

Nachweis von  
*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*  
bei Rindern in unterschiedlichem Alter

---

**Adrian Pfeiffer**



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 Autor dieses Werkes.**

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

1. Auflage 2017

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

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der "Klinik für Wiederkäuer"  
und dem "Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde"

Betreuer: Prof. Dr. K. Doll und Prof. Dr. M. Bülte

**Nachweis von**  
***Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis***  
**bei Rindern in unterschiedlichem Alter**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Adrian Pfeiffer**

Tierarzt aus Siegen

Gießen 2017

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Doll
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Bülte

Tag der Disputation: 31.03.2017

Für Sandra

Einzelne Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits präsentiert in:

Doll, K., Pfeiffer, A., Bauerfeind, R., Bülte, M. (2014):

Verlauf der Paratuberkulose beim Einzeltier.

Vortragsband bpt-Kongress, Hannover, 106-110.

Pfeiffer, A., Bülte, M., Herbst, W., Bauerfeind, R., Menge, C., Doll, K. (2014):

Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus Matrices bovinen Ursprungs.

Sonderausgabe Amtstierärztlicher Dienst der 55. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 247.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 SCHRIFTTUM .....</b>	<b>3</b>
2.1 Definition und Geschichte der Paratuberkulose.....	3
2.2 Taxonomie und Eigenschaften von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	3
2.3 Epidemiologie der Paratuberkulose.....	5
2.4 Pathogenese der Paratuberkulose.....	7
2.5 Symptomatik und Verlauf der Paratuberkulose.....	7
2.6 Pathologische Veränderungen bei der Paratuberkulose.....	8
2.7 Wirtschaftliche Bedeutung der Paratuberkulose .....	9
2.8 Paratuberkulose und Morbus Crohn.....	9
2.9 Diagnostik der Paratuberkulose.....	10
2.9.1 Direkter Erregernachweis .....	11
2.9.1.1 Mikroskopischer Erregernachweis.....	11
2.9.1.2 Kultureller Erregernachweis.....	12
2.9.1.3 Molekularbiologischer Erregernachweis.....	14
2.9.2 Indirekter Erregernachweis.....	15
2.9.2.1 Johnin-Hauttest.....	16
2.9.2.2 Interferon- $\gamma$ -Test.....	16
2.9.2.3 Komplementbindungsreaktion (KBR).....	17
2.9.2.4 Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT).....	17
2.9.2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	17
2.9.2.6 Durchflusszytometrie-basierter Antikörpernachweis.....	18
2.10 Bekämpfung und Prophylaxe der Paratuberkulose.....	19
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
3.1 Arbeitskonzept.....	21
3.2 Verzeichnis der verwendeten Materialien.....	22
3.3.1 Probenentnahme in den einzelnen Betrieben.....	24
3.3.2 Aufbereitung und Archivierung der Serumproben.....	27
3.3.3 Portionierung und Archivierung der Kotproben.....	27
3.4.1 Dekontamination der Rinderkotproben zur kulturellen Anzuchtung von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	27

3.4.2 Anzuchtung von MAP aus den Rinderkotproben auf Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV.....	28
3.4.3 Identifizierung von verdächtigen Kolonien als <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> .....	30
3.5.1 Extraktionsverfahren für genomische MAP-DNS aus den Rinderkotproben.....	32
3.5.2 Aufbereitungskontrollen bei der DNS-Isolierung.....	34
3.5.3 Molekularbiologischer Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> mit Hilfe der Real-time-Polymerasekettenreaktion.....	34
3.5.4 Angaben zu den verwendeten Primern und Sonden.....	35
3.5.5 DNS-Amplifikationstechnik.....	36
3.5.6 PCR-Kontrollen.....	37
3.5.7 Auswertung der PCR-Ergebnisse.....	37
3.6 Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern mit Hilfe des Pourquier®-ELISA.....	38
3.7 Weitere Untersuchungen an zwei Kühen, welche im Kälberalter als MAP-positiv eingestuft worden waren.....	39
3.7.1 Entnahme von Organproben und Darminhalt am Schlachthof.....	40
3.7.2 Dekontamination und Homogenisation der Organproben bovinen Ursprungs zur kulturellen Antüchtung von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	41
3.7.3 Anzuchtung von MAP aus den Organproben von zwei Kühen auf Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV.....	42
3.7.4 Anzuchtung von MAP aus den Organproben von zwei Kühen in Mycobacteria Growth Indicator Tubes mit OADC, PANTA und Mycobactin J.....	42
3.7.5 Extraktionsverfahren für genomische MAP-DNS aus den MGIT-Flüssignährmedien.....	45
3.7.6 Extraktionsverfahren für genomische MAP-DNS aus Gewebe.....	46
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
4.1 Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung sowie der grobsinnlichen Kotbeurteilung.....	48
4.2 Ergebnisse der kulturellen Untersuchung auf MAP .....	51

4.3 Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion.....	53
4.4 Ergebnisse des Nachweises von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum mit Hilfe des Pourquoier <sup>®</sup> -ELISA.....	55
4.5.1 Ergebnisse der Anzuchtung von MAP aus den Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen auf Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV.....	56
4.5.2 Ergebnisse der Anzuchtung von MAP aus den Organproben von zwei geschlachteten Kühen in Mycobacteria Growth Indicator Tubes mit OADC, PANTA und Mycobactin J.....	57
4.5.3 Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion in Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen.....	58
3.5.4 Ergebnisse der serologischen Untersuchung mittels Pourquoier <sup>®</sup> - ELISA bei den zwei geschlachteten Kühen.....	59
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	59
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
5.1 Zur klinischen Allgemeinuntersuchung und der grobsinnlichen Kotbeurteilung.....	62
5.2 Zur kulturellen Untersuchung auf MAP.....	64
5.3 Zum molekularbiologischen Nachweis von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion.....	65
5.4 Zum Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum mit Hilfe des Pourquoier <sup>®</sup> -ELISA.....	67
5.5 Zur Anzuchtung von MAP aus den Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen auf Herrold's-Egg-Yolk- Schrägagar mit Mycobactin J und ANV.....	68
5.6 Zur Anzuchtung von MAP aus den Organproben von zwei geschlachteten Kühen in Mycobacteria Growth Indicator Tubes mit OADC, PANTA und Mycobactin J.....	69
5.7 Zum molekularbiologischen Nachweises von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion in Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen.....	70

5.8 Zur serologischen Untersuchung der zwei geschlachteten Kühe mittels Pourquier®-ELISA.....	71
5.9 Schlussfolgerungen.....	71
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>7 SUMMARY .....</b>	<b>76</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>9 ANHANG .....</b>	<b>100</b>
<b>10 DANKSAGUNG .....</b>	<b>102</b>
<b>11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>103</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ANV	Amphotericin B, Nalidixinsäure, Vancomycin
ATCC	American Type Culture Collection
AVID	Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BCS	Body Condition Score
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ct	Schwellenwert-Zyklus (engl.: threshold cycle)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere (lat.: et alii)
Fa.	Firma
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium
HPC	N-Hexadecylpyridiniumchlorid
Hrsg.	Herausgeber
IAK	interne Amplifikationskontrolle
KbE	Kolonie-bildende Einheit(en)
MAC	<i>Mycobacterium-avium</i> -Komplex
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
MC	Morbus Crohn
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MGB	minor groove binder
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter

μM	Mikromolar
NALC	N-Acetyl-L-Cystein
NCBI	National Center for Biotechnology
Nr.	Nummer
OADC	Ölsäure, (Rinder-)Albumin, Dextrose, Katalase (engl. catalase)
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannt
PANTA	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaktion)
Primer F	Vorwärtsprimer (engl.: forward primer)
Primer R	Rückwärtsprimer (engl.: reverse primer)
QS-Nr.	Nummer des jeweiligen Probanden aus der früheren Querschnittstudie
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rotations per minute)
s	Sekunde(n)
s. o.	siehe oben
S/P	Verhältnis des OD <sub>450</sub> -Nettowerts einer Probe (S) zum OD <sub>450</sub> -Mittelwert der Positivkontrollen (P) (-> Titer beim Pourquier®-ELISA)
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
u. a.	unter anderem
UNG	Uracil-N-glycosylase
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
®	geschütztes Warenzeichen
TM	geschütztes Warenzeichen (engl.: trademark)

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Tiere aus der ehemaligen Querschnittstudie und deren Verfügbarkeit für die beiden Nachbeprobungen im Rahmen dieser Arbeit.....	26
Tab. 2:	Angaben über die Primer des MAP-Markers F57 und die entsprechende Sonde.....	35
Tab. 3:	Angaben über die Primer des MAP-Markes ISMav2 und die entsprechende Sonde.....	35
Tab. 4:	Pipettierprotokoll für die Triplex Real-time-PCR (50 µl-Ansatz).....	36
Tab. 5:	Konfigurationen des Real-Time-Cyclers ABI PRISM 7000.....	36
Tab. 6:	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung bei der 1. Nachbeprobung.....	51
Tab. 7:	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung bei der 2. Nachbeprobung.....	52
Tab. 8:	Ergebnisse des molekularbiologischen MAP-Nachweises mittels Triplex Real-time-PCR bei der 1. Nachbeprobung.....	53
Tab. 9:	Ergebnisse des molekularbiologischen MAP-Nachweises mittels Triplex Real-time-PCR bei der 2. Nachbeprobung.....	54
Tab. 10:	Ergebnisse des Nachweises von MAP-spezifischen Antikörpern mit Hilfe des Pourquier®-ELISA.....	55
Tab. 11:	Ergebnisse der kulturellen Anzucht auf HEYM von Kot-, Darminhalt- und Organproben der beiden geschlachteten Kühe.....	56
Tab. 12:	Ergebnisse der kulturellen Anzucht in MGIT's von Organproben der beiden geschlachteten Kühe.....	57
Tab. 13:	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen mittels Triplex Real-time-PCR bei zwei geschlachteten Kühen.....	58
Tab. 14:	Übersicht über die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen bei den noch zur Verfügung stehenden Probanden.....	61
Tab. 15:	Ergebnisse der allgemeinen klinischen Untersuchung der Kühe bei der 1. Nachbeprobung sowie der grobsinnlichen Kotuntersuchung.....	100
Tab. 16:	Ergebnisse der allgemeinen klinischen Untersuchung der Kühe bei der 2. Nachbeprobung sowie der grobsinnlichen Kotuntersuchung.....	101

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Zwei MAP-Einzelkolonien nach 3 Wochen Bebrütung bei 37 °C auf HEYM mit Mycobactin J und ANV.....	30
Abb. 2:	MAP-Kolonien nach 12 Wochen Bebrütung bei 37 °C auf HEYM mit Mycobactin J und ANV.....	31
Abb. 3:	Rasenwachstum einer MAP-Kolonie nach 6 Wochen Bebrütung bei 37 °C auf HEYM mit Mycobactin J und ANV.....	31
Abb. 4:	Entnahme eines Jejunallymphknoten mit einer sterilen Einmalpinzette und einem sterilen Einmalskalpell.....	40
Abb. 5.	Vergleich der Positivkontrolle (links) und der Negativkontrolle (rechts) der Mycobacteria Growth Indicator Tubes unter der UV-Lampe bei 365 nm .....	44

# 1 EINLEITUNG

Bei der Paratuberkulose (Johnesche Krankheit) der Wiederkäuer handelt es sich um eine chronische Darmentzündung mit langer Inkubationszeit. Der Erreger, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), ist auch in deutschen Rinderbeständen weit verbreitet. Die Angaben zur Herdenprävalenz bewegen sich – regional unterschiedlich - zwischen 20 % und 90 % (Luyven et al., 2002; Hacker et al., 2004; Donat et al., 2011; Kube, 2014). Schon seit etwa 60 Jahren ist aufgrund der Ergebnisse experimenteller Infektionen bekannt, dass junge Kälber sehr empfänglich für MAP-Infektionen sind (Doyle, 1953; Taylor, 1953). Insbesondere am ersten Lebenstag sollen Kälber hochgradig gefährdet sein. Das Risiko der Infektion ist besonders hoch, wenn diese in einer stark kontaminierten Umgebung geboren werden oder die Mutter selbst infiziert ist (Windsor u. Whittington, 2010). Diesen beiden Autoren zufolge gäbe es nach gegenwärtigem Kenntnisstand zwar keine absolute Altersresistenz, doch vermindere sich mit zunehmendem Alter die Wahrscheinlichkeit erheblich, dass eine solche Erstinfektion im weiteren Verlauf zur Krankheit führt.

Aus diesem Grunde konzentrieren sich die Empfehlungen hinsichtlich der Paratuberkulose-Bekämpfung vor allem darauf, die Erregerexposition und -aufnahme im Kälberalter durch geeignete Hygienemaßnahmen zu verhindern (BMEL, 2014). Allerdings geben Whittington und Windsor (2009) an, dass Literaturangaben zufolge durchschnittlich 9 % der Kälber von subklinisch MAP-infizierten Kühen und im Mittel sogar 39 % der Feten von klinisch Paratuberkulose-kranken Kühen ohnehin bereits intrauterin infiziert seien.

Die meisten Autoren, u. a. Clarke (1997), gehen davon aus, dass MAP in infizierten Rindern in der Regel lebenslang persistiert. Die sehr lange Inkubationszeit der Johneschen Krankheit bringt es mit sich, dass viele Tiere bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome aus anderen Gründen aus dem Bestand abgehen. Die klinisch auffälligen Tiere stellen also nur die "Spitze des Eisbergs" dar. Fecteau und Whitlock (2010) gehen davon aus, dass in betroffenen Herden auf jedes Rind im fortgeschrittenen Krankheitsstadium weitere 6 bis 8 subklinisch infizierte erwachsene Tiere kommen sowie 15 bis 25 infizierte Kälber und Jungrinder.

Aufgrund der unzureichenden, stark altersabhängigen diagnostischen Validität der bislang zur Verfügung stehenden Testverfahren sind diese Angaben allerdings bis zu einem gewissen Grade spekulativ. Insbesondere ist über die tatsächliche Infektionsrate bei

natürlich exponierten Kälbern wenig bekannt, und ähnliches gilt hinsichtlich des weiteren Verlaufs dieser Infektion im einzelnen Wirt.

Im Hinblick auf die Bekämpfung der Paratuberkulose wäre eine möglichst frühzeitige Erkennung infizierter Tiere wünschenswert, da infizierte Tiere den Erreger bereits im subklinischen Krankheitsstadium ausscheiden können. Dies war Gegenstand eines im Dezember 2010 abgeschlossenen Forschungsprojektes über „Frühdiagnostik von Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) bei Rindern“ (BLE-Förderkennzeichen 28-1-32.006-06). Hierbei wurden u. a. in den Jahren 2009-2010 bei 47 weiblichen Kälbern der Rasse Deutsche Holsteins im Alter von  $100 \pm 10$  Lebenstagen laparoskopisch entnommene Biopsate der Ileozäkal- und Jejunallymphknoten mittels Tripelx Real-Time PCR (Schönenbrücher et. al, 2008) und kulturell (Herrold's Egg Yolk Medium) auf MAP untersucht. Der Nachweis von MAP-Antikörpern im Serum dieser Tiere erfolgte mittels Pourquier<sup>®</sup>-ELISA. Die beprobten Kälber stammten aus Paratuberkulose-positiven (n = 32) und aus Paratuberkulose-unverdächtigen (n = 15) Milchviehbeständen.

Ziel der Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation war die Überprüfung des MAP-Status der aus dieser früheren Studie noch zur Verfügung stehenden 27 Rinder mittels der oben genannten Methoden. Zusätzlich konnten bei zwei Kühen, bei denen im Kälberalter MAP mittels Real-Time PCR und kulturell in Jejunallymphknoten nachgewiesen worden war (eines der Tiere auch seropositiv), anlässlich der Schlachtung im Alter von jeweils 50 Monaten verschiedene Organproben entnommen und molekularbiologisch sowie kulturell auf MAP untersucht werden.

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 Definition und Geschichte der Paratuberkulose

Bei der Paratuberkulose handelt es sich um eine durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* hervorgerufene Infektionskrankheit mit langer Inkubationszeit, welche sich vorwiegend im Dünndarm in Form einer spezifischen Enteritis manifestiert. Nach chronischem klinischen Verlauf, der durch Abmagerung und Durchfall gekennzeichnet ist, endet sie stets tödlich (Klee, 2002).

Die Paratuberkulose wurde erstmals 1895 von Johne und Frothingham als eine besondere Form der Darmtuberkulose beschrieben. Diese Autoren entdeckten den Zusammenhang zwischen einer chronischen granulomatösen Enteritis beim Rind und der Anwesenheit von säurefesten Mikroorganismen in Darmgewebeproben. Nach Ihrem Entdecker wird die Paratuberkulose deshalb auch als „JOHNEsche Krankheit“ bezeichnet. 1906 erkannte Bang, dass es sich bei der Paratuberkulose um eine eigenständige Krankheit handelt, welche er „pseudotuberkulöse Enteritis“ nannte und die von der Darmform der Tuberkulose abzugrenzen ist. Erste Kultivierungsversuche von Albien (1910) scheiterten. Erst Twort und Ingram (1912) gelang es schließlich, den Erreger zu isolieren und anzuzüchten. Sie bezeichneten diesen als *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*. Nach mehrfachen Umbenennungen wurde *Mycobacterium paratuberculosis* lange Zeit als eigene Spezies angesehen, bis dieses Bakterium schließlich aufgrund des hohen genetischen Verwandtschaftsgrades mit der Spezies *Mycobacterium avium* dieser als Subspezies zugeordnet wurde, sodass es heute als *Mycobacterium avium* subspezies *paratuberculosis* bezeichnet wird (Thorel et al., 1990).

### 2.2 Taxonomie und Eigenschaften von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

MAP ist ein schwach grampositives, säure- und alkoholfestes, unbewegliches, nicht sporenbildendes, obligat aerobes und 0,5 bis 1,5 µm langes Stäbchenbakterium, welches zu den fakultativ intrazellulären Erregern zählt (Manning u. Collins, 2001).

*Mycobacterium* (*M.*) *avium* ssp. *paratuberculosis* gehört in die Abteilung der *Actinobacteria*, zur Ordnung der *Actinomycetales*, zur Unterordnung der *Corynebacterinae*

und zur Familie der *Mycobacteriaceae* (NCBI Taxonomy Browser, 2016). Die Spezies *M. avium* umfasst die vier Subspezies *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. avium* ssp. *silvaticum* und *M. avium* ssp. *hominisuis* (Thorel et al., 1990; Mijs et al., 2002; Turenne et al., 2008). *M. avium* wird zusammen mit *M. intracellulare* und den neuen Spezies *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. columbiense* und *M. vulneris* zum *Mycobacterium avium*-Komplex (MAC) zusammengefasst (Saito et al., 1989; Turenne et al., 2006; Turenne u. Alexander, 2010).

Man unterscheidet schnell und langsam wachsende Arten innerhalb der Gattung *Mycobacterium*. Bedeutende Krankheitserreger, wie *M. leprae*, *M. bovis*, *M. tuberculosis* und *M. avium*, gehören zu den langsam wachsenden Spezies, wobei MAP das langsamste Wachstum aller kultivierbaren Mycobakterien zeigt, während die schnell wachsenden Arten von apathogenen Umweltkeimen repräsentiert werden (Wayne u. Kubica, 1986; Rogall et al., 1990; Stahl u. Urbance, 1990; Whittington, 2010).

Man kann MAP-Isolate anhand von morphologischen Merkmalen und mit Hilfe von molekularbiologischen Typisierungsverfahren derzeit drei Gruppen zuordnen. Dies ist der Typ I (Schaf-Typ), Typ II (Rinder-Typ) und der Typ III (Intermediär-Typ) (Collins et al., 1990; Pavlik et al., 1999; de Juan et al., 2005). Manche Autoren ordnen den Typ III jedoch dem Schaf-Typ zu (Stevenson, 2010). Der Schaf- und der Rinder-Typ haben zwar eine Präferenz für den jeweiligen Wirt, können aber auch andere Tierarten infizieren.

Die Generationszeit von MAP ist sehr lang und beträgt 1,3 bis 4,4 Tage, unter optimalen Wachstumsbedingungen ca. 20 Stunden (Lambrecht et al., 1988).

MAP lagert sich meist nesterartig zusammen, was durch interzelluläre Filamente bedingt ist (Merkal et al., 1968). Eine weitere wichtige Eigenschaft von MAP ist die Abhängigkeit von Mycobactin J bei der kulturellen Anzucht, da es nicht in der Lage ist, diesen zellwandassoziierten Eisenchelatabbildner selbst zu synthetisieren (Merkal u. McCullough, 1982). Um ein optimales Wachstum des Erregers zu gewährleisten, empfehlen Lambrecht und Collins (1992) den Zusatz von 1 µg Mycobactin J pro Milliliter Nährmedium. *In vivo* wird dem Bakterium ein Mycobactin-unabhängiges Wachstum durch den niedrigen pH-Wert in den Phagolysosomen und seine Fähigkeit zur Produktion von Exocholinen (niedermolekulare Eisenchelatabbildner) ermöglicht (Barclay u. Ratledge, 1983; Lambrecht u. Collins, 1993).

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist seine große Hitzeresistenz, welche höher ist als die anderer Mycobakterien (Schulze-Robbecke u. Buchholz, 1992). Der Erreger ist offensichtlich sogar in der Lage, den Pasteurisierungsprozess von kommerziell

vermarkteter Milch zu überleben (Grant et al., 2002; Ellingson et al., 2005).

Auch vielen Desinfektionsmitteln gegenüber ist MAP resistent. So kann MAP beispielsweise auch in gechlortem Trinkwasser überleben (Whan et al., 2001). Phenol- und Formaldehyd-haltige Desinfektionsmittel führen jedoch zu einer Inaktivierung des Erregers (Chiodini et al., 1984).

Auch in der Umwelt zeichnet sich MAP durch seine hohe Tenazität aus, welche in seiner spezifischen Zellwandstruktur begründet ist. So ist der Erreger beispielsweise in der Lage, mehrere Monate in stehenden als auch in fließenden Gewässern zu überleben. In Rinderkot kann MAP etwa neun Monate lang überdauern. In Gülle reduziert sich die Überlebenszeit auf weniger als einen Monat (Lovell et al., 1944; Larsen et al., 1956). In reinem Rinderurin wird diese mit sieben Tagen angegeben (Vishnevskii et al., 1940). Auf kontaminierten Weiden ist MAP in der Lage, bis zu 11 Monate zu überleben (Gay u. Sherman, 1992). Direkte UV-Strahlung führt jedoch nach zwei bis vier Tagen zum Absterben des Erregers (Larsen et al., 1956).

MAP zeichnet sich auch durch eine hohe Kältetoleranz aus. Der Erreger überlebt sowohl ein Einfrieren bei -18 °C als auch bei -70 °C um durchschnittlich 18 Monate (Raizman et al., 2011).

Das Genom des MAP K10-Stammes wurde vollständig sequenziert und umfasst 4.829.781 Basenpaare (Li et al., 2005). Als charakteristisch für MAP gilt das Insertionselement *IS900*, welches auch zum molekularbiologischen Nachweis des Erregers eingesetzt werden kann (Green et al., 1989; Collins et al., 1989; Vary et al., 1990). Falsch-positive Ergebnisse bei der molekularbiologischen Diagnostik sind jedoch möglich, da *IS900*-ähnliche Sequenzen auch bei anderen Mycobakterien-Spezies vorkommen können (Cousins et al., 1999; Englund et al., 2002). Als alternative Gensequenzen eignen sich beispielsweise die Sequenz *f57* (Poupart et al., 1993) oder die Insertionssequenz *ISMav2* (Strommenger et al., 2001).

### **2.3 Epidemiologie der Paratuberkulose**

Paratuberkulose ist vor allem eine Erkrankung der Wiederkäuer. Neben den Hauswiederkäuern Rind, Schaf und Ziege können sich auch Wild- und Zoowiederkäuer mit MAP infizieren und klinische Symptome entwickeln (Chiodini et al., 1984; Weber et al., 1992; Deutz et al., 2005). Aber auch bei zahlreichen monogastrischen Tieren gelang die

Isolierung von MAP. Diese Tiere entwickeln in aller Regel jedoch keine klinischen Symptome (Chiodini et al., 1984). Graig et al. (1997) gelang beispielsweise der Nachweis des Erregers aus Kot und Organgewebe von Wildkaninchen, wobei einige der untersuchten Tiere in der Sektion pathomorphologische Veränderungen ähnlich denen der Paratuberkulose aufwiesen. Es ist möglich, dass MAP-infizierte Monogastrier ein gewisses Erregerreservoir darstellen (Shaughnessy et al., 2013).

Die Paratuberkulose ist weltweit verbreitet. Aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit verschiedener Studien (unterschiedliche Tests mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität) ist eine genaue Angabe von Prävalenzen schwierig (Nielsen u. Toft, 2009).

MAP wird hauptsächlich mit dem Kot infizierter Tiere ausgeschieden. Dabei können diese bereits im subklinischen Erkrankungsstadium den Erreger ausscheiden und so die Umgebung kontaminieren. Klinisch erkrankte Tiere können  $10^8$  KBE/g Kot bzw.  $5 \times 10^{12}$  Keime am Tag ausscheiden (Chiodini et al. 1984). Ein Problem der direkten Diagnostik besteht darin, dass MAP bei Tieren im subklinischen Erkrankungsstadium intermittierend ausgeschieden wird (Chiodini et al., 1984). In einer Studie von Antognoli et al. (2007) konnte eine MAP-Ausscheidung bereits bei ca. 3 % der unter acht Monate alten Jungrinder nachgewiesen werden, deren Mütter kurz vor der Kalbung mittels serologischer Methoden als MAP-positiv eingestuft worden waren. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer möglichst frühzeitigen Paratuberkulosedagnostik.

Auch über Kolostrum und Milch von MAP-infizierten Tieren kann der Erreger ausgeschieden werden (Sweeney et al, 1992; Streeter et al., 1995; Giese u. Ahrens, 2000).

Beschrieben ist auch die MAP-Ausscheidung mit dem Sperma infizierter Bullen (Larsen et al., 1981; Ayele et al., 2004). Ob dies jedoch für eine Übertragung der Infektion relevant ist, konnte bislang nicht geklärt werden.

Als wichtigster Übertragungsweg gilt die orale Aufnahme von MAP über kotverschmutzte Zitzen und erregerhaltiges Kolostrum (Chiodini et al., 1984; Gay u. Sherman, 1992; Sweeney, 1996). Neonaten und junge Kälber sind besonders empfänglich (Larsen et al., 1975). Ein nicht geringer Anteil der Feten von MAP-positiven Muttertieren infiziert sich bereits intrauterin (Whittington u. Windsor, 2009).

Als Mindestinfektionsdosis werden von Gerlach (2002)  $10^4$  Erreger pro Kalb angegeben.

Die Einschleppung des Erregers in eine bislang MAP-freie Herde erfolgt in der Regel über den Zukauf eines klinisch inapparent infizierten Tieres, jedoch sei auch eine indirekte Übertragung durch mit MAP kontaminierte Kleidung (z. B. Tierärzte) oder kotverschmutzte Gerätschaften möglich (Sweeney, 1996).

## **2.4 Pathogenese der Paratuberkulose**

Nach der oralen Aufnahme wird MAP über die M-Zellen im Epithel von Jejunum und Ileum aufgenommen, und zwar überwiegend im Bereich der Peyer'schen Platten (Chiodini et al., 1984; Momontani et al., 1988). Nach Freisetzung des Bakteriums aus den M-Zellen wird es von Makrophagen aufgenommen. Mit diesen gelangt es zu den Mesenteriallymphknoten und wird über den Ductus thoracicus und den Blutkreislauf im Körper verteilt (Chiodini, 1996; Lugton, 1999). In der Literatur wird dies als klinisch inapparente Frühgeneralisation bezeichnet, verbunden mit einer vorübergehenden humoralen Reaktion (Klee, 2002). Nach der "Frühgeneralisation" entspricht der Verlauf in etwa dem einer chronischen Organtuberkulose mit Hauptmanifestation im distalen Jejunum und Ileum. Da MAP lange Zeit in der Lage ist, die Abwehrmechanismen der Makrophagen zu überleben, kommt es zu keiner ausgeprägten humoralen Immunreaktion. Es überwiegt die zellvermittelte Immunantwort. Unterliegt der Organismus im Kampf gegen den Erreger, wird MAP in steigender Zahl einerseits in das Darmlumen, andererseits in den Blutkreislauf abgegeben. Ersteres ist zunächst mit intermittierender, später dauerhafter und zunehmender Keimausscheidung verbunden. Letzteres entspricht einer Spätgeneralisation mit erneuter humoraler Reaktion, welche jedoch in der terminalen Phase wiederum abklingen kann, was man als Anergie bezeichnet (Klee, 2002).

Durch die über viele Jahre andauernde Vermehrung der infizierten Makrophagen und der darin vorhandenen Mykobakterien kommt es zu einer starken Infiltration und Verdickung insbesondere der kaudalen Dünndarmschleimhaut mit Folge einer Malabsorption (Gruber, 2007).

