathogen and from which MAP can be spread in the barn, respectively. Detection of culturable MAP should be considered more important than solely DNA detection because of their potential role in paratuberculosis transmission. Incorporating these findings into the development of individual paratuberculosis control plans for husbandries of goats may promote efficient and effective disease control. However, to ensure the external validity of the obtained results, further research in a larger number of goat herds with different husbandry conditions and prevalence levels is needed.

Author Contributions: Conceptualization, C.P., K.D., U.M. and H.K.; methodology, C.P. and H.K.; formal analysis, C.P. and H.K.; investigation, C.P. and H.K.; resources, C.P. and H.K.; data curation, C.P. and H.K.; writing—original draft preparation, C.P. and H.K.; writing—review and editing, C.P., K.D., U.M. and H.K.; visualization, C.P.; supervision, K.D. and H.K.; project administration, K.D. and H.K.; funding acquisition, K.D. and H.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) via the Thüringer Aufbaubank, grant number 2019 LFE 0017.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Thuringian State Office for Consumer Protection, which is the competent authority for research ethics approval in Thuringia (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103, date of approval 1 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The dataset analyzed during the current study is available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We wish to acknowledge the dairy goat farmer involved in this study for his cooperation and friendly support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Table A1. Number of environmental samples of different materials from nine sampling sites in a dairy goat barn collected at eight environmental sampling events (ES) (total $n = 256$). B = bedding ($n = 111$), D = dust ($n = 57$), F = feed ($n = 53$), W = water ($n = 35$).

Sampling Site	ES 1			ES 2			ES 3			ES 4			ES 5			ES 6			ES 7			ES 8		
	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W
Buck pen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dry goat/kidding pen(s)	8	2	—	7	2	—	12	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Entrances to the barn	2	—	—	2	—	—	2	—	—	2	—	—	2	—	—	2	—	—	2	—	—	2	—	—
Goat kid pen(s)	9	7	1	7	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	2	1	1	1
Juvenile goat pen	—	—	—	3	1	1	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lactating goat pen	—	—	—	1	1	10	—	—	—	4	4	6	1	4	4	6	4	4	6	4	4	6	4	4
Milking rotary waiting area	1	—	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—
Milking rotary exit	1	—	—	1	—	—	1	—	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—

Table A2. Number of positive samples of bacterial culture and qPCR for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples per environmental sampling event (ES) (total $n = 256$).

Analysis Result	Sampling Material	Environmental Sampling Event								Σ
		ES 1	ES 2	ES 3	ES 4	ES 5	ES 6	ES 7	ES 8	
Culture positive	Bedding	5/21	3/15	5/16	0/11	5/11	6/11	2/14	2/12	28/111
	Dust	1/9	0/5	0/4	0/7	0/7	0/7	0/10	0/8	1/57
	Feed	0/1	0/11	N.s.	0/8	0/8	0/8	0/10	0/7	0/53
	Water	0/3	0/1	0/2	0/2	0/5	0/6	0/7	0/5	0/35
qPCR positive	Bedding	8/21	6/15	7/16	2/11	9/11	10/11	6/14	7/12	55/111
	Dust	7/9	2/5	1/4	6/7	3/7	5/7	7/10	6/8	37/57
	Feed	0/1	3/11	N.s.	0/8	1/8	3/8	6/10	0/7	13/53
	Water	1/7	0/1	0/2	1/2	0/5	3/6	6/7	1/5	12/35

N.s. = no sample of this material was collected.

References

- Sweeney, R.W. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **1996**, *12*, 305–312. [CrossRef]
- Whittington, R.J.; Windsor, P.A. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* **2009**, *179*, 60–69. [CrossRef]
- Windsor, P.A. Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* **2015**, *181*, 161–169. [CrossRef]
- Eisenberg, S.W.F.; Koets, A.P.; Nielen, M.; Heederik, D.; Mortier, R.; de Buck, J.; Orsel, K. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Res.* **2011**, *42*, 117. [CrossRef]

5. Windsor, P.A.; Whittington, R.J. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* **2010**, *184*, 37–44. [CrossRef]
6. Smith, M.C.; Sherman, D.M.; van Metre, D.C. *Goat Medicine*, 3rd ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2022; pp. 476–485.
7. Whittington, R.J.; Marshall, D.J.; Nicholls, P.J.; Marsh, I.B.; Reddacliff, L.A. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2989–3004. [CrossRef]
8. Whittington, R.; Donat, K.; Weber, M.F.; Kelton, D.; Nielsen, S.S.; Eisenberg, S.; Arrigoni, N.; Juste, R.; Sáez, J.L.; Dhand, N.; et al. Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 198. [CrossRef]
9. Wolf, R.; Barkema, H.W.; Buck, J.d.; Orsel, K. Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 275–287. [CrossRef] [PubMed]
10. Donat, K.; Schau, U.; Soschinka, A. Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mithilfe von Umgebungskotproben. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **2011**, *124*, 360–367. [CrossRef] [PubMed]
11. Lombard, J.E.; Wagner, B.A.; Smith, R.L.; McCluskey, B.J.; Harris, B.N.; Payeur, J.B.; Garry, F.B.; Salman, M.D. Evaluation of Environmental Sampling and Culture to Determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Distribution and Herd Infection Status on US Dairy Operations. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 4163–4171. [CrossRef] [PubMed]
12. Eisenberg, S.W.F.; Koets, A.P.; Hoebner, J.; Bouman, M.; Heederik, D.; Nielsen, M. Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial Dutch dairy farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6310–6312. [CrossRef] [PubMed]
13. Whittington, R.J.; Marsh, I.B.; Taylor, P.J.; Marshall, D.J.; Taragel, C.; Reddacliff, L.A. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* **2003**, *81*, 559–563. [CrossRef] [PubMed]
14. Eisenberg, S.W.F.; Nielsen, M.; Santema, W.; Houwers, D.J.; Heederik, D.; Koets, A.P. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet. Microbiol.* **2010**, *143*, 284–292. [CrossRef] [PubMed]
15. Aly, S.S.; Mangold, B.L.; Whitlock, R.H.; Sweeney, R.W.; Anderson, R.J.; Jiang, J.; Schukken, Y.H.; Hovingh, E.; Wolfgang, D.; van Kessel, J.A.S.; et al. Correlation between Herold 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.* **2010**, *22*, 677–683. [CrossRef]
16. Hahn, N.; Failing, K.; Eisenberg, T.; Schlez, K.; Zschöck, P.-M.; Donat, K.; Einax, E.; Köhler, H. Evaluation of different diagnostic methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in boot swabs and liquid manure samples. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 259. [CrossRef]
17. Pillars, R.B.; Grooms, D.L.; Kaneene, J.B. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Can. Vet. J.* **2009**, *50*, 1039–1046.
18. Raizman, E.A.; Wells, S.J.; Godden, S.M.; Bey, R.F.; Oakes, M.J.; Bentley, D.C.; Olsen, K.E. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 2959–2966. [CrossRef]
19. Wichert, A.; Kasbohm, E.; Einax, E.; Wehrend, A.; Donat, K. Detection of Low MAP Shedder Prevalence in Large Free- Stall Dairy Herds by Repeated Testing of Environmental Samples and Pooled Milk Samples. *Animals* **2022**, *12*, 1343. [CrossRef]
20. Zoche-Golob, V.; Donat, K.; Barkema, H.W.; de Buck, J.; Kastelic, J.; Wolf, R. Predicting sensitivity of repeated environmental sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds using a Bayesian latent class model. *Vet. J.* **2021**, *275*, 105728. [CrossRef]
21. Field, N.L.; Mee, J.F.; McAloon, C.G. Evaluation of Environmental Sampling for Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the Pre-Weaned Calf Area and Calving Area of Infected Dairy Farms Enrolled in a Voluntary Johne's Disease Control Programme. *Animals* **2023**, *13*, 669. [CrossRef]
22. Mortier, R.A.R.; Barkema, H.W.; Orsel, K.; Wolf, R.; de Buck, J. Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *BMC Vet. Res.* **2014**, *45*, 71. [CrossRef] [PubMed]
23. Groenendaal, H.; Nielsen, M.; Jalvingh, A.W.; Horst, S.H.; Galligan, D.T.; Hesselink, J.W. A simulation of Johne's disease control. *Prev. Vet. Med.* **2002**, *54*, 225–245. [CrossRef] [PubMed]
24. Friedrich-Loeffler-Institut. Paratuberkulose: Amtliche Methode und Falldefinition. Available online: https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00058039 (accessed on 5 May 2020).
25. Englund, S.; Ballagi-Pordány, A.; Bölske, G.; Johansson, K.-E. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1999**, *33*, 163–171. [CrossRef] [PubMed]
26. Köhler, H.; Soschinka, A.; Meyer, M.; Kather, A.; Reinhold, P.; Liebler-Tenorio, E. Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 74. [CrossRef]
27. Landis, J.R.; Koch, G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159. [CrossRef]
28. Carpenter, G.A. Dust in livestock buildings—Review of some aspects. *J. Agric. Eng. Res.* **1986**, *33*, 227–241. [CrossRef]

29. Nagel-Alne, G.E.; Asheim, L.J.; Hardaker, J.B.; Sølverød, L.; Lindheim, D.; Valle, P.S. The Norwegian Healthier Goats programme—A financial cost-benefit analysis. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *114*, 96–105. [[CrossRef](#)]
30. Pickrodt, C.; Donat, K.; Moog, U.; Köhler, H. Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. *Animals* **2022**, *12*, 1779. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.2.2 Studie 2

Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*

Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H. (2022): Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. *Animals* 12(14): 1779.

DOI: 10.3390/ani12141779.

Darstellung des Eigenanteils an Studie 2:

- Studienplanung: Pickrodt, C., Donat, K., Moog, U., Köhler, H.
- Studiendurchführung
 - Probennahme: Pickrodt C., Moog U., Köhler H.
 - Laboruntersuchungen: Pickrodt C., Köhler H.
 - Datenaufarbeitung: Pickrodt C.
 - Statistische Auswertung: Pickrodt C., Köhler H.
- Manuskripterstellung
 - Visualisierung: Pickrodt C., Köhler H.
 - Erstellung: Pickrodt C., Köhler H.
 - Revision: Pickrodt C., Donat K., Köhler H.

Eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen Anteile der einzelnen Autoren ist in der Publikation unter „Author Contributions“ angegeben und wurde von allen Autoren mit der Einreichung des Manuskripts bestätigt.

Article

Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*

Chris Pickrodt ¹, Karsten Donat ^{2,3}, Udo Moog ² and Heike Köhler ^{1,*}

¹ Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; chris.pickrodt@fli.de

² Thuringian Animal Diseases Fund, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Germany; kdonat@thtsk.de (K.D.); umoog@thtsk.de (U.M.)

³ Clinic for Obstetrics, Gynaecology and Andrology for Large and Small Animal Science with Veterinary Ambulance, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Straße 106, 35392 Giessen, Germany

* Correspondence: heike.koehler@fli.de; Tel.: +49-3641-804-2240

Simple Summary: The analysis of transmission routes for paratuberculosis as well as their prevention are critical for effective disease control. The aim of the present study was to assess the importance of colostrum and the udder skin as routes for transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) within a dairy goat herd. Swabs of the udder skin and colostrum samples were collected from goats of a paratuberculosis-infected herd during lambing season and analyzed for MAP DNA. Additionally, cultivation of the swabs was performed. MAP could not be detected in the colostrum. A low number of udder skin swabs was positive for MAP DNA but no bacteria could be cultured. Because the detection methods are imperfect, the occurrence of MAP in colostrum or on the udder skin can never be completely excluded. Therefore, present recommendations concerning colostrum and youngstock management should still be re-evaluated, but applied in goat herds within a paratuberculosis control program until the role of colostrum and udder skin for within-herd transmission of MAP is further investigated.

Abstract: Oral intake of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in first days of life is considered to be the main route of infection for paratuberculosis. This can be related to a direct contact to contaminated feces or feeding of MAP containing colostrum. Colostrum is believed to become contaminated either by lactogenic shedding or introduction of MAP from environmental sources. In this pilot study, the presence of MAP in individual and bulk colostrum samples from a paratuberculosis-infected, vaccinated dairy goat herd in Germany and the effect of udder skin disinfection on the MAP load of colostrum were examined. In order to distinguish between lactogenic shedding and fecal contamination, 49 udder skin swabs were cultivated on solid medium whereas 29 swabs were additionally analyzed by qPCR. qPCR was applied on 110 individual colostrum samples collected from 55 goats, one before and one after disinfection with a mycobactericidal disinfectant, and 14 bulk colostrum samples. MAP DNA was detected in 10.3% (3/29) of the swab samples, but no viable MAP was cultivated from any sample. These results indicate a low-level MAP contamination of the udder skin and colostrum of milking goats suggesting a low risk of MAP transmission via these routes.

Keywords: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP); goats; colostrum; udder skin swab



Citation: Pickrodt, C.; Donat, K.; Moog, U.; Köhler, H. Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. *Animals* **2022**, *12*, 1779. <https://doi.org/10.3390/ani12141779>

Academic Editors: Alfonso Zecconi and Fulvio Marsilio

Received: 28 April 2022

Accepted: 8 July 2022

Published: 11 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) causes a chronic wasting disease in ruminants known as paratuberculosis or Johne's disease. Symptoms such as emaciation despite normal feed intake, diarrhea and a decrease in milk yield are observed

partly after years of incubation. During the subclinical stage of the disease, the pathogen is already shed into the environment, primarily with the feces. Starting intermittent shedding frequency as well as intensity increases with disease progression [1–3]. Studies also revealed an increasing likelihood of a lactogenic shedding of MAP in animals showing clinical symptoms [4].

Infection occurs at a very young age, usually in the first days of life. This period is particularly relevant for disease control because susceptibility for the pathogen decreases with increasing age [5]. As the pathogen is most commonly ingested orally, MAP contaminated colostrum may serve as a source for earliest infection [1]. MAP was first detected in milk samples from clinically symptomatic cows in 1929 [6]. Further studies proved the presence in milk from asymptomatic cows [7] as well as in colostrum [8].

In contrast to bovine milk, studies about the prevalence of MAP in goat milk are rare. The percentage of DNA-positive samples varied considerably among studies, ranging from 1.94% to 37.74%. The results depended on the country where the study was conducted, which is probably associated with the locally common husbandry conditions. A high prevalence was found in India, whereas it was low in Brazil, Norway and the Netherlands [9]. Currently, there is no comparable study for German goat herds.

The presence of MAP in milk can be attributed on the one hand to lactogenic shedding or, otherwise, may result from external contamination occurring during or after milking [5,8,10]. Inappropriate milking or storage of the milk can lead to contamination with MAP containing feces or an introduction of the pathogen out of the farm environment. MAP has been detected in bedding, water, and dust samples from cattle and sheep farms in several studies [11–13]. In particular, herds with a high prevalence of MAP-shedding animals are at risk of intensive indoor spread [14]. Since MAP shows a long survival time in the environment [15], airborne spread or a transmission from burdened bedding over the udder skin into the milk during the milking process is conceivable. Diarrhea as a clinical symptom associated with heavy shedding of the pathogen may increase the contamination of the bedding and thus the risk of a transmission of MAP to the udder skin of other herd members as well.

Whether MAP can be transferred via the udder skin into the milk is not yet known. In part, this is due to the fact that no validated methods to determine the presence of MAP on the udder skin and in goat colostrum or milk are available.

This study focused on two different objectives. First, the prevalence of MAP on the udder skin and in the colostrum of dairy goats of a herd in Germany should be determined. As a carry-over of MAP from the farm environment via the udder skin into the colostrum is a conceivable route for contamination, the effect of a disinfection of the udder skin on the occurrence of MAP in the colostrum should be evaluated as well.

Validated diagnostic tools for the detection of MAP on the udder skin as well as in goat colostrum do not exist. Therefore, new methods for DNA extraction had to be developed and evaluated with respect to their limit of detection in combination with established kits for the molecular detection of MAP.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Welfare and Legislation

This study was carried out in strict accordance with European and national laws for the care and use of animals. It was approved by the Animal Health and Welfare Unit of the Thuringian State Office for Consumer Protection (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103). During the entire study every effort was made to minimize suffering.

2.2. Study Herd

Samples were collected from a commercial organic dairy herd of approximately 350 lactating goats in Thuringia, Germany, in March and May 2020, as well as in February and March 2021. Fecal shedding of MAP was detected by culture in 92 out of 307 (30.0%) of the herds' goats in 2018. Subsequently, all adult goats and the female youngstock had

been vaccinated with an inactivated vaccine (Gudair, CZ Vaccines, O Porriño, Spain). Further herd examinations in 2020 and 2021 revealed an apparent within-herd prevalence of 7.8% and 3.1% MAP shedders, respectively. Fecal shedding of each goat was repeatedly determined by fecal culture following a standardized protocol [16]. Goats with at least one positive culture result for MAP were considered as infected.

Rotational grazing was performed during the grazing season between May and November when goats are only driven into the barn for milking twice a day. The deep litter was removed before the end of the grazing season and new bedding material was added every day as necessary ensuring clean coat and udder skin. Dried off goats were grouped in separated pens approximately six weeks before lambing. The rotary milking parlor was located in the building but separated from the animal area by walls. Milking was performed without a prior cleaning of the udder or of the milking equipment within one milking time. The first three milk yields after lambing were obtained with a separate portable milking machine, and the milked colostrum of all goats during one milking time was collected in a bucket and fed as bulk colostrum to the goat kids.

Kids were raised at the farm for replacement. They were separated directly after birth and fed manually within the first five hours of life. After two further feedings of bulk colostrum, feeding was changed to an ad libitum supply of commercial milk replacer. During five days each of the lambing seasons in 2020 and 2021, every goat lambing within that time was sampled for the study regardless of the individual paratuberculosis status, body condition, age and number of parturitions. Samples were collected during the first milking time in the rotary milking parlor. In total, 110 individual colostrum samples and 49 swab samples from the udder skin as well as 14 bulk colostrum samples were obtained. In addition, udder skin swabs were taken from every goat of which individual colostrum samples were collected. From six goats, only colostrum was obtained. Four goats were sampled twice (in 2020 and in 2021); therefore, 55 individual samples were received from 51 goats. Five additional goats, not sampled individually, contributed to the bulk colostrum samples.

2.3. Detection of MAP Contamination of Udder Skin

2.3.1. Evaluation of Sampling Method for Swab Samples

Preparation of Bacteria

A dilution series was prepared consisting of a MAP-isolate (20MA0472) from a fecal sample of a goat from the study herd. To classify the MAP strain type, the PCR according to Collins et al. [17] was performed revealing the affiliation to the cattle-type (C-type).

The isolate was first sub-cultivated on Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and Amphotericin, Nalidixic acid and Vancomycin (HEYM, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and later transferred to Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) with glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), Middlebrook OACD enrichment and Mycobactin J (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) for further propagation at 37 °C. The suspensions optical density (OD) was measured at 580 nm and adjusted to 0.35 OD₅₈₀, followed by 10-fold serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁹) in distilled water. In total, 100 µL of each dilution was plated on Middlebrook agar 7H10 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) with glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), Middlebrook OACD enrichment, Mycobactin J (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and amphotericin B (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) to determine the bacterial counts of the suspension. Colony counts were obtained after 5 weeks of incubation at 37 °C.

Sampling Using Dry and Moistened Cotton Swabs

The udder skins of three adult goats from a paratuberculosis non-suspect herd were obtained after regular slaughter at a slaughterhouse. They were used to determine and compare the detection limit for MAP after sampling with dry and moistened cotton swabs. Remains of the glandular tissue were removed from the skins and 24 pieces of 10 cm² each were cut out and fastened on polystyrene pads.

A total of 1 mL of the 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-9} dilution as well as a distilled water control was evenly applied to four skin pieces each. After overnight drying, two of the four prepared skin pieces were sampled with dry sterile cotton swabs (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Germany) and two pieces were sampled with sterile cotton swabs moistened with distilled water. Two swabs were gently rubbed over each skin piece. Sticks were shortened and both swabs were transferred together into a sterile tube and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A second trial using only dry cotton swabs to increase the number of comparable attempts was performed. The abdominal skin of three 3-month-old goat kids from the same farm as the adult goats which underwent necropsy for a different study was transferred from the dissection hall to the laboratory. Hair and subcutaneous fat were removed. Five pieces of 10 cm^2 each were cut out per skin and fastened on polystyrene pads. A dilution series from 10^{-1} to 10^{-9} was prepared and the bacterial count was determined as described above. An amount of 1 mL of the dilution steps was applied to the skin parts and dried overnight. The skin pieces were sampled with dry sterile cotton swabs (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg Germany) the same way as described above.

Real-Time PCR (qPCR)

Each sample was analyzed by qPCR and culture. Therefore, swabs were thawed within the tube, 5.5 mL distilled water was added and the tube was placed in a shaking incubator for 48 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 50 rpm. After vortexing, 500 μL of the liquid was transferred to a 1.5 mL tube and DNA extraction was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium), a detection method based on the amplification of the insertion element IS900 of MAP, following instructions provided by the manufacturer. A reaction volume of 20 μL and 5 μL DNA template was used. A negative (nuclease-free water) and a positive control (provided within the kit) were included in each qPCR run. In total, 1 μL exogenous internal control of amplification (EPC-Amp) was added to each sample. qPCR was run on the QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Germany). The reaction conditions were 2 min at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 45 cycles of 15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 30 s at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Data were analyzed using the QuantStudio Design & Analysis Software, v1.5.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Mean cycle threshold (C_t) values of the duplicates were determined. Samples with C_t values ≤ 40.0 were considered positive. Values above the detection limit of 40.0 were considered negative and defined as 40.01 for analysis.

Bacterial Cultivation

A total of 5 mL of 1.5% Hexadecylpyridinium chloride monohydrate solution (HPC, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) was added to the remaining fluid and swabs in the tube. After shaking for 20 min at 200 rpm on a platform shaker, the tubes with the swabs were stored in the dark for 48 h at room temperature. Swabs were removed, and the supernatants were discarded to 5 mL and vortexed. Then, 250 μL was transferred on each of three slopes of HFYM and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 weeks. Examination of bacterial growth was conducted every second week starting after 42 days.

