

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der  
Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Wiederkäuer  
(Leiter: Univ. Prof. Dr. T. Wittek)

**Zeitlicher Verlauf von positiven *Mycobacterium avium* ssp.  
*paratuberculosis* Einzeltierergebnissen in Tiroler  
Milchviehbetrieben aus den Jahren 2015 bis 2020**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Laura Auböck

Wien, im Juni 2021

**Betreuer und**

1. Begutachter:

Priv.-Doz. Dr.med.vet. Dipl. ECBHM Johannes Lorenz Khol

Universitätsklinik für Wiederkäuer

Department für Nutztiere und öffentliches

Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

2. Begutachter:

Priv.-Doz. Dr.med.vet. Dipl. ECVM Joachim Spargser

Institut für Mikrobiologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

## **Danksagung**

Herrn Dr. Khol für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung während des Arbeitsprozesses

Dem Tiergesundheitsdienst Tirol für die Bereitstellung des Datenmaterials

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1	Geschichte der Johne´schen Krankheit .....	3
2.2	Erreger .....	3
2.3	Epidemiologie .....	4
2.3.1	Ausscheidung .....	5
2.4	Pathogenese .....	7
2.5	Pathologie .....	9
2.6	Klinische Symptome .....	10
2.7	Diagnostik .....	12
2.7.1	Direkter Erregernachweis .....	12
2.7.2	Serologische Nachweisverfahren .....	15
2.7.3	Nachweismethoden für zellgebundene Immunreaktionen .....	16
2.8	Therapie .....	17
2.9	Vakzination .....	18
2.10	Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen .....	19
2.10.1	Allgemeine Empfehlungen .....	19
2.10.2	Österreich .....	21
<b>3</b>	<b>Material und Methode</b> .....	<b>25</b>
3.1	Datenmaterial .....	25
3.2	Datenaufbereitung .....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
4.1	Antigen- und Antikörpernachweis .....	28
4.2	Abgangsdaten .....	31

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>56</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
AGIDT	Agargel-Immunodiffusionstest
AK	Antikörper
BGBI	Bundesgesetzblatt
ERIC	enterobacterial intergenic consensus
EU	Europäische Union
GIT	Gastrointestinaltrakt
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEYM	Herrold's egg yolk Medium
HT-J	high-throughput direct fecal PCR
IFN- $\gamma$	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
KbE	Kolonie bildende Einheit
KBR	Komplementbindungsreaktion
KV	Kulturversuch
LJ	Löwenstein-Jensen Medium
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NUS	Nachuntersuchung
nv	nicht vorhanden
PPD	purified protein derivate
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction

ROI	reactive oxygen intermediate
ssp.	subspecies
Tab.	Tabelle
TGD	Tiergesundheitsdienst
TH	T-Helferzelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-Alpha
ZN	Ziehl-Neelsen

## **1 Einleitung und Fragestellung**

Die Paratuberkulose ist eine chronische, unheilbare Durchfallerkrankung bei Wiederkäuern, von der sowohl domestizierte als auch in freier Wildbahn lebende Wiederkäuer betroffen sein können (Fecteau, 2018). Hervorgerufen wird die Erkrankung durch das Bakterium *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) (Hasonova und Pavlik, 2006). Die Bezeichnung Johne'sche Krankheit wird vor allem im Englischen verwendet und meist dann, wenn durch eine Infektion mit MAP klinische Symptome auftreten (Fecteau, 2018). Nutztierbestände weltweit sind von Paratuberkulose betroffen (Whittington et al., 2019) und auch in Österreich sind 2005 etwa 19 % der Rinder in Viehbeständen serologisch positiv auf MAP getestet worden (Khol et al., 2007).

Die Inkubationszeit der Paratuberkulose beträgt zwei bis sieben Jahre und die Infektion erfolgt meist im Jungtieralter, oft schon in den ersten Lebensstagen (Patterson et al., 2020). Klinische Symptome sind persistierender Durchfall sowie progressiver Gewichtsverlust (Hasonova und Pavlik, 2006) und treten meist erst drei bis vier Jahre nach der Infektion auf (Patterson et al., 2020). Die subklinisch infizierten Tiere können den Erreger aber ebenfalls mit dem Kot, dem Kolostrum oder der Milch ausscheiden und damit andere Tiere infizieren (Hasonova und Pavlik, 2006).

Der Nachweis von MAP gestaltet sich oft schwierig, da subklinisch infizierte Tiere häufig nur sehr geringe Erregermengen ausscheiden, die Ausscheidung intermittierend erfolgt, jedes Tier, abhängig vom Immunstatus, anders auf die Infektion reagiert und die Erkrankung chronisch verläuft (Plain et al., 2014). Dadurch entstehen vor allem in Milchviehbeständen hohe wirtschaftliche Verluste in Form von Fruchtbarkeitsstörungen, verminderter Immunität und schlechteren Gewichtszunahmen (Hasonova und Pavlik, 2006). Aus diesem Grund gibt es schon seit den 1920er Jahren weltweit verschiedene Kontrollprogramme, um die Paratuberkulose zu überwachen und zu bekämpfen (Geraghty et al., 2014).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden, im Zuge des Tiroler MAP Überwachungs- und Bekämpfungsprogrammes erhobene Ergebnisse aus den Jahren 2015 bis 2020 ausgewertet. Das Ziel dabei ist zu ermitteln, wie viele Tiere mehrmals auf MAP untersucht wurden und die Ergebnisse mehrmals getesteter Tiere im zeitlichen Verlauf zu evaluieren. Zusätzlich wird ermittelt, zu welchem Zeitpunkt positiv getestete Tiere aus dem Bestand ausgeschieden wurden.

Diese Analysen sollen dazu dienen, die Aussagekraft der Einzeltieruntersuchungen im Rahmen des Überwachungsprogramms zu evaluieren, sowie die Effizienz des Kontrollprogramms in MAP positiven Betrieben zu überprüfen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Geschichte der Johne'schen Krankheit

1894 wurde in Deutschland in der Region Oldenburg erstmals der Fall einer Kuh dokumentiert, die kaum Milch produzierte, nicht an Gewicht zunahm und anschließend verendete. Johne und Frothingham (1895) beschrieben diese Erkrankung erstmals mit dem Namen „Pseudotuberkulöse Enteritits“. Der Name Johne'sche Krankheit wurde 1906 durch den britischen Veterinärwissenschaftler und Tuberkulose-Forscher John McFadyean begründet.