## **2.5 Symptomatik und Verlauf der Paratuberkulose**

Die Paratuberkulose macht sich klinisch meist erst nach einer mehrjährigen Inkubationszeit bemerkbar. Durchschnittlich beträgt diese fünf Jahre (Koenig et al., 1993; Jubb et al., 2004). Nach Whitlock und Bürgelt (1996) kann man vier Phasen der Erkrankung unterscheiden: Die stille Phase der Erkrankung, die subklinische Phase und die klinische Phase, welche in die fortgeschrittene klinische Phase (Endstadium) mit unstillbaren Durchfällen übergeht. In der subklinischen Erkrankungsphase mit intermittierender Erregerausscheidung können verminderte Milchleistung sowie verminderte

Gewichtszunahmen auffallen. Die klinische Phase der Erkrankung beginnt meist im Anschluss an eine Kalbung, also einer Phase erhöhter Stressbelastung, selten jedoch bei Rindern, welche noch nicht gekalbt haben. Die wesentlichen Symptome sind zunächst intermittierender und später dauerhafter Durchfall, Abmagerung (Kachexie) bei noch lange erhaltenem Appetit und starker Rückgang der Milchleistung. Die Körpertemperatur ist normal. Der Kot werde meist im Strahl abgesetzt und sei wässrig bis suppig, gelegentlich durchsetzt mit kleinen Bläschen. Das Haarkleid der erkrankten Tiere werde zunehmend struppig und es treten Ödeme auf, v. a. im Kehlgang. Ebenso komme es zu einer fortschreitenden Dehydratation. Die Tiere verenden in der Regel nach einigen Wochen bis Monaten (Klee, 2002; Sorge, 2013). Spontane Heilungen sind in der Literatur beschrieben (Buergelt et al., 2004), dürften jedoch die absolute Ausnahme darstellen.

## **2.6 Pathologische Veränderungen bei der Paratuberkulose**

Die Kachexie und die Verdickung der Dünndarmwand (granulomatöse Enteritis), v. a. im Bereich des Ileums, sind die makroskopisch auffälligsten Veränderungen bei der Paratuberkulose. Die Verdickung betrifft nur die Schleimhaut und nicht die Darmmuskulatur. Die Verdickung führt zu einem hirnwindungsähnlichen Erscheinungsbild der Darmschleimhaut. Die Mesenteriallymphknoten sind meist geschwollen. Gelegentlich sind auch granulomatöse Veränderungen feststellbar, z. B. in der Leber. Diese sind Folge einer systemischen Erregerstreuung (Gruber, 2007; Weiss, 2007). Häufig finden sich bei Rindern mit Paratuberkulose auch multifokale Mineralisierungen der Aorta. Als Ursache wird vermutet, dass von den zahlreichen aktivierten Makrophagen im Gastrointestinaltrakt synthetisierte Vitamin-D-Metaboliten zu einer Hyperkalzämie führen (Klopfleisch u. Gruber, 2015).

Es besteht offensichtlich keine Korrelation zwischen dem Umfang der histologischen Darmwandveränderungen und dem Ausprägungsgrad der klinischen Symptome (Brady et al., 2008).

## **2.7 Wirtschaftliche Bedeutung der Paratuberkulose**

Die wirtschaftlichen Verluste ergeben sich aus einer verminderten Milchproduktion, welche auch bereits im subklinischen Stadium nachgewiesen wurde, verminderter Fruchtbarkeit, vorzeitigem Abgang aus der Herde, erhöhter Anfälligkeit für andere Krankheiten (z. B. Mastitis), verminderter Gewichtszunahme bei Fleischrinderkälbern von MAP-positiven Muttertieren und aus einem geringeren Schlachtgewicht (Benedictus et al., 1987; Johnson-Ifearulundu et al., 2000; Tiwari et al., 2005; Elzo et al., 2006; Hasonova u. Pavlik, 2006; Kudahl u. Nielsen, 2009).

Ott et al. (1999) berechneten den jährlichen Verlust in MAP-infizierten Milchviehherden der USA, verglichen mit nicht infizierten Herden, auf jährlich 200-250 Mio. US\$. Bezogen auf eine einzelne MAP-infizierte Milchkuh bedeutet dies 20 bis 27 US\$. In den Niederlanden wird der jährliche Verlust pro Milchkuh in einer MAP-infizierten Herde von Groenendal et al. (2002) mit 19 € angegeben. Die selbe Studie gibt den jährlichen Verlust in Pennsylvania (USA) mit 35 US\$ an. In einer Studie aus Thüringen wurde bei einer MAP-Intraherdenprävalenz von über 10 % ein Rückgang der Milchleistung um durchschnittlich 1,9 kg und bei 5 bis 10 % um 1,7 kg errechnet, bei jedoch erheblichen Unterschieden zwischen den einzelnen Betrieben. Eine Prävalenz unter 5 % hatte keine signifikante Auswirkung auf die Milchleistung (Donat, 2014).

Bei Fleischrindern sind die Verluste offenbar geringer. Groenendal et al. (2003) geben den Verlust in MAP-infizierten niederländischen Fleischrinderherden mit 16 bis 21 € pro Tier und Jahr an.

## **2.8 Paratuberkulose und Morbus Crohn**

Morbus Crohn (MC) ist eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung des Menschen. Aufgrund gewisser pathomorphologischer Ähnlichkeiten mit der Paratuberkulose wurde eine Beteiligung von MAP am Krankheitsgeschehen bei Morbus Crohn bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts diskutiert. Auch die Symptome ähneln sich: So sind häufige Symptome bei MC chronischer Durchfall, Bauchschmerzen, Fieber sowie Gewichtsverlust (Reinshagen, 2009).

Der erste Nachweis von MAP aus dem Darmgewebe von MC-Patienten wurde von Chiodini et al. (1984) publiziert. Naser et al. (2004) konnten MAP aus dem Blut von MC-

Patienten nachweisen. Füllgrabe (2008) folgert aus den Ergebnissen ihrer Fall-Kontroll-Studie, dass MAP nicht immer und nicht ausschließlich bei MC-Patienten vorkommt, da MAP auch bei den Kontrollprobanden häufig nachgewiesen wurde. Siew et al. (2013) kommen zu dem Schluss, dass es sich bei MC um ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen handelt, dessen Entstehung von verschiedenen Risikofaktoren abhängt, wie genetische Veranlagung, Verwestlichung des Lebensstils, Ernährungsgewohnheiten, antibiotische Behandlungen, Veränderungen in der Ausbildung des intestinalen Mikrobioms, gute Hygiene, Rauchen, Entfernung des Blinddarm-Wurmfortsatzes, geringe Sonnenbestrahlung und zunehmende Entfernung vom Äquator. Eine Metaanalyse ergab keine gesicherten Hinweise hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen MAP und Morbus Crohn. Die Ergebnisse der Hälfte der eingeschlossenen Studien schienen diese These zu bestätigen, während dies in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden konnte (Waddel et al., 2008). Unklar bleibt vor allem, welche Faktoren bei einem urbanen Lebensstil ein erhöhtes Risiko bedingen, an MC zu erkranken. So konnte in einer in Deutschland durchgeführten Fall-Kontroll-Studie gezeigt werden, dass das Risiko an MC zu erkranken bei Personen mit Kontakt zur Landwirtschaft im Kindesalter geringer ist als bei Kontrollpersonen (Radon et al., 2007). Sollte ein Zusammenhang zwischen MAP und MC bestehen, so wäre wohl eher das Gegenteil anzunehmen. Insbesondere müsste für Landwirte oder Tierärzte ein höheres Risiko bestehen. Solches wurde bisher jedoch in keiner Studie nachgewiesen.

## **2.9 Diagnostik der Paratuberkulose**

Es steht eine große Anzahl verschiedener Testmethoden für den direkten oder indirekten Nachweis von MAP zur Verfügung. Die Sensitivität und Spezifität der bislang zur Verfügung stehenden Diagnostika ist jedoch stark vom Alter sowie dem Krankheitsstadium der getesteten Tiere abhängig. Dadurch wird der Nachweis von MAP zu einer großen Herausforderung. So ist ein Nachweis in der inapparenten Phase der Erkrankung sehr schwierig, über das subklinische, klinische und fortgeschrittene klinische Stadium (vgl. 2.5) nimmt die Wahrscheinlichkeit des Erregernachweises immer mehr zu (Gilardoni et al., 2012).

Da MAP eine hohe Tenazität besitzt (vgl. 2.2), wäre eine möglichst frühzeitige Identifikation infizierter Tiere wünschenswert, bevor diese den Erreger ausscheiden und so

die Umgebung kontaminieren. Im Hinblick auf die Schaffung MAP-freier Bestände böte dies einen entscheidenden Vorteil. Denn besonders während der subklinischen Erkrankungsphase, in der die infizierten, aber klinisch unauffälligen Tiere den Erreger mit dem Kot ausscheiden, erfolgt häufig eine unbemerkte Verbeitung und Anreicherung des Erregers in der Umgebung der Tiere (Köhler et al., 2003).

### **2.9.1 Direkter Erregernachweis**

Der direkte Nachweis von MAP kann mittels mikroskopischer Untersuchung, kultureller Anzucht oder mit molekularbiologischen Methoden erbracht werden (Gilardoni et al., 2012).

#### **2.9.1.1 Mikroskopischer Erregernachweis**

Der mikroskopische Erregernachweis kann aus Kotproben und Abklatschpräparaten von Darmschleimhaut oder Darmlymphknoten erfolgen (Homuth, 2002). MAP stellen sich im Lichtmikroskop, typischerweise in Nestern liegend, als schlanke Stäbchen dar (Ris et al., 1988). Mykobakterien lassen sich auf Grund ihrer Säure- und Alkoholfestigkeit mittels Ziehl-Neelsen-Färbung rot anfärben. Man kann Mykobakterien auch mit Fluoreszenzfarbstoffen anfärben, wie Auramin O oder Acridinorange (Cocito et al., 1994; Smithwick et al., 1995).

Der lichtmikroskopische Nachweis ist einfach, schnell und kostengünstig durchzuführen und wird häufig bei klinischen Verdachtsfällen benutzt (Gilardoni et al., 2012). Er ist jedoch nicht zur Identifizierung subklinisch infizierter Tiere geeignet (Merkal et al., 1968). Außerdem ist eine Differenzierung zwischen MAP und anderen Mykobakterienspezies damit nicht möglich (Merkal, 1973).

Jørgensen (1983) errechnete für die lichtmikroskopische Untersuchung von Kotausstrichen, bezogen auf die kulturelle Untersuchung als Goldstandard, eine Sensitivität von 46 % und eine Spezifität von 94 %. In Untersuchungen von Hietala (1992) gelang damit der MAP-Nachweis nur bei 25-30 % der kulturell positiven Kotproben und bei 60 % der kulturell positiven Lymphknoten.

### 2.9.1.2 Kultureller Erregernachweis

Der Nachweis von MAP mittels kultureller Anzucht gilt nach wie vor als Goldstandard in der MAP-Diagnostik (Whittington, 2010; Gilardoni et al., 2012). Betrachtet man jedoch die pathologische Untersuchung als Referenzmethode, so liegt die Sensitivität für den kulturellen MAP-Nachweis aus Kotproben bei ungefähr 60 %. Die Spezifität wird mit 100 % angegeben (Collins, 1996; Collins et al., 2006). Im subklinischen Stadium liegt die Sensitivität aufgrund der intermittierenden Erregerausscheidung und unterschiedlichen Kultivierungsmethoden verschiedenen Literaturangaben zufolge lediglich bei 23 bis 49 % (Whitlock et al., 2000; Nielsen u. Toft, 2008). Für eine erfolgreiche Erregeranzucht wird von Merkal (1973) ein Mindestgehalt von 50-100 MAP-Zellen / g Kot angegeben. In der Literatur wird auch über die Möglichkeit falsch-positiver Kotkulturergebnisse diskutiert, welche durch "passagere" Erreger hervorgerufen werden sollen. Betroffen davon sollen Tiere sein, welche nicht mit MAP infiziert sind, sondern den Erreger lediglich oral aufgenommen haben und ihn wieder ausscheiden, ohne dass eine Haftung im Darm stattgefunden hat. Dieses Phänomen könnte bei Tieren mit sehr geringen Ausscheidungsraten in Herden mit hoher Paratuberkuloseprävalenz vorliegen (Sweeney et al., 1992; Fecteau et al., 2010). Es erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, dass genügend Erreger den kompletten Verdauungstrakt eines Wiederkäuers unverdaut passieren können, um kulturell nachgewiesen werden zu können (Gilardoni et al., 2012).

Man kann als Probenmaterial neben Kot auch Milch, Darmschleimhaut, Lymphknoten, Blut oder Umgebungsproben verwenden (Homuth, 2002; Whittington, 2010). Um die Kosten für eine Herdendiagnostik zu reduzieren, kann man auch gepoolte Kotkulturen von drei bis fünf Tieren anlegen, ohne dass dies mit wesentlichen Sensitivitätsverlusten einhergeht (Kalis et al., 2000; van Schaik et al., 2003). Auch die Untersuchung von Umgebungskotproben ist eine wirtschaftliche Alternative zur Identifikation MAP-positiver Herden anstelle der Kotprobenuntersuchungen bei allen Tieren im Bestand. Mittels Umgebungskotproben aus drei bis fünf Stallbereichen je Herde können MAP-infizierte Milchviehherden mit einer Sensitivität von 87 % bei vertretbarem Aufwand identifiziert werden, wenn die Einzeltierprävalenz höher ist als 2 %. Am häufigsten kann dabei MAP aus dem Laufbereich und dem Melkbereich isoliert werden, welche daher immer in die Umgebungsbeprobungen miteinbezogen werden sollten (Donat et al., 2011).

Nachteile der kulturellen MAP-Anzucht sind die hohen Kosten und die lange Bebrütungsdauer von 8 bis 16 Wochen auf festen Nährmedien, wie Herrold's Egg Yolk

Medium (Collins, 1996; Sweeney et al., 2012). Dabei erscheinen 97 % aller Kolonien in den ersten 12 Kultivierungswochen (Whitlock et al., 1989). Für Flüssignährmedien, wie Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT), wird die Mindestbebrütungsdauer von Sweeney et al. (2012) mit 4 bis 8 Wochen angegeben. Außerdem können nur Tiere als MAP-positiv identifiziert werden, die den Erreger auch aktuell ausscheiden (Collins, 1996). Außerdem ist nach positiver Kultur eine Identifizierung von MAP zwingend erforderlich. Sie kann durch kulturellen Nachweis der Mycobactin-Abhängigkeit und / oder mittels einer spezifischen PCR erfolgen. Der Nachweis der Mycobactin-Abhängigkeit (siehe auch 2.2) ist bereits bei der Primärkultur möglich; dies erfordert aus statistischen Gründen die kulturelle Anzucht aus dem Probenmaterial auf der gleichen Anzahl Mycobactin-haltiger und Mycobactin-freier Nährmedien (AVID, 2007).

Aufgrund der langen Bebrütungsdauer ist es notwendig, die Probe zu dekontaminieren, um Begleitkeime, welche vor allem in Kotproben reichlich vorhanden sind, am Wachstum zu hindern (Collins, 1996; Whittington, 2010). Für die Dekontamination von Kotproben wird in der AVID-Methodensammlung der Einsatz von 0,75%igem N-Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) empfohlen (AVID, 2007). Weitere Details zur Dekontamination von Kotproben finden sich in Kapitel 3.4.1. Ein vor allem für (humane) Darmbiopsate geeignetes Dekontaminationsmittel ist N-Acetyl-L-Cystein (Füllgrabe, 2009). Details hierzu in Kapitel 3.7.2. Allerdings muss man sich bei der Interpretation von MAP-negativen Ergebnissen bewusst sein, dass eine Dekontamination auch die Anzahl der anzüchtbaren MAP verringert, was besonders bei Tieren mit nur geringer MAP-Ausscheidung von Bedeutung sein kann (Reddaclif et al., 2003). Auch ist trotz Dekontamination eine Kontaminationsrate von 7 % bei Kotkulturen und von 0,2 % bei Gewebekulturen zu erwarten (Whittington, 2009).

Zusätzlich zu den oben genannten Methoden zur Reduzierung der Begleitflora ist es empfehlenswert, die Anzuchtnährmedien mit einem antibiotisch und antimykotisch wirkenden Gemisch zu versetzen, um eine Überwucherung mit Pilzen oder anderen Bakterien zu vermeiden (Homuth, 2002).

MAP stellt hohe Nährbodenansprüche und wird auf eidotterhaltigen Nährböden mit Mycobatinzusatz angezüchtet (Homuth, 2002). Als Festnährmedium hat sich vor allem Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) bewährt, aber auch Löwenstein-Jensen-Medium, Middlebrook 7H10 und Middlebrook 7H11-Agar können eingesetzt werden. Bei den Flüssignährmedien haben sich Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT) und Middlebrook 7H9 etabliert (Whittington, 2010).

Eine Weiterentwicklung des klassischen kulturellen Nachweises ist die Anzucht im BACTEC®-System. Im BACTEC®-12B-System wird ein Flüssigmedium eingesetzt, welches <sup>14</sup>C-Palmitat enthält. Ein Bakterienwachstum wird anhand von freigesetztem <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> bestimmt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass ein Nachweis schon nach ca. 5 bis 8 Wochen möglich ist. Der Nachteil ist der Umgang mit radioaktivem Material. Auch bei dieser Methode müssen verdächtige Isolate durch Subkultur oder PCR verifiziert werden (Homuth, 2002).

Beim vollautomatischen BACTEC®-MGIT-System wird der radioaktive Marker durch einen Fluoreszenzmarker ersetzt, wobei der Nachweis des Wachstums von Mikroorganismen mittels Messung der O<sub>2</sub>-Konzentration durch Veränderung von Fluoreszenzsignalen erfolgt. Der Vorteil liegt in der nochmaligen zeitlichen Verkürzung der kulturellen Diagnostik; der Nachteil ist, dass nicht alle MAP-Isolate in diesem System wachsen (Homuth, 2002).

### **2.9.1.3 Molekularbiologischer Erregernachweis**

Vor allem auf Grund der langen Bebrütungsdauer bei der kulturellen MAP-Anzucht gewinnt die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaktion, PCR) eine immer größere Bedeutung. Viele konventionelle PCR-Systeme zum MAP-Nachweis basieren auf der DNS-Insertionssequenz *IS900*. Diese 1451 bis 1453 bp große Sequenz liegt in 14 bis 18 Kopien vor und wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen erstmals 1989 beschrieben (Collins et al., 1989; Green et al., 1989). Den ersten PCR-Systemen zum Nachweis von MAP in Kot mangelte es vor allem an Sensitivität im Vergleich mit der Kotkultur (Vary et al., 1990; Whipple et al., 1992). Eine Arbeitsgruppe um Collins entwickelte die erste nested (engl.: verschachtelt) PCR zum MAP-Nachweis, welche ebenfalls auf dem Nachweis von *IS900* basiert (Collins et al., 1993). Bei der nested PCR handelt es sich um eine PCR, bei der nacheinander zwei Amplifikationsschritte mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt werden, was zu einer Steigerung der Sensitivität führt. Gleichzeitig wird ein solches System damit auch anfälliger für Kontaminationen, und es ist zeitaufwändiger und kostenintensiver als ein konventionelles PCR-System (Stephan, 2007; Bölske u. Herthnek, 2010). Nachdem man erkannt hat, dass *IS900*-ähnliche Elemente auch bei non-MAP Mycobacterien vorkommen können, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann, wurde die Spezifität eines darauf basierten

MAP-Nachweissystems in Frage gestellt (Cousins et al., 1999; Englund et al., 2002; Tasara et al., 2005).

Als alternative Gensequenzen wurden beispielsweise die Sequenz F57 (Poupart et al., 1993), das *hspX*-Gen (Ellingson et al., 1998), die Insertionssequenz *ISMav2* (Strommenger et al., 2001) oder *ISMap02* (Stabel u. Bannantine, 2005) identifiziert. Die Sequenz F57 und das *hspX*-Gen liegen jeweils in einer einzigen Kopie im MAP-Genom vor, während *ISMav2* in drei Kopien vorliegt. Aufgrund der geringen Anzahl an vorliegenden Kopien im MAP-Genom sind diese Marker weniger sensitiv als *IS900*, dadurch aber spezifischer (Poupart et al., 1993; Ellingson et al., 1998; Strommenger et al., 2001, Vasnick et al., 2004; Tasara et al., 2005). *ISMap02* ist mit sechs identischen Kopien im MAP-Genom vertreten (Stabel u. Bannantine, 2005).

Insbesondere F57 und *ISMav02* wurden mehrfach als geeignet für den spezifischen MAP-Nachweis beschrieben (Poupart et al., 1993; Strommenger et al., 2001; Schönenbrücher et al., 2008). Bei der von Schönenbrücher et al. (2008) entwickelten Triplex Real-time-PCR werden diese beiden MAP-Marker zusammen mit einer internen Amplifikationskontrolle eingesetzt, welche dem Ausschluss falsch-negativer Resultate dient.

Insbesondere Rinderkot stellt eine große Herausforderung für den molekularbiologischen MAP-Nachweis dar, da diese Matrix mit vielen PCR-Inhibitoren, wie beispielsweise Phytinsäure, belastet ist (Al-Soud u. Radström, 1998; Thronton u. Passen, 2004). Für die erfolgreiche Anwendung der PCR-basierten Methoden ist daher das Extraktionsverfahren in hohem Maße ausschlaggebend, da es dabei gelingen muss, die Inhibitoren weitgehend zu entfernen und gleichzeitig die in der Matrix evtl. enthaltene DNS zu isolieren (Harris u. Barletta, 2001).

### **2.9.2 Indirekter Erregernachweis**

Als indirekte MAP-Nachweisverfahren stehen zum einen der Johnin-Hauttest und der Interferon- $\gamma$ -Test zur Verfügung, welche die zelluläre Immunantwort nachweisen. Zum anderen können die Komplementbindungsreaktion (KBR), der Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT), der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und der Durchflusszytometrie-basierte Antikörpernachweis zum Nachweis der humoralen Immunantwort eingesetzt werden (Gilardoni et al., 2012).

### **2.9.2.1 Johnin-Hauttest**

Bei dem Johnin-Hauttest wird eine bei infizierten Tieren nach intradermaler Applikation von Paratuberkulin (auch Johnin genannt) oder Geflügeltuberkulin auftretende allergische Reaktion vom Typ IV (Spättyp) nachgewiesen. Analog zur Tuberkulinprobe erfolgt dies durch Messung der Hautdickenzunahme. Als positiv wird dabei eine Zunahme der Hautfaltendicke von über 3 mm 24 bis 72 h nach intradermaler Applikation gewertet (Homuth, 2002).

Dieser in der Vergangenheit häufig verwendete Test hat eine niedrige Sensitivität und Spezifität. Außerdem kann es zu Interaktionen bei evtl. später durchgeführten Tuberkulinproben kommen. Deshalb ist der Johnin-Hauttest heute als obsolet anzusehen (Collins, 1996; Homuth, 2002; Stephan, 2007; Nielsen, 2010; Sweeney et al., 2012).

### **2.9.2.2 Interferon- $\gamma$ -Test**

Dieser Test weist die spezifische Produktion des Zytokins Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch sensibilisierte T-Lymphozyten nach Stimulation mit mykobakteriellem Antigen nach. Dazu wird entnommenes Vollblut entsprechend stimuliert und das gebildete IFN- $\gamma$  mittels ELISA gemessen (Stabel, 1996).

Da die humorale Immunantwort bei jüngeren Tieren gering ist, bietet dieser Test zum Nachweis der zellulären Immunantwort (siehe auch 2.4) die Möglichkeit, Tiere in einem relativ frühen Krankheitsstadium zu detektieren (Hietala, 1992; Collins, 1996). In einer Studie von Huda et al. (2004) fand sich bei MAP-infizierten Rindern bis zu einem Alter von zwei Jahren häufiger eine positive IFN- $\gamma$ -Reaktion als ein positiver Antikörpertiter.

Dieser Test weist aber zahlreiche Nachteile auf: So sind Kreuzreaktionen möglich, die entnommenen Proben müssen schnell bearbeitet werden, da die T-Zellen noch vital sein müssen; die Kosten sind hoch und die Sensitivität ist gering (Stabel et al., 1996; Gilardoni et al., 2012).

### **2.9.2.3 Komplementbindungsreaktion (KBR)**

Die Komplementbindungsreaktion ist das älteste serologische Testverfahren zum Nachweis von MAP-Antikörpern (Twort u. Ingram, 1912; Bang u. Andersen, 1913). Aufgrund ihrer mangelnden Sensitivität und Spezifität gilt die KBR heutzutage als obsoletes Verfahren in der Paratuberkulose-Diagnostik. Trotzdem ist die KBR noch immer in einigen Ländern bei der Importuntersuchung als Verfahren vorgeschrieben. Ein großer Nachteil der KBR ist auch ihr komplexer und damit störungsanfälliger Testaufbau und die nicht vorhandene internationale Standardisierung (Homuth, 2002).

### **2.9.2.4 Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT)**

Der Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT) wurde als Schnelltest für Tiere mit Paratuberkulose-verdächtigen Symptomen entwickelt. Er wird fast ausschließlich zur MAP-Diagnostik bei Schafen, vor allem in Australien, verwendet (Gumber et al., 2006; Tiwari et al., 2006). Vorteile des AGIDT sind die einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung sowie die hohe Spezifität, welche sich durch Vorabsorbktion mit *M. phlei*-Extrakt noch verbessern lässt und dann nahezu 100 % beträgt (Merkal, 1984; Homuth, 2002; Gilardoni et al., 2012). Die Sensitivität ist jedoch bei klinisch unauffälligen Tieren mit ca. 20 % sehr gering und sollte deshalb nur bei klinisch erkrankten Tieren Anwendung finden, bei deren Testung die Sensitivität bis zu 95 % beträgt (Merkal, 1984; Gumber et al., 2006; Gilardoni et al., 2012).

### **2.9.2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Detektion von MAP-Antikörpern in Serum- oder Milchproben mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist die heute am häufigsten eingesetzte indirekte Nachweismethode in der Paratuberkulosedagnostik. Die Sensitivität und die Spezifität sind von der Art und der Präparation des verwendeten Antigens abhängig (Harris u. Barletta, 2001). Durch einen Präabsorptionsschritt mit *M. phlei* kann die Spezifität eines ELISA erhöht werden, da dadurch Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien vermieden werden (Yokomizo et al., 1985; Collins et al., 1991). Es werden überwiegend Sandwich-

ELISA-Systeme angewendet, die über verschiedene Anbieter auch kommerziell erhältlich sind. Es bestehen aber mitunter große Unterschiede in den verwendeten Antigenen, was einen Vergleich von Ergebnissen sehr erschwert (Stephan, 2007).

Vorteile der ELISA-Tests sind die einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung sowie die Automatisierbarkeit, gute Wiederholbarkeit und Objektivierbarkeit (Gilardoni et al., 2012; Sweeney et al., 2012). Die Sensitivitäten der in Deutschland erhältlichen ELISA-Tests für Blutserumproben liegen bei knapp 60 % und die Spezifitäten bei ca. 99 % (Friedrich-Löffler-Institut, 2012). Generell ist die Sensitivität allerdings durch die Art der Immunantwort bei einer MAP-Infektion limitiert, da häufig keine Antikörper gebildet werden, bevor das Tier den Erreger fäkal ausscheidet. Somit ist die Sensitivität stark vom Erkrankungsstadium abhängig, und ein negativer Test darf nicht als Infektionsfreiheit interpretiert werden. Die Serokonversion ist bei Rindern großen interindividuellen Unterschieden unterworfen und meist erst in einem Alter von einem bis drei Jahren nachweisbar. Eine Ausscheidung von MAP ist aber bereits vorher möglich (Sweeney et al., 2005; Sweeney et al., 2012; Sorge, 2013).

Nach den bisherigen Erkenntnissen eignen sich Untersuchungen von Einzeltier- oder Sammelproben mittels ELISA - aufgrund der späten Ausprägung einer Antikörperantwort nach MAP-Infektion - ausschließlich zur Identifikation von Herden mit fortgeschrittenem Infektionsgeschehen, jedoch nicht für die Einzeltierdiagnostik (Gierke, 2009). Außerdem muss bedacht werden, dass es aufgrund der nicht ganz 100 %igen Spezifität auch zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann (Sorge, 2013).

#### **2.9.2.6 Durchflusszytometrie-basierter Antikörpernachweis**

Der Durchflusszytometrie-basierte MAP-Antikörpernachweis wurde erstmals von Eda et al. (2005) beschrieben. Dabei wurden MAP-Bakterien mit den zu untersuchenden Rinderserumproben inkubiert und anschließend die an die Bakterien gebundenen IgG-Antikörper durchflusszytometrisch detektiert und quantifiziert. Im Vergleich zu verschiedenen ELISA-Systemen erwies sich der durchflusszytometrische Antikörpernachweis als sensitiver (Schillinger, 2012). Dieses Verfahren ist schnell durchführbar und gut objektivierbar. Es ist jedoch teuer, und es wird hierfür eine aufwändige Geräteausstattung benötigt (Gilardoni et al., 2012).