2.3.2. Udder Swab Samples Collected in the Study Herd

Animals

As described above, 49 milking goats were sampled directly after parturition during the first milking time on the collection days in the lambing periods in 2020 (number of samples (n) = 20) and 2021 (n = 29). The infection status of every participating goat was repeatedly determined before and during the study by fecal culture following a standardized protocol [16]. Goats with at least one positive culture result for MAP were considered as infected. This applied for five of the 49 samples (10.2%). Detailed information about the origin of the samples is provided in Table 1.

Table 1. Type and number of samples from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)-positive and negative goats within the study. A bulk colostrum sample was defined as originating from MAP-positive goats if at least one of the contributing goats was classified as MAP-positive.

Sample Classification	Number of MAP-Positive Goats	Number of MAP-Negative Goats	Total
udder swab	5	44	49
individual colostrum from non-disinfected udder	9	46	55
individual colostrum from disinfected udder	9	46	55
bulk colostrum	7	7	14

Sampling

Swab samples ($n = 49$) of the udder skin of the goats were taken with sterile cotton swabs (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Germany) while standing in the rotary milking parlor. Two dry swabs were successively rubbed over both udder halves and the teats of the goat. After shortening the sticks, both swabs were stored in a sterile tube, frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and transferred to the laboratory.

The samples from 2021 were analyzed by culture and qPCR the same way as described above. Samples from 2020 were analyzed by culture only. Deviating from the procedure applied in 2021, swabs were thawed within the tube and 5 mL of 0.75% HPC instead of 5 mL of 1.5% HPC were added to achieve a final concentration of 0.75% HPC in both years. The subsequent steps of bacterial cultivation remained unchanged.

2.4. Detection of MAP in Goat Colostrum

2.4.1. Evaluation of Detection Method for MAP in Goat Colostrum

After adjusting the bacterial suspension to 0.35 OD₅₈₀, 10-fold serial dilutions (10^{-1} to 10^{-8}) of MAP isolate 20MA0472 were prepared in bulk goat colostrum from the studied herd as well as in distilled water which was analyzed for bacterial counting the same way as described above. Two times 10 mL of every dilution were processed directly after preparation using the ADIAPURE PARATB MILK kit (Adiogene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) according to manufacturers' instructions to extract MAP DNA based on immunomagnetic separation (IMS). Subsequently, the extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiogene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) under the same conditions described above and mean C_t values were determined. Samples with C_t values ≤ 40.0 were considered positive. Values above the detection limit of 40.0 were considered negative and defined as 40.01 for analysis.

The experiment was performed twice, each time with newly prepared spiked colostrum.

2.4.2. Colostrum Samples Collected in the Study Herd

Animals

As described above, 55 milking goats were sampled directly after parturition during the first milking time. Bulk colostrum consisted of the milk from two to twelve goats. The age of the individually sampled goats varied between one and seven years. None of the goats showed clinical signs of paratuberculosis. Nine of the 55 individual colostrum sample sets (16.4%) originated from goats with at least one positive fecal culture result during regular herd examinations since 2018. A bulk colostrum sample was defined as originating from MAP-positive goats if at least one of the contributing goats was classified as MAP-positive. Seven of 14 collected bulks (50.0%) contained the milk of one (3/7; 42.9%) or two (4/7; 57.1%) infected goats. Detailed information about the origin of the samples is provided in Table 1 and Figure 1.

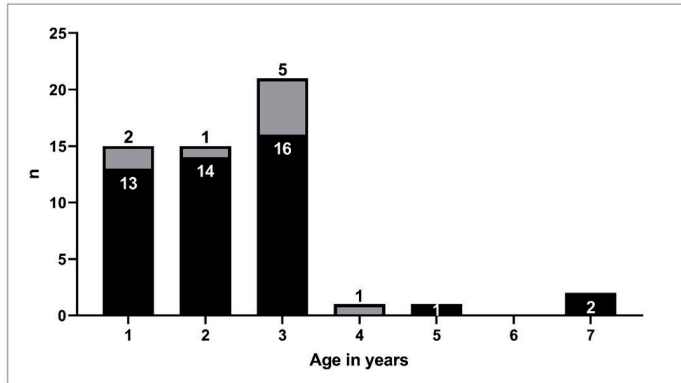


Figure 1. Age distribution and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) status of the sampled goats within the study ($n = 55$). MAP-negative (black, $n = 46$), MAP-positive (gray, $n = 9$).

Sampling

Two colostrum samples ($n = 110$) of approximately 30 mL each were obtained per animal on the day of lambing from both udder halves while standing in the rotary milking parlor. The first one was taken from the non-disinfected udder followed by a second sample after cleaning with a mycobactericidal disinfectant (Sterilium Tissue, BODE CHEMIE GmbH, Hamburg, Germany) and discard of the first milk. Furthermore, bulk colostrum samples ($n = 14$) were collected for analysis. A total of 50 mL of the separate bulks were bottled out of the collection bucket into a vial after the end of the milking time. All samples were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ directly after collection, transferred to the laboratory and kept at this temperature until further processing.

Samples were thawed at room temperature. In total, 10 mL of each colostrum sample was processed using the ADIAPURE PARATB MILK kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). DNA extracts were examined in duplicate by the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) following instructions provided by the manufacturer. Mean C_t values of the duplicates were determined. Samples with C_t values ≤ 40.0 were considered positive. Values above the detection limit of 40.0 were considered negative and defined as 40.01 for analysis.

2.5. Data Analysis

Data analysis was performed using Microsoft Office Excel version 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Figures were created using GraphPad Prism software version 9.1.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. MAP Contamination of Udder Skin

3.1.1. Detection Limit of MAP in Swab Samples

The colony counts revealed total MAP numbers in the OD-adjusted bacterial suspensions of 1.6×10^7 cfu/mL for the comparison of dry and moistened swabs (trial 1) and 2.1×10^7 cfu/mL for the following experiment with dry swabs only (trial 2).

C_t values obtained from dry swabs were higher than from moistened swabs in the 10^2 dilution (31.4 vs. 29.8). This difference disappeared in the 10^{-4} dilution (38.1 vs. 37.6) (Figure 2a). Apart from one detection in the 10^{-6} dilution of the MAP-suspension, C_t

values were regularly measured up to the 10^{-4} dilution corresponding to a MAP load of $1.6\text{--}2.1 \times 10^2$ cfu/cm² of skin when dry cotton swabs were used (Figure 2b).

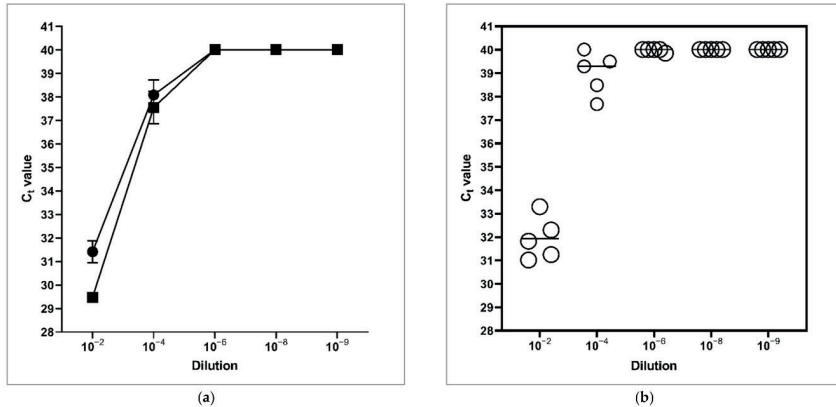


Figure 2. C_t values obtained for serial dilutions of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on udder skin by sampling with cotton swabs after DNA extraction using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). (a) Comparison of dry (●) and moistened swabs (■) expressed as means ± SD; (b) Comparison of dry swabs from trial 1 and 2. Each dot represents an individual sample. Mean C_t values of the dilutions are denoted by horizontal lines.

MAP was cultivated out of all dry (5/5, 100%) and all moistened (2/2, 100%) swab samples of the 10⁻² dilution within six weeks after inoculation and out of 3/5 (60%) of the dry swab samples of the 10⁻⁴ dilution within six to eight weeks after inoculation. MAP was not isolated from all other dry and moistened swabs of the dilutions 10⁻⁴ to 10⁻⁹. Hence, the detection limit by culture for viable MAP on the udder skin of goats using dry swabs is between 10² and 10⁴ cfu/cm².

3.1.2. Detection of MAP on the Udder Skin of Goats from a MAP-Positive Dairy Herd

MAP could not be cultivated from any of the processed swab samples (*n* = 49). C_t values of 35.8, 38.7 and 39.5, respectively, were detected in three of the 29 swab samples (10.3%), which were analyzed by qPCR. All positive samples originated from MAP-negative goats.

3.2. MAP Contamination of Colostrum

3.2.1. Detection Limit of MAP in Spiked Colostrum Samples

The colony counts revealed total MAP numbers in the OD-adjusted bacterial suspensions of 7.9×10^7 cfu/mL for the first trial and 3.3×10^7 cfu/mL for the second trial. The lowest dilution in spiked colostrum giving a detectable qPCR signal was about 10⁻⁶ (Figure 3), corresponding to a MAP load of 33–79 cfu/mL. Lower bacterial counts were not detectable. Hence, the detection limit for MAP DNA in goat colostrum is between 33 and 79 cfu/mL.

3.2.2. Detection of MAP in Colostrum of Goats from a MAP-Positive Dairy Herd

MAP could be detected neither in one of the 110 colostrum samples from 55 different goats nor in the 14 bulk colostrum samples by qPCR. All individual colostrum samples

obtained before and after a cleaning of the udder with a mycobactericidal disinfectant were negative.

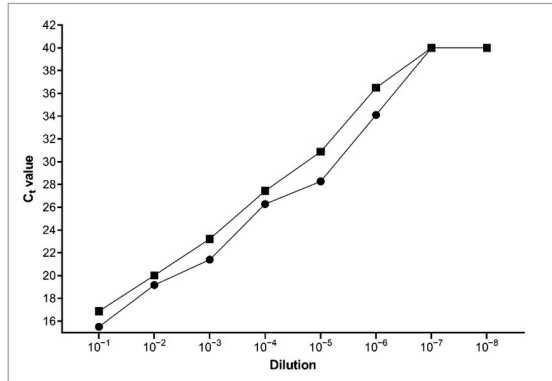


Figure 3. C_t values obtained for serial dilutions of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in caprine colostrum after DNA extraction using the ADIAPURE PARATB MILK kit and the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). Trial 1 (■) and trial 2 (●).

4. Discussion

This study analyzed colostrum samples and swabs of the udder skin from milking goats of a paratuberculosis-positive herd to determine the prevalence of MAP on the udder skin and in the colostrum. Furthermore, the effect of a disinfection of the udder on the occurrence of MAP in the colostrum was evaluated to ascertain if this measure can prevent a possible carry over of MAP out of the farm environment via the udder skin into the colostrum.

Assessment of MAP prevalence on the udder skin as a source of contamination of colostrum or milk was the first part of the study. For the sampling, a new protocol based on wiping sterile cotton swabs over the udder skin was developed and tested for its sensitivity concerning the detection of MAP DNA by qPCR and viable MAP by culture. Furthermore, we examined if dry or moistened swabs achieved better results. MAP DNA could be detected for amounts of 1.6 to 2.1×10^2 cfu/cm² and cultivation was successful down to bacterial loads between 10^2 and 10^4 cfu/cm². The direct comparison between dry and moistened cotton swabs revealed similar C_t values for DNA detection. Because of the comparable analytic sensitivity of both variants, it was decided to use dry swabs for the sampling of the goats in this study. This would also prevent a potential cross contamination using the same fluid to moisten different swabs during sampling at the farm.

In contrast to Pithua et al. [10], who detected MAP DNA in 60% of teat swabs of milking cows from a herd with paratuberculosis, in the present study, MAP could only be detected in 10.3% (3/29) of the samples. The high C_t values in combination with the completely negative culture results indicate a low contamination of the udder skin of dairy goats from the study herd with MAP. All positive samples originated from MAP-negative goats. This fact and the negative results of five MAP-positive animals lead to the assumption that the occurrence of MAP on the udder skin is independent from the fecal MAP status of the individual goat. However, the small number of samples allows no conclusion about the significance of this finding.

MAP DNA was not detected in the colostrum samples of the goats before and after disinfection of the udder skin. These results are in contrast to the common assumption that MAP can be shed into colostrum. For dairy cows, evidence for that transmission route is provided by some studies [4,8]. External contamination of colostrum by feces is discussed as an alternative source for MAP introduction [5,8,10]. Because of the limited number of studies concerning MAP detection in colostrum in small ruminants [9,18] it is difficult to rate our results in the context of the current knowledge concerning this field of research.

The fact that MAP DNA was not found in the 55 individual colostrum samples obtained aseptically after disinfection of the udder provided evidence that lactogenic shedding did not occur in the goats of our study. However, it cannot be ruled out that the MAP load of the colostrum, if any, was below the detection limit of our method, which amounted to 33–79 cfu/mL. As the commercial test kit for the detection of MAP used in this study was only validated for bovine milk, the detection limit for goat colostrum had to be determined in advance. Analysis of milk samples is hampered by the high content of protein and fat contributing to a low sensitivity of direct PCR without any further preparation of the sample [19]. This situation worsens when colostrum has to be examined due to its characteristic composition. Colostrum contains a higher proportion of fat, protein and somatic cells than milk [4,20]. Sample preparation by IMS has been proven to be an effective way to lower the detection limit of MAP in milk samples [19]. The specific method of IMS enables the separation of the desired bacteria from other PCR-inhibiting contents and their concentration. Using colostrum from the study herd, a limit of detection between approximately 33 and 79 cfu/mL was revealed. This is comparable to the limits of an IMS protocol developed by Grant [21] for the analysis of bovine milk samples with 20 cfu/mL. Therefore, a serious failure of the detection method is unlikely.

As shown by another study, an interference between the antibodies used for IMS and host antibodies induced by vaccination is unlikely. Dønne et al. [22] analyzed milk samples from goats at different points of lactation with a self-designed IMS method. There was no difference between vaccinated and unvaccinated animals concerning the percentage of positive samples.

Currently there is no certain knowledge about the amount of MAP shed into milk or the colostrum [23]. For infected but asymptomatic cows, a number of 2–8 cfu per 50 mL milk was suggested [7]. Stabel et al. [4] showed a relation between clinical disease stage and probability of lactogenic shedding of MAP. In total, 12.6% of analyzed milk samples from cows with subclinical and 49.2% from cows with clinical paratuberculosis were positive using direct PCR. Furthermore, the amount of MAP was higher in samples from clinically affected cows. An association between the occurrence of lactogenic and the intensity of fecal shedding in cows was also observed [8]. In that study, MAP was more often detected in the colostrum of high fecal shedders than of light shedders, but colostrum from two non-shedding cows was also positive for MAP. As there was not one goat in the clinical stage of paratuberculosis and just 16.4% (9/55) were diagnosed as infected with MAP in our study, this may have influenced the allover negative results. Furthermore, the whole study herd was vaccinated against paratuberculosis. The goal of this measure was to reduce MAP-shedding and to protract the clinical stage of the disease [2]. The probability to detect MAP in colostrum samples resulting from lactogenic shedding of the pathogen was therefore lower as if the study would have been carried out in a herd with a higher disease prevalence or if just infected goats or animals showing clinical symptoms of paratuberculosis would have been sampled. Additionally, 30 out of the 55 examined goats (54.5%) were two years or younger (Figure 1). As the severity of the disease increases with age [1], as a consequence, the likelihood of lactogenic shedding is low, as younger goats are more likely not to shed MAP into the colostrum. This assumption is supported by findings of Dønne et al. [22], who analyzed milk samples from goats of different ages and revealed that older goats showed more often positive results than younger goats. Nevertheless, the goats selected for this investigation represent the age profile of the study herd which is typical for a commercial dairy herd. In consideration of the limitations resulting from the

age as well as the corresponding stage of disease and amount of shedding, we decided not to apply any selection criteria to the sampled goats to avoid a selection bias.

Lactogenic shedding of MAP is assumed to be discontinuous as has been shown for fecal shedding [24,25]. During the dry period, MAP is possibly transferred within macrophages from the intestine over the lymphatic system to the udder. This can lead to an accumulation in the colostrum because macrophages are the most common mononuclear cells in the first milk [26,27]. This assumption was strengthened by studies where cows were sampled several times during lactation and more colostrum than milk samples were positive for MAP [4,8]. Similar results were observed for the lactogenic shedding in asymptomatic sheep. However, whereas six out of 20 examined sheep showed lactogenic shedding approximately ten days after parturition, no positive milk sample was obtained from goats (0/9) at this point [24]. This matches the negative results of the analyzed goat colostrum samples in our study. MAP-infected goats in the subclinical stage of disease appear to have a lower likelihood for MAP-positive colostrum than other ruminant species. In a study from The Netherlands, MAP could not be detected in any colostrum sample from animals in the subclinical stage of disease, whereas it was detected in four percent of the milk samples obtained later during lactation [18]. MAP was also detected in milk samples from dairy goats during different timepoints of lactation in a study from India [25]. Although the number of relevant studies is very small, there seems to be a genus difference which cannot be explained at the moment. Further studies are necessary to prove this difference and to elucidate the pathogenetic mechanisms behind it.

In addition to the individual colostrum samples, the analyzed bulk colostrum had also tested negative for the occurrence of MAP. These results were not surprising as the bulk colostrum was composed of the colostrum of two to twelve goats, where MAP was not detected in the individual samples. Even if MAP was detected in a small number of individual samples, the dilution effect resulting from pooling of different colostrum would have led to a further reduction of MAP per mL, possibly below the detection limit. Bulk colostrum in the study herd is prepared by milking individual goats into a container using a separate milking machine. This practice does not seem to be a source of contamination of the colostrum with MAP from the environment.

Due to the detection limit of 33–79 cfu/mL, the negative bulk colostrum samples can contain a small number of MAP, as already discussed. If this amount per mL is summed up to the recommended amount of colostrum of about 500 mL that the kid should receive within the first day of life, this can cause a total MAP intake of up to 10^4 cfu. Compared to an assumed infectious dose of 50 to 1000 cfu [26], an infection remains possible. This underlines the necessity of good colostrum management in the herd.

Despite the missing detection of MAP in the analyzed colostrum samples, general recommendations concerning youngstock rearing in paratuberculosis-infected herds should be applied. This includes the feeding of colostrum only from MAP-negative goats. Furthermore, the feeding of bulk colostrum is critical and should be avoided wherever possible. This may reduce the potential spread of even low numbers of MAP to several kids in herds with a high prevalence of MAP-shedding goats. Moreover, hygienic collection, storage and feeding is the basis for a good kid health in general. This can also include a preventive disinfection or cleaning of the udder before milking colostrum to minimize contamination with MAP as well as other bacteria.

In the present study, the assumed transfer of MAP over the udder skin into the colostrum could not be proven because most of the udder skin swabs were negative and MAP could not be detected in the colostrum samples before disinfection. Nevertheless, this finding remains a hypothesis and should be further examined. The presumably higher prevalence of MAP on the udder skin of dairy cows in comparison to goats suggests performing such a study in cattle as well.

5. Conclusions

MAP DNA could not be detected in colostrum samples from milking goats of a paratuberculosis-positive vaccinated herd. Despite contamination of the farm environment due to fecal shedders, the transmission of MAP onto the udder skin is low. The results suggest a minor risk of MAP transmission into the colostrum from the udder skin during the milking process. These findings stand in contrast to results from dairy cows where MAP detection in both sample types has been reported. As this pilot study only analyzed a small number of samples from one farm, further studies in dairy goat herds have to be conducted to confirm reproducibility of the presented results, preferably using the methods evaluated for this study to ensure comparability.

Common recommendations concerning colostrum and youngstock management for herds of small ruminants are often derived from cattle. With respect to the assumed differences between these genera concerning the presence of MAP in colostrum, recommendations regarding hygiene improvement for the control of paratuberculosis in small ruminants should be re-evaluated.