Die erstmalige Isolierung und Anzuchtung des Erregers gelang Twort und Ingram (1912) und sie benannten ihn *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis, Johne*. Die Notwendigkeit von Kontroll- und Überwachungsprogrammen wurde schon in den 1920er Jahren erkannt und zur gleichen Zeit wurde auch der Erreger der Johne'schen Krankheit als *Mycobacterium paratuberculosis* bezeichnet.

In den 1940er Jahren wurden Ähnlichkeiten zwischen humaner Lepra und Paratuberkulose festgestellt. In den 1950er Jahren wurde der Fokus auf Vakzinierung als Kontrollmaßnahme gegen Paratuberkulose gelegt.

Erst im Jahr 1989, als die neue Technik der PCR entdeckt wurde, konnten Nukleotidsequenzen der DNA des Erregers entschlüsselt werden und er wurde fortan als *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* klassifiziert (Manning und Collins, 2010).

### 2.2 Erreger

MAP ist ein säurefestes, gram-positives, fakultativ intrazelluläres Stäbchen (Fecteau, 2018), welches zur Familie der *Mycobacteriaceae* und zur Ordnung der *Actinomycetales* gehört (Selbitz, 2007).

Sowie andere Mykobakterien hat auch MAP eine stark lipidhaltige Zellwand, die aus verschiedenen Schichten besteht (Woo und Czuprynski, 2008). Dadurch hat der Erreger eine hohe Beständigkeit gegenüber Umwelteinflüssen, wie Temperatur oder Feuchtigkeit. Im Boden konnte MAP noch nach elf Monate nachgewiesen werden und auch nach Lagerung über zwölf Monate bei -14 C ließ sich das Bakterium noch anzüchten (Büttner, 2005).

Die Subspezies MAP kann von anderen nahe verwandten *Mycobacteriaceae* gut durch ihr sehr langsames Wachstum und durch ihre Abhängigkeit vom Siderophor Mycobactin unterschieden werden (Englund, 2003). Letzteres ist vor allem dann nötig, wenn die Primärkultur aus tierischem Gewebe gewonnen wird (Büttner, 2005).

Als Nährmedien für die Kultivierung von MAP können HEYM (Herrold's egg yolk medium), Löwenstein-Jensen Medium, modifiziertes BACTEC 12B radiometrisches Medium und modifiziertes Middlebrook 7H10 (7H10) Medium verwendet werden (Whittington et al., 2000).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Insertionssequenz IS900, die im Genom mittels PCR nachgewiesen werden kann und spezifisch für MAP ist. Obwohl die Kultivierung als Gold Standard in der MAP-Diagnostik gilt, wird oftmals die PCR herangezogen, da hiermit schneller ein Ergebnis erzielt werden kann (Englund, 2003).

### **2.3 Epidemiologie**

Paratuberkulose ist eine Erkrankung, die bei domestizierten Wiederkäuern, wie Milchkühen, Mastrindern, Ziegen, Schafen und Kameliden vorkommen kann. Außerdem wurde der Erreger bei Büffeln, Bisons (Whittington et al., 2019), Rothirschen, Rehen, Damhirschen und Mufflons nachgewiesen (Machackova et al., 2004). Darüber hinaus konnte MAP aus Menschen, Primaten, wildlebenden Nicht-Wiederkäuern, wie Hasen, Füchsen, Hermelinen, Wiesel (McAloon et al., 2019), Hunden, verwilderten Katzen, Papageien sowie Bären isoliert werden, wobei diese keine klinischen Symptome aufwiesen (Fawzy et al., 2018).

Nach dem ersten Nachweis in Deutschland 1895 verbreitete sich die Paratuberkulose in ganz Europa sowie in die Vereinigten Staaten und wurde im Laufe der Jahre weltweit registriert (McAloon et al., 2019).

Aktuelle Studienergebnisse aus 48 Ländern weisen auf Herdenebene eine MAP-Prävalenz von über 20 % in der Hälfte der untersuchten Länder auf. Dabei konnte der Erreger in bis zu 73 % der Milchviehherden isoliert werden (Whittington et al., 2019). Bei Mastrindern konnte MAP in 33 von 45 Ländern nachgewiesen werden, bei Schafen und Ziegen in 28 von 44 Ländern und bei Kameliden in 12 von 28 Ländern (Whittington et al., 2019). Zu beachten ist, dass die Prävalenz in 60 % der Länder vermutlich zu niedrig eingeschätzt wurde. Gründe dafür sind das

verwendete Testverfahren im jeweiligen Land, unzureichende Überwachungsprogramme, ungenügendes Wissen über die klinischen Symptome der Krankheit, Zurückhaltung von Daten, aufgrund von Bedenken seitens der LandwirtInnen oder Sorglosigkeit gegenüber Paratuberkulose seitens der Regierung (Whittington et al., 2019).

In Österreich konnten im Jahr 2005 in einer landesweiten Untersuchung 19 % der Rinderherden serologisch positiv auf MAP getestet werden (Khol et al., 2007). In aktuelleren Untersuchungen aus Tirol waren im Jahr 2013 7,5 % der Rinderbetriebe bei Umweltkotproben (Sockentupfer) MAP-positiv. Im Anschluss wurden bei 3758 Tieren aus den positiven Betrieben Einzeltierkotproben entnommen, bei denen 248 Tiere ein positives Ergebnis aufwiesen (6,6 %) (Khol et al., 2019).

MAP wird meist durch Zukauf subklinisch infizierter Tiere in einen naiven Bestand eingeschleppt (McAloon et al., 2019). Das exakte Nachvollziehen der Verbreitung von MAP zwischen und innerhalb von Herden ist, aufgrund der langen Latenzzeit und der geringen Sensitivität der verfügbaren Labortests in frühen Infektionsstadien schwierig. Somit zeigen experimentelle Modelle oft eine ungenaue Herdenprävalenz an, die von der tatsächlich vorherrschenden abweicht (McAloon et al., 2019).

### **2.3.1 Ausscheidung**

Eine Infektion mit MAP erfolgt meist durch orale Aufnahme von erregerhaltigem bzw. kontaminiertem Material wie Kot, Kolostrum oder Milch (Clarke, 1997; Streeter et al., 1995). Letzteres ist auch für den Menschen relevant, da MAP im Verdacht steht, mitverantwortlich für die humane Erkrankung Morbus Crohn zu sein. Studien zeigten, dass Morbus Crohn Patienten häufiger positiv auf MAP getestet wurden als gesunde Probanden (Waddell et al., 2015). Problematisch dabei ist auch, dass MAP bei der herkömmlichen Pasteurisierung der Milch überleben kann, jedoch nur, wenn der Erreger in ausreichenden Mengen in der Milch vorhanden ist (Grant et al., 2002). Auch wenn der Beweis eines Zusammenhangs zwischen den beiden Erkrankungen nach wie vor aussteht, ist es von größter Wichtigkeit die Menge an MAP-haltiger Milch mittels Kontrollprogrammen zu reduzieren (McAloon et al., 2019).