## 2.10 Bekämpfung und Prophylaxe der Paratuberkulose

Da für die Johnesche Krankheit keine kausale Therapie existiert, muss der Fokus auf der Bekämpfung und Prophylaxe liegen. Eine Impfung ist jedoch in Deutschland zur Zeit nicht zugelassen (Paul-Ehrlich-Institut, 2015). Eine solche führt außerdem nicht zu einem Schutz vor einer MAP-Infektion, sondern reduziert lediglich die Erregerausscheidung und das Auftreten klinisch kranker Tiere (Bastida u. Juste, 2011). Ein großes Problem ist, dass geimpfte Tiere bei serologischen Untersuchungen nicht von MAP-infizierten Tieren zu unterscheiden sind und es somit zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann. Auch kann es zu Kreuzreaktionen bei Tuberkulinisierungen kommen (Bastida u. Juste, 2011). Ein weiterer Nachteil ist das Auftreten von großen Granulomen an der Injektionsstelle. Auch beim Menschen kommt es bei einer versehentlichen Selbstinjektion zu schweren Gewebsreaktionen (Bastida u. Juste, 2011).

Die Paratuberkulose ist eine in Deutschland meldepflichtige Tierkrankheit (BMELV, 2011). Zur Zeit gibt es für die Tierhalter keine Pflicht zur Bekämpfung der Johneschen Krankheit. Die 2005 vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft herausgegebenen "Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien)" wurden in die 2014 vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft herausgegebenen "Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern" übernommen (BMVEL, 2005; BMEL, 2014).

Diese Empfehlungen verfolgen folgende Ziele:

- a) Vereinheitlichung der Empfehlungen und Maßnahmen für Wiederkäuer-haltende Betriebe in Deutschland,
- b) Erhaltung und Förderung der Tiergesundheit und des Tierschutzes,
- c) Eindämmung der Weiterverbreitung von Krankheitserregern,
- d) Senkung der Prävalenz besonderer Tierkrankheiten und Infektionen mit Zoonoseerregern,
- e) Verminderung der wirtschaftlichen Verluste und Erhaltung / Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit der Wiederkäuerbestände.

Die Empfehlungen basieren auf zwei, sich ergänzenden Bereichen: Den allgemeinen Hygienemaßnahmen und den spezifischen Maßnahmen gegen eine bestimmte Krankheit

(Paratuberkulose und Q-Fieber).

Im Abschnitt über allgemeine Hygienemaßnahmen wird auf allgemeine bauliche Anforderungen, betriebseigene Kontrollen, gesundheitliche Maßnahmen, die tierärztliche Bestandsbetreuung und auf die Anforderungen an die Haltung, Fütterung und Pflege von Wiederkäuern eingegangen.

Im Abschnitt über Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose in Rinderhaltungen wird festgestellt, dass Kälber im ersten Lebensjahr besonders anfällig für eine orale Ansteckung mit MAP seien und es daher das wichtigste Ziel der Paratuberkulosebekämpfung sein müsse, eine möglichst MAP-freie Kälber- und Jungtieraufzucht zu gewährleisten. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür sei die Senkung des Infektionsdruckes durch geeignete Hygienemaßnahmen und frühzeitige Entfernung MAP-ausscheidender Tiere.

Folgende Ziele sollen mit den Empfehlungen erreicht werden:

- a) Senkung der Prävalenz der MAP-Infektionen in den Beständen,
- b) Verminderung der wirtschaftlichen Schäden in den Betrieben,
- c) Eindämmung der Ausbreitung in andere Rinderbestände,
- d) Schaffung und Schutz von Paratuberkulose-unverdächtigen Rinderbeständen.

Den Beständen wird im Rahmen eines freiwilligen Bekämpfungsprogramms folgender Status zugeordnet: Infizierter Bestand, Bestand in der Kontrollphase, Bestand in der Anerkennungsphase oder Paratuberkulose-unverdächtiger Bestand.

Die Einzelheiten zu den Vorsorgemaßnahmen und der Statureinstufung sind den Empfehlungen des BMEL (2014) zu entnehmen.

In Österreich ist die klinische Form der Johneschen Krankheit seit 2006 anzeigepflichtig. Auch das Fleisch solcher Tiere wird dort verworfen. In Schweden, welches als einziges europäisches Land als nahezu frei von Paratuberkulose gilt, wird die Krankheit bei einem Ausbruch ebenfalls streng staatlich geregelt. Einen guten Überblick über die Paratuberkulosebekämpfungsstrategien weiterer europäischer Länder geben Khol und Baumgartner (2012). Eine Zusammenfassung der internationalen Kontrollprogramme und der verschiedenen Kontrollmöglichkeiten kann der Publikation von Sorge (2013) entnommen werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Arbeitskonzept

Im Rahmen eines früheren Forschungsprojektes über „Frühdiagnostik von Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) bei Rindern“ [Bundesanstalt für Landwirtschaft (BLE), Förderkennzeichen 28-1-32.006-06 (2007-2010)] waren zwischen Dezember 2009 und August 2010 insgesamt 47 Kälber im Alter von 100 +/- 10 Lebenstagen mittels verschiedener Methoden auf MAP untersucht worden. Goldstandard waren dabei die molekularbiologische (Triplex Real-Time PCR nach Schönenbrücher et al., 2008) und die kulturelle Untersuchung (auf Herrold's Egg Yolk Medium) von laparoskopisch entnommenen Biopsaten aus den Ileozäkal- und Jejunallymphknoten dieser Probanden.

Ziel der jetzigen Untersuchungen war die nochmalige Überprüfung des MAP-Status der aus dieser früheren Studie noch zur Verfügung stehenden Tiere, welche inzwischen bei der 1. Probenentnahme (Mai und Juni 2013) ein Alter von 36 bis 41 Monaten und bei der 2. Probenentnahme (August und September 2013) ein Alter von 39 bis 44 Monaten erreicht hatten.

Hierzu wurden zweimal Kotproben dieser Tiere im Abstand von ca. 3 Monaten entnommen und mittels der o. g. Methoden molekularbiologisch und kulturell auf MAP untersucht.

Zusätzlich wurden Serumproben mittels Pourquier<sup>®</sup>-ELISA auf MAP-Antikörper untersucht und die Ergebnisse mit dem zum Zeitpunkt der Erstbeobachtung ermittelten Antikörperstatus verglichen.

Von zwei Kühen, bei denen im Kälberalter MAP mittels Real-time-PCR (nach Schönenbrücher et al., 2008) und kultureller Untersuchung (auf Herrold's Egg Yolk Medium) in Jejunallymphknoten nachgewiesen worden war, konnten anlässlich der Schlachtung im Alter von jeweils 50 Monaten verschiedene Organproben (Ileozäkal- und Jejunallymphknoten, Ileozäkalklappe, Ileum, Colon, Milz, Tonsillen) entnommen und molekularbiologisch und kulturell auf MAP untersucht werden.

### 3.2 Verzeichnis der verwendeten Materialien

#### a) Allgemeine Laborausstattung:

- Analyse- und Präzisionswaage, Typ BP 3100 S, Fa. Sartorius AG
- Autoklav, Typ Varioklav 500 E, Fa. H+P Labortechnik GmbH
- Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter 1250 µl extra long, Artikelnr. 70.1186.210, Fa. Sarstedt
- Brutschrank (+37 °C), Typ Tv 80, Fa. Memmert GmbH & Co. KG
- Bunsenbrenner, Sicherheitsbrenner mit Sensor und Netzteil, Typ Schütt Flammy L, Fa. Schütt Labortechnik GmbH
- Eichfähige elektronische Analyse- und Präzisionswaage, Typ BA 210 S-OD1/MCBB 100, Fa. Sartorius AG
- Einmalkanülen STERICAN® B. Braun 18G (1,2 x 40 mm), Artikelnr. 96210, Fa. WDT
- Einmalpapiertücher, Fa. Torx
- Einmal-Pasteurpipetten, Volac, Typ D 8112, Fa. VWR International
- Einmal-Skalpelle Cutfix® (einzeln verpackt), Artikelnr. X004.1, Fa. Roth
- Flächendesinfektionsmittel, Buraton®rapid, Fa. Schülke & Mayr
- Kontainer für Glaspipetten mit Desinfektionsmittel: Gigasept AF 1,5 %, Fa. Schülke
- Kühlschrank, Typ Privileg Super Energie Sparer, Fa. Quelle GmbH
- Kurzzeitmesser
- Mörser, Artikelnr. 410-9111, Fa. VWR International
- Nitril Einweg-Untersuchungshandschuhe, Oberfläche texturiert, Typ Nitrile Premium-CHEMO-protectPLUS, Fa. Kirchhof Group Deutschland
- Petrischalen 92 x 16 mm mit Entlüftungsnocken, Artikelnr. 09-031-0000, Fa. Nerbe plus
- Pipette, Typ Research Family 100-1000 µl, Fa. Eppendorf AG
- Pistill, Artikelnr. 410-9131, Fa. VWR International
- Reagenzglasschüttler („Vortexer“), Typ VV3-S 40, Fa. VWR International
- Rektalhandschuhe WDT spezial, Artikelnr. 93423, Fa. WDT
- Rotilabo®-einmal-Pinzetten, steril (einzeln verpackt), Artikelnr. KL05.1, Fa. Roth

- Rotilabo<sup>®</sup>-Wattestäbchen, Art.-Nr.: EH12.1, Fa. Roth
- Schraubröhrchen 50 ml („Falcon-Röhrchen“), steril + pyrogenfrei, Artikelnr. 62.559.001, Fa. Sarstedt
- Schüttelapparat, Typ 3014, Fa. GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
- Serumröhrchen KABEVETTE<sup>®</sup> 4,9 ml mit Gerinnungsforderer und Trennmittel, Artikelnr. 100701, Fa. KABE Labortechnik
- Sicherheits-Pipettierball Flip, rot („Peleusball“), Artikelnr. C261.1, Fa. Roth
- Sicherheitswerkbank, Typ Hera Safe KS 12, Fa. Kendro
- Spezialvernichtungsbeutel PP, Artikelnr. 09.322.0000, Fa. Nerbe plus GmbH
- Ständer für Kulturröhrchen, Artikelnr. E 101.1, Fa. Roth
- sterile Glaspipetten
- Tiefkühlzelle mit kältetechnischer Anlage (-18 °C), Typ 4750 021, Fa. Viessmann Kältetechnik AG
- Urinbecher mit Schraubdeckel, 125 ml (für Kotproben), Artikelnr. 05004, Fa. KABE Labortechnik
- vergallter Alkohol (zum Abflammen)
- Zentrifuge („Serum-Zentrifuge“), Typ EBA 12 R, Fa. Hettich

b) Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen:

- Biosphere<sup>®</sup> MicroTube 2 ml, Safe-Seal Deckelverriegelung, Artikelnr. 72.695.200, Fa. Sarstedt
- DNA-Away<sup>™</sup>, Artikelnr. X996.1, Fa. Roth
- Halbrahmen PCR-Platten, 96 well, Artikelnr. G606/H/1E-0A, Fa. Kisker GbR
- Kühlzentrifuge, Typ Multifuge 1 S-R, Fa. Heraeus Instruments
- PCR-Reaktionsgefastander, Fa. Eppendorf AG
- Pipette (zum DNS pipettieren), Typ Eppendorf Varipette 4710 (0,5-10 µl), Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
- Pipetten, Typ Eppendorf Reference (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

- Pipettenspitzen:
  - Quali-Maximum-Recovery Filtertips, 0,1-10 µl (Artikelnr. A300SX-MR), 100-1000 µl (Artikelnr.: A1000S-MR), Fa. Kisker Biotech GmbH & Co. KG
  - Neptune Barriertips BT 100, 100 µl, Artikelnr. 711179, Fa. Kisker Biotech GmbH & Co. KG
- Probenröhrchen 2 ml („Lysing-Tubes“), farblos (Dnase-, Rnase-frei), Art.-Nr.: 710011, Fa. Biozym Scientific GmbH
- Reaktionsgefäße PP 2 ml ohne Deckel („Sammelgefäße“), Artikelnr. 04-232-0000, Fa. Nerbe plus GmbH
- Real-Time Cycler, Typ ABI PRISM 7000 Sequence, Fa. Applied Biosystems
- Safe Seal Reagiergefäße 1,5 ml, PCR Performance Tested, Artikelnr. 72.706.400, Fa. Sarstedt
- Schraubröhrchen 15 ml („Falcon-Röhrchen“), steril + pyrogenfrei, Artikelnr. 62.554.502, Fa. Sarstedt
- Schraubverschlüsse (für Probenröhrchen), rot (mit Dichtring), Artikelnr. 710031, Fa. Biozym Scientific GmbH
- SiLibeads® (Keramikkügelchen), Typ ZY 1,4-1,6mm, Fa. Sigmund Lindner
- Thermomixer, Typ Eppendorf Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf AG
- Tischzentrifuge, Typ 5415C, Fa. Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH
- Ultra-Clear-Folie, Artikelnr. G060/UC-RT, Fa. Kisker GbR
- UV-Kabinett, Typ L020-GC, Fa. G. Kisker GbR
- Zell-Homogenisator („Ribolyser“), Typ Precellys 24, Fa. Bertin Technologies
- Zentrifuge für Mikrotiterplatten, Typ Perfect Spin P, Fa. PEQLAB Biotechnologie GmbH

### **3.3.1 Probenentnahmen in den einzelnen Betrieben**

Vor Beginn der Beprobung wurde mit den einzelnen Betrieben, aus denen die im Rahmen des früheren Forschungsprojektes untersuchten Kälber bezogen worden waren, Kontakt aufgenommen um zu ermitteln, welche der damals getesteten Tiere noch im Bestand vorhanden waren.

Im Rahmen des damaligen Innovationsprojektes waren 47 weibliche Kälber im Alter von

100 Lebenstagen (+/- 10 Tage) aus 11 verschiedenen Betrieben (8 Paratuberkulose-positive und 3 Paratuberkulose-unverdächtige Betriebe) beprobt worden. Diese Statusfestlegung basierte auf umfangreichen anamnestischen, serologischen (Svanovir<sup>®</sup>-ELISA, als Bestätigungstest nachfolgend Pourquoi<sup>®</sup>-ELISA), kulturellen und molekularbiologischen (Triplex Real-time-PCR) Untersuchungen. Davon stammten 32 Tiere aus Paratuberkulose-positiven und 15 Tiere aus Paratuberkulose-unverdächtigen Betrieben. Aus den Paratuberkulose-positiven Betrieben waren noch 20 Tiere verfügbar, aus unverdächtigen Betrieben noch 7 Tiere. Bei allen Probanden handelte es sich um Tiere der Rasse Deutsche Holsteins (schwarzbunt und rotbunt). Bis auf einen Paratuberkulose-unverdächtigen Betrieb (Betriebsnr. 6), in dem die Kühe in Anbindehaltung (Kurzstand) standen, wurden die Kühe stets in Liegeboxenlaufställen gehalten.

Nachfolgend wurden Termine mit den einzelnen Betrieben vereinbart. Wurde an einem Tag sowohl ein Paratuberkulose-positiver Betrieb als auch ein unverdächtiger Betrieb angefahren, so erfolgte die Probenentnahme zuerst in dem unverdächtigen Betrieb, um eine mögliche Keimverschleppung zu vermeiden.

Die Entnahme der Blutproben erfolgte aus der Schwanzvene (Vena coccygica mediana) zwischen dem 5. und 6. Schwanzwirbel unter Verwendung steriler Einmalkanülen und Serumröhrchen (KABEVETTE<sup>®</sup> 4,9 ml mit Gerinnungsförderer und Trennmittel, Artikelnr. 100701, Fa. KABE Labortechnik).

Die Kotproben wurden direkt aus dem Enddarm entnommen. Dabei wurde für jede Kuh ein neuer Rektalhandschuh verwendet. Die Kotproben wurden in Plastikbechern („Urinbecher“) mit Schraubdeckeln abgepackt und beschriftet.

Sowohl Blut- als auch Kotproben wurden unmittelbar nach der Entnahme für den Transport ins Labor in einer Kühlbox bei ca. 10 °C aufbewahrt.

Des Weiteren wurde für jede beprobte Kuh ein Protokoll erstellt, auf dem das Datum der Beprobung, das Signalement, das Ergebnis einer kurzen allgemeinen klinischen Untersuchung, der Body Condition Score sowie das Ergebnis einer grobsinnlichen Kotuntersuchung notiert wurde. Diese Untersuchungen erfolgten entsprechend den Angaben in dem Lehrbuch von Dirksen, Gründer und Stöber (1990): „Die klinische Untersuchung des Rindes“.

Alle diese Beprobungen wurden nach jeweils ca. 3 Monaten wiederholt.

Tabelle 1: Tiere aus der ehemaligen Querschnittstudie und deren Verfügbarkeit für die beiden Nachbeprobungen im Rahmen dieser Arbeit

Status	Be- trieb- Nr.	QS- Nr.	MAP- Status im Kälber- alter	Farb- rich- tung	noch im Betrieb?	Geburts- datum	Alter bei 1. Nachbe- probung (Monate)	Alter bei 2. Nachbe- probung (Monate)
MAP-positiver Betrieb	1	1	negativ	Rbt	ja	25.12.2009	41	44
MAP-positiver Betrieb	1	2	negativ	Rbt	ja	25.12.2009	41	44
MAP-positiver Betrieb	2	3	positiv	Sbt	ja	01.01.2010	41	44
MAP-positiver Betrieb	2	4	positiv	Sbt	ja	08.01.2010	41	44
MAP-positiver Betrieb	2	5	positiv	Sbt	ja	08.01.2010	41	44
MAP-positiver Betrieb	3	6	fraglich	Sbt	nein	12.01.2010	40	43
MAP-positiver Betrieb	3	7	negativ	Sbt	nein	12.01.2010		
MAP-positiver Betrieb	3	8	fraglich	Sbt	ja	13.01.2010		
MAP-positiver Betrieb	3	9	negativ	Sbt	nein	15.01.2010		
MAP-positiver Betrieb	3	16	negativ	Sbt	nein	23.02.2010		
MAP-positiver Betrieb	3	17	negativ	Sbt	ja	22.02.2010	39	42
MAP-positiver Betrieb	3	18	negativ	Sbt	ja	20.02.2010	39	42
MAP-positiver Betrieb	3	19	negativ	Sbt	ja	27.02.2010	39	42
MAP-positiver Betrieb	3	37	negativ	Sbt	nein	22.04.2010	37	40
MAP-positiver Betrieb	3	38	negativ	Sbt	ja	27.04.2010		
MAP-positiver Betrieb	3	39	negativ	Sbt	nein	29.04.2010		
MAP-positiver Betrieb	3	40	negativ	Sbt	ja	30.04.2010	37	40
MAP-positiver Betrieb	4	10	negativ	Sbt	ja	31.01.2010	41	44
MAP-positiver Betrieb	4	11	negativ	Sbt	nein	03.02.2010	39	42
MAP-positiver Betrieb	4	12	negativ	Sbt	nein	05.02.2010		
MAP-positiver Betrieb	5	13	negativ	Sbt	ja	19.02.2010		
MAP-positiver Betrieb	5	14	negativ	Sbt	ja	22.02.2010	39	42
MAP-positiver Betrieb	5	15	negativ	Sbt	ja	22.02.2010	39	42
MAP-positiver Betrieb	5	28	negativ	Sbt	ja	14.03.2010	40	43
MAP-positiver Betrieb	5	29	negativ	Sbt	nein	24.03.2010	38	41
MAP-positiver Betrieb	8	30	negativ	Sbt	nein	05.04.2010		
MAP-positiver Betrieb	9	31	negativ	Rbt	ja	30.03.2010		
MAP-positiver Betrieb	9	32	negativ	Sbt	ja	01.04.2010	38	41
MAP-positiver Betrieb	10	33	negativ	Sbt	nein	16.04.2010	37	40
MAP-positiver Betrieb	10	34	negativ	Sbt	ja	16.04.2010		
MAP-positiver Betrieb	10	46	negativ	Sbt	ja	25.05.2010		
MAP-positiver Betrieb	10	47	negativ	Sbt	nein	05.06.2010	36	39
unverdächtiger Betrieb	6	20	negativ	Sbt	ja	07.03.2010	38	41
unverdächtiger Betrieb	6	21	negativ	Sbt	ja	10.03.2010	38	41
unverdächtiger Betrieb	7	22	negativ	Sbt	nein	05.03.2010	39	42
unverdächtiger Betrieb	7	23	negativ	Sbt	nein	07.03.2010		
unverdächtiger Betrieb	7	24	negativ	Sbt	nein	12.03.2010		
unverdächtiger Betrieb	7	25	negativ	Sbt	ja	14.03.2010		
unverdächtiger Betrieb	7	26	negativ	Sbt	ja	15.03.2010		
unverdächtiger Betrieb	7	27	negativ	Sbt	ja	17.03.2010	39	42
unverdächtiger Betrieb	7	41	negativ	Sbt	nein	09.05.2010	37	40
unverdächtiger Betrieb	7	42	negativ	Sbt	nein	12.05.2010		
unverdächtiger Betrieb	7	43	negativ	Sbt	nein	14.05.2010		
unverdächtiger Betrieb	7	44	negativ	Sbt	nein	14.05.2010		
unverdächtiger Betrieb	7	45	negativ	Sbt	ja	17.05.2010		
unverdächtiger Betrieb	11	35	negativ	Rbt	ja	06.04.2010	38	41
unverdächtiger Betrieb	11	36	negativ	Sbt	nein	22.04.2010		

### 3.3.2 Aufbereitung und Archivierung der Serumproben

Die Serumproben wurden am Tag der Probennahme bei 3750 rpm für 10 min bei 18 °C zentrifugiert (Zentrifuge, Typ EBA 12 R, Fa. Hettich). Danach wurde das Serum jeweils eines Tieres in je 2 Eppendorf-Gefäße (2 ml) überführt. Die Eppendorf-Gefäße wurden danach bis zur weiteren Bearbeitung bei -26 °C tiefgekühlt gelagert.

### 3.3.3 Portionierung und Archivierung der Kotproben

Die gekühlt transportierten Kotproben wurden am Tag der Probennahme für die weitere Bearbeitung portioniert. Zunächst wurde der Kot im Probengefäß gründlich mit Hilfe von sterilen Einmal-Wattestäbchen durchmischt. Um Kontaminationen zwischen den einzelnen Kotproben zu vermeiden, wurden auch zum Abwiegen ausschließlich sterile Einmalwattestäbchen (Rotilabo®-Wattestäbchen, Artikelnr.: EH12.1, Fa. Roth) verwendet. Danach wurden je 3 +/- 0,1 g Kot in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgewogen. Für die molekularbiologische Diagnostik wurden jeweils 2 x 1,5 g (+/- 0,1 g) Kot abgewogen. Die so portionierten und eindeutig beschrifteten Proben wurden nun bis zur weiteren Bearbeitung in einer Tiefkühlzelle mit kältetechnischer Anlage bei -18 °C gelagert.

### 3.4.1 Dekontamination der Rinderkotproben zur kulturellen Anzucht von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP)

#### Verwendete Chemikalien:

- N-Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC)/1-Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrate, Artikelnr. 8.40008.0100, Fa. Merck
- Herstellung der 0,75%igen HPC-Lösung:  
30 g Aqua dest. ad 0,225 g HPC

Um die im Rinderkot enthaltene Begleitkeimflora zu unterdrücken, erfolgte eine Dekontamination der Kotproben in Anlehnung an die Methode des Arbeitskreises für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID-Methodensammlung 2007).

Am Tag der Kotprobennahme wurden jeweils 3 g (+/- 0,1 g) Kot mit Hilfe von sterilen

Wattestäbchen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgewogen. Diese Proben wurden dann unmittelbar in einer Tiefkühlzelle mit kältetechnischer Anlage bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte innerhalb einer Woche.

Hierzu wurden zunächst 0,225 g N-Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) je Probe mit Hilfe einer geeichten elektronischen Analyse- und Präzisionswaage (Typ BA 210 S-OD1/MCBB 100, Fa. Sartorius AG) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgewogen. Dann wurden je Probe 30 g Aqua dest., welches im Brutschrank auf  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt wurde, in je ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgewogen und anschließend zu dem abgewogenen HPC gegeben. Das verschlossene Falcon-Röhrchen wurde manuell geschüttelt, bis sich das HPC komplett gelöst hatte. Nun wurde die 0,75%ige HPC-Lösung zu den abgewogenen und aufgetauten Kotproben gegeben und das Röhrchen gründlich geschüttelt. Jetzt wurde das Falcon-Röhrchen 2-5 min stehen gelassen, so dass grobe Bestandteile sedimentieren konnten. Danach wurden 15-20 ml des Überstandes in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen dekantiert und anschließend auf dem Laborschüttler in waagerechter Stellung bei ca. 200 U/min für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das restliche Sediment wurde verworfen. Nun wurden die Röhrchen aufrecht und in Dunkelheit bei Raumtemperatur für 24 h in einem Schrank inkubiert.

Nach der 24-stündigen Einwirkzeit wurde der Überstand bis auf 1-2 ml Sediment dekantiert.

### **3.4.2 Anzüchtung von MAP aus den Rinderkotproben auf Herrold's Egg Yolk-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV**

Zusammensetzung des Nährmediums (Artikelnr. 222233, Fa. Becton Dickinson (BD<sup>®</sup>)):

- 9,0 g Casein (pankreatisch abgebaut)
- 2,7 g Rinderfleischextrakt
- 4,0 g Natriumchlorid
- 4,1 g Natriumpyruvat
- 0,1 g Malachitgrün
- 0,05 g Amphotericin B
- 0,002 g Mycobactin J
- 15,3 g Agar

- 0,05 g Nalidixinsäure
- 0,05 g Vancomycin
- 100,0 ml Eigelb
- 27,0 ml Glycerol
- 873,0 ml destilliertes Wasser

Der Herrold's Egg Yolk-Schrägagar mit den Zusätzen Mycobactin J, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin wurde von der Firma Becton Dickinson (BD®) gebrauchsfertig bezogen. Mycobactin J ist für das Wachstum von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* notwendig, da das Bakterium in Abwesenheit von Mycobactin J nicht auf Medien wächst. Die antibiotischen Zusätze Nalidixinsäure und Vancomycin sowie das Antimykotikum Amphotericin B dienen der Unterdrückung der Begleitkeimflora während der langen Bebrütungsdauer.

Die Nährmedienröhrchen wurden gemäß Herstellervorgaben gelagert und innerhalb des angegebenen Verbrauchsdatums verwendet.

#### Inokulation und Bebrütung:

In Anlehnung an die AVID-Methode (AVID-Methodensammlung 2007) wurden alle Proben im Dreifachansatz angelegt.

Jeweils 200 µl des Sediments wurden mit Hilfe von Filterspitzen auf die Nährmedien gegeben. Dann wurde das Inokulat mit einer sterilen Glaspipette (1 ml) auf dem Schrägagar verteilt und dann zur Seite gestrichen. Diese Tätigkeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (Typ Hera Safe KS 12, Fa. Kendro) durchgeführt.

Anschließend wurden die Röhrchen in leichter Schräglage, bei waagerechter Nährbodenoberfläche, für 6-7 Tage bei 37 +/- 1 °C inkubiert, wobei der Schraubdeckel eine Vierteldrehung weit geöffnet blieb. Danach wurden die Röhrchen fest verschlossen und in senkrechter Stellung weiter bebrütet.

Nach 3 bis 4, 5 bis 6 und nach 12 Wochen wurden die Medien unter einer Lupenlampe sowie makroskopisch auf Koloniewachstum überprüft. Eine abschließende Beurteilung erfolgte nach mindestens 12 Wochen Bebrütungsdauer. Eine weitere Kontrolle nach 16 Wochen zeigte gegenüber der vorherigen keine Veränderungen.

### 3.4.3 Identifizierung von verdächtigen Kolonien als *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Als verdächtig galten weißlich-graue, glatte, glänzende Kolonien, welche zunächst halbkugelig erschienen (Abb. 1) und mit zunehmender Bebrütungsdauer flacher und wachsartig wurden. Teilweise zeigte sich auch eine zentrale, mamillenförmige Erhabenheit (siehe Abb. 2). Die Kolonien konnten einen Durchmesser von bis zu 4 mm erreichen. Bei starkem Wachstum blieben sie jedoch stecknadelspitz- bis stecknadelkopfgroß (Abb. 3).