Author Contributions: Conceptualization, C.P., K.D., U.M. and H.K.; formal analysis, C.P. and U.M.; funding acquisition, K.D. and H.K.; methodology, C.P. and H.K.; project administration, H.K.; visualization, C.P. and H.K.; writing—original draft, C.P. and H.K.; writing—review and editing, K.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) via the Thüringer Aufbaubank, grant number 2019 LFE 0017.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Thuringian State Office for Consumer Protection, which is competent authority for research ethics approval in Thuringia (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103, date of approval 1 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank the dairy goat farmer involved in this study for his cooperation and friendly support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Windsor, P.A. Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* **2015**, *181*, 161–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Whittington, R.; Donat, K.; Weber, M.F.; Kelton, D.; Nielsen, S.S.; Eisenberg, S.; Arrigoni, N.; Juste, R.; Sáez, J.L.; Dhand, N.; et al. Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Collins, P.; Davies, D.; Matthews, P. Mycobacterial infection in goats: Diagnosis and pathogenicity of the organism. *Br. Veter. J.* **1984**, *140*, 196–201. [[CrossRef](#)]
- Stabel, J.; Bradner, L.; Robbe-Austerman, S.; Beitz, D. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 6296–6304. [[CrossRef](#)]
- Windsor, P.A.; Whittington, R.J. Evidence for age susceptibility of cattle to Jolme's disease. *Veter J.* **2010**, *184*, 37–44. [[CrossRef](#)]
- Alexejeff-Goloff, N.A. Zur Frage der Pathogenese und Bazillenauscheidung bei Rinderparatuberkulose. *Zeits. Infekt. Krank. Haus.* **1929**, *36*, 313–317.
- Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H.; Rosenberger, A.E. Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 166–171. [[CrossRef](#)]
- Streeter, R.N.; Hoffsis, G.F.; Bech-Nielsen, S.; Shulaw, W.P.; Rings, D.M. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* **1995**, *56*, 1322–1324.
- Roberto, J.P.d.L.; Limeira, C.H.; Barnabé, N.N.D.C.; Soares, R.R.; Silva, M.L.C.R.; Gomes, A.A.D.B.; Higino, S.S.D.S.; de Azevedo, S.S.; Alves, C.J. Antibody detection and molecular analysis for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) in goat milk: Systematic review and meta-analysis. *Res. Vet. Sci.* **2021**, *135*, 72–77. [[CrossRef](#)]
- Pithua, P.; Wells, S.J.; Godden, S.M.; Stabel, J.R. Evaluation of the association between fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* and detection in colostrum and on teat skin surfaces of dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2011**, *238*, 94–100. [[CrossRef](#)]

11. Lombard, J.; Wagner, B.; Smith, R.; McCluskey, B.; Harris, B.; Payeur, J.; Garry, F.; Salman, M. Evaluation of Environmental Sampling and Culture to Determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Distribution and Herd Infection Status on US Dairy Operations. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 4163–4171. [[CrossRef](#)]
12. Whittington, R.J.; Marsh, I.B.; Taylor, P.J.; Marshall, D.J.; Taragel, C.; Reddacliff, L.A. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* **2003**, *81*, 559–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Eisenberg, S.; Nielsen, M.; Santema, W.; Houwers, D.; Heederik, D.; Koets, A. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet. Microbiol.* **2010**, *143*, 284–292. [[CrossRef](#)]
14. Donat, K.; Schau, U.; Soschinka, A. Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mithilfe von Umgebungskotproben. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **2011**, *124*, 360–367. [[CrossRef](#)]
15. Whittington, R.J.; Marshall, D.J.; Nicholls, P.J.; Marsh, I.B.; Reddacliff, L.A. Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2989–3004. [[CrossRef](#)]
16. Friedrich-Loeffler-Institut. Paratuberkulose: Amtliche Methode und Falldefinition. Available online: https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00058039 (accessed on 5 May 2020).
17. Collins, D.M.; De Zoete, M.; Cavaignac, S.M. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains from Cattle and Sheep Can Be Distinguished by a PCR Test Based on a Novel DNA Sequence Difference. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 4760–4762. [[CrossRef](#)]
18. Lievaart-Peterson, K.; Lutikholt, S.; Gonggrijp, M.; Ruuls, R.; Ravestloot, L.; Koets, A.P. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA and Antibodies in Dairy Goat Colostrum and Milk. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Husakova, M.; Dziedzinska, R.; Slana, I. Magnetic Separation Methods for the Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Various Types of Matrices: A Review. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 5869854. [[CrossRef](#)]
20. Sánchez-Macias, D.; Moreno-Indias, I.; Castro, N.; Morales-delaNuez, A.; Argüello, A. From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 10–16. [[CrossRef](#)]
21. Grant, I. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet. Microbiol.* **2000**, *77*, 369–378. [[CrossRef](#)]
22. Dønne, B.; Jensen, M.; Grant, I.; Holstad, G. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* **2003**, *92*, 135–143. [[CrossRef](#)]
23. Barkema, H.W.; Orsel, K.; Nielsen, S.S.; Koets, A.P.; Rutten, V.P.M.G.; Bannantine, J.P.; Keefe, G.P.; Kelton, D.F.; Wells, S.J.; Whittington, R.J.; et al. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 125–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nebbia, P.; Robino, P.; Zoppi, S.; De Meneghi, D. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Rumin. Res.* **2006**, *66*, 116–120. [[CrossRef](#)]
25. Singh, M.; Gupta, S.; Chaubey, K.K.; Singh, S.V.; Sohal, J.S. Profiling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the milk of lactating goats using antigen-antibody based assays. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *64*, 53–60. [[CrossRef](#)]
26. Chiodini, R.J. Immunology: Resistance to Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **1996**, *12*, 313–343. [[CrossRef](#)]
27. Hurley, D.J.; Kensinger, M.H.; Mastro, A.M.; Wilson, R.A. An evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and non-specific esterase staining. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1990**, *25*, 177–193. [[CrossRef](#)]

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Fragestellung

Im Rahmen der Evaluierung von Umgebungsproben zur Bestimmung und Überwachung des Paratuberkulose-Herdenstatus wurden in Rinderhaltungen verschiedene Stallbereiche auf das Vorkommen von MAP untersucht (Raizman et al. 2004; Lombard et al. 2006; Pillars et al. 2009; Donat et al. 2011; Wolf et al. 2015). Neben der Etablierung einer kostengünstigeren Methode zur Bestandscharakterisierung im Vergleich zur Gesamtbstandsuntersuchung mittels Kotproben (Wolf et al. 2015), konnten durch diese Studien Stallbereiche mit hoher MAP-Kontamination identifiziert werden. Diese stellen potenzielle Orte für die Übertragung des Erregers auf nicht infizierte Tiere dar. Vergleichbare Untersuchungen in mit Paratuberkulose infizierten Milchziegenherden fehlen zum momentanen Zeitpunkt. Aufgrund der zum Teil erheblichen Unterschiede in der Haltung und im Herdenmanagement der beiden Wiederkäuergattungen sind die Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragbar. Um diese Wissenslücke zu schließen, wurden in der vorliegenden Arbeit Umgebungsproben aus verschiedenen Produktionsbereichen einer von Paratuberkulose betroffenen Milchziegenherde auf das Vorhandensein von MAP untersucht. Zusätzlich wurden für jede entnommene Probe weitere managementassoziierte Parameter erhoben, um nach einer statistischen Auswertung Rückschlüsse auf deren Einfluss auf die Nachweiswahrscheinlichkeit von MAP ziehen zu können (Studie 1).

MAP konnte bereits in einer Vielzahl unterschiedlicher Matrices nachgewiesen werden. Neben typischen Untersuchungsmaterialien der individuellen Einzeltierdiagnostik wie Blut, Organgewebe, Kot oder Milch (Sweeney et al. 1992b; Buergelt und Williams 2004; Köhler et al. 2015) wurde das Vorkommen auch in der Umwelt in Staub, Wasser, Futter und Bodenproben bestätigt (Whittington et al. 2003; Pillars et al. 2009; Eisenberg et al. 2010a; Fecteau et al. 2013; Waddell et al. 2016). Der Nachweis eines Erregers an einem bestimmten Ort oder in einem bestimmten Material wirft immer die Frage nach seiner epidemiologischen Bedeutung auf. Dies umfasst sowohl den Eintragsweg als auch die Frage, inwieweit davon ein potenzielles Infektionsrisiko ausgeht. Die meisten Studien über die Verbreitung von MAP in der

Umwelt haben sich jeweils nur auf ein oder wenige Materialien konzentriert. Dies erschwert die Identifizierung und Bewertung möglicher Zusammenhänge sowie die exakte Einordnung der Ergebnisse in das komplexe Infektionsgeschehen der Paratuberkulose. Um eine solche umfassende Analyse in einem Bestand zu ermöglichen, wurden in Studie 1 alle relevanten Matrices aus der Stallumgebung einbezogen.

Eine frühzeitige und ausreichende Kolostrumversorgung der Lämmer ist für den Aufbau eines adäquaten passiven Immunschutzes durch den Transfer von Antikörpern von entscheidender Bedeutung (Ganter et al. 2012a; Sánchez-Macias et al. 2014). Die natürliche Aufnahme aus dem Euter des Muttertieres erfolgt innerhalb der ersten ein bis zwei Lebensstunden *post partum* (Ganter et al. 2012a). Zu diesem Zeitpunkt sind die neugeborenen Lämmer besonders empfänglich für eine Infektion mit MAP, weshalb dies einen kritischen potenziellen Infektionsmoment darstellt (Chiodini et al. 1984; Sweeney 1996; Windsor und Whittington 2010).

Neben der fäkalen Erregerausscheidung kann MAP auch laktogen mit der Milch ausgeschieden werden (Sweeney et al. 1992b; Stabel et al. 2014). Darüber hinaus wurde der Erreger bereits in bovinem Kolostrum nachgewiesen (Streeter et al. 1995; Pithua et al. 2011; Stabel et al. 2014). In kommerziellen Milchproduktionsbetrieben wird häufig betriebseigenes Kolostrum an die Jungtiere vertränkt oder die Aufnahme erfolgt noch direkt vom Muttertier vor der Separierung der Nachkommen (Nielsen et al. 2008; Sieber 2014; Manek et al. 2017). Diese Praxis birgt das Risiko der Übertragung von MAP zu einem sehr frühen Zeitpunkt (Sweeney 1996). Neben der laktogenen Erregerausscheidung kann eine Kontamination des Gemelks ebenso während des Melkvorgangs durch den externen Eintrag von MAP hervorgerufen werden (Streeter et al. 1995; Pithua et al. 2011). Erfolgt die erste Kolostrumaufnahme direkt am Muttertier, kann ein Erregerkontakt auch über die kontaminierte Zitzenhaut gegeben sein (Ayele et al. 2001; Nielsen et al. 2008; Pithua et al. 2011).

Der Nachweis von MAP in Ziegenmilch und -kolostrum gelang bereits mehrfach, jedoch vorrangig bei klinisch auffälligen Tieren (Nebbia et al. 2006; Lutikholt et al. 2019; de Lacerda Roberto et al. 2021). Darüber hinaus konnten verschmutzte Euter als Risikofaktor für die Seropositivität von Herden kleiner Wiederkäuer identifiziert werden (Iarussi et al. 2019). Obwohl die Übertragung von MAP über die Euterhaut seit langem diskutiert und zumindest bei bekannt positiven Tieren eine Euterreinigung als

Präventionsmaßnahme empfohlen wird (Sweeney 1996; Ayele et al. 2001; Windsor und Whittington 2010), wurde das Vorkommen von MAP auf der Euterhaut bisher nur in einer Studie bei Rindern konkret betrachtet (Pithua et al. 2011). Für Ziegen liegen diesbezüglich bislang keine Daten vor. Aufgrund der unterschiedlichen Kotkonsistenz und Haltungsbedingungen der beiden Wiederkäuergattungen ist mit Unterschieden zu rechnen, die einen Einfluss auf das von der Kolostrumaufnahme aus dem Euter des Muttertieres ausgehende Infektionsrisiko haben können.

Die genaue Bedeutung der Übertragung von MAP über das Kolostrum im gesamten Infektionsgeschehen ist insbesondere für Ziegenhaltungen daher bisher noch unklar (Barkema et al. 2018; Lievaart-Peterson et al. 2019). Um die Rolle des Saugens am Muttertier als Infektionsweg besser zu verstehen, wurden in Studie 2 Kolostrumproben und Euterhauttupfer aus der Studienherde untersucht. Dies beinhaltete die Bestimmung des Vorkommens von MAP im Kolostrum von Tieren der Projektherde und auf deren Euterhaut.

In mit Paratuberkulose infizierten Herden können erhebliche wirtschaftliche Verluste durch verringerte Schlachterlöse und eine verminderte Milchleistung erkrankter Tiere, höhere Remontierungsraten und tierärztliche Kosten entstehen (Hasonova und Pavlik 2006; Kudahl und Nielsen 2009; McAloon et al. 2016). Die Bereitschaft der Tierhalter, alle in verschiedenen aktuellen Sanierungsprogrammen und den Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2014) aufgeführten Maßnahmen umzusetzen, ist dennoch teilweise eingeschränkt. Insbesondere die Verfügbarkeit von finanziellen und zeitlichen Ressourcen sowie betriebsstrukturelle Gegebenheiten werden dabei als Gründe angeführt (Roche et al. 2019). Es ist daher von entscheidender Bedeutung, die bestehenden Empfehlungen hinsichtlich ihrer Eignung zur Unterbindung von Neuinfektionen zu klassifizieren, um mit einer möglichst geringen Anzahl von Maßnahmen eine größtmögliche Wirkung zu erzielen. Dazu ist ein umfangreiches Verständnis der Übertragungswege von MAP zwingend erforderlich. Die Empfehlung, wenige, dafür gezielte und speziell auf die individuelle Betriebssituation abgestimmte Maßnahmen umzusetzen, kann zu einer höheren Compliance des Tierhalters und damit zu einer effektiven Bekämpfung beitragen (Roche et al. 2019).

4.2 Diskussion der Methode

4.2.1 Allgemeines Studiendesign

Das Ziel der beiden vorliegenden Studien war die Untersuchung des Vorkommens von MAP in der Stallumgebung, auf der Euterhaut und im Kolostrum von Ziegen. Aufgrund des primär fäkal-oralen Übertragungsweges der Paratuberkulose stellen diese Medien jene mit dem größten Risiko dar, eine entscheidende Rolle im Infektionsgeschehen der Herde zu spielen (Sweeney 1996; Doré et al. 2012; Windsor 2015). Um die dieser Arbeit zugrundeliegenden Fragestellungen zu beantworten, wurden Untersuchungen in einer mit Paratuberkulose infizierten Milchziegenherde durchgeführt. Die im Rahmen dieser Feldstudie gewonnenen Daten spiegeln die reale Situation in einem kommerziell wirtschaftenden Betrieb wider. Nur so konnte eine praxisrelevante Einordnung der gewonnenen Ergebnisse erfolgen und eine Grundlage für deren externe Validität geschaffen werden.

Bei dem untersuchten Projektbetrieb handelte es sich um eine Milchziegenhaltung, die in wesentlichen Punkten des Betriebs- und Herdenmanagements mit anderen Herden in Deutschland vergleichbar war. Jedoch können Unterschiede zu anderen Betrieben in Bezug auf die Herdengröße, das Stallgebäude, den Weidegang sowie die Trennung der Lämmer von den Muttertieren direkt nach der Geburt bestehen (Ganter et al. 2012a; Sieber 2014; Manek et al. 2017). Dies kann Auswirkungen auf den Tierverkehr im Stall und das Kolostrummanagement haben. Daher handelt es sich bei den durchgeführten Untersuchungen um explorative Studien. Obwohl davon auszugehen ist, dass die identifizierten Infektionsquellen auch auf andere Milchziegenhaltungen übertragbar sind, ist es zur Sicherung der externen Validität wichtig, die Untersuchungen in anderen Beständen mit ähnlichen und abweichenden Haltungsbedingungen zu wiederholen (Kreienbrock et al. 2012).

In beiden Studien wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Diagnostika in Verbindung mit allgemeinen Aufarbeitungsschritten eingesetzt. Damit sollte die Reproduzierbarkeit auch für andere Untersuchungslabore und somit die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse gewährleistet werden.

Die Probennahmen erfolgten regelmäßig zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von drei Jahren. Dadurch war es möglich, einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Produktionsphasen sowie der Entwicklung der

Paratuberkulose-Prävalenz während der Bestandssanierung und der Verbreitung von MAP im Stallgebäude bei der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Außerdem konnte auf diese Weise die anhaltende MAP-Belastung der Stallumgebung über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. Die Kolostrumuntersuchungen, die während zwei Ablampperioden durchgeführt wurden, lieferten untereinander vergleichbare Ergebnisse.

4.2.2 Studie 1

Die Auswahl der Untersuchungsmatrizes aus der Stallumgebung (Einstreu, Staub, Tränkwasser, Futter) basierte auf dem bereits erfolgten Nachweis von MAP in diesen Materialien (Whittington et al. 2003; Pillars et al. 2009; Eisenberg et al. 2010a) und der damit verbundenen Möglichkeit, als unbelebte Vektoren zu fungieren. Um die methodisch bedingte Variabilität der Umgebungsproben zu minimieren, wurde das Probennahmeverfahren standardisiert und bei jeder Probennahme angewandt. Dies beinhaltete die Festlegung der Entnahmestellen sowie die Technik der Probennahme. Damit sollte sichergestellt werden, dass Unterschiede in den Analyseergebnissen ausschließlich auf den MAP-Gehalt der Proben zurückzuführen sind. Nur so konnte der tatsächliche Einfluss der für jede Umgebungsprobe zusätzlich erhobenen Charakteristika statistisch zuverlässig ermittelt werden (Aly et al. 2009; Kreienbrock et al. 2012).

Im Stallgebäude wurden neun Entnahmelokalisationen entsprechend der Aufstallung der Herde definiert. Die Auswahl der Probenlokalisationen basierte auf dem Bestreben, alle Bereiche des Stalles abzudecken, zu denen die Ziegen Zugang hatten und in denen somit die Möglichkeit eines Kontaktes zwischen Tier und Erreger bestand. Ein besonderer Fokus wurde auf die Aufenthaltsbereiche von Lämmern gelegt, da diese Altersgruppe eine besonders hohe Suszeptibilität aufweist (Windsor und Whittington 2010).

Sofern vorhanden wurden an jeder Lokalisation Proben vier verschiedener Materialien entnommen. Die angewandten Probennahmetechniken sollten ein höchst mögliches Maß an Reproduzierbarkeit, Repräsentativität und Aussagekraft für die Übertragungswege von MAP gewährleisten.

Diskussion

Da in der amtlichen Methodensammlung des FLI keine Protokolle für die Untersuchung von Umweltproben beschrieben sind (Friedrich-Loeffler-Institut 2020), wurden hierfür eigene Protokolle entwickelt. Der direkte Erregernachweis kann prinzipiell mit mikro- oder molekularbiologischen Methoden erfolgen. Vermehrungsfähige MAP können beziehungsweise in verschiedenen Nährmedien kultiviert werden. MAP-DNA hingegen kann unter anderem mittels einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (englisch: real-time quantitative polymerase chain reaction; qPCR) in Proben nachgewiesen werden, was zusätzlich den Nachweis von nicht vermehrungsfähigen, toten oder in einer Dormanzphase befindlichen Erregern ermöglicht (Whittington et al. 2004; Whittington 2020). Die Unterscheidung hinsichtlich des verwendeten Verfahrens zum Erregernachweis in der Stallumgebung ist für die Aussage über das Risiko als Infektionsquelle von Bedeutung (Eisenberg et al. 2010b). Daher wurden alle Umgebungsproben sowohl mittels qPCR als auch kulturell auf das Vorkommen von MAP untersucht.

Neben einer qualitativen Aussage über das Vorhandensein vermehrungsfähiger Erreger erlaubt die kulturelle Anzucht von MAP auch eine quantitative Abschätzung der Kontaminationsstärke. Zur Berechnung eines semiquantitativen Wachstumsindex in Anlehnung an Köhler et al. (2015) wurde die Anzahl der auf dem Nährmedium sichtbaren Einzelkolonien bestimmt und anschließend kategorisiert. Da der Wachstumsindex aufgrund der exponentiellen Vermehrung der Bakterien von der Bebrütungszeit der Proben beeinflusst wird, wurde diese als Faktor berücksichtigt. Jede Probe wurde gemäß der amtliche Methodensammlung des FLI in einem Dreifachansatz kultiviert (Friedrich-Loeffler-Institut 2020). Um eine mögliche aufarbeitungsbedingte Ungleichverteilung der Erreger in der Probe zu berücksichtigen, wurde für die Bewertung des Wachstums der Mittelwert aller Anlagen gebildet (Marquetoux et al. 2019).

Um die Ergebnisse des Nachweises von MAP mittels Kultur und qPCR vergleichen zu können, wurde die Interrater-Reliabilität mithilfe des Kappa-Koeffizienten (Landis und Koch 1977) bestimmt. Dieser Parameter kann in Kombination mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman interpretiert werden, der einen Zusammenhang zwischen quantitativen Parametern beschreibt (Kreienbrock et al. 2012). In der durchgeführten Auswertung wurden hierfür der berechnete Wachstumsindex und die Höhe des mittels qPCR ermittelten

C_t-Wertes (cycle threshold) verwendet. Diese statistischen Analysen erlaubten eine Aussage über die Übereinstimmung der mikro- und molekularbiologischen Untersuchungsmethoden.

Die verwendeten Verfahren zur Probenaufarbeitung und Analyse der einzelnen Umgebungsmaterialien wurden in Anlehnung an die Methodik in anderen Studien mit ähnlichen Fragestellungen konzipiert (Whittington et al. 2004; Whittington et al. 2005; Eisenberg et al. 2010b). Untersuchungen zum Einfluss der Methodik auf die analytische Sensitivität oder Versuche zur Bestimmung einer minimalen Nachweisgrenze wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Der Nachweis von MAP-DNA in allen Matrices lässt eine prinzipiell ausreichende Eignung der Verfahren annehmen. Die Tatsache, dass MAP trotz positiver qPCR-Ergebnisse nicht aus Tränkwasser- und Futterproben angezüchtet werden konnte, wirft jedoch Fragen auf. Einerseits können die negativen Ergebnisse auf das Fehlen vermehrungsfähiger Erreger in den Proben zurückzuführen sein, andererseits könnte auch eine ungeeignete Probenaufbereitung oder eine geringe Sensitivität zu falsch-negativen Ergebnissen geführt haben.

Solche methodischen Einflussfaktoren umfassen sowohl das aus logistischen Gründen erforderliche Einfrieren und anschließende Auftauen des Probenmaterials als auch dessen Dekontamination in Vorbereitung auf die Kultivierung, um ein Überwachsen der Nährmedien durch Begleitflora zu minimieren (Aly et al. 2010; Whittington 2020). Es besteht daher die Möglichkeit einer falsch-negativen Probenklassifizierung aufgrund eines sehr geringen MAP-Gehalts in den Proben. Dies wird durch eine Studie untermauert, welche die Reduktion um 10² kultivierbare Organismen in mit MAP-kontaminiertem Kot gespickten Bodenproben zeigte (Whittington et al. 2003). Auch können Probenbestandteile wie Stroh die Anzucht nachteilig beeinflussen (Wolf et al. 2017).

Insgesamt ist folglich generell von einer Unterschätzung der MAP-Kontamination auszugehen. Dies ist insofern relevant, als dass eventuell nicht alle potenziell an der Übertragung von MAP beteiligten Vektoren und Risikobereiche im Stall identifiziert werden konnten. Umgekehrt gewinnen positive Ergebnisse durch die wahrscheinlich hohe Keimzahl, die dafür notwendig war, umso mehr an Bedeutung.