Eine aerogene Übertragung wurde experimentell nachgewiesen, deren epidemiologische Bedeutung jedoch unklar ist (Eisenberg et al., 2011). MAP konnte auch im Sperma nachgewiesen werden, es gibt jedoch keine Studien, die belegen, dass durch kontaminiertes

Sperma eine Infektion des Muttertieres oder des Fötus hervorgerufen wird (Manning und Collins, 2001).

Eine Übertragung durch kontaminierte Milch ist vermutlich der häufigste Infektionsweg beim Rind, da gerade Kälber besonders empfänglich sind und sehr große Mengen an Milch zu sich nehmen (Manning und Collins, 2001).

Bei der fäkalen Ausscheidung von MAP können sogenannten low shedder (<10 Kolonie bildende Einheiten (KbE)/Reagenz), medium shedder (10-50 Kbe/Reagenz) und high shedder (>50 KbE/Reagenz) je nach ausgeschiedener Erregermenge unterschieden werden, wobei etwa 70% der Tiere low shedder sind (Whitlock et al., 2000). Zusätzlich gibt es einen kleinen Anteil an Tieren, die besonders viel Erregermaterial ausscheiden: die super-shedder (Whitlock et al., 2005). Es wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob diese Tiere dann auch als super-spreader fungieren, wobei es möglich scheint, dass solche Tiere für zeitlich und lokal begrenzte Paratuberkuloseausbrüche verantwortlich sind.

Außerdem muss bei der Ausscheidung noch zwischen kontinuierlichen und intermittierenden Ausscheidern unterschieden werden. Ein Großteil der natürlich infizierten Tiere scheidet geringe Mengen in intermittierenden Abständen aus (McAloon et al., 2019). Mit fortschreitender Infektion steigt die MAP-Ausscheidung jedoch meist an und findet schließlich kontinuierlich statt (Fecteau, 2010).

Mit Paratuberkulose wird zusätzlich noch eine weitere Ausscheidungsform in Verbindung gebracht: das sogenannte passive shedding. Dabei wird der Erreger oral über kontaminiertes Futter aufgenommen und ohne eine Infektion hervorzurufen mit dem Kot wieder ausgeschieden. Erstmals wurde dieses Phänomen von Sweeny et al. (1992) beschrieben (Kralik et al., 2014). Dabei zeigte sich, dass Kalbinnen, die mit MAP-kontaminiertem Futter gefüttert wurden, den Erreger, proportional zur Aufnahme, mit dem Kot wieder ausschieden. Alle Tiere blieben währenddessen stets seronegativ (Sweeny et al., 1992).

Eine weitere Studie untersuchte eine Rinderherde auf passive shedding, indem Tiere mit hoher MAP-Ausscheidung identifiziert und aus dem Bestand ausgeschieden wurden. Dabei zeigt sich, dass nach der Schlachtung von zwei high shedder Tieren die MAP-Prävalenz im gesamten Bestand bei der qPCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) von 63,4 % auf 42,1 % sank und in der Kultur kein einziges Tier mehr positiv war. Dies könnte ein Hinweis darauf

sein, dass einige Tiere nur passive Ausscheider waren (Kralik et al., 2014). In der Praxis ist die passive Ausscheidung von der aktiven Ausscheidung mit Infektion jedoch schwer zu unterscheiden und deren Vorkommen und Bedeutung umstritten (Sweeney et al., 1992).

## 2.4 Pathogenese

Eine Infektion mit MAP hängt stark vom Alter, dem Immunstatus und der Resistenzlage des jeweiligen Tieres (Klee, 2006) sowie vom Infektionsdruck ab (Fecteau, 2018). Es wird davon ausgegangen, dass sich 85 % der Tiere in den ersten Lebenswochen und etwa weitere 5 % im Laufe des ersten Lebensjahres mit MAP infizieren. Je älter die Tiere werden, desto stärker wird eine Altersresistenz ausgebildet. Eine altersabhängige Empfänglichkeit gegenüber MAP war wiederholt Gegenstand verschiedener Untersuchungen (McAloon et al., 2019). Dabei hat sich gezeigt, dass Kälber unter sechs Monaten ein signifikant höheres Risiko haben, sich mit Paratuberkulose zu infizieren als sechs bis zwölf Monate alte Kälber bzw. adulte Tiere (Windsor und Whittington, 2010). Bei höheren MAP-Konzentrationen haben auch sechs bis zwölf Monate alte Tiere eine höhere Signifikanz für eine Infektion als erwachsene Rinder. Bei sehr starker MAP-Umweltkontamination können sich adulte Tiere jedoch ebenfalls mit dem Erreger infizieren. Sie entwickeln dann oft keine oder nur sehr milde klinische Symptome im Gegensatz zu Tieren, die sich bereits im Jungtieralter mit MAP infiziert haben (Windsor und Whittington, 2010).

Die verbleibenden 10 % betroffener Tiere infizieren sich intrauterin (Büttner et al., 2005). Kongenitale Infektionen erfolgen meist dann, wenn das Muttertiere während der Trächtigkeit klinische Symptome aufweist. Bei etwa 39 % der Kälber konnte daraufhin MAP nachgewiesen werden, wohingegen nur 9 % der Kälber von subklinisch infizierten Kühen betroffen waren (Whittington und Windsor, 2009). Die Inzidenz von intrauterinen Infektionen hängt dabei stark von der Herdenprävalenz und dem Verhältnis von subklinisch zu klinisch infizierten Tieren ab (Whittington und Windsor, 2009).

Nach oraler Aufnahme gelangt das Bakterium über den Gastrointestinaltrakt (GIT) in den Dünndarm, wo es über M-Zellen der Peyer'schen Platten in das Darmgewebe eindringt. MAP exprimiert dabei FAPs (fibronectin attachment proteins), woran Fibronektion bindet und dieses wiederum an Integrine, was die Aufnahme in die Peyer'schen Platten mediiert. Nach dem

Eintritt in das Epithel wird der Erreger von subepithelialen Makrophagen phagozytiert (Woo und Czuprynski, 2008). Ob nun eine Infektion stattfindet, hängt vom Immunsystem des Tieres ab. Da MAP die Fähigkeit hat, in mononukleären Phagozyten zu persistieren, besteht die Möglichkeit, dass der Erreger intrazellulär überlebt und die für Paratuberkulose typische lange Inkubationszeit beginnt (Fecteau, 2018).