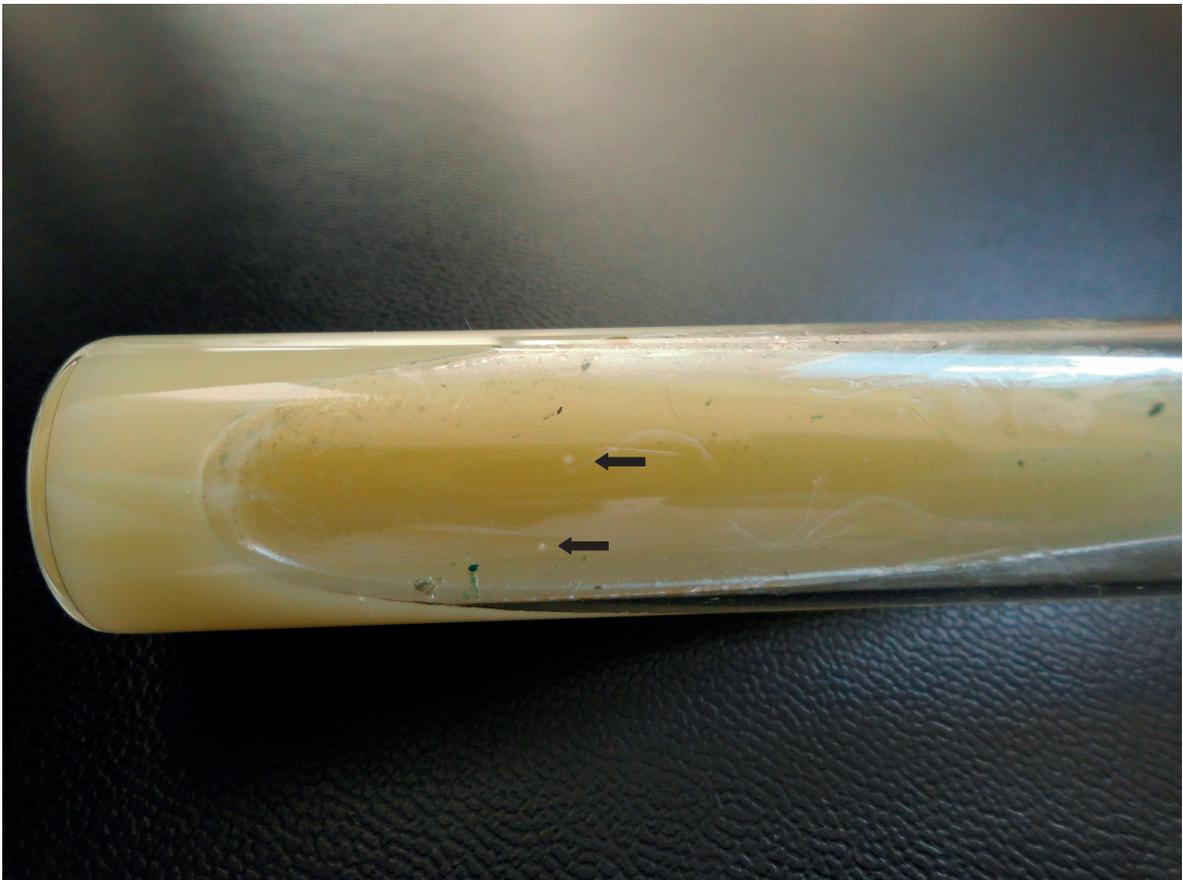
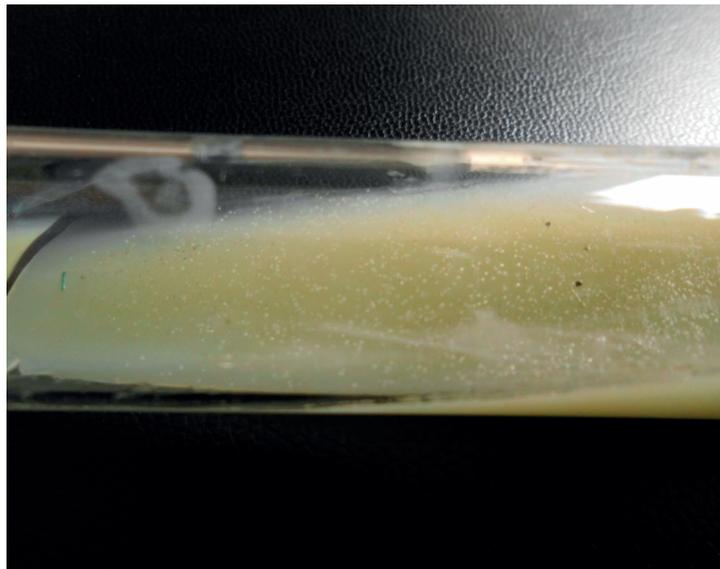


Abbildung 1: Zwei MAP-Einzelkolonien nach 3 Wochen Bebrütung bei 37 °C auf HEYM mit Mycobactin J und ANV



*Abbildung 2: MAP-Kolonien nach 12 Wochen  
Bebrütung bei 37 °C auf HEYM mit Mycobactin J und  
ANV*



*Abbildung 3: Rasenwachstum von MAP-Kolonien nach  
6 Wochen Bebrütung bei 37 °C auf HEYM mit  
Mycobactin J und ANV*

Die DNS-Isolierung aus dem verdächtigen Koloniematerial erfolgte in Anlehnung an die AVID-Methodensammlung (2007).

Dafür wurde Koloniematerial einzeln vom Herrold's Egg Yolk-Schrägagar mittels Impföse abgenommen und in 100 µl AE-Puffer (aus dem Dneasy Blood & Tissue-Kit<sup>®</sup>, Artikelnr. 69504, Fa. Qiagen) in einem Tube eingerieben. Das Tube wurde verschlossen, gründlich

gevoertext und anschließend 15 min unter leichtem Schütteln bei 99 °C im Thermomixer (Fa. Eppendorf AG) gekocht. Nach Abkühlung wurde das Tube 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge, Typ 5415C, Fa. Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH). Der Überstand wurde möglichst komplett in ein neues Tube überführt. Das Pellet wurde verworfen. Nun wurde erneut für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wieder in ein neues Tube überführt und das Pellet erneut verworfen. Die so behandelte Probe wurde nun im Kühlschrank (Fa. Quelle GmbH) bei 4 bis 8 °C gelagert.

Zur Bestätigung des verdächtigen Koloniematerials als *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* wurde nach der eben beschriebenen DNS-Extraktion die Triplex Real-time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008) durchgeführt.

### 3.5.1 Extraktionsverfahren für genomische MAP-DNS aus den Rinderkotproben

#### Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- High Pure PCR Template Preparation Kit<sup>®</sup> (100 Reaktionen), Artikelnr. 11796828001, Fa. Roche Applied Science
- S.T.A.R.-Puffer, Artikelnr. 03335208001 Fa. Roche Applied Science
- Isopropanol, Artikelnr. 7343.1, Fa. Roth
- Lysozym (100000 U/mg), Artikelnr. 1.05281.0010, Fa. VWR International GmbH
- Tris-Puffer, Artikelnr. 4855.2, Fa. Roth
- Ethanol ROTISOLV<sup>®</sup> HPLC, Artikelnr. P076.1, Fa. Roth (zur Zugabe zum Inhibitor Removal Buffer und zum Wash Buffer)

Die Isolierung der genomischen DNS von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rinderkot erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche) unter Verwendung des S.T.A.R.-Buffers (Fa. Roche). Dieses modifizierte thermisch-chemisch-mechanische DNA-Extraktionsverfahren erwies sich nach Bulander (2009) dem Standardextraktionsverfahren als überlegen.

Am Tag der Probennahme wurden jeweils 1,5 +/- 0,1 g gut durchmischten Kotmaterials in 15 ml Falcon-Röhrchen (Fa. Sarstedt) im Doppelansatz eingewogen und bis zur weiteren Aufbereitung in einer Tiefkühlzelle mit kältetechnischer Anlage bei -18 °C eingefroren. Die Lagerungsdauer betrug höchstens zwei Wochen.

Vor Beginn der folgenden Arbeiten wurden die Arbeitsflächen gereinigt und mit dem Flächendesinfektionsmittel Buraton<sup>®</sup>-rapid der Fa. Schülke & Mayr behandelt. Anschließend wurde eine eventuell vorhandene DNS-Kontamination mit DNA-Away der Fa. Roth beseitigt.

Nachdem die eingefrorenen Proben aufgetaut waren, wurden je 5 ml S.T.A.R.-Buffer hinzugegeben und anschließend gründlich gevortext, sodass es zu einer guten Homogenisation des Materials kam. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 1.000xg zentrifugiert (Kühlzentrifuge, Typ Multifuge 1 S-R, Fa. Heraeus Instruments). Danach wurde je 1 ml des Überstandes in Lysing-Tubes überführt, in denen sich SiLibeads<sup>®</sup> befanden. Nun erfolgte ein mechanischer Aufschluss im Zell-Homogenisator („Ribolyser“), Typ Precellys 24 (Fa. Bertlin Technologies) mit der Einstellung 2 x Stufe 5500 je 20 s (mit 60 s Pause dazwischen). Nach dem Absetzen des entstandenen Schaumes wurden die Proben dann für 10 min bei 95-96 °C im Thermomixer (Typ Eppendorf Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf AG) unter leichtem Schütteln (750 rpm) erhitzt. Jetzt wurde nach einer Abkühlphase gründlich gevortext und die Proben bei 5.000xg zentrifugiert. Die nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten immer mit der Tischzentrifuge, Typ 5415C (Fa. Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH). In der Zwischenzeit wurden je 5 µl Lysozymlösung in 1,5 ml Tubes vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 200 µl des Zentrifugationsüberstandes zur Lysozymlösung hinzugegeben und vorsichtig gevortext. Nun wurde mindestens 15 min bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Danach erfolgte, nach erneutem Mischen mit dem Vortex-Schüttler, die Zugabe von 200 µl Binding Buffer und 40 µl Proteinase-K-Lösung. Nach gründlichem Mischen mit dem Vortex-Schüttler wurde jetzt mindestens 10 min bei 70 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln (750 rpm) inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde gevortext und dann 100 µl Isopropanol hinzugegeben. Danach wurden die zuvor erneut gevortexten Proben in die vorbereiteten Säulen überführt, welche in ein Sammelgefäß eingesetzt waren. Nun wurde bei 8.000xg für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl Inhibitor Removal Buffer und wieder eine Zentrifugation bei 8.000xg für 1 min. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Es folgte die Zugabe von 500 µl Wash Buffer und eine Zentrifugation mit den selben Einstellungen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, nachdem die Säule wieder in ein neues Sammelgefäß gesetzt wurde. Um den Wash Buffer vollständig zu entfernen, wurde danach für 10 s mit maximaler Umdrehungszahl (20.000xg) zentrifugiert. Zur nun folgenden Elution wurde die

Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und je 100 µl des zuvor aliquotierten und auf 70 °C erwärmten Elution Buffers hinzugegeben. Jetzt folgte eine abschließende Zentrifugation für 1 min bei 8.000xg. Die Säule wurde verworfen. Das so aufgefangene Eluat enthält DNS (wenn vorhanden). Es wurde bis zur Untersuchung mittels der Triplex Real-Time PCR im Kühlschrank bei +2 bis +8 °C für maximal eine Woche gelagert.

### **3.5.2 Aufbereitungskontrollen bei der DNS-Isolierung**

Es wurde eine positive Aufbereitungskontrolle mitgeführt. Hierbei handelte es sich um eine mit einem MAP-Stamm gespikete Kotprobe. Das positive PCR-Ergebnis dieser Aufbereitungskontrolle galt als Indikator für eine erfolgreiche Gesamtprobenaufarbeitung. Eine Leerwert-Aufbereitungskontrolle ohne Probenmaterial wurde ebenfalls mitgeführt. Deren negatives PCR-Ergebnis dient als Bestätigung dafür, dass während der Aufbereitung keine Kontamination mit MAP-DNS erfolgt ist.

### **3.5.3 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* mit Hilfe der Real-time-Polymerasekettenreaktion**

#### Chemikalien und Reagenzien

- DNA-Away™ zur Beseitigung von unerwünschter DNA auf Oberflächen und Gerätschaften, Artikelnr. X996.1, Fa. Roth
- qPCR™ Mastermix without UNG, Artikelnr. RT-QP2X-03WOU+, Fa. Eurogentec
- TaqMan-MGB®-Sonde F57po, Fa. Applied Biosystems
- TaqMan-MGB®-Sonde IS\_IFTN, Fa. Applied Biosystems
- TaqMan-MGB®-Sonde IAK 0607, Fa. Applied Biosystems
- Primer: f57po-244F/f57po-306R und ISMav2-735F/ISMav2-896R, Fa. MWG Biotech

Zum molekularbiologischen Nachweis von MAP aus Rinderkot bzw. zur Bestätigung von verdächtigen Kolonien nach der kulturellen Anzucht wurde das im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelte Triplex Real-time-

PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008) verwendet. Damit werden die MAP-spezifischen Marker F57 und ISMav2 sowie eine interne Amplifikationskontrolle (IAK) nachgewiesen.

Als positiver Kontrollstamm wurde verwendet:

- *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ATCC® BAA-968™ (interne Bezeichnung: MAP K10)  
Herkunft: Rinderkot, Quelle: American Type Culture Collection, Manassas (USA)

### 3.5.4 Angaben zu den verwendeten Primern und Sonden

Zur Detektion der MAP-spezifischen Marker F57 und ISMav2 wurden Oligonukleotidprimer und ein TagMan-MGB®-Sonden-System verwendet. Zum Nachweis des Markes F57 dienten die Primer „f57po-244F“ und „f57po-306R“ und für die Insertionssequenz ISMav2 die Primer „ISMav2-735F“ und „ISMav2-896R“. Die Primer wurden nach Institutsangaben bei der Fa. MWG Biotech hergestellt. Die TaqMan-MGB®-Sonden wurden von der Fa. Applied Biosystems bezogen. Nähere Angaben über die Primer und die entsprechenden Sonden sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

*Tabelle 2: Angaben über die Primer des MAP-Markers F57 und die entsprechende Sonde*

Zielgen	Bezeichnung	Sequenz	Oligo-nucleotid-größe	Position <sup>1)</sup>	Amplifikat-Größe
F57	PrimerF: F57po-244F	5'-TAG GAG CAC GCA GGC ATT C-3'	19-mer	244-263	62 Bp
	PrimerR: F57po-306R	5'-CGG TCC AGT TCG CTG TCA T-3'	19-mer	288-307	
	F57-TaqMan-Sonde	VIC-CCT GAC CAC CCT TC-MGB	14-mer	268-282	

<sup>1)</sup> Positionen bezogen auf Genbank-Zugriffs-Nr. X70277 des NCBI

*Tabelle 3: Angaben über die Primer des MAP-Markes ISMav2 und die entsprechende Sonde*

Zielgen	Bezeichnung	Sequenz	Oligo-nucleotid-größe	Position <sup>1)</sup>	Amplifikat-größe
ISMav2	PrimerF: ISMav2-735F	5'-CGG CAA AAT CGA GCA GTT TC-3'	20-mer	1645-1665	150 Bp
	PrimerR: ISMav2-896R	5'-TGA GCC GGT GTG ATC ATC TTT-3'	21-mer	1786-1807	
	IS-IFTN-TaqMan-Sonde	FAM-CGC TGA GTT CCT TAG-MGB	15-mer	1678-1693	

<sup>1)</sup> Positionen bezogen auf Genbank-Zugriffs-Nr. AF286339 des NCBI

### 3.5.5 DNS-Amplifikationstechnik

Die Beschickung der PCR-Gefäße erfolgte räumlich getrennt von den übrigen Arbeitsbereichen in einem UV-Kabinett, Typ L020-GC, der Fa. G. Kisker GbR. Die Reihenfolge der Beschickung, die Bestandteile, deren Konzentration sowie die Pipettiermenge pro Ansatz sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Danach wurde die Halbrahmen-96-well-PCR-Platte mit Ultra-Clear-Folie versiegelt. Vor Durchführung der PCR wurde die 96-well-Platte in einer Zentrifuge für Mikrotiterplatten (Typ Perfect Spin P, Fa. PEQLAB Biotechnologie GmbH) zentrifugiert, um möglicherweise am Rand der Vertiefungen haftende Tröpfchen zu beseitigen.

Die Real-time-PCR wurde in dem Thermocycler ABI PRISM 7000 Sequence der Fa. Applied Biosystems durchgeführt. Die Konfigurationen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

*Tabelle 4: Pipettierprotokoll für die Triplex Real-time-PCR (50 µl-Ansatz)*

<b>Bestandteile und deren Konzentration</b>	<b>Pipettiermenge pro Ansatz</b>
Nuclease freies Wasser	8,5 µl
2x qPCR <sup>TM</sup> Mastermix Plus without UNG (Fa. Eurogentec)	25,0 µl
Primer: f57po-244F/-306R (10 µM)	je 1,0 µl
Primer: ISMav2-735F/-896R (10 µM)	je 1,0 µl
f57po-TaqMan <sup>®</sup> -Sonde VIC (2 µM)	je 2,0 µl
IS-IFTN-TaqMan <sup>®</sup> -Sonde FAM (2 µM)	
IAK 0607-TaqMan <sup>®</sup> -Sonde NED (2 µM)	
DNS IAK-Verdünnung	1,5 µl
Ziel-DNS	5,0 µl

*Tabelle 5: Konfigurationen des Real-Time-Cyclers ABI PRISM 7000*

<b>Thermocyclerprogramm</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing/Extension	60 °C	1 min

} 45x

### 3.5.6 PCR-Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde der MAP K10-Stamm (s. o.) verwendet. Es wurde ein Leerwert-Mastermix mitgeführt, welchem statt Probenmaterial Nuclease-freies Wasser in entsprechender Menge zugefügt wurde. Dieser garantiert, dass in den Ansatz des Mastermixes keine MAP-DNS eingetragen wurde. Eine solche PCR-Kontamination würde zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Die interne Amplifikationskontrolle (IAK) wurde verwendet, um falsch-negative Ergebnisse jeder einzelnen PCR-Reaktion, möglicherweise infolge enthaltener Hemmstoffe, zu erkennen. Die IAK wird unter Einsatz des kommerziell erhältlichen Plasmids pUC 19 in einer vorangegangenen PCR gewonnen, passend zu dem Primerpaar „f57po-244F/f57po-306R“ (Abdulmawjood et al., 2002; Schönenbrücher et al., 2008). Zur Detektion wurde die „IAK 0607-TaqMan-Sonde“ der Fa. Applied Biosystems verwendet. Die IAK-DNS muss für den Einsatz in der PCR so verdünnt werden, dass bei der Auswertung der PCR, sofern keine MAP Ziel-DNS vorhanden ist, ein Ct-Wert von 30 bis 35 erreicht wird. Somit zeigt die IAK auch bei negativen Proben eine erfolgreiche PCR an.

### 3.5.7 Auswertung der PCR-Ergebnisse

Generell wurde die Auswertung qualitativ vorgenommen. Es erfolgte eine manuelle Analyse durch eine erfahrene technische Assistentin.

Für die Auswertbarkeit der Real-time-PCR galten folgende Kriterien:

- die Positivkontrolle musste einen Ct-Wert unter 30 aufweisen
- der Leerwert Mastermix musste undetektiert bleiben bzw. einen Ct-Wert über 40 aufweisen
- der Ct-Wert der IAK musste sich bei negativen Proben zwischen 30 und 35 befinden
- entsprechende Ergebnisse der Aufbereitungskontrollen (siehe 3.5.2)

Eine Probe galt als „MAP-positiv“, wenn der Ct-Wert des Zielgens bei dieser Probe unter 37 lag. Ct-Werte zwischen 37 und 40 führten zu der Einstufung „fraglich“. Bei einem Ct-

Wert von über 40 wurden die Proben als „MAP-negativ“ bewertet.

### 3.6 Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern mit Hilfe des Pourquier®-ELISA

Die gewonnenen Serumproben wurden dankenswerter Weise durch das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Hilfe des Pourquier®-ELISA (Pourquier® ELISA Paratuberculosis Antibody Screening Testkit, Fa. Institut Pourquier, Montpellier, Frankreich) gemäß Herstellervorgaben auf das Vorhandensein von MAP-spezifischen Antikörpern untersucht (indirekter Erregernachweis). Alle Serumproben und die Negativkontrolle wurden dabei im Einfachansatz getestet. Die Positivkontrolle wurde im Doppelansatz mitgeführt.

In dem Testkit waren folgende Materialien und Reagenzien enthalten:

- mit MAP-Antigen beschichtete 96-well-Mikrotiterplatten
- Waschlösung (20-fach konzentriert)
- Verdünnungspuffer Nr. 12 (für die Seren)
- Verdünnungspuffer Nr. 1 (für Konjugat)
- Positiv- und Negativkontrollserum
- Anti-Wiederkäuer-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat
- Tetramethylbenzidin- (TMB) Substratlösung Nr. 9
- Stopplösung Nr. 3 (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Zunächst erfolgte bei Raumtemperatur eine Vorinkubation der Serumproben (und Kontrollseren) unter Schütteln für 15 min mit dem Verdünnungspuffer Nr. 12 (1 : 20 Verdünnung), welcher *Mycobacterium-phlei*-Extrakt enthielt, um unspezifische Antikörper zu binden. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Proben in 96-well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol überführt, mit einer Klebefolie abgedeckt und bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Während der Inkubation wurden evtl. vorhandene MAP-Antikörper am Boden der Plattenvertiefungen, welche mit protoplasmatischem MAP-Antigen beschichtet waren, gebunden. Nun erfolgten drei Waschzyklen mit jeweils 300 µl Waschlösung (Herstellung aus 20-fach konzentrierter Waschlösung und Aqua dest.). Jetzt wurde die im Verhältnis 1:100 mit dem Verdünnungspuffer Nr. 1 verdünnte Anti-Wiederkäuer-IgG-

Meerrettichperoxidase-Konjugatlösung dazupipettiert (jeweils 100 µl pro Vertiefung), die Mikrotiterplatte mit Klebefolie abgedeckt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschzyklen (s. o.) wurden jeweils 100 µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung Nr. 9 in jede Vertiefung dazupipettiert und 10 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Reaktion mit jeweils 100 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Stopplösung Nr. 3) abgestoppt. Nun erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) der Test- und Kontrollseren bei einer Wellenlänge von 450 nm [A(450)].

Die Validierungskriterien des Herstellers besagen, dass die OD der Positivkontrollen größer oder gleich 0,350 sein müssen. Weiterhin muss das Verhältnis des Mittelwertes der OD der Positivkontrollen (PC<sub>x</sub>) und der OD der Negativkontrolle (NC) größer oder gleich 3,00 sein.

Abschließend erfolgte für jede Probe (S) gemäß Herstellervorgaben die Berechnung des Titers in % nach folgender Formel:

$$\% \text{ S/P} = 100 \times \frac{(\text{Sample [A(450)]} - \text{NC})}{(\text{PC}_x - \text{NC})}$$

Serumproben mit einem Titer kleiner oder gleich 45 % galten als negativ. Als fraglich galten solche mit einem Titer größer als 45 %, aber kleiner als 55 %. Proben mit einem Titer größer oder gleich 55 % galten als MAP-Antikörper-positiv.

### **3.7 Weitere Untersuchungen an zwei Kühen, welche im Kälberalter als MAP-positiv eingestuft worden waren**

Bei den Tieren Nr. 3 und Nr. 4 (beide Dt. Holstein, schwarzbunt), welche aus demselben MAP-positiven Betrieb stammten, war im Kälberalter jeweils in Jejunallymphknoten MAP sowohl mittels Triplex Real-time-PCR (Schönenbrücher et al. 2008) als auch kulturell nachgewiesen worden. Tier Nr. 4 reagierte damals auch im Pourquier<sup>®</sup>-ELISA positiv. Diese beiden Kühe wurden anlässlich ihrer Schlachtung im Alter von jeweils 50 Monaten wie folgt untersucht.

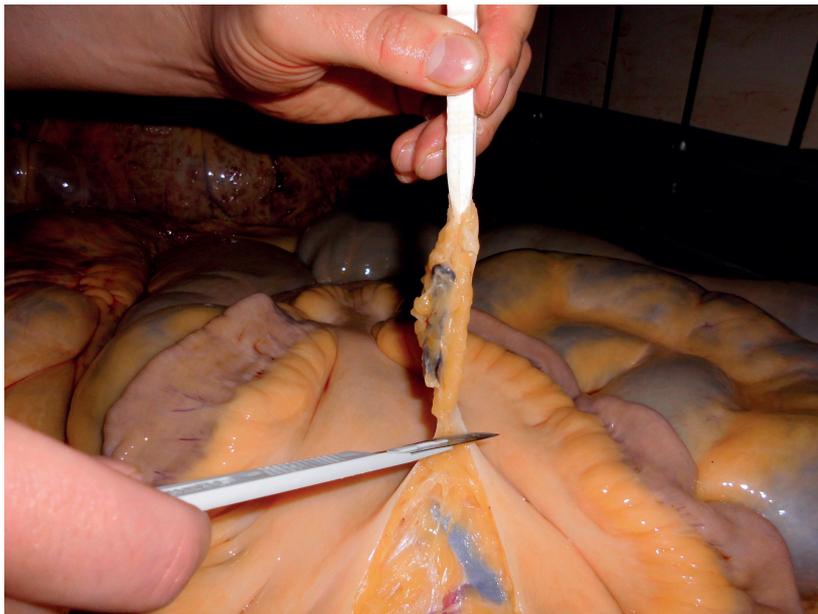
Einen Tag vor der Schlachtung wurden nochmals Kot- und Serumproben entnommen und in der bereits dargestellten Weise untersucht.

### 3.7.1 Entnahme von Organproben und Darminhalt am Schlachthof

Unmittelbar nach dem Ausweiden der Schlachtkörper wurden folgende Organproben entnommen: Ileocaecallymphknoten, Jejunallymphknoten, Ileocaecalklappe, Ileum, Colon (aus der Flexura centralis des Colon ascendes), Milz und Tonsille. Des Weiteren wurde Darminhalt aus dem Ileum und aus der Flexura centralis des Colon ascendes entnommen.

Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde für die Entnahme jeder Organprobe ein neues steriles Einmal-Skalpell (Fa. Roth) und eine neue sterile Einmal-Pinzette (Fa. Roth) verwendet (siehe Abb. 4). Die Organproben wurden zum Transport in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen verbracht. Die Proben des Darminhalts wurden in Plastikbechern („Urinbecher“) transportiert. Für die Transportdauer (ca. 2,5 Stunden) zum Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde befanden sich diese Proben bei ca. +10 °C in einer Kühlbox. Sofort nach der Ankunft wurden sie in einem Kühlschrank (Fa. Quelle GmbH) bei +2 bis +8 °C gelagert. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte am nächsten Morgen.

Die Dekontamination und die weitere Bearbeitung der Darminhalt-Proben wurden analog zu den Kotproben durchgeführt (sowohl kulturelle Anzucht auf HEYM, als auch Triplex Real-time-PCR).



*Abbildung 4: Entnahme eines Jejunallymphknotens mit einer sterilen Einmalpinzette und einem sterilen Einmalskalpell*

### 3.7.2 Dekontamination und Homogenisation der Organproben bovinen Ursprungs zur kulturellen Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

#### Verwendete Chemikalien und Herstellung der Lösungen:

- N-Acetyl-L-Cystein (NALC), Artikelnr. 1.124.22.0025, Fa. Merck
- Herstellung der gebrauchsfertigen NALC-NaOH-Lösung (sie ist instabil und daher täglich frisch anzusetzen):  
50 ml sterile wässrige 2,9 %ige Lösung von Na<sub>3</sub>-Citrat x 2 H<sub>2</sub>O und 50 ml sterile wässrige 4 %ige Lösung von NaOH mischen, dann 500 mg NALC zur Lösung geben.
- Phosphatpufferlösung nach Sørensen (pH 6,8; 1/15 molar):  
4,84 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 5,53 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O mit sterilem Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Die Dekontamination der Organproben aus beiden geschlachteten Rindern erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Füllgrabe (2009) zur Dekontamination von humanen Darmbiopaten. Dabei kam als Dekontaminationsmittel NALC zum Einsatz.

Die Aufbereitung erfolgte im Doppelansatz. Es wurden von jeder dieser Organproben, welche zuvor steril in Petrischalen (92 x 16 mm) überführt worden waren, jeweils zweimal 50 mg (+/- 1 mg) unter der Sicherheitswerkbank (Typ Hera Safe KS 12, Fa. Kendro) abgewogen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Dann wurden 0,5 ml sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung zu jeder Probe zugegeben. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml der gebrauchsfertigen NALC-NaOH-Lösung hinzugegeben, das Röhrchen verschlossen und gründlich auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Nun wurden die beschickten 15 ml Falcon-Röhrchen für 20 min auf den Schüttelapparat (Typ 3014, Fa. GFL) gelegt. Anschließend wurde jeweils 1 ml sterile Phosphatpufferlösung (nach Sørensen) hinzugefügt und nochmals gründlich gemischt. Jetzt wurden die Gewebeteile mit Hilfe einer Einmal-Pasteurpipette (Volac, Typ D 8112, Länge 230 mm, Fa. VWR International) in einen sterilen Mörser (Artikelnr. 410-9111, Fa. VWR International) überführt. Nun wurde das Gewebe nach Zugabe von wenig sterilem Seesand und einem sterilen Pistill (Artikelnr. 410-9131, Fa. VWR International) homogenisiert. Danach wurde das Pistill mit 500 µl der Phosphatpufferlösung über dem Mörser abgespült, um anhaftende Gewebepartikel zu entfernen. Jetzt wurde der Mörserinhalt mit der Pasteurpipette wieder in das 15 ml Falcon-

Röhrchen überführt und der Mörser dann mit 500 µl Phosphatpufferlösung ausgespült und diese Spüllösung dann ebenfalls in das Falcon-Röhrchen überführt. Danach wurden die Falcon-Röhrchen in der Zentrifuge (Typ Multifuge 1 S-R, Fa. Heraeus Instruments) bei 10.000xg für 10 min zentrifugiert (Bull et al., 2003). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 750 µl steriler 0,9 %iger NaCl resuspendiert.