Im Rahmen von Studie 1 konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anwendung einer kommerziellen qPCR als auch die kulturelle Anzucht in Anlehnung an die

Methodensammlung des FLI (Friedrich-Loeffler-Institut 2020) geeignete Verfahren sind, um MAP in Umgebungsproben nachzuweisen. Dies bildet die Grundlage für die Identifizierung von Risikobereichen für eine Erregerübertragung. Der Nachweis von MAP-DNA gelang in allen vier untersuchten Umgebungsmatrizes, wohingegen die kulturelle Anzucht nur aus Einstreu und Staub möglich war. Hierbei wiesen insgesamt deutlich mehr Proben ein positives qPCR- als Kulturergebnis (45,7 % versus 11,3 %) auf. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden wurde auf Basis des Kappa-Koeffizienten als leicht bewertet (Landis und Koch 1977). Insbesondere wurden Abweichungen zwischen den Untersuchungsergebnissen hauptsächlich durch 93 Umgebungsproben verursacht, welche ein positives qPCR-Ergebnis zeigten, bei denen jedoch keine Anzucht von MAP gelang. Eine ähnliche Verteilung der Analyseergebnisse wurde ebenso für eine gepaarte Untersuchung von Umgebungskotproben aus verschiedenen Rinderhaltungen beschrieben (Donat et al. 2015). Die Ergebnisse aus Studie 1 zeigen, dass das verwendete Untersuchungsmaterial im Zusammenhang mit der durchgeführten Diagnostikmethode einen starken Einfluss auf das Nachweisergebnis hat.

Jede entnommene Umgebungsprobe wurde neben dem Material und dem Ort der Probenahme durch weitere managementassoziierte Parameter charakterisiert. Die Aufstallung der Herde wurde in Weide- und Stallhaltungssaison unterteilt. Dieses Merkmal bezieht sich auf die Aufenthaltsdauer der laktierenden Ziegen im Stallgebäude. Eisenberg et al. (2010b) konnte zeigen, dass die Aufstallung von MAP-ausscheidenden Rindern zu einer sukzessiv ansteigenden Kontamination des Stallgebäudes und des Außengeländes führte. Ein möglicher Effekt der Aufenthaltsdauer der Ziegen im Stallgebäude auf den Nachweis von MAP in Umgebungsproben war daher zu vermuten und wurde durch den statistischen Vergleich der Proben aus beiden Saisonen untersucht.

Außerdem wurden die einzelnen Probenlokalisationen einer von drei Belegungskategorien (Bereiche adulter Ziegen, Jungtierbereiche, Bereiche hohen Tierverkehrs) zugeordnet. Dies erfolgte in Abhängigkeit von der Tiergruppe, die sich vorwiegend im jeweiligen Bereich aufhielt. Die vorgenommene Eingruppierung der Entnahmelokalisationen ermöglichte die Berücksichtigung des Alters der sich dort aufhaltenden Tiere sowie der Verweildauer im jeweiligen Bereich. Für beide Faktoren

konnte in Rinderhaltungen bereits ein Einfluss auf die Prävalenz von MAP in der Stallumgebung nachgewiesen werden (Raizman et al. 2004).

Da ein Zusammenhang zwischen der Prävalenz der Paratuberkulose und der Wahrscheinlichkeit eines MAP-Nachweises in der Umgebung aus Untersuchungen in Rinderherden bekannt ist (Pillars et al. 2009), wurde auch der Anteil der MAP-Ausscheider in der Herde aus der zeitlich jeweils naheliegendsten Bestanduntersuchung bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt.

Um verifizierte Aussagen über den Einfluss der einzelnen erhobenen Probencharakteristika auf die Nachweiswahrscheinlichkeit von MAP treffen zu können, erfolgte eine statistische Auswertung der Daten mittels einer logistischen Regression. Dieses Verfahren dient dazu, Wirkungsbeziehungen zwischen einer oder mehreren unabhängigen Variablen auf eine abhängige Variable zu erkennen und zu beschreiben (Kreienbrock et al. 2012). Die beiden Nachweisverfahren (Kultur und qPCR) wurden getrennt betrachtet, da sie, wie bereits erläutert, unterschiedliche Zielgrößen besitzen.

4.2.3 Studie 2

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen existierten in Deutschland keine durch das NRL zugelassenen *In-vitro*-Diagnostika zum Nachweis von MAP in Kolostrum und mittels Euterhautpfarn. In vergleichbaren Studien wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden und Protokolle verwendet (Slana et al. 2008; Pithua et al. 2011; de Lacerda Roberto et al. 2021). Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander erheblich. Daher war es notwendig geeignete Verfahren zu etablieren. Um die Validität der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auch im Hinblick auf eine minimal nachweisbare Erregerbelastung richtig einschätzen zu können, wurde im Vorfeld der Untersuchung der Feldproben eine Methodenevaluierung durchgeführt.

Für die Untersuchung der Kolostrumproben wurde ein für bovine Milchproben zugelassener Diagnostik-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Dies sollte die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studie mit zukünftigen Untersuchungen auch in anderen Betrieben ermöglichen. Die im Rahmen der Methodenevaluierung ermittelte Nachweisgrenze von 33 – 79 KbE/ml Kolostrum liegt im Bereich der Herstellerangaben für Rindermilch sowie eines von Grant (2000) entwickelten Protokolls mit bis zu 20 KbE/ml. Diese Ergebnisse belegen die Eignung des Kits für die Untersuchung von Ziegenkolostrum. Andererseits könnten MAP-Gehalte unter 33 KbE/ml nicht nachgewiesen worden sein. Diese Konsequenz

der unvollkommenen Sensitivität der Nachweismethode ist bei der Interpretation negativer Ergebnisse stets zu berücksichtigen. Andere Methoden, mit denen wesentlich geringere Erregermengen zuverlässig nachgewiesen werden können, stehen derzeit nicht zur Verfügung (Slana et al. 2008; Husakova et al. 2017).

In zwei aufeinanderfolgenden Ablammperioden wurden sowohl Einzeltier- als auch Sammelkolostrumproben und Euterhauttupfer entnommen. Die Anzahl der infizierten Tiere hat sich aufgrund der aktiven Sanierung des Projektbetriebes seit 2018 drastisch reduziert. Um einen ausreichenden Stichprobenumfang zu gewährleisten und gleichzeitig die vorliegende Bestandsstruktur hinsichtlich der Paratuberkulose-Prävalenz und der Altersverteilung möglichst äquivalent abzubilden, wurden die Untersuchungen zum Vorkommen von MAP auf der Euterhaut und zur Beurteilung der laktogenen Ausscheidung nicht auf MAP-positive Ziegen begrenzt. Alle Ziegen, die in der jeweiligen Beprobungsperiode ablammten, wurden unabhängig von Paratuberkulosestatus, Alter, Parität und Körperkondition in die Studie aufgenommen. Darüber hinaus konnte so die Frage einer externen Kontamination des Kolostrums durch den Eintrag des Erregers während des Melkvorgangs sowie die Übertragung über die Euterhaut bei nicht infizierten Ziegen, die in einer nachweislich kontaminierten Umgebung gehalten wurden, untersucht werden. Dass auch bei einer nicht unerheblichen Anzahl dieser Tiere MAP-DNA im Kolostrum und auf der Euterhaut nachgewiesen werden kann, zeigte Pithua et al. (2011). Mehr als die Hälfte der Proben von MAP-Kot-negativen Kühen in dieser Studie waren positiv. Bei ausschließlicher Einbeziehung von MAP-positiven Tieren wäre eine Risikoabschätzung für MAP-negative Ziegen nicht möglich gewesen. Außerdem hätte eine Unterscheidung zwischen einer möglichen Kontamination der Euterhaut durch erregerhaltigen Eigenkot und einem Eintrag aus der Stallumgebung nicht vorgenommen werden können.

Um die Vergleichbarkeit aller Proben aus beiden Ablammperioden zu gewährleisten, erfolgte die Probennahme nach einem im Voraus festgelegten Protokoll. Von jedem Einzeltier wurde unmittelbar vor dem ersten Melken *post partum* eine Tupferprobe der Euterhaut mittels zweier trockener, steriler Tupfer entnommen. Die Tupfer wurden gezielt über jene Bereiche des Euters geführt, die von einem Lamm während des Saugvorganges erreicht werden können. Anschließend wurde eine erste

Kolostrumprobe aus dem ungereinigten Euter mit je einer frisch behandschuhten Hand entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass das Kolostrum aus beiden Euterhälften gewonnen wurde, da in mehreren Studien unterschiedliche Ergebnisse bei der getrennten Analyse von Gemelk aus den einzelnen Euterhälften erzielt wurden (Singh und Vihan 2004; Slana et al. 2008; Lievaart-Peterson et al. 2019). Das Euter wurde anschließend mit einem mykobakteriziden Desinfektionstuch gereinigt. Dies sollte eine mögliche Kontamination der zweiten Kolostrumprobe mit MAP von der Euterhaut verhindern. Nach dem Verwerfen der ersten Kolostralmilch wurde eine zweite Probe aus dem gereinigten Euter analog der Vorgehensweise der ersten Probenahme gewonnen.

Die gleichzeitige Entnahme von Tupferproben der Euterhaut und einer zusätzlichen Kolostrumprobe nach erfolgter Euterdesinfektion sollte bei positiven Proben die Differenzierung zwischen laktogener Erregerausscheidung und äußerem Eintrag von MAP ermöglichen. Von jedem der 55 Einzeltiere konnten die kombinierten Kolostrumproben gewonnen werden, wohingegen nur bei 49 Ziegen eine Tupferprobe der Euterhaut entnommen werden konnte. Da vier dieser sechs Ziegen als MAP-positiv bekannt waren, wurden die Kolostrumproben trotz fehlender Euterhauttupfer in die Untersuchung einbezogen, da ein wesentlicher Schwerpunkt der Studie auf der Erregerausscheidung von subklinisch erkrankten Ziegen lag. Dadurch erhöhte sich der Anteil infizierter Tiere in der Stichprobe auf 16,4 %.

Von den im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Eutertupfern stammten lediglich fünf (10,2 %) von MAP-positiven Ziegen. Die hohe Anzahl an MAP-negativen Tieren ist auf den Rückgang der Prävalenz in der Herde aufgrund der Bekämpfungsmaßnahmen zurückzuführen.

Im Projektbetrieb erfolgte die Kolostrumversorgung der Lämmer durch Sammelkolostrum, das von allen vor der jeweiligen Melkzeit abgelammten Ziegen ermolken wurde. Da auch dies ein potenzielles Übertragungsmedium für MAP darstellt, wurden 14 zu unterschiedlichen Melkzeiten gewonnene Sammelkolostrumproben analog zu den Einzeltierproben auf MAP untersucht. Die einzelnen beitragenden Ziegen wurden dokumentiert, um einen möglichen Verdünnungseffekt eines MAP-positiven Einzelkolostrums im Sammelkolostrum (Okura et al. 2012) nachweisen zu können.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit präsentiert neue Erkenntnisse zum Vorkommen und der Verbreitung von MAP in einem mit Paratuberkulose infizierten Milchziegenbestand. Basierend darauf erfolgte die Identifizierung und risikobasierte Bewertung von Infektionsquellen im Betrieb sowie die Ableitung von Empfehlungen für die Unterbrechung von Infektketten.

4.3.1 Wie ist MAP in der Stallumgebung einer infizierten Milchziegenherde verbreitet und können hierbei räumliche sowie zeitliche Unterschiede festgestellt werden?

Im Rahmen von Studie 1 wurde erstmalig eine umfassende Untersuchung der Stallumgebung einer mit Paratuberkulose infizierten Milchziegenherde auf die Präsenz von MAP durchgeführt. Die Analyse verschiedener Materialien, die potenziell als Vektoren für den Erreger fungieren können, ermöglichte einen Einblick in die Verbreitung von MAP im Stallgebäude und damit eine Bewertung der einzelnen untersuchten Stallbereiche hinsichtlich ihres Risikos für eine Erregerübertragung.

Die Anzucht von MAP gelang aus 29 der 256 in Studie 1 untersuchten Proben. Hierbei entfielen 96,6 % (28/29) auf Einstreuproben und nur 3,4 % (1/29) auf Staubproben. Diese Verteilung stimmt mit den Ergebnissen von Studien aus Rinderhaltungen überein, bei denen neben der Einstreu ebenfalls weitere Materialien mikrobiologisch untersucht wurden. Pillars et al. (2009) konnte MAP nur selten aus Futter- (4/81) und Wasserproben (7/81) anzüchten. Siebzig der insgesamt 81 positiven Umgebungsproben waren Kotproben vom Stallboden oder dem Güllelager. Eine Untersuchung von Staubproben wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Im Vergleich zu allen anderen Probenmaterialien wiesen die in Studie 1 untersuchten Staubproben eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit auf MAP-DNA zu enthalten. Die unterschiedlichen Nachweisraten in den einzelnen Materialien in Abhängigkeit von der Methode lassen sich durch die weitere Verbreitung von MAP in der Stallumgebung nach der Ausscheidung mit dem Kot infizierter Tiere erklären. Zunächst kommt es durch den Kotabsatz zu einer direkten Kontamination der Einstreu. Wird diese nicht aus dem Stall entfernt, können Austrocknung und Luftbewegung zur weiteren Verbreitung des Erregers im Gebäude sowie der anschließenden Ablagerung und Akkumulation im Rahmen der Staubbildung führen (Carpenter 1986). MAP weist eine

hohe Tenazität auch außerhalb eines geeigneten Wirtes auf, was bei optimalen Bedingungen zu einem Erhalt der Infektiosität von bis zu einem Jahr führen kann. Im Gegensatz zu Faktoren wie ultravioletter Strahlung und Feuchtigkeit scheinen nur Temperaturschwankungen die Lebensdauer nachhaltig zu beeinflussen (Whittington et al. 2004; Elliott et al. 2015). Eine vollständige Entfernung des Staubes aus dem Stallgebäude erfolgt im Gegensatz zur Einstreu, deren Austausch bei Tiefstreu mindestens einmal jährlich empfohlen wird (Ganter et al. 2012a), aufgrund des immensen Arbeitsaufwandes nur in den seltensten Fällen. Dies bietet die Möglichkeit einer Akkumulation des Erregers in dieser Matrix über einen langen Zeitraum, wobei nach einiger Zeit von einem Verlust der Infektiosität auszugehen ist (Whittington et al. 2004; Eisenberg et al. 2010b).

In Rinderbetrieben gelang der kulturelle Nachweis von MAP im Tränkwasser der Tiere (Pillars et al. 2009; Eisenberg et al. 2010a). Damit stellt es einen potenziellen Vektor für die orale Erregeraufnahme dar. Auch wenn eine Tränkwasserprobe aus dem Projektstall den niedrigsten im Rahmen der Untersuchungen gemessenen C_t-Wert (27,57) aufwies, konnte in Studie 1 MAP aus dieser Probenmatrix nicht angezüchtet werden. Im untersuchten Ziegenstall ist eine Kontamination der Tränken durch erregerhaltigen Kot, wie es möglicherweise in den Rinderställen der Fall war (Eisenberg et al. 2010a), aufgrund der Kotkonsistenz, der Tiefstreuhaltung und der Tränkenstandorte dagegen unwahrscheinlich. Als mögliche Ursache für die Nachweise im Projektbetrieb kommt ein Eintrag durch das Absetzen von erregerhaltigem Staub aus der Stallluft in Betracht.

Räumliche Unterschiede

Durch die mögliche weiträumige Verbreitung von MAP in der Stallumgebung durch infizierte Tiere entsteht eine Vielzahl von potenziellen Kontaktmöglichkeiten und damit Infektionsquellen (Whittington und Sergeant 2001; Whittington et al. 2003). Die durchgeführten Bestandsuntersuchungen zeigten, dass sich über den gesamten Zeitraum, in welchem die Umgebungsuntersuchungen in Studie 1 durchgeführt wurden, aktive Ausscheider in der Herde und damit im Stallgebäude befunden haben. Im Hinblick auf die Übertragung der Paratuberkulose ist es wichtig, infizierte Tiere in infektiös und nicht infektiös zu unterscheiden. Allgemein gelten Tiere, welche den Erreger in sich tragen, als infiziert. Nicht infektiöse Tiere scheiden MAP aber nicht oder

nur in sehr geringen Mengen aus, wohingegen die Ausscheidung bei infektiösen Tieren in solch hinreichenden Mengen stattfindet, dass eine Ansteckung weiterer Herdenmitglieder möglich wird. Beide Gruppen müssen keine klinischen Symptome der Paratuberkulose aufweisen (Whitlock und Buergelt 1996; Whittington et al. 2000; Nielsen und Toft 2008). Der Nachweis von vermehrungsfähigen MAP in der Stallumgebung deutet auf eine eher kürzliche Präsenz von infektiösen Tieren hin, wohingegen alleinig qPCR-positive Ergebnisse auch durch eine lang zurückliegende Kontamination entstanden sein können. So konnte MAP-DNA auch in einem gänzlich geräumten und mit Hochdruckreinigern gesäuberten Stall noch nachgewiesen werden, wohingegen die kulturelle Anzucht negativ verlief (Eisenberg et al. 2010b).

MAP wurde kulturell in allen Stallbereichen nachgewiesen, zu welchen adulte Ziegen der melkenden Herde Zugang hatten. Hingegen war keine Anzucht des Erregers aus Bereichen der Jungziegen und der Böcke möglich. Diese Verteilung deutet klar auf einen Zusammenhang zwischen der Gegenwart von Ausscheidern im Stallbereich und dem Vorkommen von vermehrungsfähigen MAP in der Umgebung hin. Insbesondere Stallbereiche, die von sämtlichen Tieren der Herde und damit gleichzeitig von allen aktuellen Ausscheidern durchlaufen werden, sollten folglich eine hohe Erregerbelastung aufweisen. Diese Annahme konnte durch die in Studie 1 durchgeführte logistische Regression bestätigt werden, da die unter der Kategorie ‚Bereich mit hohem Tierverkehr‘ zusammengefassten Probenlokalisationen eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für kultur-positive Einstreuproben aufwiesen als andere Stallbereiche der adulten Ziegen. Die Mehrzahl der Proben dieser Gruppe stammte aus dem Bereich des Melkkarussells. Dieses Ergebnis stimmt mit Studien aus Rinderbetrieben überein (Lombard et al. 2006; Donat et al. 2011; Wolf et al. 2015). Zudem stellten dort die Laufwege einen ebenso häufig positiven Ort dar (Raizman et al. 2004; Pillars et al. 2009; Donat et al. 2011). Da im Gegensatz zu Rinderhaltungen im Projektbetrieb keine getrennten Laufwege und Liegebereiche für die Ziegen bestanden, können dieser Lokalisation nur die Proben der einzelnen Quadranten des Melkziegenabteils gegenübergestellt werden. Aus diesen Stallbereichen wurden in Studie 1 am zweithäufigsten positive Kulturergebnisse erzielt.

Auch in den Ablambbereichen wurde eine hohe Erregerbelastung festgestellt, da aus einem Drittel der in Studie 1 aus diesen Abteilen entnommenen Einstreuproben MAP angezüchtet werden konnte. Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungsergebnissen

aus Rinderhaltungen, wo der Abkalbbereich nur selten (14,3 % - 17 %) kultur-positiv war (Raizman et al. 2004; Lombard et al. 2006; Pillars et al. 2009; Donat et al. 2011). Eine mögliche Erklärung hierfür liefert zum einen die Zeit, welche die Tiere in diesem abgetrennten Bereich verbringen, als auch dessen Reinigungsfrequenz. Trockenstehende Kühe werden erst kurz vor der Kalbung in einen separaten Abkalbbereich verbracht. In der Studienherde hingegen existierte neben dem Trockenstehabteil kein gesonderter Ablammbereich. Dies führt zu einer möglichen Akkumulation von MAP durch den Kot infektiöser Ziegen, welche sich über mehrere Wochen ausschließlich in diesem Stallbereich aufhalten. Eine Reinigung der Ablammbereiche erfolgt im Studienbetrieb erst nach Ende der Ablampperiode, wohingegen Abkalbbereiche häufig in kürzeren Abständen gereinigt und desinfiziert werden (Ganter et al. 2012b; Donat et al. 2016).

Eine kotkulturelle Untersuchung der Jungziegen vor der ersten Ablammung wurde im Zuge der Gesamtbestandsuntersuchungen nicht durchgeführt. MAP konnte jedoch bereits bei Ziegen im zweiten Lebensjahr nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass es sowohl bei diesen als auch weiteren Tieren der einzelnen Jahrgänge zu einer Infektion im Lammalter gekommen ist. Die Wahrscheinlichkeit der Erregerausscheidung durch infizierte Tiere steigt mit deren Alter (Whitlock und Buergelt 1996; Windsor und Whittington 2010). Experimentelle Infektionsstudien bei Kälbern und Ziegenlämmern haben indes gezeigt, dass die Ausscheidung von MAP im Kot nach einer Infektion mit einer hohen Erregerdosis bereits nach wenigen Wochen beginnen kann (Mortier et al. 2014; Köhler et al. 2015). Neben der aktiven Ausscheidung des Erregers nach Vermehrung im infizierten Jungtier, konnte MAP auch nach alleiniger Passage des Magendarmtraktes im Kot nachgewiesen werden (Sweeney et al. 1992a). Dieses als passive Ausscheidung bezeichnete Phänomen kann zur Infektion weiterer Jungtiere, auch in Abwesenheit der ursprünglichen Infektionsquelle, beitragen und so zu einer horizontalen Erregerübertragung führen (van Roermund et al. 2007). Beide Modelle setzen den Kontakt zu einer sehr hohen initialen MAP-Dosis voraus, welche in den angeführten Studien jeweils durch eine experimentelle Infektion erreicht wurde. Da sich der Projektbetrieb in der Sanierungsphase befindet und aktiv bekannte Ausscheider sowie Tiere mit klinischen Anzeichen der Paratuberkulose aus der Herde eliminiert, ist die Aufnahme äußerst hoher Erregerdosen durch die Neugeborenen vor dem Verbringen

in den Jungtierbereich unwahrscheinlich. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass MAP in den Aufzuchtbereichen nicht kulturell nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren besteht ein hohes Risiko, dass MAP durch eine schlechte Hygienepraxis in den Aufzuchtbereich eingetragen werden kann (Wolf et al. 2016). In der Studie von Raizman et al. (2004) in amerikanischen Rinderbetrieben wurde MAP nicht in Umgebungsproben aus Bereichen von Kälbern vor, jedoch in 3 % aus jenen nach dem Absetzen kultiviert. Diese Ergebnisse führten die Autoren entweder auf eine sehr frühe Erregerausscheidung oder, wahrscheinlicher, aufgrund der hohen vorherrschenden Paratuberkulose-Prävalenz in den untersuchten Herden, auf einen Eintrag aus den Bereichen der adulten Kühe zurück. Dies kann durch gemeinsam genutzte Arbeitsmaterialien oder das Schuhwerk erfolgen (Whittington et al. 2000; Field et al. 2023). Die Bauweise der Lämmerboxen im Projektbetrieb sowie deren gänzlicher Rückbau nach jeder Lampperiode reduzieren die Wahrscheinlichkeit dieses Eintragsweges erheblich und stellen daher auch einen Grund für die negativen kulturellen Untersuchungsergebnisse dar.