In Folge einer fortschreitenden Infektion rufen die subepithelialen Makrophagen eine T-Zell Aktivierung sowie eine klonale Expansion hervor. Zuerst werden T-Helferzellen 1 (TH1) aktiviert, die eine Gewebeeinfiltration durch Lymphozyten hervorrufen. Außerdem werden vermehrt Zytokine wie Interferon-Gamma (IFN $\gamma$ ), Interleukin 2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ) produziert, die vermutlich die zell-medierte Immunfunktion modulieren, um die intrazelluläre Infektion einzudämmen. Die TH1 Immunreaktion ist dabei vor allem während des subklinischen Stadiums vorherrschend. MAP kann Monate bis Jahre in den Makrophagen und Granulomen verweilen. Während dieser Zeit wird immer wieder eine T-Zell Immunantwort hervorgerufen, um Gewebeschäden und eine weitere Ausbreitung des Erregers zu verringern (Manning und Collins, 2001). In den Makrophagen wird der Erreger in die mesenterialen Lymphknoten transportiert und von dort aus kommt es zu einer hämatogenen und lymphogenen Verbreitung des Erregers (Khol et al., 2014).

Welche Mechanismen für das Persistieren von MAP möglich sind, ist beispielsweise Gegenstand der Untersuchung von Woo und Czuprynski (2008). Die wohl wirksamste Möglichkeit ist, dass lebende MAP die Phagozyten-Lysosom-Fusion und die Phagosom-Ansäuerung unterdrücken können. Beide Mechanismen sind bedeutsam für die intrazelluläre Erregereliminierung. Eine weitere Möglichkeit für das intrazelluläre Überleben könnte sein, dass bovine Monozyten und Makrophagen bei einer MAP-Infektion kaum ROIs (reactive oxygen intermediate), wie zum Beispiel Superoxidanionen, Hydrogenperoxid oder Hydroxylradikale, produzieren, die normalerweise zur Eliminierung von Mykobakterien beitragen (Woo und Czuprynski, 2008). Weiters produziert MAP Superoxid-Dismutase, welches das intrazelluläre Überleben sichern könnte. Mit MAP infizierte Monozyten und Makrophagen produzieren außerdem nur sehr geringe Mengen an Stickstoffmonoxid, welcher mykobakterizide Eigenschaften aufweist (Woo und Czuprynski, 2008).

Wenn die Tiere klinische Symptome zeigen, läuft die T-Helferzellen 2 (TH2) Immunreaktion ab (Stabel, 2000). Die Ursache für diesen Übergang zum klinischen Stadium der Erkrankung ist nicht bekannt. Die TH2 aktivieren die humorale Immunantwort, somit die Bildung von Antikörpern (AK), die aber keinen Schutz für den Organismus bedeutet und die fortschreitende Erkrankung mit MAP nicht aufhält. Die Einwanderung von Entzündungszellen führt zur Verdickung der Darmwand und damit einhergehender Malabsorption sowie zu Proteinverlustenteropathie (Patterson et al., 1967). Durch TNF- $\alpha$  wird der Gewebeabbau gefördert, was wiederum zur Abmagerung des Tieres führt.

Zu diesem Zeitpunkt der Infektion ist MAP nicht nur im GIT vorhanden, sondern auch in Makrophagen, die in Niere, Leber, Euter und andere Organe eingewandert sind. Tiere in diesem Stadium der Erkrankung verenden meist nach einigen Wochen (Manning und Collins, 2001).

## **2.5 Pathologie**

Bei einer Infektion mit MAP können verschiedene pathologische Veränderungen festgestellt werden. Diese sind immer abhängig vom Stadium der Erkrankung sowie von der betroffenen Tierart.

Bei Rindern sind die häufigsten Läsionen ein verdicktes Ileum mit gewellter Schleimhaut, vergrößerte, ödematöse Mesenteriallymphknoten sowie erweiterte Lymphgefäße (Manning und Collins, 2001). Die Veränderungen im Darm werden dabei auch als „hirnwindungsähnliches“ Erscheinungsbild beschrieben und gelten als pathognomon (Klee, 2006). Darüber hinaus können eine Gelierung des viszeralen Fettes, Schleimhauterosionen im Darm sowie ein vergrößertes Darmlumen mit schleimig-wässrigem Inhalt festgestellt werden (Narnaware et al., 2016). Histopathologische Veränderungen sind eine ausgeprägte granulomatöse Entzündung im Bereich der Darmzotten, zahlreiche multinukleäre Riesenzellen und unzählige säurefeste Stäbchen im Zellinneren (Manning und Collins, 2001). Die Granulome bestehen dabei aus Makrophagen vom epitheloiden Typ. Die Darmzotten sind verkürzt, keulenförmig, zum Teil miteinander verschmolzen und zudem von Lymphozyten, Riesenzellen und epitheloiden Makrophagen infiltriert. Im Rahmen der Kultivierung und der PCR von Gewebeproben kann bei solchen Veränderung MAP eindeutig nachgewiesen werden (Narnaware et al., 2016).

Weiters können bei schweren klinischen Fällen granulomatöse Veränderungen an Niere, Lunge und systemischen Lymphknoten auftreten. (Clarke, 1997).

Im Gegensatz dazu können auch nur sehr milde, unspezifische pathologische Veränderungen, wie diffuse Lymphozyteninfiltration und vereinzelt Makrophagen in der Schleimhaut sowie fokale Granulome an den mesenterialen Lymphknoten, beobachtet werden. Diese Tiere weisen in der bakteriologischen Kultur fast immer ein negatives Ergebnis auf. Mittels PCR oder qPCR können Tiere mit milden pathologischen Veränderungen eher positiv auf MAP getestet werden (Narnaware et al., 2016).

## **2.6 Klinische Symptome**

Bei einer Infektion mit MAP können betroffene Tiere in unterschiedliche Erkrankungsstadien eingeteilt werden. Dabei werden vier verschiedene Kategorien unterschieden:

Stadium I: Stille Infektion

Stadium II: Subklinische Erkrankung

Stadium III: Klinische Erkrankung

Stadium IV: Fortgeschrittene klinische Erkrankung

Diese Stadien unterscheiden sich in der Schwere der klinischen Symptome, dem Potential der Ausscheidung des Erregers und damit der Wahrscheinlichkeit für den Nachweis von MAP. Im Zusammenhang dazu wird das sogenannte „Eisbergphänomen“ beschrieben, wobei für jedes klinisch erkrankte Tier einer Herde bis zu 25 weitere infiziert sind. Dabei wird vermutete, dass sich ein bis zwei Tiere in Stadium III, vier bis acht Tiere in Stadium II und zehn bis 14 Tiere in Stadium I befinden (Whitlock und Buergelt, 1996).