### **3.7.3 Anzucht von MAP aus den Organproben von zwei Kühen auf Herrold's Egg Yolk-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV**

Zur Anzucht von MAP aus den Organproben wurden jeweils 250 µl der Suspension auf HEYM-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV überführt. Da von jeder Organprobe zwei Portionen zu jeweils ca. 50 mg verwendet wurden, lag von jeder Organprobe ein Doppelsatz auf HEYM vor. Die Bebrütung und das weitere Vorgehen entsprachen dem unter 3.4.2 beschriebenen Verfahren.

### **3.7.4 Anzucht von MAP aus den Organproben von zwei Kühen in Mycobacteria Growth Indicator Tubes mit OADC, PANTA und Mycobactin J**

#### Zusammensetzung des Nährmediums:

Das BD BBL™ MGIT™-Indikatorröhrchen (Artikelnr. 245113, Fa. Becton Dickinson GmbH) enthält 110 µl Fluoreszenzindikator (enthält Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Rutheniumchlorid in Silikonkautschuk-Basis) und 4 ml Bouillon.

Ungefähre Zusammensetzung pro Liter Aqua dest.:

- 5,9 g Modifizierte Middlebrook 7H9 Bouillonbasis
- 1,25 g Casein-Pepton

Das BD BBL™ MGIT™ OADC (Artikelnr. 245116, Fa. Becton Dickinson GmbH) enthält 15 ml Middlebrook OADC-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung pro Liter Aqua dest.:

- 50,0 g Rinderalbumin
- 20,0 g Dextrose

- 0,03 g Katalase
- 0,6 g Ölsäure

Das BD BBL™ MGIT™ PANTA™-Fläschchen enthält ein lyophilisiertes Gemisch an Bakteriostatika. Zur Rekonstitution wird ein Fläschchen mit 3 ml sterilisiertem und deionisiertem Wasser versetzt.

Ungefähre Zusammensetzung pro Fläschchen lyophilisiertem PANTA:

- 6.000 Einheiten Polymyxin B
- 600 µg Amphotericin B
- 2.400 µg Nalidixinsäure
- 600 µg Trimethoprim
- 600 µg Azlocillin

Mycobactin J wurde von der Fa. Synbiotics Europe SAS bezogen (Artikelnr. 112407).

Die MGIT-Flüssignährmedien wurden mit jeweils 0,5 ml OADC, 0,1 ml PANTA und 9,42 µl Mycobaction J versetzt. Ölsäure wird von Tuberkelbazillen verwertet und spielt beim Stoffwechsel von Mycobacterien eine wichtige Rolle. Albumin agiert als Schutzmittel und verbessert die Isolierung von *Mycobacterium*-Spezies, indem es freie Fettsäuren bindet, die für diese toxisch sein können. Dextrose dient als Energiequelle und Katalase zerstört eventuell im Medium vorkommende toxische Peroxide. Durch das antibiotische und antimykotische Gemisch PANTA soll die mikrobielle Begleitflora unterdrückt werden.

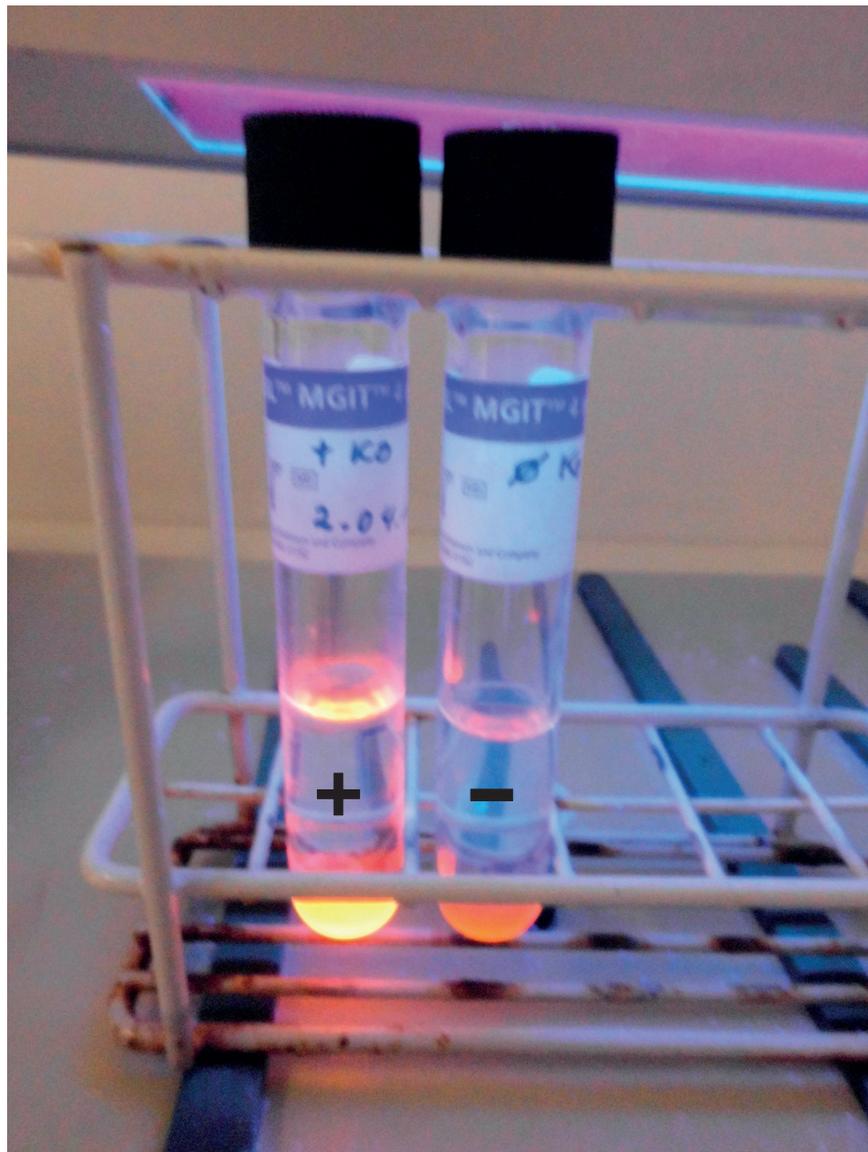
Die Nährmedien sowie die Zusätze OADC und PANTA wurden gemäß Herstellervorgaben gelagert und innerhalb des angegebenen Verbrauchszeitraums verwendet.

#### Inokulation und Bebrütung:

Es wurden jeweils 500 µl der mit NALC-NaOH dekontaminierten Lösung zu den supplementierten MGIT's zugegeben und anschließend gründlich mit dem Vortex-Schüttler gemischt. So erhielt man auch bei den MGIT's für jede Organprobe einen Doppelansatz. Es erfolgte eine 12-wöchige Bebrütung bei 37 °C in senkrechter Stellung und vollständig verschlossenem Schraubdeckel. Die Flüssigmedien wurden wöchentlich mit einer UV-Lampe bei 365 nm auf Fluoreszenz überprüft. Eine Fluoreszenz in der am

Röhrchenboden in Silikon eingebetteten fluoreszierenden Verbindung kommt durch den Sauerstoffverbrauch von aktiv respirierenden Mikroorganismen zustande. Gemäß Herstellervorgaben wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt (siehe Abb.5).

Bei positiver Fluoreszenzkontrolle bzw. nach 12 Wochen Bebrütung wurden die MGIT-Flüssigmedien mittels Triplex Real-time PCR auf MAP-Wachstum überprüft.



*Abbildung 5: Vergleich der Positivkontrolle (links) und der Negativkontrolle (rechts) der Mycobacteria Growth Indicator Tubes unter der UV-Lampe bei 365 nm*

### 3.7.5 Extraktionsverfahren für genomische MAP-DNS aus den MGIT-Flüssignährmedien

#### Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- Dneasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Mini Kit, Artikelnr. 69504, Fa. Qiagen
- Nuklease-freies Wasser, Artikelnr. 129115, Fa. Qiagen
- enzymatischer Lysispuffer für Gram-positive Bakterien (Herstellung nach Vorschrift von Fa. Qiagen)
- Lysozym (100000 U/mg), Artikelnr. 1.05281.0010, Fa. VWR International GmbH
- Ethanol ROTISOLV<sup>®</sup> HPLC, Artikelnr. P076.1, Fa. Roth

Die Isolierung der genomischen DNS von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus den MGIT-Flüssignährmedien erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Dneasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Mini Kits der Fa. Qiagen, entweder nach positiver Fluoreszenzkontrolle oder nach 12 Wochen Bebrütungsdauer bei 37 °C.

Vor Beginn der folgenden Arbeiten wurden die Arbeitsflächen gereinigt und desinfiziert und anschließend eine evtl. vorhandene DNS-Kontamination mit DNA-Away der Fa. Roth beseitigt.

Zunächst wurde jeweils 1 ml des Flüssigmediums in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und für 10 min bei 5.000xg zentrifugiert. Es wurde für alle Zentrifugationsschritte stets die Tischzentrifuge Typ 5415C (Fa. Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH) verwendet. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die Pellets wurden danach jeweils in 1 ml Nuclease-freiem Wasser resuspendiert und für 5 min bei 5.000xg erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und verworfen. Nun wurden die Pellets in 180 µl Lysispuffer aufgenommen und resuspendiert. Danach wurde gründlich mit dem Vortex-Schüttler gemischt und die Gefäße anschließend für mindestens 1,5 h bei 37 °C im Thermomixer (Fa. Eppendorf AG) unter leichtem Schütteln (750 rpm) inkubiert. Danach wurde nochmals gründlich gemischt (Vortex-Schüttler) und kurz anzentrifugiert, um evtl. am Gefäßdeckel anhaftende Tröpfchen zu entfernen. Anschließend wurden 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL zugegeben und wieder gemischt. Jetzt wurde für 1,5 bis 3 h bei 56 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert und danach auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Zur Inaktivierung von evtl. noch nicht vollständig lysierten Mycobakterien wurden die Proben nun für 15 min bei 95-96 °C im Thermomixer unter

leichtem Schütteln erhitzt, dann wieder gründlich geschüttelt (Vortex-Schüttler) und nach Abkühlung auf Raumtemperatur aus o. g. Gründen kurz anzentrifugiert. Im Anschluss daran wurden jeweils 200 µl Ethanol (96-100 %) hinzugegeben, gemischt und kurz anzentrifugiert. Jetzt wurde die gesamte Flüssigkeit jeweils in eine QIAmp spin Säule, welche zuvor in ein Sammelgefäß gesetzt wurde, überführt und für 1 min bei 6.000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Nun wurden jeweils 500 µl des Puffers AW 1 auf die Säulen gegeben und dann für 1 min bei 6.000xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Jetzt wurden jeweils 500 µl des Puffers AW 2 auf die Säule gegeben und anschließend für 3 min bei maximaler Umdrehungszahl (20.000xg) zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule erneut in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Zur vollständigen Entfernung evtl. noch vorhandener Restflüssigkeit in der Säule wurde nochmal bei maximaler Umdrehungszahl für 1 min zentrifugiert. Jetzt wurden die Säulen für die Elution in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gesetzt und jeweils 100 µl AE-Puffer direkt auf den Filter der Säule pipettiert und nun für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde für 1 min bei 6.000xg zentrifugiert. Das so aufgefangene Eluat enthält vorhandene DNS; es wurde bis zur Untersuchung mittels Triplex Real-Time PCR im Kühlschrank bei +2 bis +8 °C gelagert. Der molekularbiologische Nachweis entspricht dem unter 3.5.3 beschriebenen Verfahren.

### **3.7.6 Extraktionsverfahren für genomische MAP-DNS aus Gewebe**

Die Isolierung der genomischen DNS von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus dem bovinen Gewebe erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Dneasy® Blood & Tissue Mini Kits der Fa. Qiagen. Die verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind unter 3.7.5 bereits gelistet. Die DNS-Isolierung erfolgte am Morgen nach der Organprobenentnahme am Schlachthof.

Vor Beginn der folgenden Arbeiten wurden die Arbeitsflächen gereinigt und desinfiziert und anschließend eine evtl. vorhandene DNS-Kontamination mit DNA-Away der Fa. Roth beseitigt.

Die Gewebeproben wurden zunächst in sterilen Petrischalen mit sterilen Einmalskalpellen so lange zerkleinert, bis sie eine breiige, homogene Konsistenz hatten.

Für den Doppelansatz wurden jeweils 50 mg Gewebe in ein 2 ml Lysing-Tube (mit

SiLibeads<sup>®</sup> (Keramikkügelchen), Typ ZY 1,4-1,6mm, Fa. Sigmund Lindner) mit Hilfe einer geeichten elektronische Analyse- und Präzisionswaage (Typ BA 210 S-OD1/MCBB 100, Fa. Sartorius AG) abgewogen. Von dem sehr zellreichen Milzgewebe wurden nur 20 mg für den Doppelansatz abgewogen. Danach erfolgte die Zugabe von 300 µg TE-Puffer (Lysispuffer ohne Triton, um einer Schaumbildung bei der mechanischen Homogenisation im Ribolyser vorzubeugen). Nun erfolgte der mechanische Aufschluss im Zell-Homogenisator („Ribolyser“), Typ Precellys 24 der Fa. Bertin Technologies mit der Einstellung 2 x Stufe 5500 je 20 s (mit 60 s Pause dazwischen). Jetzt wurden jeweils 60 µl Lysispuffer (6-fach Tritonpuffer mit Lysozym) hinzugegeben, im Vortex-Schüttler gemischt und im Thermomixer über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden 50 µl Proteinase K und 400 µl Puffer AL hineinpipettiert und gründlich mit dem Vortex-Schüttler gemischt. Jetzt wurde im Thermomixer bei 56 °C für 1,5 bis 2 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Inaktivierung von evtl. nicht vollständig lysierten Mycobakterien im Thermomixer für 15 min unter leichtem Schütteln auf 95 bis 96 °C erhitzt. Nun wurden jeweils 400 µl absolutes Ethanol (96 bis 100 %) zugegeben und gründlich auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Anschließend wurde die Flüssigkeit aufgeteilt (Doppelansatz) und jeweils 600 µl in eine QIAmp spin Säule in einem Sammelgefäß überführt und der Rest ebenfalls in eine weitere QIAmp spin Säule (im Sammelgefäß) überführt. Es wurde für alle folgenden Zentrifugationsschritte stets die Tischzentrifuge, Typ 5415C (Fa. Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH) verwendet. Jetzt wurde für 1 min bei 6000 xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Ab jetzt wurde analog zu dem in 3.7.5 beschriebenen Extraktionsverfahren weitergearbeitet (Zugabe von jeweils 500 µl Puffer AW 1 usw.). Das so am Ende aufgefangene Eluat enthält vorhandene DNS; es wurde bis zur Untersuchung mittels Triplex Real-Time PCR im Kühlschrank bei +2 bis +8 °C gelagert. Der molekularbiologische Nachweis entspricht dem unter 3.5.3 beschriebenen Verfahren.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung sowie der grobsinnlichen Kotbeurteilung**

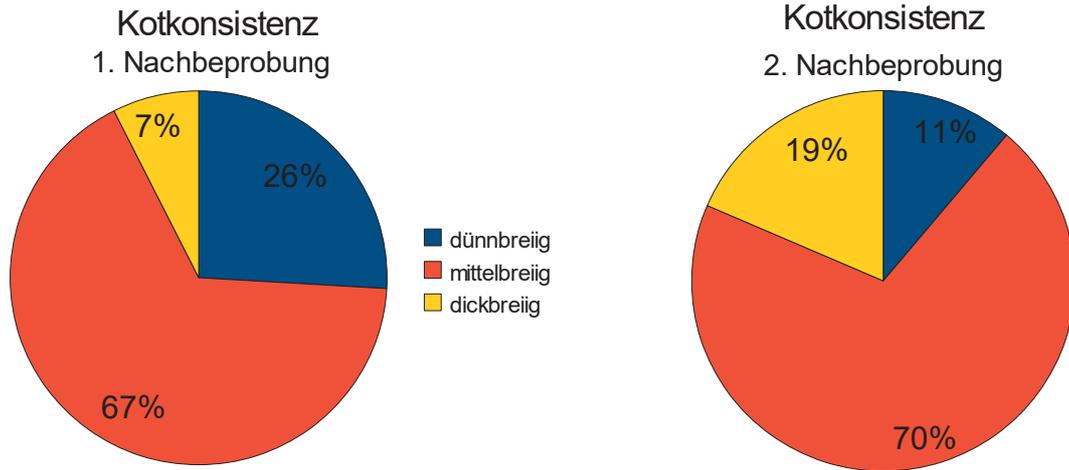
Der Ernährungszustand (Body Condition Score, BCS) der 27 noch zur Verfügung stehenden Kühe wurde bei der 1. Nachbeprobung mit durchschnittlich (arithmetischer Mittelwert) 3,15 beurteilt. Der niedrigste BCS lag bei 2,50 und der höchste bei 3,75. Bei der 2. Nachbeprobung lag der Durchschnittswert bei 3,20, bei einer Spannweite von 2,50 bis 3,75 (Tab. 15 und Tab. 16 im Anhang). Die bei den Erst- oder den beiden Nachbeprobungen MAP-positiven Tiere hatten BCS-Werte zwischen 2,75 und 3,75.

Die durchschnittliche Herzfrequenz lag bei der 1. Nachbeprobung bei 80,6 / min, bei einer Spannweite von 52 / min bis 124 / min. Bei der 2. Nachbeprobung lag diese bei 79,6 / min, bei einer Spannweite von 64 / min bis 104 / min.

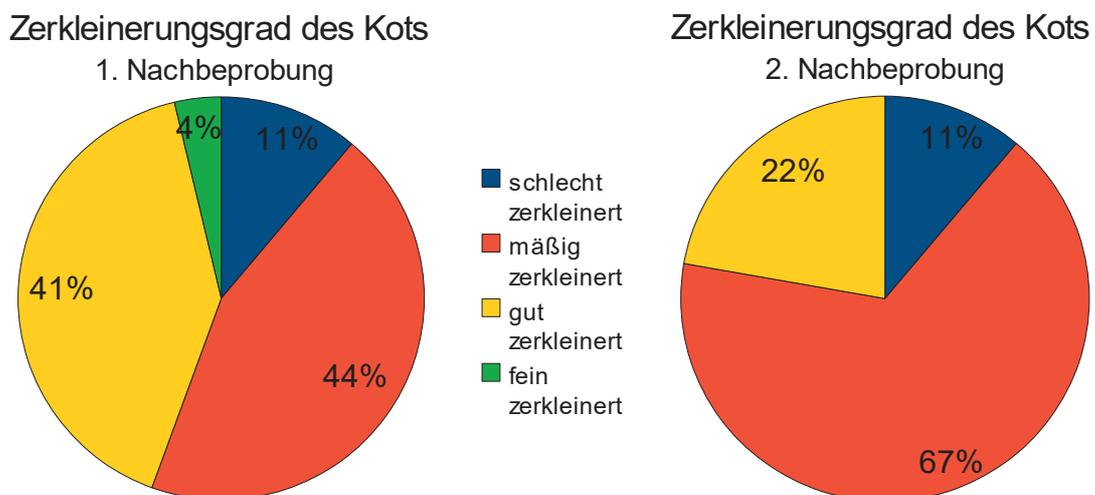
Die durchschnittliche Atemfrequenz betrug bei der 1. Nachbeprobung 33,2 / min, bei einer Spannweite von 24 / min bis 52 / min. Bei der 2. Nachbeprobung lag sie bei 35,0 / min, bei einer Spannweite von 28 / min bis 44 / min.

Die durchschnittlich festgestellte Rektaltemperatur der Probanden lag bei der 1. Nachbeprobung bei 38,4 °C und bei der 2. Nachbeprobung ebenfalls bei 38,4 °C. Insgesamt bewegte sich die Rektaltemperatur zu den beiden Messzeitpunkten zwischen 38,0 °C und 39,0 °C.

Die Kotkonsistenz war bei der 1. Nachbeprobung bei 7 Probanden (25,9 %) dünnbreiig, bei 18 Probanden (66,7 %) mittelbreiig und bei 2 Probanden (7,4 %) dickbreiig. Bei der 2. Nachbeprobung war die Kotkonsistenz bei 3 Probanden (11,1 %) dünnbreiig, bei 19 Probanden (70,4 %) mittelbreiig und bei 5 Probanden (18,5 %) dickbreiig. Die Kotkonsistenz der fünf in einer der Untersuchungen als MAP-positiv eingestuftten Kühe war bei der 1. Nachbeprobung bei 2 Probanden (40 %) dünnbreiig und bei 3 Probanden (60 %) mittelbreiig. Bei der 2. Nachbeprobung war die Kotkonsistenz bei 3 Probanden (60 %) mittelbreiig und bei 2 Probanden (40 %) dickbreiig.



Bei der 1. Nachbeprobung wurde der Zerkleinerungsgrad des Kotes bei 3 Kühen (11,1 %) als "schlecht zerkleinert" (viele über 1 - 2 cm lange Partikel), bei 12 Kühen (44,4 %) als "mäßig zerkleinert" (reichlich bis zu 0,5 cm lange Pflanzenfasern), bei 11 Kühen (40,7 %) als "gut zerkleinert" (Zerkleinerung deutlich feiner als diejenige bei mäßig verdauten Darmausscheidungen) und bei einer Kuh (3,7 %) als "fein zerkleinert" (nahezu ohne erkennbare Partikel) bewertet. Bei der 2. Nachbeprobung war der Zerkleinerungsgrad des Kotes bei 3 Kühen (11,1 %) "schlecht zerkleinert", bei 18 Kühen (66,7 %) "mäßig zerkleinert" und bei 6 Kühen (22,2 %) "gut zerkleinert".



Der Geruch des Kotes war stets physiologisch, in wenigen Einzelfällen auch leicht muffig (siehe Tab. im Anhang).

Beimengungen im Kot, wie Schleim, Fibrin, Blut, Gasblasen oder Sonstiges, waren bei beiden Nachbeprobungen bei keinem der Probanden festzustellen.

Die genauen Daten zu den einzelnen Tieren sind den beiden Tabellen im Anhang zu entnehmen.

## 4.2 Ergebnisse der kulturellen Untersuchung auf MAP

In keiner einzigen der anlässlich der 1. Nachbeprobung entnommenen Kotproben konnte nach 12 wöchiger Bebrütungsdauer bei 37 °C auf Herrold's Egg Yolk Schrägagar im Dreifachansatz (A, B, C) MAP angezüchtet werden. Bei manchen Ansätzen zeigten sich Kontaminationen mit Hefe- oder Schimmelpilzkolonien (siehe Tab. 6).

*Tabelle 6: Ergebnisse der kulturellen Kotuntersuchung bei der 1. Nachbeprobung*

Betrieb-Nr.	QS-Nr.	Anzahl gewachsener MAP-Kolonien bei 1. Nachbeprobung	Kontaminationen
1	1	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie
1	2	kein Wachstum	keine
2	3	kein Wachstum	B: 3 Bakterien-Kolonien
2	4	kein Wachstum	keine
2	5	kein Wachstum	keine
3	8	kein Wachstum	keine
3	17	kein Wachstum	C: 1 Hefe-Kolonie
3	18	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie / B: 1 SP-Kolonie / C: 1 Hefe-Kolonie
3	19	kein Wachstum	keine
3	38	kein Wachstum	A: 1 Hefe-Kolonie
3	40	kein Wachstum	A: 1 Hefe-Kolonie
4	10	kein Wachstum	A: mit Schimmel überwuchert
5	13	kein Wachstum	keine
5	14	kein Wachstum	keine
5	15	kein Wachstum	keine
5	28	kein Wachstum	keine
6	20	kein Wachstum	keine
6	21	kein Wachstum	keine
7	25	kein Wachstum	B: 4 Hefe-Kolonien
7	26	kein Wachstum	B: 1 Hefe-Kolonie
7	27	kein Wachstum	C: 1 SP-Kolonie
7	45	kein Wachstum	A: 1 Hefe-Kolonie / C: 3 Hefe-Kolonien
9	31	kein Wachstum	A: 3 SP-Kolonien / B: 2 SP-Kolonien / C: 1 SP-Kolonie
9	32	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie / B: 1 SP-Kolonie
10	34	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie / C: 1 SP-Kolonie
10	46	kein Wachstum	keine
11	35	kein Wachstum	keine

Alle Proben wurden im Dreifachansatz auf HEYM angelegt (A, B, C)

SP: Schimmelpilz

QS-Nr.: Nummer des jeweiligen Probanden aus der früheren Querschnittstudie

Bei der 2. Nachbeprobung konnte MAP bei den Tieren Nr. 8 und Nr. 18 nachgewiesen werden, welche beide aus dem selben Betrieb stammten (Betrieb Nr. 3).

Bei Tier Nr. 8 zeigte sich im Ansatz A kein Wachstum. Im Ansatz B fand sich eine MAP-Kolonie und im Ansatz C entwickelten sich zwei MAP-Kolonien.

Bei Tier Nr. 18 fanden sich in Ansatz A und B jeweils eine MAP-Kolonie, in Ansatz C zeigte sich jedoch kein MAP-Wachstum.

Bei allen anderen Tieren gelang keine Anzucht von MAP. Auf einigen Herrold's - Egg - Yolk - Schrägagarmedien fanden sich Kontaminationen durch Hefe- und Schimmelpilzkolonien sowie durch Bakterien (siehe Tab. 7).

*Tabelle 7: Ergebnisse der kulturellen Kotuntersuchung bei der 2. Nachbeprobung*

Betrieb-Nr.	QS-Nr.	Anzahl gewachsener MAP-Kolonien bei 2. Nachbeprobung	Kontaminationen
1	1	kein Wachstum	keine
1	2	kein Wachstum	C: 1 SP-Kolonie
2	3	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie
2	4	kein Wachstum	keine
2	5	kein Wachstum	A: mit Schimmel überwuchert
3	8	0 / 1 / 2	B: 1 SP-Kolonie / C: 1 SP-Kolonie
3	17	kein Wachstum	B: 2 Hefe-Kolonien
3	18	1 / 1 / 0	A: 1 SP-Kolonie / C: 1 SP-Kolonie
3	19	kein Wachstum	A: 2 SP-Kolonien / B: 2 SP-Kolonien / C: 1 SP-Kolonie
3	38	kein Wachstum	A: mit Schimmel überwuchert / B: 1 SP-Kolonie / C: 1 SP-Kolonie
3	40	kein Wachstum	A: mit Schimmel überwuchert / B: 1 SP-Kolonie / C: 1 SP-Kolonie
4	10	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie und 19 Bakterien-Kolonien/ B: 1 SP-Kolonie / C: mit Schimmel überwuchert
5	13	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie / C: 1 SP-Kolonie
5	14	kein Wachstum	keine
5	15	kein Wachstum	C: 1 SP-Kolonie
5	28	kein Wachstum	keine
6	20	kein Wachstum	keine
6	21	kein Wachstum	keine
7	25	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie / B: mit Schimmel überwuchert
7	26	kein Wachstum	A: 2 SP-Kolonien / B: 3 SP-Kolonien / C: 1 SP-Kolonie
7	27	kein Wachstum	A: mit Schimmel überwuchert
7	45	kein Wachstum	A: mit Schimmel überwuchert / B: 1 SP-Kolonie
9	31	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie / B: 1 SP-Kolonie
9	32	kein Wachstum	keine
10	34	kein Wachstum	keine
10	46	kein Wachstum	keine
11	35	kein Wachstum	C: 1 Hefe-Kolonie

Alle Proben wurden im Dreifachansatz auf HEYM angelegt (A, B, C)

SP: Schimmelpilz

QS-Nr.: Nummer des jeweiligen Probanden aus der früheren Querschnittstudie

### 4.3 Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion

Bei der 1. Nachbeprobung war der MAP-Marker F57 in keiner der Kotproben detektierbar; der Ct-Wert lag stets über 40, so dass alle Proben als negativ zu werten waren (siehe 3.5.7). Gleiches galt bezüglich des MAP-Markers ISMav2. Bei der Kotprobe von Tier-Nr. 20 war eine 1:2 Verdünnung notwendig, da der Ct-Wert der internen Amplifikationskontrolle (IAK) nicht zwischen 30 und 35 lag und somit davon auszugehen war, dass in der Probe Hemmstoffe enthalten waren, welche zu falsch-negativen Ergebnissen führen können (siehe 3.5.6).

*Tabelle 8: Ergebnisse des molekularbiologischen MAP-Nachweises in den Kotproben mittels Triplex Real-time-PCR bei der 1. Nachbeprobung*

Betrieb-Nr.	QS-Nr.	Marker F57 (Ct-Werte)	Marker ISMav2 (Ct-Werte)	Verdünnung (auf Grund von Hemmungen)
1	1	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
1	2	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
2	3	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
2	4	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
2	5	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	8	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	17	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	18	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	19	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	38	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	40	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
4	10	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
5	13	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
5	14	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
5	15	n. d. / 41,69	n. d. / n. d.	nein
5	28	42,16 / n. d.	n. d. / n. d.	nein
6	20	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1:2
6	21	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	25	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	26	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	27	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	45	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
9	31	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
9	32	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
10	34	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
10	46	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
11	35	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein

n. d.: nicht detektiert

QS-Nr.: Nummer des jeweiligen Probanden aus der früheren Querschnittstudie

Bei der 2. Nachbeprobung lag der Ct-Wert des MAP-Markers ISMav2 bei einem Ansatz von Tier-Nr. 8 bei 38,37 und somit im fraglichen Bereich (siehe 3.5.7). In dem anderen Ansatz war ISMav2 nicht detektierbar. Der Marker F57 war im Kot dieses Tieres jedoch in keinem der beiden Ansätze nachweisbar.