Anders verhält es sich hinsichtlich des Nachweises von MAP-DNA. Dieser erfolgte in allen untersuchten Stallbereichen. Insgesamt erzielten 35,3 % aller untersuchten Proben aus den Jungtierbereichen ein positives qPCR-Ergebnis, wobei mehr als die Hälfte dieser positiven Ergebnisse auf Staubproben entfiel. Wie bereits diskutiert deuten auch die hier vorliegenden Ergebnisse stark darauf hin, dass der Bereich der adulten Ziegen der primäre Ausgangspunkt für eine luftstrombedingte Verbreitung des Erregers im Stallgebäude ist, insbesondere da keine Trennung des Luftbereiches zwischen Adulten und Lämmern besteht. Dafür spricht der insgesamt höhere Anteil an positiven Proben aus den Bereichen der adulten Ziegen als auch deren im Durchschnitt geringerer C_i-Wert. In der Studie von Eisenberg et al. (2010b) wurden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anteile von positiven Staubproben zwischen belegten und unbelegten Stallbereichen festgestellt, welche von Flächen oberhalb der Tiere entnommen wurden. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass MAP nur aus Staubproben aus Kälberbereichen kultiviert werden konnte, wenn keine räumliche Trennung zu adulten Tieren bestand. Wurden beide Gruppen in separaten Gebäuden gehalten, gelang zudem seltener ein DNA-Nachweis im Jungtierbereich als bei der kombinierten Haltung (Eisenberg et al. 2010a).

Zeitliche Unterschiede

Zwei der acht in Studie 1 durchgeführten Umgebungsprobennahmen fanden während der Weidesaison statt. Dabei stellt eine dieser Probennahmen die einzige dar, in welcher aus keiner Umgebungsprobe MAP angezüchtet werden konnte. Die statistische Analyse zeigte kongruent, dass die Proben, welche während dieses Zeitraumes entnommen wurden, signifikant seltener kultivierbare Erreger sowie MAP-DNA enthielten. Lombard et al. (2006) untersuchte den Zusammenhang verschiedener Herdencharakteristika und der Präsenz von MAP in Umgebungsproben aus Rinderbetrieben. Hierbei wurden unter anderem die Aufstallungsform (kein, ein oder mehrere Stallgebäude) sowie der Entnahmemonat berücksichtigt. Die Ergebnisse der statistischen Datenauswertung sprachen gegen einen signifikanten Einfluss beider Faktoren. Indes zeigten ähnliche Untersuchungen durch Wolf et al. (2015) eine saisonale Abhängigkeit. In Proben, welche im Frühjahr (März bis Juni) entnommen wurden, konnte signifikant häufiger MAP nachgewiesen werden als in Proben aus den Wintermonaten Januar und Februar.

Während der Weideperiode befanden sich mit den zur Eigenremontierung aufgezogenen Jungziegen nur Ziegen im ersten Lebensjahr ganztägig im Stallgebäude des Studienbetriebes. Dies entsprach in etwa einem Fünftel der Gesamtherde. Folglich bestand die Möglichkeit, dass MAP-Ausscheider den Erreger durch Kotabsatz in das Stallgebäude eintragen, ausschließlich während des Melkens. Der Tierbesatz im Gebäude scheint demnach einen maßgeblichen Einfluss auf die Prävalenz von MAP in der Umgebung zu haben. Des Weiteren werden diese Ergebnisse durch die höheren Nachweisraten von MAP an Orten hohen Tierverkehrs gestützt, welche auch während der Weidesaison mehrmals täglich von jeder laktierenden Ziege passiert wurden. Während der winterlichen Stallhaltung kommt es aufgrund der verstärkten Tierbewegung im Stall zusätzlich zu einer vermehrten Staubbildung. Da Staubproben signifikant häufiger positive Nachweise von MAP-DNA zeigten als andere Probenmatrizes, ist von einer weiträumigen Verbreitung des Erregers im Stallgebäude während dieser Zeit auszugehen (Carpenter 1986; Eisenberg et al. 2010a).

In Studie 1 wurde ein weiterer zeitlich variabler Faktor untersucht, der potenziell Einfluss auf den Nachweis von MAP in Umgebungsproben hatte: der prozentuale Anteil der Ausscheider unter den Tieren, die zur halbjährlichen Bestandsuntersuchung

beprobte wurden. Im Gegensatz zur Weidenutzung zeigten beide Regressionsmodelle keinen Einfluss des Ausscheideranteils auf den kulturellen oder mittels qPCR durchgeführten Nachweis von MAP. Über einen Zeitraum von zwei Jahren wurde während der Studiendauer eine Reduktion der aktiven Ausscheider im Bestand von 9,4 % im April 2020 auf 1,7 % im Mai 2022 festgestellt. Jedoch kann eine alleinige Fokussierung auf die Anzahl der Ausscheider zu einer Verzerrung der vermuteten Kontamination der Stallumgebung führen. Scheiden mehrere Tiere den Erreger zur gleichen Zeit aus, führt dies wahrscheinlich zu einer großen Verbreitung im Gebäude, insbesondere bei uneingeschränkter Bewegungsfreiheit aufgrund einer Laufstallhaltung. Als zweiter Aspekt ist jedoch gleichermaßen auch die Intensität der Ausscheidung zu berücksichtigen. Ein sogenannter Super-Ausscheider kann hierbei die Umgebung gleichermaßen stark kontaminieren wie einige starke, etliche moderate oder viele schwache Ausscheider (Whitlock et al. 2005). Auch muss die imperfekte Sensitivität der Kotuntersuchung berücksichtigt werden. Diese steigt mit der Ausscheidungsstärke, führt aber dazu, dass einige Tiere im subklinischen Erkrankungsstadium, die eventuell nur intermittierend ausscheiden, möglicherweise bei der Herdenuntersuchung nicht als Ausscheider identifiziert wurden (Whitlock und Buergelt 1996; Whitlock et al. 2000). Daher muss von einer Unterschätzung der wahren Anzahl von Ausscheidern im Bestand ausgegangen werden. Letztlich zeigen die Ergebnisse der Umgebungsuntersuchungen aus Studie 1, dass bereits eine geringe Anzahl nachweislich aktiv ausscheidender Ziegen in der Herde ausreicht, um zu einer feststellbaren Kontamination der Stallumgebung zu führen. Somit besteht trotz einer erheblichen Reduktion ihres prozentualen Anteils in der Herde weiterhin die Gefahr einer Erregerübertragung auf empfängliche Tiere.

Verschiedene Studien, deren Ziel es war, eine Aussage zur Korrelation zwischen dem Nachweis von MAP in Umgebungsproben und der Paratuberkulose-Prävalenz im Bestand zu treffen, verglichen jeweils eine Umgebungsprobennahme mit einer durchgeführten Herdenuntersuchung (Lombard et al. 2006; Pillars et al. 2009; Donat et al. 2011; Donat et al. 2015). Alle beschrieben einen positiven Zusammenhang zwischen beiden Faktoren. Je höher die Innerherden-Prävalenz war, desto wahrscheinlicher konnte MAP in der Umgebung nachgewiesen werden. Lavers et al. (2013) erweiterte diesen Ansatz und führte mehrerer Bestands- und Umgebungsuntersuchungen in definierten Zeitabständen in den gleichen

Diskussion

Rinderherden durch. In Herden mit einer Paratuberkulose-Prävalenz über 5 % konnte, mit einer Ausnahme, in jeder Umgebungsuntersuchung MAP nachgewiesen werden. Nur in Beständen mit niedrigeren Prävalenzen, sowie teilweise Bestandsuntersuchungen ohne einen aktuellen Ausscheider, nahm die Häufigkeit des Erregernachweises in der Umgebung ab. Jedoch wurde beispielsweise in einer von sechs Umgebungsuntersuchungen auch in einer Herde mit einer Prävalenz von 0,7 % MAP nachgewiesen. Diese sowie weitere Studien zeigen, dass mit einer wiederholten Probenahme die Sensitivität der Umgebungsuntersuchung auch in niedrig prävalenten Herden gesteigert werden kann (Wichert et al. 2022). Einen maßgeblichen Unterschied zwischen den durchgeführten Studien mit wiederholter Probenahme in Rinderbetrieben und Studie 1 stellt das entnommene Probenmaterial dar. Im Gegensatz zu den hier untersuchten Einstreuproben arbeiteten andere Studien zumeist mit Sammelkot von Orten hohen Tierverkehrs wie den Laufgängen. Diese Bereiche unterliegen einer deutlich höheren Reinigungsfrequenz im Vergleich zur Tiefstreu im Studienbetrieb (Ganter et al. 2012b). Daher ist im Ziegenstall eine Akkumulation des Erregers über einen längeren Zeitraum denkbar, was die vermehrte Nachweisrate in den Einstreuproben und den fehlenden statistischen Zusammenhang mit dem Anteil von Ausscheidern in der Herde erklären könnte. Diese Hypothese wird durch Eisenberg et al. (2010b) unterstützt, welche MAP-DNA gleichermaßen im Staub von niedrig- und hochprävalenten Rinderherden nachgewiesen hat. Wie bereits diskutiert, ist von einer Anreicherung von MAP in diesem Material über die Zeit noch wahrscheinlicher auszugehen als bei anderen Materialien.

Die Ergebnisse aus Studie 1 lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Ablambbereich wahrscheinlich eine entscheidende Rolle im Infektionsgeschehen spielt, da hier vermehrungsfähige Erreger und empfängliche Neugeborene zusammentreffen. Dabei steht der Kontakt mit kontaminierter Einstreu im Vordergrund. Im Gegensatz zur Aufstallungsform hat der Anteil der Ausscheider in der Herde keinen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen von MAP in der Stallumgebung.

4.3.2 Welche Risiken birgt das Saugen der Ziegenlämmer an der Mutter im Vergleich zum Vertränken von ermolkenem Kolostrum hinsichtlich der Übertragung von MAP?

Im Rahmen von Studie 2 wurden Nachweismethoden von MAP in Ziegenkolostrum und auf der Euterhaut etabliert. Ziel war es, Grundlagen für die Abschätzung des Risikos einer Übertragung des Erregers durch das Saugen der Lämmer an den Muttertieren sowie für das Vertränken von ermolkenem Kolostrum zu schaffen. Dabei wurden drei Aspekte berücksichtigt: erstens die laktogene Ausscheidung des Erregers in das Kolostrum, zweitens eine Kontamination der Euterhaut mit MAP und zuletzt eine externe Kontamination des Gemelks. Während der erste Aspekt für beide Aufzuchtverfahren gleichermaßen von Bedeutung ist, müssen die beiden letztgenannten jeweils separat betrachtet werden.

Kolostrum

Die molekularbiologische Untersuchung aller Kolostrumproben in Studie 2 verlief negativ. Damit konnte weder der Nachweis für eine laktogene Erregerausscheidung erbracht, noch eine Kontamination des Kolostrums während des Melkprozesses nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu Untersuchungen bei Rindern (Streeter et al. 1995; Pithua et al. 2011; Stabel et al. 2014), bestätigen jedoch jene aus einer ebenfalls bei Ziegen durchgeführten Studie (Lievaart-Peterson et al. 2019).

Generell ist davon auszugehen, dass MAP von allen Wiederkäuern laktogen ausgeschieden werden kann. Der wiederholte Nachweis des Erregers in Milchproben von Rindern, Schafen und Ziegen in verschiedenen Studien lässt diesen Schluss zu (Okura et al. 2012; Waddell et al. 2016; de Lacerda Roberto et al. 2021). Wie die fäkale scheidet auch die laktogene Erregerausscheidung stark mit dem Erkrankungsstadium assoziiert zu sein. Stabel et al. (2014) konnte MAP in 12,6 % der Kolostrum- und Milchproben von subklinisch, jedoch in 49,2 % von klinisch erkrankten Rindern nachweisen. Eine weitere Studie untersuchte zusätzlich zu Kolostrumproben verschiedener Ziegen aus mit Paratuberkulose infizierten Herden auch Proben von klinisch erkrankten Tieren. MAP konnte dabei nur in Proben von letzteren nachgewiesen werden (0/120 versus 2/22). Der in Studie 2 untersuchte Betrieb befand sich in einer begleiteten Bestandssanierung, in deren Rahmen alle Ziegen mit Anzeichen einer klinischen Paratuberkuloseerkrankung aus der Herde entfernt

wurden. Daher stammten alle untersuchten Kolostrumproben von Tieren welche entweder als Paratuberkulose-unverdächtig galten (46/55) oder sich im subklinischen Erkrankungsstadium befanden (9/55). Mit hoher Wahrscheinlichkeit hat dieser Sachverhalt maßgeblich zu den gänzlich negativen Kolostrumbefunden beigetragen. Es ist demnach anzunehmen, dass insbesondere bei klinisch erkrankten Tieren ein erhöhtes Risiko besteht, dass MAP nicht nur über den Kot, sondern auch über die Milch ausgeschieden wird.

Wie verschiedene Studien gezeigt haben, kann MAP jedoch auch von subklinisch erkrankten Tieren über die Milch ausgeschieden werden (Sweeney et al. 1992b; Streeter et al. 1995; Djønnø et al. 2003; Stabel et al. 2014). Die ausgeschiedene Erregermenge in den verschiedenen Erkrankungsstadien konnte trotz der Identifizierung einiger Einflussfaktoren bisher nicht genau bestimmt werden (Barkema et al. 2018). In den als positiv klassifizierten Proben muss sie jedoch mindestens oberhalb der Nachweisgrenze des in der jeweiligen Untersuchung angewandten Verfahrens gelegen haben. Aufgrund der Heterogenität der Studien sowie zum Teil fehlender konkreter Angaben ist ein direkter Vergleich der vorhandenen Daten zu dieser Fragestellung nicht möglich (Okura et al. 2012). Ein Referenzwert für asymptomatische Kühe wurde mit 2 - 8 KbE/50 ml Milch durch Sweeney et al. (1992b) beschrieben. Vergleicht man diese Angabe mit der im Rahmen der Methodevaluierung in Studie 2 bestimmten minimalen Nachweisgrenze für MAP in Ziegenkolostrum mit 33 - 79 KbE/ml, so müssen die negativen Untersuchungsergebnisse kritisch betrachtet werden. Das negative Ergebnis der molekularbiologischen Analyse ist nicht mit der vollständigen Abwesenheit des Erregers gleichzusetzen. Tatsächlich kann nur eine Kontamination oberhalb dieser definierten Grenze mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Es bleibt demnach immer das Risiko einer minimalen Kontamination mit MAP bestehen, solange eine Infektion der Herde vorliegt und damit die Möglichkeit des Eintrages existiert. Die notwendige einmalig aufgenommene Erregermenge welche zu einer Infektion führt ist für MAP bisher nicht bekannt, jedoch steigt die Wahrscheinlichkeit durch mehrmaligen Erregerkontakt (Sweeney 1996). Berücksichtigt man die durchschnittliche Menge an Kolostrum, welche durch das Lamm am ersten Lebenstag aufgenommen wird, kann bereits eine geringe Belastung mit MAP zur Ingestion von bis zu 10^4 KbE führen (Sieber 2014). Nach Chiodini (1996) könnten solche Mengen prinzipiell ausreichen,

um eine Infektion auszulösen. Daher ist es von immenser Bedeutung auch geringfügige Kontaminationen durch geeignete Maßnahmen bestmöglich zu verhindern.

Alle untersuchten Ziegen des Projektbetriebes wurden gegen Paratuberkulose geimpft. Diese Maßnahme in der Erkrankungsbekämpfung soll unter anderem zu einer Protraktion der klinischen Erkrankungsphase sowie einer damit einhergehenden Reduktion der Ausscheidung von MAP führen (Reddacliff et al. 2006; Windsor 2015; Whittington et al. 2019). Ein paralleler Effekt auf die fäkale als auch laktogene Erregerausscheidung ist hierbei anzunehmen, da ein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Parametern besteht (Streeter et al. 1995). In Herden mit einer höheren Prävalenz oder einer größeren Anzahl aktiver MAP-Ausscheider, in denen die Impfung nicht als Maßnahme zur Paratuberkulose-Prävention eingesetzt wird, könnte daher die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von MAP im Kolostrum erhöht sein.

Auch ohne Impfung zeigt die Paratuberkulose einen chronisch progressiven Verlauf mit einer oft mehrjährigen Inkubations- beziehungsweise subklinischen Phase (Whitlock und Buergelt 1996; Clarke 1997). Ziegen entwickeln häufig in einem Alter zwischen zwei und vier Jahren erste Symptome (Idris et al. 2022). Abhängig von der initialen Expositionsdosis und dem Alter zum Zeitpunkt der Infektion kann dieser Zeitraum tierindividuell verkürzt oder soweit verlängert sein, dass ein Eintritt in die klinische Phase nicht während der Lebenszeit des Tieres stattfindet (Whitlock und Buergelt 1996). In einer Studie von Dønne et al. (2003) wurde gezeigt, dass Milchproben von Ziegen, die älter als vier Jahre waren, häufiger positiv auf MAP getestet wurden als die von jüngeren Ziegen. Die für Studie 2 entnommenen Kolostrumproben stammten in 54,5 % der Fälle von zweijährigen oder jüngeren Ziegen, was die negativen Untersuchungsergebnisse erklären könnte.

Neben der laktogenen Erregerausscheidung kann eine externe Kontamination der Probe eine weitere Quelle für den Nachweis von MAP in Kolostrum oder Milch sein. Die Verunreinigung mit erregerehaltigem Kot oder Staub durch eine unzureichende Melkhygiene oder mangelhafte Lagerung des Gemelks stellen mögliche Eintragswege und somit Risikofaktoren dar (Streeter et al. 1995; Windsor und Whittington 2010; Pithua et al. 2011). Dies ist insbesondere bei der Gewinnung und anschließenden

Vertrankung von Sammelkolostrum zu beachten. Um den Einfluss dieses Kontaminationsweges im Milchziegenbetrieb beurteilen zu können und außerdem eine Diskriminierung zur laktogenen Ausscheidung von MAP zu ermöglichen, wurde die Probenahme nach dem in Studie 2 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Die gänzlich negativen Ergebnisse der Einzeltierkolostren vor der Euterreinigung sowie der Sammelkolostrumproben, welche direkt aus dem Sammelgefäß entnommen wurden, weisen auf ein geringes Risiko einer äußeren Kontamination während des Melkprozesses hin. In Hinblick auf die in Studie 1 festgestellte starke Erregerbelastung der eingetragenen Einstreu im Melkkarussell sowie des Staubes im gesamten Stallgebäude verdeutlichen die Ergebnisse, dass ein hygienisches Melken auch in einer kontaminierten Umgebung möglich ist. Dies kann zum einen mit der hohen Mechanisierung, jedoch ebenso mit einer guten Euterhygiene im Betrieb zusammenhängen (Beaver et al. 2016; Bauman et al. 2019).

Euterhauttupfer

Wie der Melkbecher kommt auch das Lamm während der Eutersuche und des Saugvorganges sowohl mit der Zitzenhaut als auch dem Inguinalbereich der Mutter in Kontakt. Diese Bereiche können mit MAP kontaminiert sein, was eine orale Aufnahme des Erregers ermöglicht. Verschmutzte Euter bei Schafen und Ziegen waren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der Seropositivität des jeweiligen Bestandes assoziiert (Iarussi et al. 2019). Darüber hinaus war der Nachweis von MAP in Umgebungsproben in Rinderbeständen häufiger möglich, wenn die Tiere starke Verschmutzungen am Körper aufwiesen, insbesondere wenn sich diese bis in den Flankenbereich erstreckten (Wolf et al. 2016). Die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes zwischen Jungtieren und MAP bei der Kolostrumaufnahme ist unter solchen Bedingungen erhöht und damit auch das Risiko der Erregerübertragung. Die Verschmutzungen sind sehr wahrscheinlich auf eine verschmutzte Stallumgebung zurückzuführen. Dies deutet auf ein schlechtes Hygienemanagement im Betrieb hin, was wiederum ebenfalls als Risikofaktor für Paratuberkulose beschrieben wurde (Wolf et al. 2016).

Eine Kontamination des Euters mit MAP kann bei infizierten Tieren durch den eigenen Kot erfolgen oder aber, und insbesondere bei nicht-infizierten Tieren, durch einen übertrag aus der Stallumgebung verursacht werden. Pithua et al. (2011) konnte mittels steriler Gazetucher MAP-DNA an den Zitzen von 70 % der untersuchten Ausscheider

und 55 % der nicht-ausscheidenden Rinder nachweisen. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem DNA-Nachweis und dem Kotbefund sowie eine Assoziation zur Ausscheidungsstärke festgestellt werden. Entgegen dieser Beobachtungen wurde nur in 10,3 % (3/29) der in Studie 2 untersuchten Eutertupfer von Milchziegen MAP molekularbiologisch nachgewiesen sowie in keinem von 49 Tupfern durch eine kulturelle Anzucht. Alle DNA-positiven Tupfer stammten von Paratuberkulosestatus-negativen Ziegen, wobei die fünf untersuchten infizierten Ziegen negative Tupferergebnisse erzielten. Im Gegensatz zur zuvor angeführten Untersuchung erfolgte die Eingruppierung der Ziegen in Studie 2 auf Basis der Untersuchungsergebnisse der Kotproben aus den Bestandsuntersuchungen. Es kann daher keine Aussage zum aktuellen Ausscheidungsstatus der Ziegen zum Zeitpunkt der Euterhauttupferprobennahme gemacht werden. Nichtsdestotrotz konnte eine deutlich geringere Kontamination der Ziegeneuter im Projektbetrieb im Vergleich zu Eutern von Rindern aus ebenfalls mit Paratuberkulose infizierten Herden aufgezeigt werden. Der Nachweis von MAP-DNA auf der Euterhaut von Ziegen mit negativem Paratuberkulosestatus zeigt zudem, dass die alleinige Fokussierung auf bekannt infizierte Tiere das Risiko einer Erregerübertragung nicht vollständig ausschließt.