Aktuellere Studien zeigen jedoch, dass die Anzahl der Tiere in den einzelnen Stadien durchaus stark variieren kann. Die Verhältnisse zwischen den einzelnen Stadien hängen unter anderem davon ab, wie lange die Erkrankung schon am Betrieb vorherrscht. Dabei zeigt sich, dass mehr Tiere subklinisch infiziert sind, als eine stille Infektion haben. Etwas mehr bzw. gleich viele

Tiere haben eine stille Infektion und sind klinisch infiziert, jedoch nur in den ersten sieben Jahren der Erkrankung. Mit der Dauer der Erkrankung befinden sich etwa gleich viele Tiere in Stadium II und III, aber nach wie vor kaum Tiere in Stadium IV, da sie den Betrieb meist schon vor Erreichen dieses Stadiums verlassen (Magombedze et al., 2013).

#### Stadium I: Stille Infektion

Dieses Krankheitsstadium betrifft meist Kälber, Kalbinnen und juvenile Rinder bis zu einem Alter von zwei Jahren (Whitlock und Buergelt, 1996). Dieses Stadium dauert mindestens zwei und bis zu zehn Jahre. Die infizierten Tiere zeigen keinerlei klinische Symptome und sowohl Wachstum als auch Produktivität sind nicht beeinträchtigt (Fecteau, 2018). Etwa vier Wochen nach der Infektion können im Darm histopathologisch erste diffuse Zellinfiltrationen nachgewiesen werden (Büttner et al., 2005). MAP kann dabei mittels Kultivierung aus Darmgewebe nachgewiesen werden. Infizierte Tiere weisen in Stadium I keine AK gegen MAP auf und der Erreger wird, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Mengen unterhalb der Nachweisgrenze und intermittierend ausgeschieden (Fecteau, 2018).

#### Stadium II: Subklinische Erkrankung

Adulte Trägartiere mit subklinischer Infektion zeigen weder Durchfall noch andere sichtbare Anzeichen für Paratuberkulose (Whitlock und Buergelt, 1996). Histologisch kann eine granulomatöse Entzündung des Darms festgestellt werden und der Erreger verbreitet sich in umliegendes Gewebe oder Organe wie Uterus oder Euter. Subklinisch infizierte Tiere können eine reduzierte Milchleistung und verminderte Fertilität aufweisen (Fecteau, 2018). Vereinzelt weisen diese Tiere AK gegen MAP auf und der Erreger kann im Kot mittels Kultur bereits nachgewiesen werden (Baumgartner und Khol, 2006). Diese Tiere kontaminieren über die Erregerausscheidung mit dem Kot die Umwelt und bilden eine Infektionsquelle für andere Tiere (Fecteau, 2018). Subklinisch infizierte Tiere werden oft aus anderen Gründen, die nicht mit Paratuberkulose in Zusammenhang stehen, aus dem Bestand ausgeschieden (Baumgartner und Khol, 2006).

#### Stadium III: Klinische Erkrankung

Eine klinische Erkrankung manifestiert sich meist im Alter von drei bis sechs Jahren (Büttner et al., 2005) und tritt oft nach einer Abkalbung auf (Klee, 2006). Erste unspezifische Symptome sind eine verringerte Milchleistung und ein vermindertes Geburtsgewicht des Kalbes. Die Tiere

zeigen sukzessiven Gewichtsverlust bei gleichzeitig normalem oder auch gesteigertem Appetit und das Trinkvolumen ist erhöht. Zusätzlich kann intermittierender Durchfall mit abwechselnd flüssiger bis fester Kotkonsistenz beobachtet werden (Whitlock und Buergelt, 1996). Die Vitalparameter, wie innere Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz liegen in der Norm (Fecteau, 2018). Bei der Sektion zeigen sich die für Paratuberkulose typischen Veränderungen, wie Schleimhauthypertrophie, „hirnwindungsartige“ Darmstruktur, vergrößerte Lymphknoten sowie eine granulomatöse Entzündung des Ileums (Büttner et al., 2005). Die klinisch erkrankten Tiere haben hohe MAP-AK-Konzentrationen und scheiden große Erregermengen über den Kot aus, welche mittels Kultivierung oder PCR detektiert werden können (Fecteau, 2018).

#### Stadium IV: Fortgeschrittene klinische Erkrankung

Im finalen Stadium der Erkrankung zeigen die betroffenen Tiere ein vermindertes Allgemeinverhalten, sind schwach und abgemagert (Whitlock und Buergelt, 1996). Das Haarkleid ist struppig und bei Tieren mit schwarzer Fellfarbe kann sich das Haarkleid ins rötliche umfärben (Klee, 2006). Ödeme zwischen den Kieferästen, durch die Hypoproteinämie, Kachexie und schwallartiger, wässriger Durchfall sind weiters typisch für Stadium IV (Whitlock und Buergelt, 1996). Jedoch ist weder frisches noch verdautes Blut in Kot noch zeigen die Tiere Tenesmus. Mit dem Kot scheiden die Tiere große Mengen an MAP aus, ein serologischer Nachweis kann jedoch zu diesem Zeitpunkt auch negativ ausfallen (Büttner et al., 2005). Tiere in diesem Stadium der Erkrankung werden geschlachtet bzw. abgeschafft, andernfalls würden sie an Dehydrierung und Abmagerung sterben (Fecteau, 2018).

## **2.7 Diagnostik**

MAP kann mittels unterschiedlicher Methoden nachgewiesen werden. Es ist möglich einen direkten Erregernachweis durchzuführen, ein serologisches Verfahren zu verwenden oder eine zellgebundene Immunreaktion nachzuweisen. Zudem können bei der Sektion pathologische Veränderungen einen Hinweis geben (Klee, 2006).

### **2.7.1 Direkter Erregernachweis**

#### **Kultureller Erregernachweis**

Der kulturelle Erregernachweis über den Kot gilt als Goldstandard bei der Detektion von MAP (Mita et al., 2015). Er ist ein häufig verwendetes Testverfahren zur nichtinvasiven, antemortem

Diagnostik von infizierten Tieren (Plain et al., 2014). Ein Nachteil der Kotkultur ist jedoch die lange und auch variable Inkubationszeit bei der Kultivierung des Erregers (Nielsen und Toft, 2006). Diese kann acht bis zwölf Wochen (Plain et al., 2014) oder sogar bis zu 16 Wochen dauern und darüber hinaus ist das Verfahren relativ kostspielig. Als günstigere Alternative zu Einzeltierkotproben können Sammelkotproben verwendet werden. Diese liefern jedoch wesentlich weniger sensitive Ergebnisse, was wiederum von der ausgeschiedenen Erregermenge (Mita et al., 2015) bzw. der Herdengröße abhängt (Gschaider et al., 2019).