Bei Tier-Nr. 18 lag der Ct-Wert für F57 in einem Ansatz bei 37,38 und war somit ebenfalls als fraglich einzustufen. In dem anderen Ansatz war F57 nicht nachweisbar, und auch ISMav2 war in keinem der beiden Ansätze nachweisbar.

Bei allen anderen Tieren waren weder der MAP-Marker F57 noch ISMav2 detektierbar, bzw. der Ct-Wert lag über 40, so dass diese Proben alle als negativ zu bewerten waren.

*Tabelle 9: Ergebnisse des molekularbiologischen MAP-Nachweises in den Kotproben mittels Triplex Real-time-PCR bei der 2. Nachbeprobung*

Betrieb-Nr.	QS-Nr.	Marker F57 (Ct-Werte)	Marker ISMav2 (Ct-Werte)	Verdünnung (auf Grund von Hemmungen)
1	1	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
1	2	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
2	3	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
2	4	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
2	5	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	8	n. d. / n. d.	n. d. / 38,37	nein
3	17	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	18	n. d. / 37,38	n. d. / n. d.	nein
3	19	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	38	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
3	40	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
4	10	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
5	13	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
5	14	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
5	15	40,20 / 40,61	n. d. / n. d.	nein
5	28	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
6	20	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
6	21	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	25	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	26	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	27	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
7	45	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
9	31	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
9	32	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
10	34	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
10	46	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
11	35	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein

n. d.: nicht detektiert

QS-Nr.: Nummer des jeweiligen Probanden aus der früheren Querschnittstudie

#### 4.4 Ergebnisse des Nachweises von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum mit Hilfe des Pourquier®-ELISA

Bis auf eine Ausnahme lag der Titer der MAP-spezifischen Antikörper sowohl bei der 1. als auch bei der 2. Nachbeprobung bei allen Proben unter 45 %. Deshalb waren diese Tiere in diesem indirekten Nachweisverfahren als MAP-negativ zu bewerten (siehe 3.6). Lediglich Tier-Nr. 46 hatte bei der 2. Nachbeprobung einen Titer von 54,2 und somit ein fragliches Ergebnis.

*Tabelle 10: Ergebnisse des Nachweises von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum mit Hilfe des Pourquier-ELISA*

Betrieb-Nr.	QS-Nr.	S/P in % (1. Nachbeprobung)	S/P in % (2. Nachbeprobung)
1	1	-13,6	-7,3
1	2	-4,9	-13,8
2	3	-5,1	-0,8
2	4	5,1	-13,6
2	5	-16,8	-9,7
3	8	-8,5	-16
3	17	-16,4	-13,2
3	18	6,3	-17,6
3	19	-13,8	-6,1
3	38	-16,6	-22,3
3	40	-18,6	-10,3
4	10	-22,5	-11,5
5	13	-4,3	-2,2
5	14	-2,8	-9,5
5	15	-8,5	-17
5	28	-18,8	-17,2
6	20	-15	-12,3
6	21	-3,8	4,2
7	25	-20,8	-16
7	26	-16,2	-7,9
7	27	-16,6	-16,2
7	45	-14,8	-18
9	31	-17,8	-19,6
9	32	-23,3	-17,6
10	34	-19,4	-23,7
10	46	-22,3	54,2
11	35	-7,1	-20,2

QS-Nr.: Nummer des jeweiligen Probanden aus der früheren Querschnittstudie

#### 4.5.1 Ergebnisse der Anzüchtung von MAP aus Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen auf Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV

Bei Tier Nr. 3 (QS 3) konnte MAP mittels kultureller Anzüchtung auf HEYM mit Zusatz von Mycobactin J und ANV im Kot, im Darminhalt des Ileums sowie im Ileozaekallymphknoten, im Ileum und in der Ileozaekalklappe nachgewiesen werden. Im Colon sowie in dessen Inhalt, in der Milz und in der Tonsille konnte MAP bei diesem Tier jedoch nicht angezüchtet werden.

Bei Tier Nr. 4 (QS 4) war eine Anzucht von MAP in keiner der o. g. Proben möglich. Die Anzahl der jeweils gewachsenen Kolonien sowie evtl. vorhandene Kontaminationen sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

*Tabelle 11: Ergebnisse der kulturellen MAP-Anzucht auf HEYM aus Kot, Darminhalt und Organproben der beiden geschlachteten Kühe*

Probenbezeichnung	Anzahl gewachsener MAP-Kolonien	Kontaminationen
QS 3 Kot	1 / 0 / 2	keine
QS 3 Darminhalt Ileum	1 / 6 / 4	keine
QS 3 Darminhalt Colon	kein Wachstum	keine
QS 3 Ileozaekallymphknoten	Rasenwachstum / Rasenwachstum	keine
QS 3 Jejunalymphknoten	kein Wachstum	keine
QS 3 Ileum	15 / Rasenwachstum	keine
QS 3 Ileozaekalklappe	30 / Rasenwachstum	keine
QS 3 Colon	kein Wachstum	keine
QS 3 Milz	kein Wachstum	keine
QS 3 Tonsille	kein Wachstum	keine
QS 4 Kot	kein Wachstum	A: 1 SP-Kolonie / B: mit Schimmel überwuchert
QS 4 Darminhalt Ileum	kein Wachstum	keine
QS 4 Darminhalt Colon	kein Wachstum	keine
QS 4 Ileozaekallymphknoten	kein Wachstum	keine
QS 4 Jejunalymphknoten	kein Wachstum	keine
QS 4 Ileum	kein Wachstum	keine
QS 4 Ileozaekalklappe	kein Wachstum	keine
QS 4 Colon	kein Wachstum	keine
QS 4 Milz	kein Wachstum	keine
QS 4 Tonsille	kein Wachstum	keine

Kot und Darminhalt im Dreifachansatz angelegt, Gewebeproben im Doppelansatz angelegt  
 SP: Schimmelpilz

#### 4.5.2 Ergebnisse der Anzucht von MAP aus Organproben von zwei geschlachteten Kühen in Mycobacteria Growth Indicator Tubes mit OADC, PANTA und Mycobactin J

Bei Tier Nr. 3 (QS 3) war ein MAP-Wachstum nach Anzucht in MGIT's im Ileozäkallymphknoten, im Ileum, in der Ileozäkalklappe sowie im Colon mittels Triplex Real-time-PCR (nach Schönenbrücher et al., 2008) nachweisbar. Die DNS-Isolierung wurde aufgrund positiver Fluoreszenz bei 365 nm der Proben "Ileozäkallymphknoten", "Ileum" und "Ileozäkalklappe" nach 4 Wochen Bebrütung durchgeführt. Bei den restlichen Proben war über die gesamte 12-wöchige Bebrütungsdauer keine Fluoreszenz nachweisbar. Bei diesen Proben erfolgte die DNS-Isolierung nach 12 Wochen Bebrütung. Im Jejunallymphknoten, in der Milz und in der Tonsille konnte bei diesem Tier kein MAP nachgewiesen werden.

Bei Tier Nr. 4 ließ sich MAP nach 12-wöchiger Bebrütung in MGIT's nicht nachweisen.

*Tabelle 12: Ergebnisse der kulturellen Anzucht in MGIT's von Organproben der beiden geschlachteten Kühe*

Probenbezeichnung	MAP-Wachstum im MGIT mittels Triplex Real-time-PCR nachweisbar?	Fluoreszenz bei 365 nm nachweisbar? (nach wieviel Wochen?)
QS 3 Ileozäkallymphknoten	ja / ja	ja (4 Wochen) / ja (4 Wochen)
QS 3 Jejunallymphknoten	nein / nein	nein / nein
QS 3 Ileum	ja / ja	ja (3 Wochen) / ja (3 Wochen)
QS 3 Ileozäkalklappe	ja / ja	ja (4 Wochen) / ja (3 Wochen)
QS 3 Colon	ja / nein	nein / nein
QS 3 Milz	nein / nein	nein / nein
QS 3 Tonsille	nein / nein	nein / nein
QS 4 Ileozäkallymphknoten	nein / nein	nein / nein
QS 4 Jejunallymphknoten	nein / nein	nein / nein
QS 4 Ileum	nein / nein	nein / nein
QS 4 Ileozäkalklappe	nein / nein	nein / nein
QS 4 Colon	nein / nein	nein / nein
QS 4 Milz	nein / nein	nein / nein
QS 4 Tonsille	nein / nein	nein / nein

MGIT's wurden jeweils im Doppelansatz angelegt

### 4.5.3 Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion in Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachtete Kühen

Bei Tier Nr. 3 (QS 3) ließ sich MAP-DNS im Ileozäkallymphknoten (allerdings nur der MAP-Marker F57) nachweisen, nachdem eine 1 : 5 Verdünnung vorgenommen wurde, da es unverdünnt zu Hemmungen der PCR gekommen war. Im Ileum ließ sich MAP-DNS mit Hilfe der Marker F57 und ISMav2 nachweisen. Hier war ebenfalls eine 1 : 5 Verdünnung notwendig. In der Probe aus der Ileozäkalklappe kam es zu einem fraglichen Ergebnis, nachdem eine 1 : 10 Verdünnung vorgenommen wurde. Im Kot, im Darminhalt von Ileum und Colon, im Jejunallymphknoten, im Colon, in der Milz und in der Tonsille konnte MAP-DNS nicht nachgewiesen werden. Die Ct-Werte sowie die auf Grund von Hemmungen jeweils notwendigen Verdünnungen können Tabelle 13 entnommen werden.

Bei Tier Nr. 4 (QS 4) war MAP-DNS in keiner der o. g. Proben nachweisbar. Die Proben des Jejunallymphknoten waren bei diesem Tier nicht auswertbar, da es auch nach einer 1 : 10 Verdünnung zu Hemmungen der PCR gekommen war.

*Tabelle 13: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen von Proben aus den zwei geschlachteten Kühen mittels Triplex Real-time PCR*

Probenbezeichnung	Marker F57 (Ct-Werte)	Marker ISMav2 (Ct-Werte)	Verdünnung (auf Grund von Hemmungen)
QS 3 Kot	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
QS 3 Darminhalt Ileum	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
QS 3 Darminhalt Colon	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
QS 3 Ileozäkallymphknoten	35,86 / 35,83	n. d. / n. d.	1 : 5
QS 3 Jejunallymphknoten	n. a. / n. a.	n. a. / n. a.	1 : 10
QS 3 Ileum	31,55 / 31,51	36,34 / 36,20	1 : 5
QS 3 Ileozäkalklappe	38,29 / 38,22	39,65 / 44,85	1 : 10
QS 3 Colon	n. a. / n. d.	n. a. / n. d.	1 : 10
QS 3 Milz	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1 : 5
QS 3 Tonsille	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1 : 5
QS 4 Kot	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
QS 4 Darminhalt Ileum	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
QS 4 Darminhalt Colon	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	nein
QS 4 Ileozäkallymphknoten	n. a. / n. d.	n. a. / n. d.	1 : 10
QS 4 Jejunallymphknoten	n. a. / n. a.	n. a. / n. a.	1 : 10
QS 4 Ileum	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1 : 10
QS 4 Ileozäkalklappe	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1 : 10
QS 4 Colon	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1 : 10
QS 4 Milz	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1 : 5
QS 4 Tonsille	n. d. / n. d.	n. d. / n. d.	1 : 10

n. d.: nicht detektiert  
n. a.: nicht auswertbar

#### **4.5.4 Ergebnisse der serologischen Untersuchung mittels Pourquoi®-ELISA bei den zwei geschlachteten Kühe**

Der Titer für MAP-spezifische Antikörper lag einen Tag vor der Schlachtung bei Tier Nr. 3 bei 4,5 % und bei Tier Nr. 4 bei 9,4 %. Somit sind beide Tiere als serologisch negativ einzustufen (siehe 3.6).

#### **4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Bei Tier Nr. 3 konnte im Kälberalter MAP in der kulturellen Untersuchung sowie mittels Triplex Real-Time PCR nach Schönenbrücher et al. (2008) nachgewiesen werden. Bei beiden Nachbeprobungen war mit keiner der o. g. Methoden MAP in den Kotproben nachweisbar.

Bei Tier Nr. 4 verlief sowohl die PCR, die kulturelle Untersuchung, als auch der indirekte Nachweis mittels Pourquoi®-ELISA im Alter von ca. 100 Tagen positiv. Bei den Nachbeprobungen konnte MAP weder direkt im Kot noch indirekt nachgewiesen werden.

Bei Tier Nr. 5 gelang der Nachweis von MAP im Kälberalter mittels PCR, und das Tier war damals auch bei der serologischen Untersuchung positiv. Ein Nachweis von MAP mittels kultureller Untersuchung gelang damals nicht. Bei den Nachbeprobungen verliefen alle Untersuchungen bei diesem Tier negativ.

Tier Nr. 6, welches im Kälberalter ein fragliches Ergebnis in der PCR erzielt hatte, stand für die Nachuntersuchungen leider nicht mehr zur Verfügung.

Bei Tier Nr. 8 ergab im Kälberalter die PCR ein fragliches Ergebnis. Die kulturelle Anzucht gelang nicht und auch das Ergebnis der Serologie war negativ. Bei den Proben dieses Tieres gelang bei der 1. Nachbeprobung der MAP-Nachweis mit keiner der genannten Methoden. Bei der 2. Nachbeprobung konnte MAP mittels kultureller Anzucht auf HEYM im Kot nachgewiesen werden. Die PCR ergab ein fragliches Ergebnis.

Bei allen anderen Tieren der Studie verliefen die Untersuchungen im Alter von 100 (+/- 10) Lebenstagen mit den o.g. Methoden negativ.

Bei Tier Nr. 18 gelang bei der 2. Nachbeprobung der MAP-Nachweis im Kot mittels kultureller Untersuchung. Die Real-Time PCR ergab bei diesem Tier ein fragliches Ergebnis.

Bei Tier Nr. 46 lieferte die serologische Untersuchung bei der 2. Nachbeprobung ein

fragliches Ergebnis. Ein Nachweis von MAP mit den o. g. direkten Nachweisverfahren gelang nicht.

Bei allen anderen Kühen, welche für diese Studie noch zur Verfügung standen, konnte anlässlich beider Nachbeprobungen MAP weder direkt im Kot noch indirekt (Antikörper) nachgewiesen werden.

Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich in Tabelle 14.

Bei den Tieren Nr. 3 und Nr. 4 wurden anlässlich der Schlachtung Kot, Darminhalt und Organproben entnommen und untersucht. Bei Tier Nr. 3 ließ sich MAP in mehreren Proben (s. o.) sowohl kulturell (auf HEYM und in MGIT`s) als auch molekularbiologisch nachweisen. Ein Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum mittels Pourquier®-ELISA gelang jedoch nicht. Bei Tier Nr. 4 hingegen gelang der MAP-Nachweis in keiner der o. g. Proben.

Tabelle 14: Übersicht über die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen bei den noch zur Verfügung stehenden Probanden

Betriebs-Nr.	Tier-Nr.	Beprobung mit 100 Tagen			1. Nachbeprobung			2. Nachbeprobung		
		Real-Time PCR (Lnn.)	Lnn.-Kultur	Serologie	Real-Time PCR (Kot)	Kot-Kultur	Serologie	Real-Time PCR (Kot)	Kot-Kultur	Serologie
1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	5	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	8	(+)	-	-	-	-	-	(+)	+	-
4	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	18	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-
3	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	46	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)

- = negativ  
 (+) = fraglich  
 + = positiv

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Zur klinischen Allgemeinuntersuchung und grobsinnlichen Kotbeurteilung

Da die allgemeine klinische Untersuchung die Grundlage für das Stellen einer Diagnose und somit unabdingbar für die tierärztliche Tätigkeit ist, wurden anlässlich jeder Probenentnahme bei jedem Probanden die wichtigsten Befunde erhoben. Die Durchführung der allgemeinen klinischen Untersuchung sowie der grobsinnlichen Kotuntersuchung erfolgte entsprechend den Angaben in dem Lehrbuch von Dirksen et al. (1990): "Die klinische Untersuchung des Rindes". Auch die Referenzwerte wurden diesem Standardwerk entnommen.

Der Ernährungszustand, angegeben durch den Body Condition Score (BCS), lag bei den meisten Probanden in einem als physiologisch anzusehenden Bereich (siehe 4.1). Die wenigen Kühe mit einem BCS von 2,5 waren anlässlich der Beprobung im Kälberalter als MAP-negativ eingestuft worden, und auch bei den Nachbeprobungen hatte sich kein Hinweis auf eine solche Infektion ergeben. Zudem variierte die Körperkondition der untersuchten Kühe zwischen den beiden Nachbeprobungsterminen, so dass davon auszugehen ist, dass die beobachteten Änderungen auf andere Einflüsse zurückzuführen waren, wie etwa auf das jeweilige Laktationsstadium.

Die Herzfrequenz eines erwachsenen Rindes bewegt sich normalerweise zwischen 65 und 90 Schlägen / min. Die Durchschnittswerte für die Herzfrequenzen lagen mit 80,6 / min bzw. 79,6 / min bei den beiden Nachbeprobungen also im physiologischen Bereich. Die Spannweite betrug 52 bis 124 / min. Somit hatten manche Tiere eine Bradykardie und manche eine Tachykardie. Dies kann ein Hinweis auf das Vorliegen einer Krankheit sein, jedoch muss dabei bedacht werden, dass es auch natürliche interindividuelle Unterschiede gibt, welche nicht als pathologisch anzusehen sind. Außerdem steigt die Herzfrequenz bei Aufregung und Belastung an. Hierin liegt sehr wahrscheinlich auch die Ursache für die bei manchen Probanden festgestellte Tachykardie, da sie von einer für sie fremden Person untersucht wurden und dafür eine Fixierung bei den im Liegeboxenlaufstall gehaltenen Rindern (z. B. im Fressgitter) notwendig war. Die beiden Probanden in Betrieb Nr. 6 wurden in Anbindehaltung (Kurzstand) gehalten, sodass keine weitere Fixierung erforderlich war. Die Herzfrequenz lag bei diesen beiden Tieren stets im physiologischen Bereich. Ein deutlicher Unterschied zwischen den positiv bzw. negativ auf den

Paratuberkuloseerreger getesteten Probanden lag nicht vor.

Die normale Atemfrequenz des erwachsenen Rindes liegt bei 24 bis 36 Atemzügen / min. Sie ist starken individuellen Schwankungen (Bewegung, Aufregung) und umweltbedingten Einflüssen unterworfen, wobei vor allem die Lufttemperatur eine Rolle spielt. Die durchschnittliche Atemfrequenz lag bei 33,2 bzw. 35,0 / min bei den beiden Nachbeprobungen und somit im physiologischen Bereich. Die Spannweite betrug 24 bis 52 / min. Eine Bradypnoe lag also bei keinem der Probanden vor. Die gelegentlich erfasste Tachypnoe ist sehr wahrscheinlich durch Aufregung bedingt gewesen. Auch hier waren keine Unterschiede bezüglich des MAP-Status der Tiere zu erkennen.

Die rektal gemessene Körpertemperatur eines erwachsenen Rindes liegt physiologischerweise zwischen 38,0 und 39,0 °C. Die durchschnittlich gemessene Körpertemperatur lag bei beiden Nachbeprobungen bei 38,4 °C und somit im physiologischen Bereich. Die Spannweite bewegte sich an beiden Messzeitpunkten zwischen 38,0 °C und 39,0 °C. Somit hatte kein Proband eine Hypo- oder Hyperthermie.

Die allgemeine klinische Untersuchung ergab somit bei keinem Probanden Hinweise auf eine Allgemeininfektion.

Da die Paratuberkulose im klinischen Stadium mit Durchfall assoziiert ist (Klee, 2002) wurden auch die Kotkonsistenz, der Zerkleinerungsgrad des Kotes, dessen Geruch und eventuelle Beimengungen erfasst. Die normale Kotkonsistenz wiederkäuender Rinder ist mittelbreiig, was auch bei der überwiegenden Anzahl der Probanden der Fall war (siehe 4.1). Bei manchen Probanden war die Konsistenz auch dünnbreiig oder dickbreiig. Nachdem allerdings keine klinischen Hinweise auf eine Erkrankung vorlagen und die Konsistenz stark von der Fütterung und Wasseraufnahme abhängt, dürfte diesen Befunden keine pathologische Bedeutung zukommen. Dies kann man auch erkennen, wenn man die Kotkonsistenz der Tiere aus den unterschiedlichen Herkunftsbetrieben vergleicht (siehe Tab. 15 u. Tab. 16 im Anhang). Erwachsene Rinder sondern normalerweise "mäßig verdauten" Kot ab, in dem sich erkennbare Pflanzenfasern von bis zu 0,5 cm Länge befinden. Dies war bei dem überwiegenden Anteil der Probanden auch der Fall (siehe 4.1). Ein Unterschied zwischen den positiv bzw. negativ auf den Paratuberkuloseerreger getesteten Probanden war nicht zu erkennen.

Der Geruch des Kots war bei fast allen Probanden physiologisch, bis auf wenige Ausnahmen, wo er leicht muffig war. Diese geruchlichen Abweichungen waren jedoch nur geringgradig und vermutlich fütterungsbedingt.

Beimengungen im Kot, wie Schleim, Fibrin, Blut, Gasblasen oder Sonstiges waren bei

beiden Nachbeprobungen bei keinem der Probanden festzustellen. Gasblasen finden sich vor allem in den suppig-wässrigen Exkrementen von an Pararuberkulose erkrankten Rindern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zu keinem Untersuchungszeitpunkt und insbesondere auch nicht bei den in der Nachbeprobung MAP-positiven Probanden ein klinischer Hinweis auf eine Pararuberkuloseinfektion vorlag. Auch die Kotkonsistenz war unabhängig vom MAP-Status, bezogen auf die Ergebnisse der Erst- und der beiden Nachbeprobungen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass solche subklinischen MAP-Infektionen nur anhand eines Erregernachweises, gegebenenfalls auch mittels indirekter Nachweismethoden (Antikörper, Interferon- $\gamma$ -Reaktion) erkannt werden können.

## **5.2 Zur kulturellen Untersuchung auf MAP**

Die kulturelle Untersuchung der Rinderkotproben auf MAP erfolgte auf Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagar in Anlehnung an die AVID-Methode (AVID-Methodensammlung 2007) im Dreifachansatz. Der kulturelle Nachweis des Erregers in Verbindung mit molekularbiologischen Verfahren gilt derzeit als sicherste Methode zum Nachweis einer Infektion, da nach einer Infektion nicht in jedem Fall messbare Antikörper nachgewiesen werden können und somit die Sensitivität der derzeit verfügbaren ELISA-Methoden begrenzt ist. Aber auch der Nachweis des Erregers im Kot ist mit Unsicherheiten behaftet, da die Erregerausscheidung diskontinuierlich erfolgen kann (Chiodini et al., 1984; AVID-Methodensammlung, 2007). Um diese Unsicherheiten zu minimieren, erfolgte im Anschluss an die erste Nachbeprobung eine weitere Untersuchung im Abstand von drei Monaten. Dies erwies sich als sinnvoll, da bei der ersten Nachbeprobung bei keinem einzigen der 27 noch vorhandenen Probanden MAP im Kot nachweisbar war. Bei der zweiten Nachbeprobung war bei zwei Tieren (QS-Nr. 8 und 18) ein geringes MAP-Wachstum jeweils in zwei der drei Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagarröhrchen nachweisbar. Dies zeigt auch die Notwendigkeit der Anzüchtung im Dreifachansatz. Die in der AVID-Methodensammlung (2007) empfohlene Bebrütungsdauer für Rinderkotproben von 12 Wochen erwies sich als ausreichend lang, da sich nach einer weiteren Überprüfung der HEYM-Röhrchen auf Koloniewachstum nach 16 Wochen keine weiteren MAP-Kolonien entwickelt hatten. Aufgrund der geringen Anzahl gewachsener MAP-Kolonien bei der zweiten Nachbeprobung der Kühe QS-Nr. 8 und 18, welche beide aus dem selben Betrieb

stammten, ist es nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um falsch-positive Ergebnisse gehandelt haben könnte im Sinne einer "passageren" Erregerausscheidung (siehe auch 2.9.1.2). Nach Literaturangaben soll dieses Phänomen in Herden mit einer hohen Paratuberkuloseprävalenz auftreten, wobei sich bei einer solchen passageren Ausscheidung nur wenige Keime im Kot nachweisen lassen (Sweeney et al., 1992; Fecteau et al., 2010). In der Arbeit von Gilardoni et al. (2012) wird jedoch angemerkt, dass es sehr unwahrscheinlich sei, dass genug Erreger den kompletten Verdauungstrakt eines Wiederkäuers passieren können, ohne dabei abgebaut zu werden.

Bei QS-Nr. 18 hatten alle im Kälberalter durchgeführten Untersuchungen auf MAP zu einem negativen Ergebnis geführt. Dieses Tier hat sich also vermutlich, sofern es sich hierbei nicht um eine passagere MAP-Ausscheidung gehandelt hat (s. o.), erst nach dem 100. Lebenstag mit MAP infiziert. In einem Jejunallymphknoten von QS-Nr. 8 wurde im Kälberalter in der Triplex Real-time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008) MAP-DNS nachgewiesen, und auch in der 2. Nachuntersuchung fand sich dieser Erreger im Kot. Dieses Tier muss sich also vor dem 100. Lebenstag mit MAP infiziert haben.

Trotz Dekontamination der Rinderkotproben mittels N-Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) und den antibiotisch sowie antimykotisch wirksamen Zusätzen in HEYM zeigte sich relativ häufig eine Kontamination mit Schimmel- oder Hefepilzen wie auch mit anderen Bakterien (siehe 4.2) aufgrund der in dieser Matrix reichlich vorhandenen Begleitkeimflora, wie dies auch von Whittington (2009) beschrieben wurde. Die Entwicklung von effektiveren Methoden zur Dekontamination bzw. zur Unterdrückung der Begleitkeimflora wäre wünschenswert, zumal die derzeit verwendeten Verfahren auch die Anzahl von anzüchtbaren MAP verringern, was besonders bei Tieren mit nur geringer MAP-Ausscheidung von Bedeutung ist (Reddaclif et al., 2003).

### **5.3 Zum molekularbiologischen Nachweis von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion**

Der molekularbiologische Nachweis von MAP erfolgte mit der im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde entwickelten Triplex Real-time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008), welche stets im Doppelansatz durchgeführt wurde. Bei dieser kommen die MAP-Marker F57 und IS*Mav2* zum Einsatz, welche sich gut für den spezifischen MAP-Nachweis eignen (Poupart et al., 1993; Strommenger et al., 2001; Schönenbrücher et al.,

2008). Außerdem verfügt diese PCR über eine interne Amplifikationskontrolle zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse, was heutzutage für eine diagnostische PCR als zwingend notwendig angesehen wird (Stephan, 2007). Das modifizierte thermisch-chemisch-mechanische DNA-Extraktionsverfahren des High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche) unter Verwendung des S.T.A.R.-Buffers (Fa. Roche), welches sich schon in der Dissertation von Bulander (2009) dem Standardextraktionsverfahren als überlegen erwiesen hat, bewährte sich auch bei den jetzigen Untersuchungen. Bei der 1. Nachbeprobung war nur bei der Probe von QS-Nr. 20 eine 1:2 Verdünnung aufgrund von Hemmungen notwendig. Bei allen anderen Proben gelang es mit diesem DNA-Extraktionsverfahren, die im Rinderkot vorhandenen PCR-Inhibitoren weitgehend zu entfernen, was für die erfolgreiche Anwendung von PCR-basierten Methoden in hohem Maße ausschlaggebend ist (Harris u. Barletta, 2001).

Die Ergebnisse der Triplex Real-time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008) stimmen sehr gut mit denen der kulturellen Untersuchung auf HEYM mit Mycobactin J überein. Bei der 1. Nachbeprobung lag der Ct-Wert sowohl für F57 als auch für *ISMav2* stets über 40, so dass alle Proben als negativ zu werten waren. Die kulturelle Anzucht von MAP gelang hier ebenfalls bei keinem der Probanden. Bei der 2. Nachbeprobung lag der Ct-Wert für *ISMav2* bei QS-Nr. 8 bei einem der beiden Ansätze bei 38,37 und somit im fraglichen Bereich. Im anderen Ansatz war *ISMav2* nicht detektierbar. Der Marker F57 war bei diesem Tier nicht nachweisbar. In der Kotkultur auf HEYM mit Mycobactin J war bei QS-Nr. 8 ein geringes MAP-Wachstum festzustellen. Bei QS-Nr. 18, wo in der Kotkultur ebenfalls ein geringes MAP-Wachstum nachweisbar war, lag der Ct-Wert für F57 bei einem der beiden Ansätze bei 37,38 und somit ebenfalls im fraglichen Bereich. Im anderen Ansatz war F57 hier nicht detektierbar. *ISMav2* war bei diesem Tier ebenfalls nicht nachweisbar. Bei allen anderen Proben lag der Ct-Wert für die beiden hier verwendeten MAP-Marker stets über 40, sodass sie als negativ zu werten waren. Bei keiner der in dieser Real-time-PCR negativen Proben konnte der Erreger kulturell nachgewiesen werden.