Die Ziegen der Projektherde hielten sich während der Trockenstehphase über mehrere Wochen im Ablambbereich auf, in welchem in Studie 1 eine starke Belastung der Einstreu mit MAP nachgewiesen werden konnte. Trotz der durch die Tiefstreuhaltung bedingten ausgebliebenen Reinigung des Bereiches während dieser Zeit scheint es zu keinem wesentlichen Übergang des Erregers aus der Einstreu auf die Euterhaut gekommen zu sein. Jedoch muss hierbei die im Rahmen der Methodenevaluierung bestimmte minimale Nachweisgrenze der Eutertupfer berücksichtigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass es zu einer Unterschätzung der wahren Kontamination gekommen sein kann. Die Ergebnisse der Euterhautuntersuchungen lassen ein geringes, jedoch trotzdem vorhandenes, Risiko für die Übertragung von MAP auf das Lamm über den Kontakt zur Euterhaut des Muttertieres vermuten.

Sammelkolostrum

Die Lämmer des Projektbetriebes wurden in den ersten Lebenstagen mit Sammelkolostrum versorgt. Die Untersuchung aller in Studie 2 entnommenen Chargen führte zu keinen positiven qPCR-Befunden. Dies war aufgrund der gänzlich negativ verlaufenen Untersuchung der Einzeltiergemelke zu erwarten. Sofern ein

Einzelkolostrum MAP in nachweisbaren Mengen enthalten hätte, wäre der Nachweis im Sammelkolostrum aufgrund der Verdünnung durch die hinzugefügten ein bis maximal elf weiteren Gemelke wahrscheinlich nicht reproduzierbar gewesen. Dieser Sachverhalt konnte in einem Review bestätigt werden, welches die scheinbare Prävalenz von MAP zwischen Sammel- und Einzelmilchproben verglich (Okura et al. 2012).

Die Ergebnisse aus Studie 2 deuten darauf hin, dass das Risiko einer Erregerübertragung durch die Aufnahme von Kolostrum im Infektionsgeschehen der untersuchten Ziegenherde von untergeordneter Bedeutung ist. Dies bestätigt Studien aus anderen Ziegenherden, steht jedoch im Widerspruch zu jenen bei Rindern durchgeführten (Pithua et al. 2011; Lievaart-Peterson et al. 2019). Generell scheint eine nachweisbare laktogene Erregerausscheidung bei Ziegen im subklinischen Stadium, wenn überhaupt, nur in sehr geringem Umfang und selten aufzutreten. Eine Kontamination der Euterhaut wurde bei einem geringen Anteil der ablamenden Ziegen festgestellt, was eine Übertragung während des Saugaktes potenziell ermöglicht. Wie insbesondere die Untersuchungsergebnisse der Sammelkolostren zeigen, ist eine hygienische Kolostrumgewinnung im Melkstand auch in einer infizierten Herde möglich.

4.3.3 Schlussfolgerungen für die Unterbrechung von Infektketten in Milchziegenhaltungen

Die Ergebnisse beider Studien zeigen, dass teils erhebliche Unterschiede zwischen Rinder- und Milchziegenhaltungen bestehen. Dies hat Auswirkungen auf das von einzelnen Stallbereichen ausgehende Risiko im Rahmen der Erregerübertragung sowie zu empfehlende Managementmaßnahmen in Hinblick auf die Unterbrechung von Infektketten.

Für eine erfolgreiche Paratuberkulosebekämpfung ist es von entscheidender Bedeutung, Nachweisen von MAP die ihnen angemessene Beachtung beizumessen und gezielt Maßnahmen zu ergreifen, die das Risiko eines Erregerkontaktes beziehungsweise einer Erregerübertragung wirksam reduzieren. Alle Nachweise von MAP in der Stallumgebung sollten unter Berücksichtigung der verwendeten

Diagnostikmethoden differenziert werden. Teils da erhebliche Unterschiede zwischen den Untersuchungsergebnissen von qPCR und der kulturellen Anzucht in Studie 1 festgestellt werden konnten, vorrangig jedoch, weil die Methode einen direkten Einfluss auf die Risikobewertung der potenziellen Infektionsquelle hat (Eisenberg et al. 2010b). Auch wenn eine minimal notwendige Dosis bisher nicht definiert werden konnte, so ist die Aufnahme vitaler Erreger notwendig um eine Infektion auszulösen (Chiodini 1996). Demnach würde prinzipiell nur von kulturpositiven Umgebungsproben ein Risiko für die Übertragung von MAP ausgehen. Wie bereits diskutiert, können jedoch verschiedene Faktoren im Rahmen der Probenbearbeitung die Analyseergebnisse beeinflussen. Ein negatives Kulturergebnis kann und sollte daher nicht direkt mit der Abwesenheit von vitalen Erregern und einem gänzlich zu vernachlässigendem Infektionsrisiko gleichgesetzt werden. Es ist eher von einer Unterschätzung der wahren Kontamination der Stallumgebung auszugehen. In Studie 1 sowie bei Aly et al. (2010) wurde ein quantitativer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen beider Untersuchungsmethoden durch die negative Korrelation zwischen dem C_t -Wert und dem berechneten Wachstumsindex beziehungsweise KbE je Nährröhrchen deutlich. Proben mit einer starken Wachstumsintensität wiesen einen niedrigeren C_t -Wert auf als Proben, bei welchen keine Anzucht möglich war. Da angenommen wird, dass die Wahrscheinlichkeit einer Infektion sowie die Zeitspanne bis klinische Symptome auftreten in direktem Zusammenhang mit der aufgenommenen Erregerdosis stehen (Stehman 1996; Sweeney 1996; Windsor und Whittington 2020), sollte im Rahmen der Infektionsprophylaxe der Fokus auf Stallbereiche mit kulturellem MAP-Nachweis gelegt werden. Obwohl dadurch möglicherweise einige Bereiche, in denen ein Kontakt zwischen Tier und infektiösem Erreger möglich ist, nicht berücksichtigt werden, so ist das von diesen Bereichen ausgehende Risiko für eine Übertragung als geringer einzuschätzen als von Orten, an denen der Erreger kulturell nachgewiesen wurde.

Der kulturelle Nachweis von MAP in Studie 1 war eindeutig mit der Anwesenheit von Ausscheidern assoziiert. Die durch die Laufstallhaltung der Ziegen eröffnete Möglichkeit der freien Bewegung innerhalb der Stallquadranten stellt eine empfohlene, möglichst artgerechte Haltungsform der Tiere dar (Ganter et al. 2012a), begünstigt jedoch gleichzeitig die Verbreitung des Erregers im gesamten Stall. Im Hinblick auf die Unterbrechung von Infektketten und die Minimierung der Erregerverbreitung sollte die

uneingeschränkte Bewegungsfreiheit infektiöser Tiere durchaus kritisch betrachtet werden. Nicht zuletzt aufgrund der bestehenden Gefahr der Erregerverschleppung in andere Stallbereiche empfänglicherer Altersgruppen (Raizman et al. 2004; Field et al. 2023). Insbesondere klinisch erkrankte Tiere bergen das Risiko MAP in hohen Mengen von bis zu 10^8 KbE je Gramm Kot auszuscheiden und dadurch zu einer maßgeblichen Umgebungskontamination beizutragen (Whittington et al. 2000; Whitlock et al. 2005; Windsor 2015). Zur Vermeidung des kontinuierlichen Neueintrages von MAP in die Stallumgebung durch infizierte Tiere sollten diese schnellstmöglich aus dem Bestand entfernt werden (Windsor 2015; Whittington et al. 2019). Deren Identifizierung kann auf Basis von Gesamtbestands- oder selektiven Einzeltieruntersuchungen erfolgen.

Einige Tierhalter könnten jedoch zögern, diese Maßnahme konsequent und zeitnah umzusetzen, insbesondere wenn es sich um leistungsstarke Tiere handelt oder eine hohe Intraherden-Prävalenz vorliegt. Eine getrennte Unterbringung der infizierten Tiere in einem separaten Stallbereich ist in diesem ungünstigen Fall als Mindestmaßnahme sinnvoll. Basierend auf den in Studie 1 identifizierten Risikobereichen gilt dies insbesondere für die Trockenstehzeit und die Ablammung.

Ziegenherden ohne einen abgetrennten Ablambbereich weisen eine höhere Paratuberkulose-Prävalenz auf als Herden, in welchen ein solcher existiert (Barrero-Domínguez et al. 2019; Iarussi et al. 2019). Trotzdem wurde der Ablambbereich in Studie 1 als der Ort mit dem höchsten Risiko für einen initialen Kontakt zwischen Lamm und MAP identifiziert. Der Erreger konnte mehrfach aus Einstreuproben sowie aus einer Staubprobe angezüchtet werden, was auf eine hohe Kontamination schließen lässt. Da es sich bei neugeborenen Lämmern um die empfänglichste Altersgruppe handelt, stellt bereits die Aufnahme einer geringen Erregermenge ein erhebliches Risiko für eine Infektion dar (Sweeney 1996; Windsor und Whittington 2010). Für eine erfolgreiche Reduzierung der Wahrscheinlichkeit einer Erregeraufnahme ist eine Kombination von zwei Strategien erforderlich: die Reduzierung der grundlegenden MAP-Belastung und die Reduzierung der Zeit, die sich die empfänglichen Tiere im kontaminierten Bereich aufhalten.

Um den Erregerdruck im Ablambbereich zu reduzieren, sollte eine regelmäßige und wirksame Reinigung und Desinfektion des Bereiches erfolgen. Eine Studie in Rinderbeständen konnte zeigen, dass eine mangelnde Desinfektion des

Abkalbebereiches als Risikofaktoren für die Inzidenz von MAP-Ausscheidern gilt (Donat et al. 2016). Für Haltungen kleiner Wiederkäuer wird aufgrund der hohen allgemeinen Keimbelastung im Ablambbereich, verursacht durch abgegangene Nachgeburten und Lochien, ohnehin eine routinemäßige Zwischendesinfektion empfohlen. Das Intervall kann von wöchentlich auf nach jeder Geburt intensiviert werden, insbesondere bei der Häufung von Infektionen oder bekannten Herdenerkrankungen (Ganter et al. 2012a). Zusätzlich kann die Nutzung von Einzeltier-Geburtsboxen im Allgemeinen, als auch alleinig für MAP-Ausscheider im Speziellen, das Risiko einer Infektion der Neugeborenen senken (Pithua et al. 2013; Donat et al. 2016).

Grundsätzlich sollte jedoch die Belegung von infizierten Tieren vermieden werden. Nur so ist eine schnellstmögliche Entfernung des betreffenden Tieres aus dem Bestand möglich, um einer Kontamination der Stallumgebung und insbesondere des Ablambbereiches im Falle einer aktiven Erregerausscheidung entgegenzuwirken.

Die Zeit, die Jungtiere bis zur Trennung bei ihren Müttern verbringen, stellt nachweislich einen Risikofaktor dar (Doré et al. 2012). Die Ergebnisse aus Studie 1 deuten darauf hin, dass die Erregerübertragung über die kontaminierte Ablammumgebung dafür ursächlich sein könnte. Der Kontakt mit kontaminierter Einstreu kann zu einer oralen Aufnahme von MAP führen. Die Wahrscheinlichkeit dafür und die Menge an aufgenommenen Erregern stehen vermutlich mit der Zeit die das Lamm diesem Risiko ausgesetzt ist in Zusammenhang. Aus diesem Grund sollten Lämmer schnellstmöglich aus dem kontaminierten in einen möglichst MAP-freien Bereich verbracht werden. Zur Gewährleistung eines zeitnahen Auffindens der neugeborenen Lämmer ist die Häufigkeit der Kontrollen der Ablambuchten während der Ablampperiode zu erhöhen (Ganter et al. 2012a).

Die sofortige Trennung der Lämmer von den Mutterziegen nach der Geburt wird unter dem Begriff ‚Snatching‘ in mehreren internationalen Ziegengesundheits- und Paratuberkulose-Bekämpfungsprogrammen ebenso empfohlen wie in den deutschen Haltungsempfehlungen für kleine Wiederkäuer um zur Unterbrechung von Infektketten beizutragen (Ganter et al. 2012a; Nagel-Alne et al. 2014; Whittington et al. 2019).

Die Bereiche der Jungtieraufzucht im Studienbetrieb wiesen in Studie 1 nur eine geringe Kontamination mit MAP-DNA auf und konnten daher als Orte mit einem

geringeren Risiko der Erregerübertragung eingestuft werden. Dies muss jedoch nicht in allen Betrieben der Fall sein, wie verschiedene Untersuchungen von Kälberaufzuchtbereichen zeigten. Insbesondere dann, wenn keine strikte Trennung von Alt- und Jungtieren eingehalten wurde oder die allgemeine Hygienepraxis unzureichend war, konnte MAP-DNA nachgewiesen oder der Erreger kulturell angezüchtet werden (Raizman et al. 2004; Eisenberg et al. 2010a; Field et al. 2023). Wie bereits ausgeführt, ist auch der Nachweis von MAP im Staub des untersuchten Betriebes wahrscheinlich auf eine Verschleppung aus dem stärker belasteten Bereich der laktierenden Ziegen zurückzuführen. Um das Risiko eines Erregereintrages in den Bereich der Lämmeraufzucht so gering wie möglich zu halten, wäre eine bauliche Trennung zu den Bereichen der adulten Herdenmitglieder zu empfehlen. Zusätzlich sollte die Nutzung derselben Arbeitsutensilien im gesamten Stall sowie ein mehrfacher Wechsel zwischen Bereichen verschiedener Altersgruppen ohne eine ausreichende Reinigung beziehungsweise Wechsel der Arbeitskleidung, insbesondere des Schuhwerkes, vorzunehmen vermieden werden.

Aus diesem Grund können auch Stallbereiche epidemiologisch von Bedeutung sein, in denen MAP nachgewiesen werden kann und in welchen sich nur adulten Tiere aufhalten. Darüber hinaus ist eine horizontale Erregerübertragung zwischen adulten Tieren grundsätzlich möglich. Diese können sich in einer stark mit MAP belasteten Stallumgebung infizieren und klinische Symptome entwickeln, wenngleich die Wahrscheinlichkeit hierfür geringer ist als bei Jungtieren (Rankin 1962; Whittington und Sergeant 2001; Windsor und Whittington 2010). Zur Vermeidung einer Akkumulation des Erregers im Stallgebäude, insbesondere an Orten mit hohem Tierverkehr wie dem Melkkarussell und dem Vorwartebereich, sollten diese Bereiche in Hygieneplänen gesondert berücksichtigt werden. MAP besitzt eine hohe Tenazität (Whittington et al. 2004; Elliott et al. 2015), was entscheidend zu seiner Verbreitung im Stall und der daraus resultierenden Vielzahl an Infektionsquellen beiträgt. Daher sind regelmäßige und wirkungsvolle Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zu empfehlen, um den Erregerdruck periodisch herabzusetzen.

Eine zeitweise Weidehaltung kann nicht nur aus ökonomischen Gründen empfehlenswert sein (Ganter et al. 2012a), sondern, wie die Ergebnisse aus Studie 1 nahelegen, auch zu einer Minimierung des Erregerdrucks im Stallgebäude beitragen. Sie stellt im Gegensatz zu einer ganzjährigen Stallhaltung eine weniger intensive

Haltungsform dar, welche als Risikofaktor für Paratuberkulose-positive Bestände identifiziert wurde (Barrero-Domínguez et al. 2019; Schrott et al. 2023). Das Weidemanagement ist hierbei jedoch dringend an bestehende Empfehlungen in Bezug auf die Prävention der Erregerübertragung außerhalb des Stallgebäudes anzupassen (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2014; Whittington et al. 2019).

Die Untersuchung von Umgebungsproben stellt zusätzlich zur Identifizierung von Risikobereichen für eine Erregerübertragung auch eine alternative Möglichkeit dar, eine Paratuberkuloseinfektion in einem Ziegenbestand nachzuweisen. Dieses Verfahren wird seit Längerem in Rinderherden angewandt (Lombard et al. 2006; Donat et al. 2015; Klawonn et al. 2016) und hat aufgrund der positiven Erfahrungen inzwischen Eingang in viele Sanierungsprogramme gefunden (Whittington et al. 2019). In Deutschland wird die Untersuchung von Umgebungsproben zur Bestandsdiagnostik momentan nicht routinemäßig in Ziegenbeständen durchgeführt. Die Untersuchungen in Studie 1 legen den Grundstein für die weitere Erforschung dieses Diagnostikverfahrens und dessen zukünftige Integration in Sanierungs- und Kontrollprogramme für Milchziegenbestände. Auf dieser Grundlage kann empfohlen werden, Einstreuproben für eine beabsichtigte Kultivierung und Staubproben für eine qPCR-Untersuchung auf MAP zu verwenden. Prinzipiell ist zur Steigerung der Nachweiswahrscheinlichkeit auch eine Kombination von verschiedenen Untersuchungsmethoden und -materialien möglich (Wolf et al. 2017).

Die Erregeraufnahme durch das Saugen an der Mutter gilt als ein weiterer möglicher Übertragungsweg für MAP (Sweeney 1996; Windsor und Whittington 2010; Windsor 2015). Insbesondere in einem Großteil der ökologisch wirtschaftenden Milchziegenbetriebe erfolgt die Kolostrumaufnahme in dieser Form (Sieber 2014; Manek et al. 2017). Dagegen wird unter anderem in den Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2014) sowie auch im norwegischen „Healthier Goats programme“ (Nagel-Alne et al. 2014) die sofortige Trennung von Lamm und Mutter nach der Geburt empfohlen. Durch diese Maßnahme soll die Aufnahme von Kolostrum aus dem Euter und damit eine mögliche Übertragung von Infektionskrankheiten verhindert werden. Dies betrifft neben der Paratuberkulose

insbesondere die Caprine Arthritis-Encephalitis und die Pseudotuberkulose (Ganter et al. 2012a; Nagel-Alne et al. 2014).

MAP konnte im Rahmen von Studie 2 in keiner untersuchten Kolostrumprobe und nur in einer geringen Anzahl von Proben auf der Euterhaut nachgewiesen werden. Obwohl sich die trockenstehenden Ziegen des Projektbetriebes über einen längeren Zeitraum in einem nachweislich stark mit MAP belasteten Stallbereich aufhielten, konnte kein vermehrter Übergang auf die Euterhaut belegt werden. Auch eine laktogene Ausscheidung von MAP scheint bei den untersuchten Ziegen nicht in erheblichen Mengen stattgefunden zu haben. Die schnellstmögliche Separierung der neugeborenen Lämmer von den Muttertieren wird jedoch aufgrund der starken Umgebungskontamination des Ablambbereiches mit MAP dringend empfohlen. Das bereits diskutierte dennoch verbleibende geringe Restrisiko einer Erregerübertragung durch die Kolostrumaufnahme aus dem Euter wird durch diese Maßnahme gleichzeitig eliminiert.

Die Trennung vor dem ersten Saugakt ermöglicht es Kolostrum unter hygienischen Bedingungen zu gewinnen und durch kontrolliertes Tränkmanagement eine optimale Versorgung aller Lämmer sicherzustellen (Ganter et al. 2012a). Durch beide Studien konnte gezeigt werden, dass es trotz einer nachweislichen Umgebungskontamination im Bereich des Melkstandes zu keiner nachweisbaren Kontamination des Gemelks während des Melkprozesses gekommen ist.

Die Adspektion der Euter der in Studie 2 untersuchten Ziegen offenbarte nur bei wenigen Tieren Verunreinigungen, welche zumeist mit der abgehenden Nachgeburt in Verbindung zu bringen waren. Belege für die dringende Notwendigkeit der Durchführung einer Euterreinigung vor der Kolostrumgewinnung, wie sie von einigen Autoren empfohlen wird (Chiodini et al. 1984; Windsor und Whittington 2010), konnten im Rahmen dieser Untersuchung für Milchziegen nicht erbracht werden. Trotz des molekularbiologischen Nachweises auf der Euterhaut konnte mittels eines sensibleren Verfahrens die Erreger-DNA im Kolostrum selbst nach der Probengewinnung aus dem ungereinigten Euter nicht nachgewiesen werden. Die Reinigung der Euter stellt eine zusätzliche potenzielle Maßnahme dar, der jedoch im Hinblick auf die Unterbrechung der Infektkette nach den vorliegenden Erkenntnissen keine hohe Priorität zugeordnet werden sollte.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die bedeutendste Maßnahme zur Reduktion der Gefahr der Übertragung von MAP aus der Stallumgebung die Entfernung von Ausscheidern ist. Da MAP eine sehr hohe Tenazität besitzt, ist dies als alleinige Maßnahme jedoch nicht ausreichend. Ferner sind regelmäßige und wirkungsvolle Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durchzuführen, um den Erregerdruck periodisch zurückzusetzen und einer Akkumulation vorzubeugen. Dabei sollten insbesondere Orte hohen Tierverkehrs als auch der Ablambbereich berücksichtigt werden.

Der Ablambbereich stellt einen hochsensiblen Ort im Infektionsgeschehen dar, da hier vermehrungsfähige Erreger und hoch empfängliche Neugeborene zusammentreffen können. Eine schnellstmögliche Entfernung der Lämmer aus diesem Risikobereich trägt dazu bei, die Wahrscheinlichkeit der Erregeraufnahme zu minimieren.