Als häufigste Nährböden für die Kultivierung werden Herrold's egg yolk Medium (HEYM) und modifiziertes Löwenstein-Jensen Medium (LJ) verwendet. HEYM unterstützt dabei das Wachstum von MAP besser und schneller als LJ (Nielsen et al., 2004). Weitere Nährböden sind modifiziertes BACTEC 12B radiometrisches Medium (Whittington et al., 2000), modifiziertes Dubois-Medium und verschiedene Middlebrook-Medien. Die Nährböden sind zusätzlich mit Mycobactin J versehen, da das Wachstum von MAP mycobactinabhängig ist (Stephan, 2007). Zur Dekontamination muss der Kot mit Natriumhydroxid, Oxalsäure, Malachitgrün sowie Neomycin und Amphotericin B behandelt werden (Nielsen und Toft, 2006).

Die Spezifität dieses Testverfahrens erreicht 96 bis 98 % (Nielsen und Toft, 2006) bzw. bis über 99 % bei Collins et al., 2006. Die Sensitivität dagegen ist niedriger und reicht, abhängig von der untersuchten Population, von 23 % bis zu 74 % (Nielsen und Toft, 2008).

### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die PCR ist eine weitere, direkte Methode, um MAP nachzuweisen. Im Gegensatz zur Kultivierung liegt das Ergebnis schneller vor und es ist eine Quantifizierung der ausgeschiedenen Erregermenge möglich. Die PCR kann dabei aus dem Kot, aus Gewebematerial (Fecteau, 2018), aus Milchproben (Logar et al., 2012), aus Blut (Baumgartner und Khol, 2006) oder auch aus Lymphflüssigkeit angefertigt werden (Khol et al., 2014). Nachteilig ist, dass bei der PCR nicht zwischen lebenden und abgestorbenen Erregern unterschieden werden kann (Baumgartner und Khol, 2006).

Als wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu anderen Mykobakterien gilt die von Collins et al. (1989) beschriebene repetitive DNA-Insertionssequenz *IS900*. Die anfangs schlechte Sensitivität der PCR wurde durch eine verbesserte nested PCR von Collins et al., 1993 gesteigert (Stephan, 2007).

In neueren Untersuchungen werden andere Sequenzen, wie die enterobacterial intergenic consensus (ERIC) Sequenz zusätzlich zur IS900 (Englund, 2003) oder die auf dem MAP F578-Gen basierende Sequenz verwendet, um MAP besser von anderen Mykobakterien, die ebenfalls IS900 Sequenzen besitzen, unterscheiden zu können.

Bei der Spezifität und Sensitivität erzielt die PCR ähnliche Ergebnisse wie die Kultivierung (Fecteau, 2018). Eine Spezifität von 99,5 % (Collins et al., 2006) und von bis zu 100 % (Logar et al., 2012) konnte nachgewiesen werden. Die Sensitivität reicht von 30 % bei Collins et al. (2006), über 36 % bei der qPCR aus Milch (Logar et al., 2012) und 53 % (Baumgartner und Khol, 2006) bis zu 73,5 %, 81 % und 93 % bei real-time PCRs aus Kot bei Prendergast et al. (2018). Wie bei der Kultur, hängt die Sensitivität der PCR wesentlich von der untersuchten Population bzw. dem Infektionsstadium ab: je kleiner die vorhandene Erregermenge, desto niedriger ist auch die Sensitivität (Prendergast et al., 2018).

Zusätzlich werden neue PCR Methoden, wie eine ertragsstarke PCR (HYDEqPCR) (Logar et al., 2012) und eine „high-throughput direct fecal PCR (HT-J)“, eine PCR mit höherer Durchsatzgeschwindigkeit (Plain et al., 2014), mit einer Sensitivität von 89 % (Logar et al., 2012) bzw. einer Spezifität von 99 % sowie einer Sensitivität von 60 % entwickelt (Plain et al., 2014).

### **Mikroskopischer Erregernachweis**

Als Material für den mikroskopischen Nachweis können Kot (Zimmer et al., 1999), distales Ileum, Ileozäkallymphknoten oder eine Biopsie ebendieser verwendet werden. Diese werden entsprechend aufbereitet und mittels der Ziehl-Neelsen (ZN) Färbung gefärbt. Anschließend wird nach säurefesten (roten) Stäbchen gesucht, die klassischerweise in Klumpen oder Nestern innerhalb der Makrophagen angeordnet sind. Bei der Histopathologie kann zusätzlich mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung nach Makrophagen vom epitheloiden Typ gesucht werden (Stephan, 2007).

Die Sensitivität dieser Methode ist jedoch gering und liegt bei etwa 36 %. Bei knapp der Hälfte der klinisch erkrankten Tiere können dabei säurefeste Stäbchen im Kot nachgewiesen werden (Zimmer et al., 1999).

## **2.7.2 Serologische Nachweisverfahren**

### **Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)**

Eine weit verbreitete Methode, um MAP-AK nachzuweisen ist der ELISA (Laurin et al., 2017). Dieses Testverfahren verwendet Enzyme, die an die AK binden und anschließend mithilfe eines Substrates sichtbar gemacht werden (Crowther, 2001).

Als Probenmaterial kann entweder Milch oder Blutserum verwendet werden. Das Verfahren ist schnell und einfach durchzuführen (Baumgartner und Khol, 2006) und zudem relativ kostengünstig.

Um den MAP-Status einer Herde zu ermitteln oder zu überwachen, können auch Tankmilchproben mittels ELISA untersucht werden. Bei einer hohen Herdenprävalenz haben ELISA aus Tankmilchproben eine hohe Sensitivität und Spezifität. Problematisch ist jedoch, dass viele Herden eine sehr niedrige Prävalenz haben, Tiere oft infiziert sind, aber keine AK aufweisen und die AK-Titer der einzelnen Tiere stark variieren können (Nielsen und Toft, 2014). Zudem ist es vom Alter der Tiere abhängig, wie sensitiv ein ELISA infizierte Tiere ermitteln kann (Nielsen und Toft, 2006). Dies ist vor allem in kleinen Herden mit einer jungen Altersstruktur mit relativ niedriger Herdenprävalenz problematisch (Sergeant et al, 2008).