Dies verdeutlicht sowohl die Notwendigkeit der Durchführung im Doppelansatz als auch die Sinnhaftigkeit der Verwendung von zwei verschiedenen MAP-Markern. Die theoretische Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund des DNA-Nachweises von "passagieren" Erregern besteht analog zur kulturellen Anzucht (siehe 5.2).

Ein großer Vorteil des molekularbiologischen MAP-Nachweises, im Gegensatz zur kulturellen Anzucht, ist das schnelle Vorliegen von Untersuchungsergebnissen.

#### **5.4 Zum Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum mit Hilfe des Pourquier®-ELISA**

Der Pourquier®-ELISA (Pourquier® ELISA Paratuberculosis Antibody Screening Testkit, Fa. Institut Pourquier, Montpellier, Frankreich) enthält einen Präabsorptionsschritt mit *M. phlei* zur Vermeidung von Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien. Bei der Untersuchung von bovinem Serum wird die Sensitivität mit 58,2 % und die Spezifität mit 99,0 % angegeben (Yokomizo et al., 1985; Collins et al., 1991; Friedrich-Löffler-Institut, 2012). Als Antigen wird ein protoplasmatischer Extrakt von MAP verwendet.

Bei QS-Nr. 4 und 5 wurden im Kälberalter mit diesem ELISA Antikörper gegen MAP nachgewiesen. Allerdings könnte es sich dabei auch noch um maternale Antikörper gehandelt haben, da eine ausgeprägte humorale Immunreaktion erst recht spät im Verlauf des Infektionsgeschehens auftreten soll (Klee, 2002). Im Rahmen des Innovationsprojekts über die "Frühdiagnostik von Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) bei Rindern" (BLE-Förderkennzeichen 28-1-32.006-06) gelang der Nachweis von maternalen Antikörpern bei Kälbern aus MAP-positiven Muttertieren bis zum 121. Lebenstag. In den beiden Nachbeprobungen ergab dieser ELISA bei allen Probanden stets ein negatives Testergebnis - ausgenommen die Kuh mit der QS-Nr. 46; hier lieferte der Test bei der 2. Nachbeprobung ein fragliches Ergebnis. Die Kühe QS-Nr. 8 und 18, bei denen bei der 2. Nachbeprobung ein MAP-Wachstum in der kulturellen Anzucht nachweisbar war - bei einem molekularbiologisch fraglichen Ergebnis - hatten offenbar noch nicht genügend im ELISA nachweisbare Antikörper gebildet. Eine Serokonversion, welche bei Rindern starken interindividuellen Schwankungen unterworfen ist, kann meist erst in einem Alter von ein bis drei Jahren nachgewiesen werden. Eine Ausscheidung von MAP ist aber bereits vorher möglich. Ein negativer Test darf daher nicht als Infektionsfreiheit interpretiert werden (Sorge, 2013; Sweeney et al., 2005; Sweeney et al., 2012).

Auch diese eigenen Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf (siehe 4.4), dass der ELISA für die Einzeltierdiagnostik nur sehr eingeschränkt geeignet ist (AVID-Methodensammlung, 2007). Dies trifft, aufgrund der späten Ausprägung einer Antikörperantwort im Rahmen von Paratuberkuloseinfektionen, insbesondere für jüngere Rinder zu. Die Interpretation der Ergebnisse muss immer auf Herdenebene erfolgen und es muss bedacht werden, dass ein positiver Antikörpernachweis auch bedeuten kann, dass das Tier mit dem Erreger infiziert war und ihn daraufhin evtl. wieder eliminiert hat. Eine

Infektion des Tieres zum Zeitpunkt der Probenentnahme muss also nicht zwingend vorliegen (Sorge, 2013). In der Literatur finden sich jedoch keine Quellen welche belegen, dass MAP-infizierte Rinder den Erreger wieder eliminieren können. Die serologische Bestandsuntersuchung ist für eine orientierende Einstufung von Beständen jedoch durchaus geeignet - vorausgesetzt, es werden alle Tiere über 24 Monate in die Untersuchung einbezogen. Aus einer einmaligen serologischen Bestandsuntersuchung kann im negativen Fall jedoch kein Bestandsstatus abgeleitet werden. Erst wiederholte serologische Untersuchungen, gegebenenfalls in Verbindung mit direkten Erregernachweisen, sind hinsichtlich des Bestandsstatus aussagekräftig (AVID-Methodensammlung, 2007).

### **5.5 Zur Anzüchtung von MAP aus Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen auf Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV**

Bei der Anzüchtung von MAP aus dem Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten, im Kälberalter MAP-positiven Kühen auf Herrold's-Egg-Yolk-Schrägagar (HEYM) mit Mycobactin J und ANV gelang bei QS-Nr. 3 der Nachweis im Kot, im Darminhalt des Ileums, im Ileozäkallymphknoten, im Ileum und in der Ileozäkalklappe. Bei der im Kälberalter MAP-positiven Kuh QS-Nr. 4 gelang die Anzucht von MAP aus keiner der entnommenen Proben (siehe 4.5.1).

Bei QS-Nr. 3 war MAP im Kälberalter sowohl mittels Triplex Real-time-PCR als auch mittels kultureller Untersuchung in den minimalinvasiv entnommenen Lymphknotenbiopsaten nachweisbar. Bei keiner der beiden Nachbeprobungen gelang der direkte oder indirekte Nachweis von MAP, jedoch in der einen Tag vor der Schlachtung entnommenen Kotprobe. Dies verdeutlicht, dass aus einem negativen Kotbefund nicht auf die Infektionsfreiheit eines Tieres geschlossen werden kann. In dem nach der Schachtung entnommenen Darminhalt aus dem Ileum dieses Probanden gelang die Anzucht ebenfalls, nicht jedoch im Darminhalt aus dem Colon. Dies zeigt, dass MAP nicht homogen im Darminhalt verteilt ist, sondern sich nesterartig zusammenlagert (siehe 2.2). Insbesondere der kulturelle Nachweis von MAP im Ileozäkallymphknoten gilt als Goldstandard in der Diagnostik (Klee, 2002). Dort gelang auch bei QS-Nr. 3 die Anzucht des Erregers, ebenso wie im Ileum und in der Ileozäkalklappe. Klinisch war dieses Tier zum Zeitpunkt der

Schlachtung unauffällig, was die Annahme bestätigt, dass klinisch auffällige Tiere nur die "Spitze des Eisbergs" darstellen (Fecteau u. Whitlock, 2010).

Da bei QS-Nr. 4 MAP im Kälberalter sowohl mittels kultureller Anzuchtung als auch mittels Triplex Real-time-PCR in den Lymphknotenbiopsaten nachweisbar war, jedoch weder bei den Nachbeprobungen im Kot und auch nicht in den im Rahmen der Schlachtung entnommenen Proben, kann vermutet werden, dass dieses Tier den Erreger wieder eliminiert hat.

In Anlehnung an das Protokoll von Füllgrabe (2009), welches sich auf die Dekontamination von humanen Darmbiopsaten bezieht, kam bei dem der Anzucht vorgeschalteten Dekontaminationsschritt N-Acetyl-L-Cystein (NALC) zum Einsatz, was sich bei den jetzigen Untersuchungen an bovinen Organproben auch gut bewährt hat. Bei der kulturellen Untersuchung der entnommenen Organproben gab es im Gegensatz zu den Kotproben keine Probleme mit Kontaminationen. Dies ist als Vorteil der Untersuchung dieser Matrices anzusehen.

### **5.6 Zur Anzucht von MAP aus den Organproben von zwei geschlachteten Kühen in Mycobacteria Growth Indicator Tubes mit OADC, PANTA und Mycobactin J**

Zusätzlich zu der Anzucht von MAP auf HEYM wurden die Organproben, welche im Rahmen der Schlachtung bei den Tieren QS-Nr. 3 und 4 entnommen wurden, auch im Doppelansatz in Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT's) angezchtet, welche mit OADC, PANTA und Mycobactin J (Fa. Becton Dickinson GmbH) supplementiert waren. Die Ergebnisse der Anzucht in diesem Flüssignährmedium stimmen gut mit denen der Anzucht auf HEYM überein (siehe 4.5.2). Zusätzlich zur Anzucht auf HEYM konnte in einem MGIT von QS-Nr. 3 MAP auch im Colon kulturell nachgewiesen werden. Als Vorteil der Anzucht von MAP in MGIT's ist das schnellere Wachstum anzusehen. Bei den Ansätzen aus den Ileozäkallymphknoten, dem Ileum und der Ileozäkalklappe von QS-Nr. 3 war bereits nach 3 bzw. 4 Wochen eine Fluoreszenz bei 365 nm nachweisbar, woraufhin diese Proben nach der DNS-Extraktion, welche nach einem modifizierten Protokoll des Dneasy® Blood & Tissue Mini Kits (Fa. Qiagen) durchgeführt wurde, mittels Triplex Real-time PCR auf MAP-Wachstum überprüft wurden.

Bei QS-Nr. 4 war auch bei der Anzucht in den MGIT's kein MAP nachweisbar.

### **5.7 Zum molekularbiologischen Nachweis von MAP mit Hilfe der Triplex Real-time-Polymerasekettenreaktion in Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen**

Der molekularbiologische Nachweis von MAP aus Organmaterial, Darminhalt und Kotproben von zwei geschlachteten Kühen erfolgte ebenfalls mittels Triplex Real-time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008; siehe auch 5.3). Die DNS-Extraktion erfolgte mittels eines modifizierten Protokolls des Dneasy® Blood & Tissue Mini Kits (Fa. Qiagen; siehe 3.7.6).

Bei QS-Nr. 4 war in keiner Probe der MAP-Marker F57 oder *ISMav2* detektierbar. Die beiden Ansätze aus dem Jejunallymphknoten und je ein Ansatz des Probenmaterials aus dem Ileozäkallymphknoten waren auf Grund von Hemmungen der PCR, trotz 1 : 10 Verdünnung, nicht auswertbar (siehe 4.5.3).

Bei QS-Nr. 3 waren die beiden Ansätze aus dem Jejunallymphknoten trotz 1: 10 Verdünnung ebenfalls nicht auswertbar. Auch in den Kot- und Darminhaltproben dieses Tieres waren die beiden MAP-Marker nicht detektierbar. Jedoch gelang mittels kulturellem Nachweis auf HEYM mit Mycobactin J die Anzucht im Kot und im Darminhalt des Ileums. Dies kann durch die nesterartige Zusammenlagerung von MAP erklärt werden oder durch die bessere Sensitivität der kulturellen Untersuchung, welche als Goldstandard gilt. Bei den beiden Ansätzen der Probe aus dem Ileozäkallymphknoten von QS-Nr. 4 lagen die Ct-Werte für den Marker F57 nach einer 1: 5 Verdünnung bei 35,86 bzw. 35,83 und somit im als positiv zu wertenden Bereich. Der Marker *ISMav2* war hier nicht nachweisbar. Sowohl bei der kulturellen Untersuchung auf HEYM als auch in MGIT's gelang der Nachweis von MAP in dieser Probe ebenfalls. Nach Klee (2002) ist insbesondere der Nachweis des Erregers im Ileozäkallymphknoten als Goldstandard der MAP-Diagnostik anzusehen. Die Ct-Werte der beiden MAP-Marker bei den beiden Ansätzen der Probe des Ileum von QS-Nr. 4 lagen alle im positiven Bereich und bei denen der Probe der Ileozäkalklappe im fraglichen Bereich (siehe 4.5.3). Ein Ansatz der Probe des Colons war aufgrund von Hemmungen der PCR nicht auswertbar, und im anderen Ansatz war keiner der Marker detektierbar. Bei den restlichen Proben war weder F57 noch *ISMav2* detektierbar. Insgesamt stimmen die Ergebnisse gut mit denen der kulturellen Untersuchung (HEYM und MGIT) überein.

## **5.8 Zur serologischen Untersuchung der zwei geschlachteten Kühe mittels Pourquier®-ELISA**

Sowohl bei QS-Nr. 3 als auch bei QS-Nr. 4 ergab dieser Test keinen Hinweis auf eine MAP-Infektion (siehe 4.5.1). Dies verdeutlicht nochmals, dass sich der Antikörper-ELISA für die Einzeltierdiagnostik nur sehr eingeschränkt eignet (AVID-Methodensammlung, 2007). Für weitere Ausführungen zu diesem Thema siehe 5.4.

## **5.9 Schlussfolgerungen**

Aus den Ergebnissen dieser Studie ergeben sich folgende Aussagen, welche zumeist auch schon in der bisherigen Literatur diskutiert wurden:

- Die klinischen Befunde einschließlich der grobsinnlichen Kotbeschaffenheit liefern keine Hinweise auf das Vorliegen einer subklinischen MAP-Infektion.
- Somit ist für die MAP-Diagnostik beim Einzeltier der direkte Erregernachweis unabdingbar. Der indirekte Erregernachweis mittels Antikörper-ELISA eignet sich allenfalls zur Feststellung des Herdenstatus.
- Aufgrund der intermittierenden Erregerausscheidung ist bei negativem Befund eine mehrmalige Kotuntersuchung zur Absicherung des MAP-Status notwendig.
- Im Fall eines negativen Kotprobenbefundes kann nicht auf die Infektionsfreiheit des Tieres geschlossen werden. Denn wie das Beispiel der Kuh QS-Nr. 3 zeigt, kann sich der Erreger in Organen befinden, obwohl mehrmalige Kotuntersuchungen negativ verlaufen sind.
- Die Untersuchung von am Schlachthof entnommenen Organproben auf den Paratuberkuloseerreger könnte im Rahmen von Monitoring- oder Sanierungsprogrammen zur Ermittlung des MAP-Status einer Herde beitragen.
- Kontaminationen mit Hefe- oder Schimmelpilzen sowie mit zahlreichen Bakterien stellen ein Problem bei der kulturellen Kotuntersuchung dar, sodass die Entwicklung effektiverer Methoden zur Dekontamination bzw. zur Unterdrückung der Begleitkeimflora wünschenswert wäre.
- Der Vorteil der Untersuchung von Organproben liegt darin, dass es im Gegensatz zu den Kotproben zu keinen Problemen mit Kontaminationen kommt.

- Die kulturelle MAP-Untersuchung auf HEYM nach der AVID-Methode im Dreifachansatz und die Triplex Real-time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008) im Doppelansatz liefern weitgehend übereinstimmende Ergebnisse, wobei die Durchführung der PCR wesentlich weniger Zeit in Anspruch nimmt.
- Rinder können sich offensichtlich auch noch nach dem 100. Lebenstag mit MAP infizieren, was die diagnostische Bedeutung bzw. Aussage einer Paratuberkulose-Frühdiagnostik relativiert.
- Da bei zwei im Kälberalter als MAP-positiv eingestuften Rindern anlässlich der späteren Nachbeprobungen jedoch kein MAP mehr nachweisbar war, kann vermutet werden, dass diese Tiere möglicherweise in der Lage waren, den Erreger zu eliminieren oder zumindest abzukapseln. Diese Aussage wird dadurch untermauert, dass bei einem dieser Tiere auch in den nach der Schlachtung entnommenen Organproben kein MAP nachgewiesen werden konnte.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen eines früheren, von der Bundesanstalt für Landwirtschaft geförderten Innovationsprojekts über die "Frühdiagnostik von Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) bei Rindern" (BLE-Förderkennzeichen 28-1-32.006-06) waren 47 weibliche Kälber der Rasse Deutsche Holstein im Alter von ca. 100 Lebenstagen auf eine MAP-Infektion untersucht worden. Bei dem Probenmaterial handelte es sich einerseits um laparoskopisch entnommene Biopsate aus den Ileozäkal- und Jejunallymphknoten, welche zum einen mittels Triplex Real-time PCR (RT-PCR; Schönenbrücher et. al, 2008), zum anderen kulturell auf MAP untersucht worden waren. Zusätzlich waren Serumproben dieser Kälber mittels Pourquier®-ELISA auf MAP-Antikörper geprüft worden.

Ziel der jetzigen Untersuchungen war die Überprüfung des MAP-Status der aus dieser früheren Studie noch zur Verfügung stehenden 27 Rinder. Von diesen stammten 20 aus Paratuberkulose-positiven und 7 aus Paratuberkulose-unverdächtig eingestuften Milchviehbeständen.

Bei drei dieser 27 Kühe war im Kälberalter MAP in den Darmlymphknoten nachgewiesen worden, bei einem weiteren hatte diese Untersuchung zu einem fraglichen Real-time-PCR-Ergebnis geführt.

Zum Zeitpunkt der ersten Nachbeprobung waren diese Tiere mittlerweile zwischen 36 und 41 Monate alt (Durchschnittsalter 38,9 Monate). Zur Ermittlung des MAP-Status wurden aus dem Rektum entnommene Kotproben kulturell (HEYM) sowie mittels Triplex-Real-time-PCR auf diesen Erreger untersucht. Zusätzlich wurden Blutproben mittels Pourquier®-Paratuberkulose ELISA (Pourquier® ELISA Paratuberculosis Antibody Screening Testkit, Fa. Institut Pourquier, Montpellier, Frankreich) auf MAP-Antikörper getestet. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der zweiten Nachbeprobung drei Monate später wiederholt.

Zusätzlich wurden bei allen Probenenden an beiden Terminen der Body Condition Score, die innere Körpertemperatur, die Herz- und Atemfrequenz sowie die Kotbeschaffenheit registriert.

Weiterhin konnten bei zwei im Kälberalter MAP-positiven Kühen anlässlich der Schlachtung im Alter von jeweils 50 Monaten nochmals Kotproben sowie Organmaterial (Ileozäkal- und Jejunallymphknoten, Ileozäkalklappe, Ileum, Colon, Milz, Tonsillen) zur Untersuchung auf MAP entnommen werden.

Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

Die zwei im Kälberalter kulturell und molekularbiologisch MAP-positiven Tiere (eines davon zusätzlich auch seropositiv), erwiesen sich bei den beiden Nachbeprobungen mittels kultureller und molekularbiologischer Kotuntersuchung als negativ. Gleiches galt für die Serologie. Das weitere Tier, bei dem im Kälberalter MAP nur mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte, wobei dieses Tier damals auch seropositiv war, erwies sich in beiden Nachbeprobungen im Erreger- wie Antikörpernachweis als negativ.

Von den zwei Tieren, bei denen die Lymphknotenuntersuchung mittels Real-time PCR im Kälberalter zu einem fraglichen Ergebnis geführt hatte, stand nur noch eines für die Nachuntersuchungen zur Verfügung. Bei dieser Kuh ließ sich MAP bei der 2. Nachbeprobung im Kot kulturell nachweisen, die Real-time PCR ergab ein fragliches Ergebnis.

Von den zwei geschlachteten Kühen erwies sich ein Tier in allen Tests als MAP-negativ. Bei der anderen Kuh gelang der direkte Erregernachweis hingegen sowohl im Kot und Darminhalt, als auch in verschiedenen Organen.

Von den noch zur Verfügung stehenden 23 Tieren, welche im Kälberalter als MAP-negativ getestet worden waren, erwiesen sich auch bei den Nachbeprobungen 21 Kühe weiterhin als negativ. Bei einem dieser ursprünglich negativen Tiere konnte MAP bei der 2. Nachbeprobung kulturell nachgewiesen werden, die Real-time PCR lieferte ein fragliches Ergebnis. Bei einem anderen Tier, bei welchem im Kälberalter weder der direkte noch indirekte Nachweis einer MAP-Infektion gelungen war, wurde bei der 2. Nachbeprobung ein serologisch fragliches Ergebnis erzielt. Alle anderen Tiere erwiesen sich sowohl im Kälberalter als auch in den Nachbeprobungen als molekularbiologisch, kulturell und serologisch negativ.

Die Aussage dieser Studie hinsichtlich der diagnostischen Bedeutung einer Frühuntersuchung von Kälbern auf MAP anhand von Lymphknotenbiopsaten wird dadurch eingeschränkt, dass für die beiden Nachbeprobungen nur noch vier von fünf der im Kälberalter als positiv oder fraglich getesteten Tiere zur Verfügung standen. Da anlässlich dieser Nachuntersuchungen nur noch bei zwei dieser vier Rinder MAP nachgewiesen werden konnte, könnte geschlossen werden, dass manche der im Kälberalter MAP-positiven Tiere im weiteren Verlauf in der Lage sind, diesen Erreger wieder zu eliminieren oder zumindest abzukapseln. Umgekehrt deutet der Befund, dass bei einem der im Kälberalter negativ getesteten Tiere bei der späteren Nachbeprobung MAP nachgewiesen

werden konnte, darauf hin, dass sich Rinder vermutlich auch noch nach dem 100. Lebensstag mit dem Paratuberkuloseerreger infizieren können. Sehr groß scheint diese Gefahr jedoch nicht zu sein, da bei allen übrigen 21 ursprünglich negativen Rindern anlässlich dieser Nachbeprobungen kein Hinweis auf eine MAP-Infektion festgestellt werden konnte.

## 7 SUMMARY

Within the framework of an earlier innovation project on the “early diagnosis of infections with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in cattle (BLE-Project code 28-1-32.006-06) which was funded by the Federal Institute for Agriculture, 47 female calves of the breed German Holstein were tested for MAP infection at the age of approximately 100 days. The samples were laparoscopically taken from the ileocecal and jejunal lymph nodes and tested for MAP on the one hand using triplex real-time PCR (RT-PCR; Schönenbrücher et al., 2008) and on the other hand also as a culture. In addition, serum samples from the calves were tested for MAP antibodies using Pourquier® ELISA. The aim of the present study was to review the MAP status of the 27 cattle still available from this earlier study. Of these, 20 came from paratuberculosis-positive and 7 from paratuberculosis-negative classified dairy cattle herds.

MAP had already been detected in the intestinal lymph nodes of three from 27 cows during calf age. The samples from one other cow led to a questionable real-time PCR result.

At the time of the first retests, the animals were between 36 and 41 months old (average age 38.9 months). To determine the MAP status, faecal samples from the rectum were analyzed culturally (HEYM) as well as using triplex real-time PCR to test for this pathogen. In addition, blood samples were tested for MAP antibodies by the means of Pourquier® paratuberculosis ELISA (Pourquier® ELISA Paratuberculosis Antibody Screening Testkit, Institut Pourquier, Montpellier, France). These tests were repeated three months later.

In addition, the body condition score, internal body temperature, cardiac and respiratory frequency as well as faeces-quality were registered for all test subjects at both dates.

Furthermore, two cows which had been tested MAP-positive as calves, before slaughter at the age of 50 months, were retested for MAP using faecal samples as well as organ material (ileocecal and jejunal lymph nodes, ileocecal valve, ileum, colon, spleen, tonsils).

The investigations gave the following results:

The two animals, which had been tested culturally and molecular biologically MAP-positive in the calf age (one of them also seropositive) proved to be negative in the two retests by means of cultural and molecular biologically faeces examination. The same was proven through serology. Both retests from the cow where MAP had been only detected by

means of RT-PCR at calf age, but which also had been seropositive, showed up negative in both pathogen and antibody detection.

Of the two animals in which the lymph gland examination using Real-time PCR in the calf age led to a questionable result, only one was available for the follow-up examinations. In this cow, MAP was culturally detectable in the second retesting of the faeces, but the real-time PCR yielded a questionable result.

Of the two slaughtered cows, one animal proved to be negative in all tests. In the other cow, however, direct pathogen detection was registered both in faeces and intestines, as well as in various organs.

Of the 23 animals, which were still available and which had been tested as MAP-negative as a calf, 21 of them were also found to be still negative in the retesting. In one of these originally negative animals, MAP could be proved culturally at the second retesting although the real-time PCR yielded a questionable result. One animal, where the direct or indirect detection of MAP infection had not been successful as a calf, a serologically questionable result was obtained in the second retest. All other animals proved to be molecular biologically, culturally and serologically negative both in the calve age as well as in the retests.

The overall results of this study regarding the diagnostic significance of an early MAP screening by means of a lymph nodes biopsies are restricted by the fact that only four out of five of the calves tested with a positive or questionable result were available for the two retests. Since only two of these four cattle were tested MAP -positive during these follow-up studies, it could be concluded that some of the MAP-positive animals in the calf age are subsequently able to eliminate or at least isolate this pathogen.

Vice versa, the result that one of the animals negatively tested in the calf age was now positively tested during subsequent post-sampling, suggests that bovines can be infected with the paratuberculosis agent even after the 100th day of life. However, the risk does not appear to be very great, since no other signs of MAP-infection could be detected for all other 21 originally negative cattle during these retests.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

**Abdulmawjood, A.; Roth, S.; Bülte, M. (2002):**

Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction.  
Mol. Cell Probes 16, 335-339.

**Albien, A. (1910):**

Über die Züchtung des Erregers der Enteritis chronica infectiosa bovis.  
Berl. Tierärztl. Wschr. 41, 793-794.

**Al-Soud, W. A.; Radström, P. (1998):**

Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples.  
Appl. Environ. Microbiol. 64, 3748-3753.

**Antognoli, M. C.; Hirst, H. L.; Garry, F. B.; Salman, M. D. (2007):**

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

**AVID (2007):**

AVID-Methodensammlung: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.  
[http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF\\_AVID\\_Alt/methoden/AB\\_AVID-Methode\\_Paratb.pdf](http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF_AVID_Alt/methoden/AB_AVID-Methode_Paratb.pdf)

**Ayele, W. Y.; Bartos, M.; Svastova, P.; Pavlik, I. (2004):**

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

**Bang, B. (1906):**

Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde.

Berl. Tierärztl. Wschr. 42, 759-763.

**Bang, O.; Andersen, C. W. (1913):**

Einige Untersuchungen über komplementbindende Antistoffe bei experimenteller und spontaner Tuberkulose sowie paratuberkulöser Darmentzündung des Rindes.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 69, 517-538.

**Barclay, R.; Ratledge, C. (1983):**

Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*.

J. Bacteriol. 153, 1138-1146.

**Bastida, F.; Juste, R. A. (2011):**

Paratuberculosis control: a review with focus on vaccination.

J. Immune Based Ther. Vaccines 9, 8-25.

**Benedictus, G.; Dijkhuizen, A. A.; Stelwagen, J. (1987):**

Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle.

Vet. Rec. 121, 142-146.

**BMEL (2014):**

Empfehlungen des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern.

BAnz. AT vom 01.08.2014 B1, 1-17.

**BMELV (2011):**

Bekanntmachung der Neufassung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten.

BGBI. I vom 11.02.2011, 252-254.

**BMVEL (2005):**

Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien).

BAnz. vom 10.02.2005, 2165.

**Bölske, G.; Herthnek, D. (2010):** Diagnosis of Paratuberculosis by PCR.

In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Hrsg.): Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International, Oxfordshire, 267-283.

**Brady, C.; O`Grady, D.; O`Meara, F.; Egan, J.; Bassett, H. (2008):**

Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows in herds affected by Johne's disease.

Vet. Rec. 162, 147-152.

**Buergelt, C. D.; Williams, J. E.; Monif, G. R. G. (2004):**

Spontaneous clinical regression of Johne's disease in a Holstein cow: A case report.

Intern. J. Appl. Res. Vet. Med. 2, 126-129.

**Bulander, K. (2009):**

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milchrinderbeständen.

Diss. med. vet., Gießen.

**Bull, T. J.; McMinn, E. J.; Sidi-Boumedine, K.; Skull, A.; Durkin, D.; Neild, P.;**

**Rhodes, G.; Pickup, R.; Hermon-Taylor, J. (2003):**

Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease.

J. Clin. Microbiol. 41, 2915-2923.

**Chiodini, R. J.; van Kruiningen, H. J.; Merkal, R. S. (1984):**

Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects.

Cornell. Vet. 74, 218-262.

**Chiodini, R. J.; van Kruiningen, H. J.; Thayer, W. R.; Merkal, R. S.; Coutu, J. A. (1984):**

Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease.

Dig. Dis. Sci. 29, 1073-1079.

**Chiodini, R. J. (1996):**

Immunology: resistance to paratuberculosis.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 313-343.

**Clarke, C. J. (1997):**

The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species.  
J. Comp. Pathol. 116, 217-261.

**Cocito, C.; Gilot, P.; Coene, M.; de Kesel, M.; Poupart, P.; Vanuffel, P. (1994):**

Paratuberculosis.  
Clin. Microbiol. Rev. 7, 328-345.

**Collins, D. M.; Gabric, D. M.; de Lisle, G. W. (1989):**

Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*.  
FEMS Microbiol. Lett. 60, 175-178.

**Collins, D. M.; Gabric D. M.; de Lisle, G. W. (1990):**

Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization.  
J. Clin. Microbiol. 28, 1591-1596.

**Collins, D. M.; Socket, D. C.; Ridge, S.; Cox, J. C. (1991):**

Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease.  
J. Clin. Microbiol. 29, 272-276.

**Collins, D. M.; Stephens, D. M.; de Lisle, G. W. (1993):**

Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces.  
Vet. Microbiol. 36, 289-299.