Einer direkten Kolostrumaufnahme aus dem Euter in Hinblick auf eine potenzielle Übertragung von MAP kann nur ein geringes Risiko zugesprochen werden. Aufgrund der imperfekten Sensitivität der Untersuchungsmethoden kann jedoch ein Restrisiko, insbesondere bei infizierten und klinisch erkrankten Mutterziegen, nicht ausgeschlossen werden. Daher wird die Trennung von Mutter und Lamm vor der ersten Kolostrumaufnahme empfohlen. Die kontrollierte und hygienische Gewinnung von Kolostrum im Melkstand ermöglicht es, die Wahrscheinlichkeit der Erregerübertragung auf ein Minimum zu reduzieren.

Um Infektketten zu unterbrechen, ist ein umfassendes Managementprogramm erforderlich, das auf Hygiene, Prävention und Überwachung basiert. Die positive Entwicklung in der Studienherde zeigt, dass durch eine konsequente Umsetzung solcher Maßnahmen die Ausbreitung der Paratuberkulose in Milchziegenhaltungen reduziert und so die Gesundheit der Tiere geschützt werden kann. Geeignete Maßnahmen im Herden- und Betriebsmanagement sollten basierend auf den Ergebnissen einer betriebsindividuellen Risikoanalyse implementiert werden, um Infektketten effektiv zu unterbrechen. Hierbei sollten die Ergebnisse dieser Arbeit berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Die Paratuberkulose gewinnt als tiergesundheitslich und wirtschaftlich relevante Infektionskrankheit bei kleinen Wiederkäuern zunehmend an Bedeutung. Um die Tiergesundheit zu fördern und zugleich die weitere Ausbreitung der Paratuberkulose in betroffenen Beständen sowie in der gesamten Ziegenpopulation zu verhindern, ist die Prävention von Neuinfektionen entscheidend. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene potenzielle Vektoren auf das Vorhandensein von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) untersucht, um die Übertragungswege der Paratuberkulose in Milchziegenherden besser zu verstehen.

Zur Abschätzung des von der Stallumgebung und dem Saugen am Muttertier ausgehenden Gefährdungspotentials wurden in einem mit Paratuberkulose infizierten Milchziegenbestand zwei Studien durchgeführt. In Studie 1 wurde die Verbreitung von MAP im Stallgebäude durch die Untersuchung von 256 Umgebungsproben, bestehend aus Einstreu, Staub, Tränkwasser und Futter, mittels kultureller Anzucht und quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time quantitative polymerase chain reaction; qPCR) bestimmt. Räumliche sowie zeitliche Einflussfaktoren auf den MAP-Nachweis wurden getrennt nach der verwendeten Nachweismethode durch eine logistische Regression analysiert. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Nachweismethoden wurde zudem durch die Berechnung des Kappa-Koeffizienten und des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman bewertet. Im Rahmen von Studie 2, in der die MAP-Belastung im Kolostrum und auf der Euterhaut bestimmt werden sollte, wurden 110 Einzeltierkolostren, 14 Sammelkolostren und 49 Euterhauttupfer im gleichen Betrieb entnommen und analysiert. Da für den Nachweis von MAP in diesen Probenmaterialien keine etablierten Methoden zur Verfügung standen, wurden diese im Vorfeld der Untersuchungen entwickelt und in Bezug auf ihre minimale Nachweisgrenze evaluiert.

MAP konnte aus 28 Einstreu- und einer Staubprobe kulturell angezüchtet werden, wohingegen der molekularbiologische Nachweis in allen Matrices möglich war. Ein kultureller Erregernachweis konnte mit der Anwesenheit von Ausscheidern im entsprechenden Stallbereich assoziiert werden. Stallbereiche mit einem hohen Tierverkehr, insbesondere das Melkkarussell, sowie der Ablambbereich wiesen eine hohe Erregerbelastung auf. Der im Verlauf der Studie sinkende Anteil der Ausscheider in der Herde hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Nachweisrate von MAP. In der

Zusammenfassung

Weidesaison konnten hingegen signifikant niedrigere Nachweisraten beobachtet werden als während der ganztägigen Stallhaltung. Trotz der festgestellten Umgebungsbelastung wies die Euterhaut lediglich eine geringe MAP-Kontamination auf. Der Nachweis erfolgte aus drei Euterhauttupfern mittels qPCR, jedoch war eine kulturelle Anzucht nicht möglich. MAP konnte molekularbiologisch weder im Einzeltier- noch im Sammelkolostrum nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Ablambbereich aufgrund des Zusammentreffens von vermehrungsfähigen Erregern und empfänglichen Neugeborenen einen Ort substantiellen Risikos für die Übertragung von MAP darstellt. Hingegen scheint das Risiko einer Erregerübertragung durch die Aufnahme von Kolostrum im Infektionsgeschehen der untersuchten Ziegenherde von untergeordneter Bedeutung zu sein. Eine potentielle Übertragung während des Saugaktes bleibt jedoch möglich. Die schnellstmögliche Separierung der Lämmer von den Alttieren in eine hygienische und möglichst MAP-freie Umgebung wird empfohlen, um die Aufnahme des Erregers aus der Ablammumgebung sowie durch die Verhinderung des Saugvorgangs zu minimieren. Die Entfernung aller identifizierten MAP-Ausscheider aus dem Bestand stellt eine weitere wesentliche Maßnahme dar, da bereits wenige dieser Tiere zu einer nachweisbaren Kontamination der Stallumgebung führen können.

Die Empfehlungen, die aus den in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen abgeleitet wurden, sollten bei einer Bestandssanierung im betrieblichen Tiergesundheitsmanagement von Milchziegenbeständen berücksichtigt werden, um die Infektketten der Paratuberkulose erfolgreich zu unterbrechen.

6 Summary

Paratuberculosis is an increasingly important infectious disease of both animal health and economic relevance in small ruminants. To promote animal health and inhibit the further spread of paratuberculosis within affected herds as well as in the goat population in general, the prevention of new infections is crucial. In this thesis, multiple potential vectors were examined to assess the occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), aiming to enhance the understanding of the transmission routes of paratuberculosis in dairy goat herds.

To evaluate the potential risk posed by the barn environment and the suckling on does, two studies were conducted within a paratuberculosis-infected dairy goat herd. In Study 1, the prevalence of MAP in the barn was determined by culture and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis of 256 environmental samples, including bedding, dust, water, and feed. The influence of spatial and temporal factors on MAP detection was examined separately for each detection method using logistic regression. Additionally, the kappa coefficient and Spearman's rank correlation coefficient were calculated to assess the concordance between the results obtained by the two detection methods. In Study 2, which aimed to determine the MAP load in colostrum and on the udder skin, 110 individual colostrum samples, 14 bulk colostrum samples and 49 udder skin swabs were collected from the same herd and analyzed. As no established methods were available for the detection of MAP in these sample materials, these methods were developed and evaluated in terms of their minimum detection limit prior to the examination.

MAP could be cultured from 28 bedding and one dust sample, while molecular biological detection was possible in all matrices. Cultural detection of the pathogen was linked to the presence of MAP shedders in the respective barn area. Elevated pathogen load was observed in areas with high animal traffic, in particular the milking parlor, and the kidding area. The percentage of MAP shedders in the herd, which decreased during the study, had no significant effect on the detection rate. In contrast, significantly lower detection rates were observed during grazing seasons compared to seasons without pasturing. Despite the confirmed contamination of the environment, the udder skin revealed only a marginal MAP contamination. Specifically, MAP was detected in three udder skin swabs by qPCR, but cultivation was not possible. Besides,

Summary

MAP was not detected by molecular biological analysis in either individual or bulk colostrum.

Based on these findings, it can be concluded that the kidding area poses a site with a substantial risk for MAP transmission due to the encounter of viable pathogen and susceptible youngstock. In contrast, the risk of pathogen transmission by colostrum ingestion appears to be of subordinate importance in the infection dynamics of the goat herd studied. However, potential transmission during the suckling act remains possible. The fastest possible separation of the kids from the adult animals in a sanitary and, if possible, MAP-free environment is recommended in order to minimize the uptake of the pathogen from the kidding environment and by preventing suckling. Removal of all identified MAP shedders from the herd is another important measure, as even a few of these animals can lead to a detectable contamination of the barn environment.

The recommendations derived from the studies presented in this thesis should be considered in the on-farm animal health management of dairy goat herds when implementing a control program to successfully interrupt the chains of infection of paratuberculosis.

7 Literaturverzeichnis

Alinovi C., Wu C., Lin T. (2009): In utero *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection of a pygmy goat. *Vet Rec* 164(9): 276–277.

DOI: 10.1136/vr.164.9.276.

Aly S., Anderson R., Whitlock R., Fyock T., McAdams S., Adaska J. et al. (2009): Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on California free-stall dairies. *J Dairy Sci* 92(8): 3634–3642.

DOI: 10.3168/jds.2008-1680.

Aly S., Mangold B., Whitlock R., Sweeney R., Anderson R., Jiang J. et al. (2010): 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(5): 677–683.

DOI: 10.1177/104063871002200501.

Ayele W., Macháčková M., Pavlík I. (2001): The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med - Czech* 46(7-8): 205–224.

DOI: 10.17221/7878-VETMED.

Bannantine J., Stabel J. (2002): Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. *BMC Microbiol* 2(1): 2.

DOI: 10.1186/1471-2180-2-2.

Barkema H., Orsel K., Nielsen S., Koets A., Rutten V., Bannantine J. et al. (2018): Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound Emerg Dis* 65(Suppl. 1): 125–148.

DOI: 10.1111/tbed.12723.

Barrero-Domínguez B., Luque I., Huerta B., Gomez-Laguna J., Galán-Relaño Á., Gómez-Gascón L. et al. (2019): Paratuberculosis in dairy goat flocks from southern Spain: risk factors associated with seroprevalence. *Vet Rec* 185(19): 600.

DOI: 10.1136/vr.105465.

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

DOI: 10.1186/1476-8518-9-8.

Bauman C., Jones-Bitton A., Jansen J., Kelton D., Menzies P. (2019): Evaluation of bulk tank milk PCR and bulk tank milk modified ELISA tests for the detection of paratuberculosis at the herd level in goat and sheep dairies in Ontario, Canada. *J Dairy Sci* 102(1): 511–520.

DOI: 10.3168/jds.2018-15020.

Baumgart D., Sandborn W. (2012): Crohn's disease. *Lancet* 380(9853): 1590–1605.

DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9.

Beaver A., Cazer C., Ruegg P., Gröhn Y., Schukken Y. (2016): Implications of PCR and ELISA results on the routes of bulk-tank contamination with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J Dairy Sci* 99(2): 1391–1405.

DOI: 10.3168/jds.2015-9855.

Buergelt C., Williams J. (2004): Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust Vet J* 82(8): 497–503.

DOI: 10.1111/j.1751-0813.2004.tb11169.x.

Bundesinstitut für Risikobewertung (2021): Ist der Erreger der Paratuberkulose des Rindes an der Entstehung von Morbus Crohn des Menschen beteiligt? Gemeinsame Mitteilung Nr. 022/2021 von BfR und MRI vom 15. Juli 2021

(Online verfügbar unter: www.bfr.bund.de/cm/343/ist-der-erreger-der-paratuberkulose-des-rindes-an-der-entstehung-von-morbus-crohn-des-menschen-beteiligt.pdf, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2014): Bekanntmachung von Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern. BAnz. AT 01.08.2014 B1

(Online verfügbar unter: www.bmel.de/DE/themen/tiere/tiergesundheit/empfehlungen-hygiene.html, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Carpenter G. (1986): Dust in livestock buildings—Review of some aspects. *J Agric Eng Res* 33(4): 227–241.

DOI: 10.1016/S0021-8634(86)80038-5.

Literaturverzeichnis

Chiodini R. (1996): Immunology: Resistance to Paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2): 313–343.

DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30409-6.

Chiodini R., van Kruiningen H., Merkal R. (1984): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet* 74(3): 218–262.

Clarke C. (1997): The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 116(3): 217–261.

DOI: 10.1016/s0021-9975(97)80001-1.

Collins M. (2011): Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(3): 581-591.

DOI: 10.1016/j.cvfa.2011.07.013.

Collins P., Davies D., Matthews T. (1984): Mycobacterial infection in goats: Diagnosis and pathogenicity of the organism. *Br Vet J* 140(2): 196–201.

DOI: 10.1016/0007-1935(84)90081-2.

Corpa J. (2000): Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Vet Microbiol* 77(3-4): 475–485.

DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00332-1.

Corpa J., Garrido J., García Marín J., Pérez V. (2000a): Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol* 122(4): 255–265.

DOI: 10.1053/jcpa.1999.0368.

Corpa J., Pérez V., Sánchez M., Marín J. (2000b): Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet Rec* 146(7): 195–196.

DOI: 10.1136/vr.146.7.195.

Dalziel T. (1913): Chronic Interstitial Enteritis. *Brit Med J* 2(2756): 1068–1070.

de Lacerda Roberto J., Limeira C., Da Costa Barnabé N., Soares R., Silva M., de Barros Gomes A. et al. (2021): Antibody detection and molecular analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in goat milk: Systematic review and meta-analysis. *Res Vet Sci* 135: 72–77.

DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.01.004.

Literaturverzeichnis

Djønne B., Jensen M., Grant I., Holstad G. (2003): Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol* 92(1-2): 135–143.

DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00355-3.

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(5): 975–985.

DOI: 10.1017/S0950268814002465.

Donat K., Schau U., Soschinka A. (2011): Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mithilfe von Umgebungskotproben. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124(9-10): 360–367.

DOI: 10.2376/0005-9366-124-360.

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(5): 3744–3752.

DOI: 10.3168/jds.2015-10625.

Doré E., Paré J., Côté G., Buczinski S., Labrecque O., Roy J., 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(1): 32–45.

DOI: 10.1111/j.1939-1676.2011.00854.x.

Eisenberg S., Koets A., Hoebøer J., Bouman M., Heederik D., Nielen M. (2010a): Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial Dutch dairy farms. *Appl Environ Microbiol* 76(18): 6310–6312.

DOI: 10.1128/AEM.00998-10.

Eisenberg S., Koets A., 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(1): 117.

DOI: 10.1186/1297-9716-42-117.

Eisenberg S., Krieger M., Campe A., Lorenz I., Einax E., Donat K. (2022): Herd Prevalence Estimation of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Burden in the Three Main Dairy Production Regions of Germany (PraeMAP). *Animals* 12(4): 447.

DOI: 10.3390/ani12040447.

Eisenberg S., Nielen M., Santema W., Houwers D., Heederik D., Koets A. (2010b): Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet Microbiol* 143(2-4): 284–292.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.11.033.

Elliott G., Hough R., Avery L., Maltin C., Campbell C. (2015): Environmental risk factors in the incidence of Johne's disease. *Crit Rev Microbiol* 41(4): 488–507.

DOI: 10.3109/1040841X.2013.867830.

Europäische Kommission (2018): Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen. ABl. L 308 04.12.2018, S. 21, geändert durch Durchführungsverordnung (EU) 2022/925 der Kommission vom 14.06.2022.

(Online verfügbar unter: eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:02018R1882-20220705&from=EN, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Fecteau M.-E., Hovingh E., Whitlock R., Sweeney R. (2013): Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil, crops, and ensiled feed following manure spreading on infected dairy farms. *Can Vet J* 54(11): 1083–1085.

Fecteau M.-E., Whitlock R. (2011): Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(3): 547-557.

DOI: 10.1016/j.cvfa.2011.07.002.

Fèvre E., Bronsvort, Barend M. de C., Hamilton K., Cleaveland S. (2006): Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends Microbiol* 14(3): 125–131.

DOI: 10.1016/j.tim.2006.01.004.

Literaturverzeichnis

Field N., Mee J., McAloon C. (2023): Evaluation of Environmental Sampling for Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the Pre-Weaned Calf Area and Calving Area of Infected Dairy Farms Enrolled in a Voluntary Johne's Disease Control Programme. *Animals* 13(4): 669.

DOI: 10.3390/ani13040669.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2023): FAOSTAT. Crops and livestock products.

(Online verfügbar unter: www.fao.org/faostat/en/#data/QCL, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Friedrich-Loeffler-Institut (2020): Paratuberkulose. Amtliche Methode und Falldefinition.

(Online verfügbar unter: www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00058039, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Ganter M., Benesch C., Bürstel D., Ennen S., Kaulfuß K.-H., Mayer K. et al. (2012a): Empfehlung für die Haltung von Schafen und Ziegen der Deutschen Gesellschaft für die Krankheiten der kleinen Wiederkäuer, Fachgruppe der DVG. Teil 1. *Tierärztl Prax Ausg G* 40(5): 314–325.

DOI: 10.1055/s-0038-1623133.

Ganter M., Benesch C., Bürstel D., Ennen S., Kaulfuß K.-H., Mayer K. et al. (2012b): Empfehlung für die Haltung von Schafen und Ziegen der Deutschen Gesellschaft für die Krankheiten der kleinen Wiederkäuer, Fachgruppe der DVG. Teil 2. *Tierärztl Prax Ausg G* 40(6): 390–396.

DOI: 10.1055/s-0038-1623142.

Grant I. (2000): Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol* 77(3-4): 369–378.

DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00322-9.

Grant I., Ball H., Rowe M. (1998): Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Lett Appl Microbiol* 26(2): 166–170.

DOI: 10.1046/j.1472-765X.1998.00309.x.

Greig A. (2000): Johne's disease in sheep and goats. *In Pract* 22(3): 146–151.

DOI: 10.1136/inpract.22.3.146.

Literaturverzeichnis

Groenendaal H., Nielen M., Jalvingh A., Horst S., Galligan D., Hesselink J. (2002): A simulation of Johne's disease control. *Prev Vet Med* 54(3): 225–245.

DOI: 10.1016/S0167-5877(02)00027-2.

Harris N., Barletta R. (2001): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 14(3): 489–512.

DOI: 10.1128/CMR.14.3.489-512.2001.

Hasonova L., Pavlik I. (2006): Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Vet Med - Czech* 51(5): 193–211.

DOI: 10.17221/5539-VETMED.

Husakova M., Dziedzinska R., Slana I. (2017): Magnetic Separation Methods for the Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Various Types of Matrices: A Review. *BioMed Res Int* 2017: 5869854.

DOI: 10.1155/2017/5869854.

Iarussi F., Paradies P., Sardaro R., Rubino G., Scaltrito D., Pieragostini E., Petazzi F. (2019): Epidemiology and risk factors of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semi-extensive dairy sheep and goat farms of Apulia, southern Italy. *Small Rumin Res* 177: 89–96.

DOI: 10.1016/j.smallrumres.2019.06.016.

Idris S., Eltom K., Okuni J., Ojok L., Elmagzoub W., El Wahed A. et al. (2022): Paratuberculosis: The Hidden Killer of Small Ruminants. *Animals* 12(1): 12.

DOI: 10.3390/ani12010012.

Jarlier V., Nikaido H. (1994): Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 123(1-2): 11–18.

DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x.

Johne H., Frothingham L. (1895): Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch Z Tiermed Pathol* 21: 438–454.

Kennedy D., Benedictus G. (2001): Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 20(1): 151–179.

DOI: 10.20506/rst.20.1.1274.

Literaturverzeichnis

Khol J., Eisenberg S., Noll I., Zschöck M., Eisenberg T., Donat K. (2019): Zweistufige Paratuberkulosebekämpfung in der Praxis: Überwachung auf Herdenebene als Basis für betriebliche Maßnahmen zur Prävalenzsenkung. *Tierärztl Prax Ausg G* 47(3): 171–183.

DOI: 10.1055/a-0896-1238.

Klawonn W., Einax E., Pützschel R., Schmidt M., Donat K. (2016): Johne's disease: reliability of environmental sampling to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in beef cow-calf herds. *Epidemiol Infect* 144(11): 2392–2400.

DOI: 10.1017/S0950268816000650.

Koenig G., Hoffsis G., Shulaw W., Bech-Nielsen S., Rings D., St-Jean G. (1993): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *Am J Vet Res* 54(9): 1441–1445.

Köhler H., Burkert B., Pavlik I., Diller R., Geue L., Conraths F., Martin G. (2008): Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine serum. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 121(5-6): 203–210.

Köhler H., Soschinka A., Meyer M., Kather A., Reinhold P., Liebler-Tenorio E. (2015): Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Vet Res* 11(1): 74.

DOI: 10.1186/s12917-015-0381-1.

Kreienbrock L., Pigeot I., Ahrens W. (2012): Epidemiologische Methoden (5. Auflage). Berlin und Heidelberg, Deutschland; Springer Spektrum.

ISBN: 978-3-8274-2333-7.

Krüger C., Köhler H., Liebler-Tenorio E. (2015): Sequential development of lesions 3, 6, 9, and 12 months after experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 52(2): 276–290.

DOI: 10.1177/0300985814533804.

Kudahl A., Nielsen S. (2009): Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *J Dairy Sci* 92(9): 4340–4346.

DOI: 10.3168/jds.2009-2039.

Literaturverzeichnis

Kuehnel M., Goethe R., Habermann A., Mueller E., Rohde M., Griffiths G., Valentin-Weigand P. (2001): Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol* 3(8): 551–566.

DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00139.x.

Lambeth C., Reddacliff L., Windsor P., Abbott K., McGregor H., Whittington R. (2004): Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Aust Vet J* 82(8): 504–508.

DOI: 10.1111/j.1751-0813.2004.tb11171.x.

Lambrecht R., Carriere J., Collins M. (1988): A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* 54(4): 910–916.

DOI: 10.1128/aem.54.4.910-916.1988.

Landis J., Koch G. (1977): The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33(1): 159–174.

DOI: 10.2307/2529310.

Lavers C., McKenna S., Dohoo I., Barkema H., Keefe G. (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(11): 1053–1060.

Li L., Bannantine J., Zhang Q., Amonsin A., May B., Alt D. et al. (2005): The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(35): 12344–12349.

DOI: 10.1073/pnas.0505662102.

Lievaart-Peterson K., Lutikholt S., Gonggrijp M., Ruuls R., Ravesloot L., Koets A. (2019): *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA and Antibodies in Dairy Goat Colostrum and Milk. *Vet Sci* 6(4): 96.