Sensitivität und Spezifität der unterschiedlichen ELISA Testsysteme variieren sehr stark (Khol et al., 2013). Die Sensitivität von Milchproben ELISA reicht von 29,9 % bei Laurin et al., 2017, über 21 % bis 61 % (Nielsen und Toft, 2008) bis zu 27,8 % bis 31,8 % bei fünf verschiedenen ELISA Testsystemen (Collins et al., 2005). Bei ELISA von Blutseren ist die Varianz noch größer und reicht von 7 % bis 94 % (Nielsen und Toft, 2008). Die Spezifität hingegen ist zumeist relativ hoch und reicht von 79 % bis 100 % bei Nielsen und Toft (2008) bis zu 84,7 % bis 100 % bei Collins et al. (2005).

Weitere serologische Verfahren zum Nachweis einer MAP-Infektion sind die Komplementbindungsreaktion (KBR) und der Agargel-Immunodiffusionstest (AGIDT). Sie weisen, wie der ELISA, MAP-spezifische AK im Blutserum des Tieres nach. Beide Testmethoden sind jedoch hauptsächlich für Tiere im klinischen Stadium der Erkrankung geeignet (Olsen et al., 2002), da die Serokonversion, also die Bildung von AK, meist erst in einem späten Krankheitsstadium erfolgt (Hilbink et al., 1994). Subklinisch infizierte Tiere haben meist sehr niedrige AK-Titer und können bei der KBR oder der AGIDT somit unentdeckt

bleiben (Olsen et al., 2002). Außerdem kann keine Aussage über die tatsächliche Erregerausscheidung getroffen werden (Hilbink et al., 1994).

Sensitivität und Spezifität sind im Vergleich zu einem ELISA sehr gering (Fecteau, 2018). Daher werden beide Nachweisverfahren im Bereich der MAP-Diagnostik kaum noch angewendet (Büttner et al., 2005).

### **2.7.3 Nachweismethoden für zellgebundene Immunreaktionen**

#### **Intradermaler Tuberkulin-Test**

Der älteste Test für den Nachweis von Paratuberkulose ist der intradermale Tuberkulin-Test oder auch Johnin-Test genannt (Olsen et al., 2002; Kalis et al., 2003). Dabei werden Antigene (AG), wie etwa Johnin oder bovines PPD (purified protein derivate) (Nielsen, 2010) in die Haut injiziert. Nach etwa drei Tagen tritt eine verzögerte Hypersensitivitätsreaktion auf, die sich in einer Zunahme der Hautdicke manifestiert und mit einem Bauchzirkel gemessen werden kann (Kalis et al., 2003).

Dieses Testverfahren wurde erfolgreich für die Bekämpfung der bovinen Tuberkulose eingesetzt, erwies sich aber für die Paratuberkulose als wenig spezifisch (Olsen et al., 2002), da es oft zu Kreuzreaktionen mit *Mycobacterium bovis*, dem Erreger der Tuberkulose, oder anderen Mykobakterien kommt (Vannuffel et al., 1994). Die Spezifität variiert sehr stark, anhängig von den verschiedenen cut-offs, den verwendeten Antigenen und den untersuchten Herden. Daher wird dieses Nachweisverfahren heute kaum noch angewendet (Kalis et al., 2003).

#### **Interferon-Gamma Test (IFN- $\gamma$ Test)**

Beim IFN- $\gamma$  Test werden mithilfe von spezifischen MAP-AG T-Lymphozyten stimuliert. Diese Immunzellen produzieren daraufhin IFN- $\gamma$ , wenn sie im Vorfeld schon einmal Kontakt zu MAP-AG hatten. IFN- $\gamma$  kann daraufhin gemessen werden (Huda et al., 2004; Stephan, 2007).

Dieses Verfahren eignet sich, um subklinisch infizierte Tiere zu identifizieren. Bei Tieren ab dem Alter von einem Jahr kann möglicherweise eine Aussage darüber getroffen werden, ob diese später einmal klinisch erkranken werden (Huda et al., 2004).

Bei Tieren unter 15 Monaten kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen, da bei Jungtiere IFN- $\gamma$  auch von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert werden kann (Nielsen, 2010).

Zusätzlich treten oft Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien auf, die sich negativ auf die Spezifität auswirken (Olsen et al., 2002). Diese beläuft sich bei Paolicchi et al. (2003) auf 88 % und bei Huda et al. (2004) auf 94 % bzw. 95 %. Die Sensitivität reicht von 13 % bis 85 % (Paolicchi et al., 2003, Huda et al., 2004). Die hohen Kosten und die aufwendige Durchführung machen das Verfahren für landesweite Überwachungs- und Kontrollprogramme somit ungeeignet (Olsen et al., 2002). Derzeit stehen auch keine kommerziell erhältliche IFN- $\gamma$  Testsysteme zur Verfügung.

Ein großer Nachteil aller serologischen Nachweisverfahren ist, dass der Erreger nicht direkt nachgewiesen wird und keine Aussage über Infektiosität oder Erkrankungsstadium getroffen werden kann (Nielsen, 2010).

## **2.8 Therapie**

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Therapie, die eine vollständige Heilung der Paratuberkulose gewährleistet. Es wurde versucht mit verschiedenen Antibiotika und Chemotherapeutika eine Therapie zu etablieren. Dies brachte jedoch nur eine vorübergehende Besserung der Symptome und nach dem Ende der Behandlung war der Erreger immer noch nachweisbar (Klee, 2006). Außerdem müsste die Therapie über einen sehr langen Zeitraum durchgeführt werden, was wiederum mit hohen Kosten verbunden ist und ökonomisch unrentabel wird. Nebenbei sind viele Präparate für lebensmittelliefernde Tiere nicht zugelassen (Emery und Whittington, 2004).

Das Ionophor Monensin soll protektive Effekte auf MAP haben. Die orale Verabreichung von Monensin war in Untersuchungen mit einer Reduktion der Läsionen im Ileum, Colon und der Leber assoziiert (Brumbaugh et al., 2000). Eine weitere Studie konnte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Verbesserung von histologischen Läsionen im Darm, auf den Nachweis mittels ZN-Färbung und auf die PCR aus Gewebe feststellen. Es wurde lediglich beobachtet, dass Monensin-supplementierte Tiere früher eine Resilienz gegenüber einer MAP-Infektion entwickeln als Tiere ohne Monensin (Stinson et al., 2019).

Da die klinische Paratuberkulose in Österreich anzeigepflichtig ist, ist auch eine Therapie bzw. der Therapieversuch untersagt.

## 2.9 Vakzination

Die erste Vakzination gegen Paratuberkulose erfolgte bereits im Jahr 1926 (Vallee und Rinjard, 1926). Die Impfung wird beim Jungtier durchgeführt, da diese Altersgruppe das höchste Risiko für eine Infektion hat und die Wirksamkeit der Vakzine vor einer Infektion oder in einem frühen Infektionsstadium am größten ist. Außerdem kann der Infektionszyklus des Erregers kontrolliert werden, da geimpfte infizierte Tiere nur sehr geringe Erregermengen ausscheiden und somit kaum andere Tiere infiziert werden (Emery und Whittington, 2004).