**Collins, M. T. (1996):**

Diagnosis of paratuberculosis.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 357-371.

**Collins, M. T.; Gardner, I. A.; Garry, F. B. (2006):**

Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 299, 1912-1919.

**Cousins, D. V.; Whittington, R.; Marsh, I.; Masters, A.; Evans, R. J.; Kluver, P. (1999):**

Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis.

Mol. Cell. Probes 13, 431-442.

**de Juan, L.; Mateos, A.; Dominguez, L.; Sharp, J.; Stevenson, K. (2005):**

Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis.

Vet. Microbiol. 106, 249-257.

**Deutz, A.; Spargser, J.; Wagner, P.; Rosengarten, R.; Köfer, J. (2005):**

Nachweise von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bei Wildtieren und Rindern in der Steiermark/Österreich.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 314-320.

**Dirksen, G. (1990):** Kotuntersuchung

In: Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (Hrsg.): Die klinische Untersuchung des Rindes.

Verlag Paul Parey, Berlin u. Wien, 358-366.

**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, 360-367.

**Donat, K. (2014):**

Einstieg in die Paratuberkulosebekämpfung.

Kompakt Vet 6, 9.

**Doyle, T. M. (1953):**

Susceptibility to Johne's disease in relation to age.

Vet. Rec. 65, 363-365.

**Eda, S.; Elliot, B.; Scott, M. C.; Waters, W. R.; Bannantine, J. P.; Whitlock, R. H.; Speer, C. A. (2005):**

New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johne's disease) by flow cytometrie.

Foodborne Path. Dis. 2, 250-262.

**Ellingson, J. L. E.; Bolin, C. A.; Stabel, J. R. (1998):**

Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis.

Mol. Cell. Probes 12, 133-142.

**Ellingson, J. L. E.; Kozickowski, J. J.; Anderson, J. L. (2005):**

Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR.

J. Food Prot. 68, 966-972.

**Elzo, M. A.; Rae, D. O.; Lanhart, S. E.; Wasdin, J. G.; Dixon, W. P.; Jones, J. L. (2006):**

Factors associated with ELISA scores for paratuberculosis in an Angus-Brahman multibreed herd of beef cattle.

J. Anim. Sci. 84, 41-48.

**Englund, S.; Boske, G.; Johansson, K. E. (2002):**

An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

FEMS Microbiol. Lett. 209, 267-271.

**Fecteau, M. E.; Whitlock, R. H.; Buergelt, C. D. (2010):**

Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. Canadian Vet. J. 51, 198-200.

**Fecteau, M. E.; Whitlock, R. H. (2010):** Partuberculosis in cattle.

In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Hrsg.): Paratuberculosis: organism, disease, control. CAB International, Oxfordshire, 144-156.

**Friedrich-Löffler-Institut (2012):**

Testcharakteristika der zugelassenen ELISA-Tests für den Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* beim Rind gemessen an den Referenzpanels Serum und Milch des NRL.

[https://www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/IMP/Information\\_NRL\\_Paratuberkulose.pdf](https://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/IMP/Information_NRL_Paratuberkulose.pdf)

**Füllgrabe, R. A. R. (2009):**

Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiopaten. Diss. med. vet., Gießen.

**Gay, J. M.; Sherman, D. M. (1992):**

Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. Vet. Med. 87, 1133-1139.

**Gerlach, G. F. (2002):**

Paratuberkulose: Erreger und Übertragungswege. Dtsch. tierärztl. Wschr. 109, 504-506.

**Gierke, F. (2009):**

Ermittlung von Einflussfaktoren auf die *intra vitam* Diagnostik der Paratuberkulose. Diss. med. vet., Berlin.

**Giесе, S. B.; Ahrens, P. (2000):**

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture.

Vet. Microbiol. 77, 291-297.

**Gilardoni, L. R.; Paolicchi, F. A.; Mundo, S. L. (2012):**

Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests.

Rev. Argent. Microbiol. 44, 201-215.

**Greig, A.; Stevenson, K.; Perez, V.; Pirie, A. A.; Grant, J. M.; Sharp, J. M. (1997):**

Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).

Vet. Rec. 140, 141-143.

**Grant, I. R.; Rowe, M. T.; Dundee, L.; Hitchings, E. (2001):**

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products.

Int. J. Dairy Technol. 54, 2-13.

**Green, E. P.; Tizard, M. L.; Moss, M. T.; Thompson, J.; Winterbourne, D. J.;**

**McFadden, J. J.; Hermon-Taylor, J. (1989):**

Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Nucleic acids Res. 17, 9063-9073.

**Groenendal, H.; Nielen, M.; Jalvingh, A. W.; Horst, S. H.; Galligan, D. T.; Hesselink,**

**J. W. (2002):**

A simulation of Johne's disease control.

Prev. Med. Vet. 54, 225-245.

**Groenendal, H.; Nielen, M.; Hesselink, J. W. (2003):**

Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model.

Prev. Med. Vet. 60, 69-90.

**Gruber, A. D. (2007):** Paratuberkulose.

In: Baumgärtner, W. (Hrsg.): Pathohistologie für die Tiermedizin.

Enke Verlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart, 154 und 164.

**Gumber, S.; Eamens, G.; Whittington, R. J. (2006):**

Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assesment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection.

Vet. Microbiol. 115, 91-101.

**Hacker, U.; Hüttner, K.; Konow, M. (2004):**

Untersuchung zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 117, 140-144.

**Harris, N. B.; Barletta, R. G. (2001):**

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine.

Clin. Microbiol. Rev. 14, 489-512.

**Hasonova, L.; Pavlik, I. (2006):**

Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review.

Vet. Med. 51, 193-211.

**Hietala, S. K. (1992):**

The options in diagnosing ruminant paratuberculosis.

Vet. Med. 87, 1122-1132.

**Homuth, M. (2002):**

Diagnostik der Paratuberkulose.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 516-519.

**Huda, A.; Jungersen, G.; Lind, P. (2004):**

Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses on cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Vet. Microbiol. 104, 43-53.

**Johne, H. A.; Frothingham, L. (1895):**

Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind.

Dtsch. Z. Thiermed. Vergl. Path. 21, 438-454.

**Johnson-Ifearulundu, Y. J.; Kaneene, J. B.; Sprecher, D. J.; Gardiner, J. C.; Lloyd, J. W. (2000):**

The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows.

Prev. Med. Vet. 46, 171-181.

**Jørgensen, J. B. (1983):**

The diagnosis of clinical paratuberculosis in bovines.

Commission of the European Communities, Agricultur Report Eur 9000, 1-8.

**Jubb, T. F.; Sergeant, E. S.; Callinan, A. P.; Galvin, J. (2004):**

Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds.

Aust. Vet. J. 82, 569-573.

**Kalis, C. H. J.; Hesselink, J. W.; Barkema, H. W.; Collins, M. T. (2000):**

Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds of paratuberculosis.

J. Vet. Diagn. Invest. 12, 547-551.

**Khol, J. L.; Baumgartner, W. (2012):**

Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle.

Jpn. J. Vet. Res. 60 (Supplement), 1-7.

**Klee, W. (2002):** Paratuberkulose (JOHNEsche Krankheit).

In: Dirksen, G.; Gründer, H.-D.; Stöber, M. (Hrsg.): Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.

Parey im Bleckwell Wissenschafts-Verlag, Berlin/Wien, 586-591.

**Klopfleisch, R.; Gruber, A. D. (2015):** Granulomatöse Enteritis.

In: Baumgärtner, W.; Gruber, A. D. (Hrsg.): Spezielle Pathologie für die Tiermedizin.  
Enke Verlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart, 70-71.

**Köhler, H.; Geue, L.; Conraths, F. J. (2003):**

Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland.

Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 10, 40-44.

**Koenig, G. J.; Hoffsis, G. F.; Shulaw, M. P.; Bech-Nielsen, S.; Rings, D. M.; 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, 1441-1445.

**Kube, J. (2014):**

Vergleich verschiedener Methoden zur Identifizierung Paratuberkulose-positiver Rinderherden.

Diss. med. vet., Leipzig.

**Kudahl, A.; Nielsen, S. (2009):**

Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows.

J. Dairy Sci. 92, 4340-4346.

**Lambrecht, R. S.; Carriere, J. F.; Collins, M. T. (1988):**

A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* spp.

Appl. Environ. Microbiol. 54, 910-916.

**Lambrecht, R. S.; Collins, M. T. (1992):**

*Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 15, 239-246.

**Lambrecht, R. S.; Collins, M. T. (1993):**

Inability to detect mycobactin in mycobacteria-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by mycobacteria in vivo.

Microb. Pathog. 14, 229-238.

**Larsen, A. B.; Merkal, R. S.; Vardaman, T. H. (1956):**

Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Am. J. Vet. Res. 17, 549-551.

**Larsen, A. B.; Merkal, R. S.; Cutlip, R. C. (1975):**

Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*.

Am. J. Vet. Res. 35, 255-257.

**Larsen, A. B.; Stalheim, O. H.; Hughes, D. E.; Appell, L. H.; Richards, W. D.; Himes, E. M. (1981):**

*Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 179, 169-171.

**Li, L.; Bannantine, J. P.; Zhang, Q.; Amonsin, A.; May, B. J.; Alt, D.; Banerji, N.; Kanjilal, S.; Kapur, V. (2005):**

The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 12344-12349.

**Lovell, R.; Levi, M.; Francis, J. (1944):**

Studies on the survival of Johne's bacilli.

J. Comp. Pathol. 54, 120-129.

**Lugton, I. (1999):**

Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria.

Immunol. Cell Biol. 77, 364-372.

**Luyven, G.; vom Schloss, A.; Saßerath, M. (2002):**

Paratuberkulosesanierung in Nordrhein-Westfalen.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 524-527.

**Manning, E. J.; Collins, M. T. (2001):**

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis.  
Rev. Sci. Tech. 20,0133-150.

**Merkal, R. S.; Larsen, A. B.; Kopecky, K. E. (1968):**

Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle.  
Am. J. Vet. Res. 29, 1533-1538.

**Merkal, R. S. (1973):**

Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 163, 1100-1102.

**Merkal, R. S.; McCullough, W. G. (1982):**

A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*.  
Current Microbiol. 7, 333-335.

**Merkal, R. S. (1984):**

Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 184, 939-943.

**Mijs, W.; de Haas, P.; Rossau, R.; van der Laan, T.; Rigouts, L.; Portaels, F.; van Soolingen, D. (2002):**

Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* from bird-type isolates and "*M. avium* subsp. *hominisuis*" for the human/porcine type of *M. avium*.  
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1505-1518.

**Momontani, E.; Whipple, D. L.; Thiermann, A. B.; Cheville, N. F. (1988):**

Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves.  
Vet. Pathol. 25, 131-137.

**Naser, S. A.; Ghobrial, G.; Romero, C.; Valentine, J. F. (2004):**

Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients

with Crohn's disease.  
Lancet, 364, 1039-1044.

**NCBI (2016):**

NCBI Taxonomy Browser: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

**Nielsen, S. 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, 217-235.

**Nielsen, S. S.; Toft, N. (2009):**

A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe.  
Prev. Vet. Med. 88, 1-14.

**Nielsen, S. S. (2010):** Immune-based diagnosis of paratuberculosis.

In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Hrsg.): Paratuberculosis: Organism, disease, control.  
CAB International, Oxfordshire, 284-293.

**Ott, S. L.; Wells. S. J.; Wagner, B. A. (1999):**

Herdlevel economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations.  
Prev. Med. Vet. 40, 179-192.

**Pavlik, I.; Horvathova, A.; Dvorska, L.; Bartl, J.; Svastova, P.; du Maine, R.; Rychlik, I. (1999):**

Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.  
J. Microbiol. Methods 38, 155-167.

**Paul-Ehrlich-Institut (2015):**

Impfstoffe für Tiere.  
<http://www.pei.de/DE/anzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere-node.html>

**Poupart, P.; Coene, M.; van Heuverswyn, H.; Cocito, C. (1993):**

Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease.

J. Clin. Microbiol. 31, 1601-1605.

**Radon, K.; Windsetter, D.; Poluda, A. L.; Mueller, B.; von Mutius, E.; Koletzko, S. (2007):**

Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: A case-control study.

Pediatrics 120, 354-361.

**Raizman, E. A.; Espejo, L. A.; Wells, S. J. (2011):**

Long-term survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples obtained from naturally infected cows and stored at -18 °C and -70 °C.

Vet. Med. Int., Vol. 2011, Article ID 341691, 1-5.

**Reinshagen, M. (2009):** Klinik des Morbus Crohn.

In: Hoffmann, J. C.; Kroesen, A. J.; Klump, B. (Hrsg.): Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Handbuch für Klinik und Praxis.

Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 68-81.

**Ris, D. R.; Hamel, K. L.; Ayling, J. M. (1988):**

The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy.

N. Z. Vet. J. 36, 112-114.

**Rogall, T.; Wolters, J.; Florh, T.; Böttger, E. C. (1990):**

Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 323-330.

**Saito, H.; Tomioka, H.; Sato, K.; Tasaka, H.; Tsukamura, M.; Kuze, F.; Asano, K. (1989):**

Identification and partial characterisation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium*

*intracellulare* by using DNA probes.

J. Clin. Microbiol. 27, 994-997.

**Schillinger, S. (2012):**

Durchflusszytometrischer Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern.

Diss. med. vet., Gießen.

**Schönenbrücher, H.; Abdulmawjood, A.; Failing, K.; Bülte, M. (2008):**

New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces.

Appl. Environ. Microbiol. 74, 2751-2758.

**Schulze-Robbeke, R.; Buchholtz, K. (1992):**

Heat susceptibility of aquatic mycobacteria.

Appl. Environ. Microbiol. 58, 1869-1873.

**Shaughnessy, L. J.; Smith, L. A.; Evans, J.; Anderson, D.; Caldow, G.; Marion, G.; Low, J. C. (2013):**

High prevalence of paratuberculosis in rabbits is associated with difficulties in controlling the disease in cattle.

Vet. J. 198, 267-270.

**Siew, C. N.; Bernstein, C. N.; Vatn, M. H.; Lakatos, P. L.; Loftus Jr, E. V.; Tysk, C.; O'Morain, C.; Moum, B.; Colombel, J.F. (2013):**

Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease.

Gut, 62, 630-649.

**Smithwick, R. W.; Bigbie, M. R. Jr.; Ferguson, R. B.; Karlix, M. A.; Wallis, C. K. (1995):**

Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria.

J. Clin. Microbiol. 33, 2763-2764.

**Sorge, U. (2013):**

Paratuberkulose - ein Update zur Epidemiologie und zu Kontrollansätzen.  
Veterinärspiegel, Enke Verlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart, 3, 122-126.

**Stabel, J. R. (1996):**

Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis.  
J. Vet. Diagn. Invest. 8, 345-350.

**Stabel, J. R.; Bannantine, J. P. (2005):**

Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples.  
J. Clin. Microbiol. 43, 4744-4750.

**Stahl, D. A.; Urbance, J. W. (1990):**

The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria.  
J. Bacteriol. 172, 116-124.

**Stephan, R. (2007):**

Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.  
J. Verbr. Lebensm. 2, 222-227.

**Stevenson, K. (2010):** Comparative differences between strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Hrsg.): Paratuberculosis: Organism, disease, control.  
CAB International, Oxfordshire, 126-137.

**Stöber, M.; Gründer, H.-D. (1990):** Technik der Blutentnahme.

In: Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (Hrsg.): Die klinische Untersuchung des Rindes.  
Verlag Paul Parey, Berlin u. Wien, 197-199.

**Streeter, R. N.; Hoffsis, G. F.; Bech-Nielsen, S.; Shulaw, W. P., Rings, D. M. (1995):**  
Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows.

Am. J. Vet. Res. 56, 1322-1324.

**Strommenger, B.; Stevenson, K.; Gerlach, G. F. (2001):**

Isolation and diagnostic potential of IS*Mav2*, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

FEMS Microbiol. lett. 196, 31-37.

**Sweeney, R. W.; Whitlock, R. H.; Hamir, A. N. (1992):**

Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle.

Am. J. Vet. Res. 53, 1312-1314.

**Sweeney, R. W.; Whitlock, R. H.; Rosenberger, A. E. (1992):**

*Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows.

J. Clin. Microbiol. 30, 166-171.

**Sweeney, R. W. (1996):**

Transmission of paratuberculosis.

Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 305-312.

**Sweeney, R. W.; Whitlock, R. H.; McAdams, S. (2005):**

Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and uninfected herd mates.

Proc. 8th Int. Coll. Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark.

**Sweeney, R. W.; Collins, M. T.; Koets, A. P.; McGuirk, S. M.; Roussel, A. J. (2012):**

Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species.

J. Vet. Intern. Med. 26, 1239-1250.

**Tasara, T.; Hoelzle, L. E.; Stephan, R. (2005):**

Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

(MAP) specific multiplex PCR assay.  
Int. J. Food Microbiol. 104, 279-287.

**Taylor, A. W. (1953):**

Experimental Johne's disease in cattle.  
J. Comp. Pathol. 63, 355-367.

**Thronton, C. G.; Passen, S. (2004):**

Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition.  
J. Microbiol. Methods 59, 43-52.

**Thorel, M. F.; Krichevsky, M.; Levy-Frebault, V. V. (1990):**

Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium silvaticum* subsp. nov.  
Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 254-260.

**Tiwari, A.; VanLeeuwen, J. A.; Dohoo, I. R.; Stryhn, H.; Keefe, G. P.; Haddad, J. P. (2005):**

Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces.  
Vet. Microbiol. 109, 147-158.

**Tiwari, A.; VanLeeuwen, J. A.; McKenna, S. L.; Keefe, G. P.; Barkema, H. W. (2006):**

Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds.  
Can. Vet. J. 47, 874-882.

**Turenne, C. Y.; Semret, M.; Cousins, D. V.; Collins, D. M.; Behr, M. A. (2006):**

Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex.  
J. Clin. Microbiol. 44, 433-440.

**Turenne, C. Y.; Collins, D. M.; Alexander, D. C.; Behr, M. A. (2008):**

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. J. Bacteriol. 190, 2479-2487.

**Turenne, C. Y.; Alexander, D. C. (2010):** *Mycobacterium avium* complex.

In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Hrsg.): Paratuberculosis: Organism, disease, control. CAB International, Oxfordshire, 60-72.

**Twort, F. W.; Ingram, G. L. Y. (1912):**

A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritidis of bovines.

Proc. Roy. Soc. B. 84, 517-543.

**van Schaik, G.; Stehman, S. M.; Schuken, Y. H.; Rossiter, C. R.; Shin, S. J. (2003):**

Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence.

J. Vet. Diagn. Invest. 15, 233-241.

**Vary, P. H.; Andersen, P. R.; Green, E.; Hermon-Taylor, J.; McFadden, J. J. (1990):**

Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease.

J. Clin. Microbiol. 28, 933-937.

**Vasnick, E.; de Rijk, P.; Vercammen, F.; Rigouts, L.; Portaels, F.; Geysen, D. (2004):**

Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Vet. Microbiol. 100, 197-204.

**Visniewski, P.P.; Mamatsev, E.G.; Chernyshev, V.V.; Chernyshev, N.S. (1940):**

Die Überlebensfähigkeit des Erregers der Johne'schen Krankheit (russ).

Sov. Vet. Sci. Nr. 11-12, 89-93

(Вишневский П.П.; Мамацев Э.Г.; Чернышев В.В.; Чернышев Н.С. (1940):

Устойчивость паратуберкулезных бацилл Йоне.  
Советская ветеринария. 1940. № 11-12. с. 89-93).

**Waddel, L.; Rajic, A.; Sargeant, J.; Harris, J.; Amezcua, R.; Downey, L., Read, S.; McEwen, S. (2008):**

The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A systematic review.

Can. J. Public Health 99, 145-155.

**Wayne, L. G.; Kubica, G. P. (1986):** The mycobacteria.

In: Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E.; Holt J. G. (Hrsg.): *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1435-1457.

**Weber, A.; Gürke, R.; Bauer, K.; Schreyer, K. (1992):**

Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Mycobacterium paratuberculosis* in Kotproben von Zoowiederkäuern.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 105, 161-164.

**Weiss, E. (2007):** Granulomatöse Darmentzündung.

In: Dahme, E.; Weiss, E. (Hrsg.): *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*.

Enke Verlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart, 141-142.

**Whan, L.; Grant, I. R.; Ball, H. J.; Scott, R.; Rowe, M. T. (2001):**

Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water.

Lett. Appl. Microbiol. 33, 227-231.

**Whipple, D. L.; Kapke, P. A.; Anderson, P. R. (1992):**

Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces.

J. Vet. Diagn. Invest. 4, 23-27.

**Whitlock, R.H.; Rosenberger, A. E.; Spencer, P. A. (1989):**

Laboratory culture techniques for Johne's disease: a critical evaluation of contamination

and incubation times.

Proc. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc. 93, 382-386.

**Whitlock, R. H.; Buergelt, C. (1996):**

Preclinical and clinical manifestation of paratuberculosis (including pathology).

Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract. 12, 345-356.

**Whitlock, R. H.; Wells, S. J.; Sweeney, R. W.; Van Tiem, J. (2000):**

ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method.

Vet. Microbiol. 77, 387-398.

**Whittington, R. J. (2009):**

Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system.

J. Clin. Microbiol. 47, 614-622.

**Whittington, R. J.; Windsor, P. A. (2009):**

In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis.

Vet. J. 179, 60-69.

**Whittington (2010):** Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

In: Behr, M. A.; Collins, D. M. (Hrsg.): Paratuberculosis: Organism, disease, control.

CAB International, Oxfordshire, 244-260.

**Windsor, P. A.; Whittington, R. J. (2010):**

Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease.

Vet. J. 184, 37-44.

**Yokomizo, Y.; Yugi, H.; Merkal, R. S. (1985):**

A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis.

Nippon. Juigaku. Zasshi. 47, 111-119.

## 9 ANHANG

Tabelle 15: Ergebnisse der allgemeinen klinischen Untersuchung der Kühe bei der 1. Nachbeobachtung, sowie der grobsinnlichen Kotuntersuchung

QS-Nr.	Betriebs-Nr.	MAP-Status im Kälberalter	MAP-Status bei Nachbeobachtung	BCS	Pulsfrequenz/min	Atemfrequenz/min	Rektaltemperatur (in °C)	Kotfarbe	Kotkonsistenz	Kotgeruch	Zerkleinerungsgrad des Kots	Beimengungen im Kot
1	1	negativ	negativ	2,75	72	36	38	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
2	1	negativ	negativ	3	76	36	38,1	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
3	2	positiv	negativ	3,5	92	32	38,4	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	fein zerkleinert	keine
4	2	positiv	negativ	3,5	104	52	38,1	oliv-grün	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
5	2	positiv	negativ	2,75	68	28	39	oliv-grün	dünnbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
8	3	fraglich	negativ	3	72	40	38,3	oliv	dünnbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
10	4	negativ	negativ	3	88	28	38,4	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	schlecht zerkleinert	keine
13	5	negativ	negativ	3,5	100	40	38,2	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
14	5	negativ	negativ	3	60	32	38,3	oliv	mittelbreiig	leicht muffig	mäßig zerkleinert	keine
15	5	negativ	negativ	2,75	124	44	38,3	oliv	mittelbreiig	physiologisch	schlecht zerkleinert	keine
17	3	negativ	negativ	3,25	100	36	38,2	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
18	3	negativ	negativ	3	76	36	38,9	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
19	3	negativ	negativ	2,75	76	28	38	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
20	6	negativ	negativ	3,5	80	32	38,3	dunkel-oliv	dickbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
21	6	negativ	negativ	2,75	80	28	38	oliv	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
25	7	negativ	negativ	2,75	76	28	38,3	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
26	7	negativ	negativ	3,75	104	40	39	oliv-braun	dünnbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
27	7	negativ	negativ	2,75	72	24	38,4	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
28	5	negativ	negativ	3,25	80	20	38	dunkelgrün	dünnbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
31	9	negativ	negativ	2,75	68	24	38,3	oliv-braun	dünnbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
32	9	negativ	negativ	3,25	76	24	38,3	oliv-braun	dünnbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
34	10	negativ	negativ	3,75	80	32	38,2	oliv	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
35	11	negativ	negativ	3,5	68	32	38,1	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
38	3	negativ	negativ	2,5	52	36	38,9	oliv-braun	dünnbreiig	leicht muffig	mäßig zerkleinert	keine
40	3	negativ	negativ	3,5	68	40	38,5	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
45	7	negativ	negativ	3,5	80	32	38,3	oliv-braun	dickbreiig	physiologisch	schlecht zerkleinert	keine
46	10	negativ	negativ	3,75	84	36	38,7	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine

*Tabelle 16: Ergebnisse der allgemeinen klinischen Untersuchung der Kühe bei der 2. Nachbeprobung, sowie der grobsinnlichen Kotuntersuchung*

QS-Nr.	Betrieb-Nr.	MAP-Status im Kälberalter	MAP-Status bei Nachbeprobung	BCS	Pulsfrequenz/min	Atemfrequenz/min	Rektaltemperatur (in °C)	Kotfarbe	Kotkonsistenz	Kotgeruch	Zerkleinerungsgrad des Kots	Beimengungen im Kot
1	1	negativ	negativ	3	68	36	38,2	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
2	1	negativ	negativ	2,75	80	40	38,6	oliv	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
3	2	<b>positiv</b>	negativ	3,5	84	32	38,6	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
4	2	<b>positiv</b>	negativ	3,75	96	44	38,2	oliv-grün	dickbreiig	physiologisch	schlecht zerkleinert	keine
5	2	<b>positiv</b>	negativ	3,5	76	40	38,2	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
8	3	fraglich	<b>positiv</b>	3	76	36	38,6	oliv	mittelbreiig	physiologisch	schlecht zerkleinert	keine
10	4	negativ	negativ	3,25	80	28	38,4	oliv-braun	dickbreiig	physiologisch	schlecht zerkleinert	keine
13	5	negativ	negativ	3,25	92	36	38,3	oliv	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
14	5	negativ	negativ	3,5	68	28	38,1	dunkelgrün	dünnbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
15	5	negativ	negativ	3	104	40	38,5	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
17	3	negativ	negativ	3,25	88	40	38,1	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
18	3	negativ	<b>positiv</b>	3,25	80	36	38,5	oliv	dickbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
19	3	negativ	negativ	3	76	32	38,2	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
20	6	negativ	negativ	3,75	76	36	38,5	oliv-grün	dickbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
21	6	negativ	negativ	2,75	72	32	38,2	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
25	7	negativ	negativ	2,5	76	32	38,8	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
26	7	negativ	negativ	2,75	88	36	38,7	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
27	7	negativ	negativ	2,75	72	28	38,5	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
28	5	negativ	negativ	3,75	84	28	38,2	dunkelgrün	dünnbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
31	9	negativ	negativ	3	76	36	38,3	oliv-grün	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
32	9	negativ	negativ	2,5	80	32	38,5	oliv-braun	dünnbreiig	leicht muffig	gut zerkleinert	keine
34	10	negativ	negativ	3,75	88	40	38,7	dunkel-oliv	dickbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
35	11	negativ	negativ	3,75	76	36	38,8	oliv	mittelbreiig	physiologisch	gut zerkleinert	keine
38	3	negativ	negativ	2,75	64	32	38,6	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
40	3	negativ	negativ	3,25	72	40	38,4	oliv	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine
45	7	negativ	negativ	3,5	76	32	38,7	oliv-braun	mittelbreiig	physiologisch	mäßig zerkleinert	keine

## 10 DANKSAGUNG

Nun möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K. Doll und Herrn Prof. Dr. M. Bülte möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung danken. Auch freue ich mich sehr, dass sie mir ein selbstständiges Arbeiten und ein flexibles Zeitmanagement ermöglicht haben und sich stets Zeit für Besprechungen genommen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau C. Walter und K. Simon vom Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde für die praktische und technische Unterstützung bei der Bearbeitung der Kot- und Organproben. Herrn Dr. W. Herbst und seinen Mitarbeitern vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der serologischen Diagnostik.

Nicht vergessen möchte ich, auch allen Landwirten, welche ihre Kühe für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben, sowie den amtlichen Tierärzten am Schlachthof in Tauberbischofsheim für die Unterstützung bei den Organprobenentnahmen, an dieser Stelle meinen Dank auszusprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen beiden Arbeitgebern, Frau Dr. B. Meister und dem Landkreis Marburg-Biedenkopf bedanken. Nur dank der flexiblen Arbeitszeiten war ein Anfertigen dieser Arbeit, vor allem während der Zeit der Probenentnahmen in den Betrieben, überhaupt erst möglich.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Freundin Sandra und meinen Eltern für die moralische Unterstützung und das Ertragen meiner wechselhaften Launen während des Anfertigens dieser Arbeit. Ohne die Hilfestellung von Sandra beim Arbeiten mit dem Computer, hätte diese Arbeit ohne Tabellen und Abbildungen auskommen müssen. Auch meine beiden Hunde Lale und Frieda haben sicherlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen, indem sie mich dazu gezwungen haben, den Schreibtisch gelegentlich zu verlassen und dadurch wieder neue Energie zu sammeln.

## 11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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.

Adrian Pfeiffer



*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: 978-3-8359-6562-1



9 783835 196562 1