DOI: 10.3390/vetsci6040096.

Lombard J., Wagner B., Smith R., McCluskey B., Harris B., Payeur J. et al. (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(11): 4163–4171.

DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72461-4.

Literaturverzeichnis

Losinger W. (2005): Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J Dairy Sci* 72(4): 425–432.

DOI: 10.1017/S0022029905001007.

Luttikholt S., Lievaart-Peterson K., Gonggrijp M., Aalberts M., van Schaik G., Vellema P. (2019): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA Responses in Milk Samples from Vaccinated and Nonvaccinated Dairy Goat Herds in The Netherlands. *Vet Sci* 6(2): 58.

DOI: 10.3390/vetsci6020058.

Manek G., Simantke C., Sporkmann K., Georg H., Kern A. (2017): Systemanalyse der Schaf- und Ziegenmilchproduktion in Deutschland. Abschlussbericht. Bioland Beratung GmbH. Augsburg

(Online verfügbar unter: <https://orgprints.org/id/eprint/31288/1/31288-12NA110-bioland-fischinger-2017-systemanalyse-schaf-ziege.pdf>, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Marquetoux N., Ridler A., Heuer C., Wilson P. (2019): What counts? A review of *in vitro* methods for the enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 230: 265–272.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.02.011.

McAloon C., Whyte P., More S., Green M., O'Grady L., Garcia A., Doherty M. (2016): The effect of paratuberculosis on milk yield—A systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci* 99(2): 1449–1460.

DOI: 10.3168/jds.2015-10156.

McAloon C., Whyte P., More S., O'Grady L., Doherty M. (2015): Development of a HACCP-based approach to control paratuberculosis in infected Irish dairy herds. *Prev Vet Med* 120(2): 152–161.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.04.018.

McGregor H., Dhand N., Dhungyel O., Whittington R. (2012): Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model. *Prev Vet Med* 107(1-2): 76–84.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2012.05.014.

Literaturverzeichnis

McKenna S., Keefe G., Tiwari A., VanLeeuwen J., Barkema H. (2006): Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can Vet J* 47(11): 1089–1099.

Merkal R., Curran B. (1974): Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol* 28(2): 276–279.

DOI: 10.1128/am.28.2.276-279.1974.

M'Fadyean J., Seather A. (1916): Johne's Disease. *J Comp Pathol Therap* 29: 62–94.

DOI: 10.1016/S0368-1742(16)80004-1.

Momotani E., Whipple D., Thiermann A., Cheville N. (1988): Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol* 25(2): 131–137.

DOI: 10.1177/030098588802500205.

Moog U., Wehrle F., Donat K., Köhler H. (2023): Screening of sheep- and goat herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* using both environmental samples and specific antibodies in blood serum. *Animal - Sci Proc* 14(1): 86–87.

DOI: 10.1016/j.anscip.2023.01.120.

Mortier R., Barkema H., Orsel K., Wolf R., de Buck J. (2014): Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res* 45(1): 71.

DOI: 10.1186/s13567-014-0071-1.

Nagel-Alne G., Asheim L., Hardaker J., Sølverød L., Lindheim D., Valle P. (2014): The Norwegian Healthier Goats programme—a financial cost-benefit analysis. *Prev Vet Med* 114(2): 96–105.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.02.002.

Nebbia P., Robino P., Zoppi S., Meneghi D. de (2006): Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Rumin Res* 66(1-3): 116–120.

DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.049.

Nielsen S., Bjerre H., Toft N. (2008): Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J Dairy Sci* 91(12): 4610–4615.

DOI: 10.3168/jds.2008-1272.

Literaturverzeichnis

Nielsen S., Toft N. (2008): Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol* 129(3-4): 217–235.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.12.011.

Okura H., Toft N., Nielsen S. (2012): Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: a systematic review and meta-analysis. *Vet Microbiol* 157(3-4): 253–263.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.019.

Patterson D., Allen W. (1972): Chronic mycobacterial enteritis in ruminants as a model of Crohn's disease. *Proc Royal Soc Med* 65(11): 998–1001.

DOI: 10.1177/003591577206501140.

Pavlik I., Matlova L., Bartl J., Svastova P., Dvorska L., Whitlock R. (2000): Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet Microbiol* 77(3-4): 309–324.

DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00316-3.

Payne J., Rankin J. (1961): The Pathogenesis of Experimental Johne's Disease in Calves. *Res Vet Sci* 2(2): 167–176.

DOI: 10.1016/S0034-5288(18)34970-1.

Pérez V., García Marín J., Badiola J. (1996): Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol* 114(2): 107–122.

DOI: 10.1016/S0021-9975(96)80001-6.

Pillars R., Grooms D., Kaneene J. (2009): Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Can Vet J* 50(10): 1039–1046.

Pithua P., Espejo L., Godden S., Wells S. (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(2): 398–404.

DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.03.014.

Literaturverzeichnis

Pithua P., Wells S., Godden S., Stabel J. (2011): Evaluation of the association between fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and detection in colostrum and on teat skin surfaces of dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 238(1): 94–100.

DOI: 10.2460/javma.238.1.94.

Raizman E., Espejo L., Wells S. (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. *Vet Med Int* 2011: 341691.

DOI: 10.4061/2011/341691.

Raizman E., 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(10): 4929–4936.

DOI: 10.3168/jds.2009-2133.

Raizman E., Fetrow J., Wells S., Godden S., Oakes M., Vazquez G. (2007): The association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Prev Vet Med* 78(3-4): 179–195.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2006.10.006.

Raizman E., Wells S., Godden S., Bey R., Oakes M., Bentley D., Olsen K. (2004): The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci* 87(9): 2959–2966.

DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73427-X.

Rangel S., Paré J., Doré E., Arango J., Côté G., Buczinski S. et al. (2015): A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. *Can Vet J* 56(2): 169–177.

Rankin J. (1962): The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. IV. Adult cattle maintained in an infectious environment. *J Comp Pathol* 72: 113–117.

DOI: 10.1016/S0368-1742(62)80013-7.

Literaturverzeichnis

Reddacliff L., Eppleston J., Windsor P., Whittington R., Jones S. (2006): Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet Microbiol* 115(1-3): 77–90.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.12.021.

Roche S., Kelton D., Meehan M., Massow M. von, Jones-Bitton A. (2019): Exploring dairy producer and veterinarian perceptions of barriers and motivators to adopting on-farm management practices for Johne's disease control in Ontario, Canada. *J Dairy Sci* 102(5): 4476–4488.

DOI: 10.3168/jds.2018-15944.

Rowe M., Grant I. (2006): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Lett Appl Microbiol* 42(4): 305–311.

DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01873.x.

Sächsisches Staatsministerium für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt und Sächsische Tierseuchenkasse (2022): Paratuberkuloseprogramm vom 2. November 2022. SächsABl. 2023 S. 151.

(Online verfügbar unter: www.revosax.sachsen.de/vorschrift/19858-Paratuberkuloseprogramm, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Sánchez-Macías D., Moreno-Indias I., Castro N., Morales-Delanuez A., Argüello A. (2014): From goat colostrum to milk: physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *J Dairy Sci* 97(1): 10–16.

DOI: 10.3168/jds.2013-6811.

Sardaro R., Pieragostini E., Rubino G., Petazzi F. (2017): Impact of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on profit efficiency in semi-extensive dairy sheep and goat farms of Apulia, southern Italy. *Prev Vet Med* 136: 56–64.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.11.013.

Schrott J., Sodoma E., Dünser M., Tichy A., Khol J. (2023): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Sheep and Goats in Austria: Seroprevalence, Risk Factors and Detection from Boot Swab Samples. *Animals* 13(9): 1517.

DOI: 10.3390/ani13091517.

Sherman D. (2011): The spread of pathogens through trade in small ruminants and their products. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 30(1): 207–217.

DOI: 10.20506/rst.30.1.2036.

Literaturverzeichnis

Sieber P. (2014): Status-quo-Erhebung des Gesundheitszustandes bayerischer Milchziegenherden anhand epidemiologischer Untersuchungen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München: Tierärztliche Fakultät.

DOI: 10.5282/edoc.17473.

Singh S., Vihan V. (2004): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk. *Small Rumin Res* 54(3): 231–235.

DOI: 10.1016/j.smallrumres.2003.12.002.

Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I. (2008): Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Vet Med - Czech* 53(6): 283–306.

DOI: 10.17221/1859-VETMED.

Smith M., Sherman D., van Metre D. (2022): Goat medicine (3rd edition). Hoboken, USA; Wiley-Blackwell.

ISBN: 978-1-119-38273-7.

Sorge U., 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(2): 754–761.

DOI: 10.3168/jds.2010-3404.

Stabel J., Bradner L., Robbe-Austerman S., Beitz D. (2014): Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci* 97(10): 6296–6304.

DOI: 10.3168/jds.2014-8204.

Ständige Impfkommission Veterinärmedizin (2022): Leitlinie zur Impfung von Rindern und kleinen Wiederkäuern (2. Auflage).

(Online verfügbar unter: www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00044277/Impfleitlinie_Wiederkaeuer_2022-01-01_ba.pdf, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Statistisches Bundesamt (2021): Landwirtschaftszählung 2020. Betriebe mit Viehhaltung.

(Online verfügbar unter: www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Landwirtschaftszaehlung2020/Ergebnisse/Tabellen/betriebe-mit-viehhaltung.html, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Stau A., Seelig B., Walter D., Schroeder C., Ganter M. (2012): Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants in Germany. *Small Rumin Res* 105(1-3): 361–365.

DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.03.008.

Stehman S. (1996): Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2): 441–455.

DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30416-3.

Stewart D., Vaughan J., Stiles P., Noske P., Tizard M., Prowse S. et al. (2006): A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet Microbiol* 113(1-2): 13–24.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.09.015.

Stewart D., Vaughan J., Stiles P., Noske P., Tizard M., Prowse S. et al. (2007): A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Vet Microbiol* 122(1-2): 83–96.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.12.030.

Storset A., Hasvold H., Valheim M., Brun-Hansen H., Berntsen G., Whist S. et al. (2001): Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study. *Vet Immunol Immunopathol* 80(3-4): 271–287.

DOI: 10.1016/S0165-2427(01)00294-X.

Streeter R., Hoffsis G., Bech-Nielsen S., Shulaw W., Rings D. (1995): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res* 56(10): 1322–1324.

Sweeney R. (1996): Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2): 305–312.

DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30408-4.

Sweeney R., Whitlock R., Hamir A., Rosenberger A., Herr S. (1992a): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am J Vet Res* 53(8): 1312–1314.

Literaturverzeichnis

Sweeney R., Whitlock R., Rosenberger A. (1992b): *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol* 30(1): 166–171.

DOI: 10.1128/JCM.30.1.166-171.1992.

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

Twort F., Ingram G. (1912): A method for isolating and cultivating the *mycobacterium enteritidis chronicæ pseudotuberculosis bovis*, Jöhne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proc Royal Soc Lond Ser B* 84(575): 517–542.

DOI: 10.1098/rspb.1912.0011.

van Roermund H., Bakker D., Willemsen P., Jong M. de (2007): Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Vet Microbiol* 122(3-4): 270–279.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.01.016.

van Schaik G., Stehman S., Schukken Y., Rossiter C., Shin S. (2003): Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. *J Vet Diagn Invest* 15(3): 233–241.

DOI: 10.1177/104063870301500304.

Waddell L., Rajić A., Stärk K., McEwen S. (2015): The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol Infect* 143(15): 3135–3157.

DOI: 10.1017/S095026881500076X.

Waddell L., Rajić A., Stärk K., McEwen S. (2016): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Prev Vet Med* 132: 32–48.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.08.003.

Literaturverzeichnis

Whitlock R., Buergelt C. (1996): Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2): 345–356.

DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30410-2.

Whitlock R., Hutchinson L., Glickman L., Meinersmann R., Rossiter C., Bruce J. et al. (1986): Paratuberculosis (Johne's disease) update. *Bovine Pract*(21): 24–30.

DOI: 10.21423/bovine-vol0no21p24-30.

Whitlock R., Sweeney R., Fyock T. (2005): MAP Super-shedders: Another Factor in the Control of Johne's Disease. *AABP Proc*(38): 193–194.

DOI: 10.21423/aabppro20054857.

Whitlock R., Wells S., Sweeney R., van Tiem J. (2000): ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 77(3-4): 387–398.

DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00324-2.

Whittington R. (2020): Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr M., Stevenson K., Kapur V.: Paratuberculosis: organism, disease, control (2nd edition). Wallingford, USA; CABI. ISBN: 9781789243413: 266–304.

Whittington R., Donat K., Weber M., Kelton D., Nielsen S., Eisenberg S. et al. (2019): Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet Res* 15(1): 198.

DOI: 10.1186/s12917-019-1943-4.

Whittington R., Marsh I., Reddacliff L. (2005): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl Environ Microbiol* 71(9): 5304–5308.

DOI: 10.1128/AEM.71.9.5304-5308.2005.

Whittington R., Marsh I., Taylor P., Marshall D., Taragel C., Reddacliff L. (2003): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust Vet J* 81(9): 559–563.

DOI: 10.1111/j.1751-0813.2003.tb12887.x.

Literaturverzeichnis

Whittington R., Marshall D., Nicholls P., Marsh I., Reddacliff L. (2004): Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol* 70(5): 2989–3004.

DOI: 10.1128/aem.70.5.2989-3004.2004.

Whittington R., Reddacliff L., Marsh I., McAllister S., Saunders V. (2000): Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust Vet J* 78(1): 34–37.

DOI: 10.1111/j.1751-0813.2000.tb10355.x.

Whittington R., Sergeant E. (2001): Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust Vet J* 79(4): 267–278.

DOI: 10.1111/j.1751-0813.2001.tb11980.x.

Whittington R., Windsor P. (2009): In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J* 179(1): 60–69.

DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.08.023.

Wichert A., Kasbohm E., Einax E., Wehrend A., Donat K. (2022): Detection of Low MAP Shedder Prevalence in Large Free-Stall Dairy Herds by Repeated Testing of Environmental Samples and Pooled Milk Samples. *Animals* 12(11): 1343.

DOI: 10.3390/ani12111343.

Windsor P. (2015): Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol* 181(1-2): 161–169.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.019.

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

DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.01.007.

Windsor P., Whittington R. (2020): Ovine Paratuberculosis Control in Australia Revisited. *Animals* 10(9): 1623.

DOI: 10.3390/ani10091623.

Literaturverzeichnis

Wolf R., Barkema H., Buck J. de, Orsel K. (2015): Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results. *J Dairy Sci* 98(1): 275–287.

DOI: 10.3168/jds.2014-8676.

Wolf R., Barkema H., Buck J. de, Orsel K. (2016): 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(6): 4526–4536.

DOI: 10.3168/jds.2015-10478.

Wolf R., Donat K., Khol J., Barkema H., Kastelic J., Wagner P. (2017): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infected cattle herds using environmental samples: a review. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 130(1-2): 4–12.

World Organisation for Animal Health (2021): Paratuberculosis. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

(Online verfügbar unter: www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.16_PARATB.pdf, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Zurbrick B., Czuprynski C. (1987): Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 55(7): 1588–1593.

DOI: 10.1128/iai.55.7.1588-1593.1987.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung potentieller Infektketten für *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Ausscheidungswege des Erregers (blau), mögliche beteiligte Vektoren (orange). In Anlehnung an McAloon et al. (2015). 12

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Publikationen mit Peer-Review-Verfahren

Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H. (2022): Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. *Animals* 12(14): 1779.

DOI: 10.3390/ani12141779.

Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H. (2023): *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn—Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention. *Animals* 13(10): 1688.

DOI: 10.3390/ani13101688.

9.2 Publierte Abstracts

Pickrodt C., Köhler H., Donat K., Moog U. (2021): Verfahren zur Senkung der Paratuberkulose-Neuinfektionsrate in Milchziegenbetrieben durch Impfung (Projektvorstellung ParaVac).

Vortrag; Gemeinsame Arbeitstagung der Nationalen Referenzlabore Chlamydiose, Q-Fieber, Paratuberkulose und Tuberkulose der Rinder, 21.-22.04.2021 online, Seite 31

(Online verfügbar unter: www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00068399, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H. (2021): Analyse möglicher Infektionsquellen für *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milchziegenhaltungen.

Vortrag; Tagung der DVG-Fachgruppe Krankheiten kleiner Wiederkäuer, 25.-26.08.2021 online, Seite 7–12

(Online verfügbar unter: www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00073593, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Pickrodt C., Donat K., Köhler H. (2022): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples from a dairy goat farm in Germany.

Vortrag; 15th International Colloquium on Paratuberculosis, 12.-16.06.2022 Dublin (Irland), Seite 85

(Online verfügbar unter: www.paratuberculosis.com/publications/proceedings/ICP_Dublin15.pdf, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Pickrodt C., Donat K., Moog U., Köhler H. (2022): No evidence of transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the udder skin into the colostrum of dairy goats.

Poster; 15th International Colloquium on Paratuberculosis, 12.-16.06.2022 Dublin (Irland), Seite 111

(Online verfügbar unter: www.paratuberculosis.com/publications/proceedings/ICP_Dublin15.pdf, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Pickrodt C., Köhler H. (2022): Paratuberkulosedagnostik: mehr als nur Kot – Alternative Untersuchungsmaterialien in der epidemiologischen Bestandsdiagnostik.

Vortrag; Tagung der DVG-Fachgruppe AVID (Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik), 14.-16.09.2021 Kloster Banz, Seite 1

(Online verfügbar unter: www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00081730, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

Pickrodt C., Moog U., Donat K., Köhler H. (2023): Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Umgebungsproben aus einem Ziegenstall – was kann man daraus für eine zielgerichtete Probeentnahme lernen?.

Vortrag; Tagung der DVG-Fachgruppe Kleine Wiederkäuer & Neuweltkamele, 11.-13.10.2023 Gießen, Seite 12.

(Online verfügbar unter: www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/23-10-09-Gesamtdatei_Tagungsband_Kleine_Wiederkaeuer_2023.pdf, zuletzt geprüft am 26.10.2023).

10 Danksagung

Mit diesen Worten möchte ich mich bei all jenen bedanken, die einen unverzichtbaren Beitrag zur Entstehung dieser Dissertation geleistet haben und mir stets zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Heike Köhler, die mich während meiner drei Jahre am FLI begleitet und mit viel Herzblut betreut hat. Die vielen fachlichen wie auch persönlichen Gespräche, ihre stete Ermutigung und ihr immerwährender Optimismus waren für mich von unschätzbarem Wert. Ich hätte mir keine bessere Begleiterin bei allen gemeinsam besuchten Tagungen und auch den Bestandsbesuchen wünschen können.

Ebenso möchte ich Herrn apl. Prof. Dr. Karsten Donat für die Möglichkeit danken, diese Dissertation anfertigen zu können. Der fachliche Austausch und die Ideenfindung bei unseren, regelmäßig ausufernden, Projektbesprechungen sowie bei der Publikationserstellung waren stets hilfreich und willkommen.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Dr. Udo Moog bedanken, der mich in die Welt der Thüringer Wald Ziegen und in die Gemeinschaft der Kleinen-Wiederkäuer-Enthusiasten eingeführt hat. Ich hoffe, er ist stolz auf seine Youngstar-Doktorandin.

Sandy Werner danke ich für die gemeinsame Zeit und die große Unterstützung im NRL, für alles, was sie mir im Labor beigebracht hat und dafür, dass ich mich jederzeit an sie wenden konnte. Auch allen anderen Mykobakterien-Friends danke ich für die freundschaftliche Gemeinschaft und die tolle Zusammenarbeit.

Ohne Frank, Mira und die über 400 vierbeinigen ‚Mitarbeiterinnen‘ in unserem Projektbetrieb wären diese Untersuchungen nicht möglich gewesen. Vielen Dank für das Vertrauen, die Kooperation (auch wenn einige Damen manchmal etwas zickig waren) und den leckeren Käse, der immer ein begehrtes Mitbringsel war.

Zu guter Letzt – aber nicht minder wichtig – danke ich meinen Freunden, meinen Mitdoktoranden, meiner Familie und vor allem meiner Mutter. Ihre Unterstützung, ihr Zuspruch und ihre Geduld haben mich nie ans Aufgeben denken lassen.

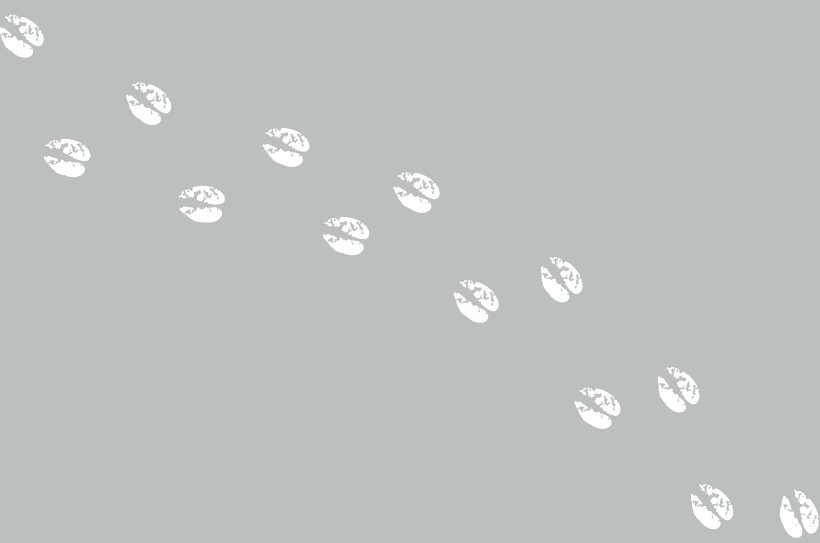
Diese Arbeit wäre nicht zu dem geworden, was sie ist, ohne die Hilfe und Unterstützung all dieser wunderbaren Menschen.

Und wenn mich noch einmal jemand fragt, wann ich denn fertig bin, kann ich nun endlich sagen: Jetzt.

11 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Chris Pickrodt



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 7189 9



Animal tracks cover: © Natural_Warp @ iStockPhoto.com
Photo goat: © nikidavison @ iStockPhoto.com