Dennoch können ein Tod- oder Lebendimpfstoff eine klinische Erkrankung nicht vollständig verhindern (Emery und Whittington, 2004). Es ist jedoch beschrieben, dass Kälber, die mit einem attenuierten Lebendimpfstoff immunisiert wurden, eine deutliche Reduktion der Inzidenz für eine klinische Erkrankung zeigten. Zusätzlich zu einer Impfung müssen in betroffenen Betrieben auch Managementmaßnahmen, wie das Keulen der Kälber von infizierten Muttertieren und die Bereitstellung von sauberem Trinkwasser für die Herde, getroffen werden, um den Erfolg zu erhöhen (Doyle, 1964; Wilesmith, 1982).

Durch die Impfung können das Auftreten von klinischen Symptomen verzögert und die Mortalitätsraten deutlich reduziert werden (Emery und Whittington, 2004). Darüber hinaus wird beschrieben, dass der Ausbruch der Erkrankung verzögert werden kann, die Ausscheidung des Erregers reduziert wird und auch die wirtschaftlichen Verluste sowie die Erregerverbreitung verringert werden können (Bastida und Juste, 2011, Reddacliff et al., 2006).

Aktuelle Studien ergaben, dass attenuierte, lebende Stämme von MAP eine Möglichkeit darstellen, neue Impfstoffe für die Ausbildung einer robusten Immunität gegenüber Paratuberkulose zu entwickeln (Ghosh et al., 2015).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass ein spezielles Membran-Protein maßgeblich für die Immunantwort bei Paratuberkulose beteiligt ist. Aufgrund dessen könnte möglicherweise eine Impfung auf Basis dieses Membran-Proteins entwickelt werden (Abdellrazeq et al., 2019).

Problematisch ist, dass geimpfte Tiere über einige Zeit hinweg positive Ergebnisse im Tuberkulintest aufweisen und somit die Tuberkulose Bekämpfung gefährden (Klee, 2006).

In Österreich ist es verboten, Tiere gegen Paratuberkulose impfen zu lassen (Paratuberkulose-Verordnung. BGBl. II, 2006/48).

## **2.10 Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen**

MAP kommt in vielen Ländern endemisch vor, beeinträchtigt das Tierwohl und führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten. Daher wurden die ersten lokal koordinierten Überwachungsprogramme für Paratuberkulose schon in den 1920er Jahren entwickelt. Die heute noch angewendeten stammen jedoch aus den letzten 30 Jahren. Diese Kontrollmaßnahmen variieren von kleinstrukturiert, über Maßnahmen in geografisch definierten Regionen bis hin zu national gültigen Überwachungsprogrammen. Effektive Kontrolle, sprich eine deutliche Reduktion der MAP-Prävalenz oder der wirtschaftlichen Einbußen, ist jedoch nur schwer zu erreichen (Geraghty et al., 2014). Es gibt jedoch auch erfolgreiche, regionale MAP-Überwachungs- und Bekämpfungsprogramme, wie Beispiele aus Thüringen, Hessen, Niedersachsen und Tirol zeigen (Khol et al., 2019).

### **2.10.1 Allgemeine Empfehlungen**

Der MAP-Eintrag in eine Herde wird oft erst dann bemerkt, wenn der Erreger schon ausgeschieden wird (Whittington und Sergeant, 2001). Dann richten sich die Kontrollmaßnahmen nicht an das Einzeltier, sondern gegen die betroffene Herde. Tiere, die MAP ausscheiden, müssen ausgemerzt und die Hygienemaßnahmen verstärkt werden, um die Infektion von Jungtieren und Kälbern möglichst zu vermeiden. Epidemiologische Modelle haben gezeigt, dass das „test and cull“ System oder auch die Rückverfolgung von Infektionsketten effektive Strategien sind, um die MAP-Prävalenz zu senken (Marcé et al., 2010, Kireby et al., 2016, Konboon et al., 2018).

MAP-Kontrollprogramme können verschiedene Ziele haben, entweder die Reduktion von klinischen Fällen und/oder die Senkung der Prävalenz innerhalb einer Herde. Beide Maßnahmen sind realisierbar, die vollständige Eradikation des Erregers kann hingegen nur in einzelnen Herden erreicht werden (Whittington et al., 2019). Das „stamping out“ von ganzen Herden ist nur sinnvoll, wenn die Inzidenz von Paratuberkulose sehr niedrig ist und der Wiederaufbau mit MAP-negativen Tieren gewährleistet werden kann (Khol et al., 2007).

Je nachdem welches Ziel man verfolgt, gibt es unterschiedliche Mittel, um Paratuberkulose zu kontrollieren. Eine Möglichkeit ist die Identifikation und Merzung von klinisch erkrankten bzw. subklinisch infizierten Tieren, das sog. „test and cull“ Prinzip (Lu et al., 2008). Dieses reicht jedoch als alleinige Maßnahme nicht aus und muss mit der Verbesserung der Biosicherheit am Betrieb kombiniert werden, um die MAP-Verbreitung zu verhindern. Die Hygienemaßnahmen richten sich vor allem auf den Bereich der Jungtieraufzucht, da diese besonders empfänglich für MAP sind. So ist zum Beispiel der Kontakt von Kälbern mit dem Kot adulter Tiere unbedingt zu vermeiden (Dore et al., 2012). Dadurch kann die fäkal-orale Übertragung unterbunden werden. In der Praxis ist dafür ein sauberer Abkalbbereich sowie ein gutes Milch- und Kollostrummanagement notwendig. Die verstärkten Hygienemaßnahmen bei der Jungtieraufzucht sollten auf den ganzen Betrieb ausgeweitet werden, um den Erfolg zu verbessern (Whittington et al., 2019).

Sowohl Feld- als auch Simulationsstudien haben gezeigt, dass die effektivste Kontrollmaßnahme eine Kombination aus „test and cull“ und verbesserter Biosicherheit am Betrieb ist (Dorshorst et al., 2006, Kudahl et al., 2011, Smith et al., 2017). So konnte in einem Modell gezeigt werden, dass „test and cull“ sowie verbesserte Kälberhygiene nötig sind, um den negativen Herdenstatus zu erhalten. Am wichtigsten war in diesem Modell jedoch die verringerte Exposition der Kälber gegenüber dem Kot adulter Tiere, gefolgt von der Testfrequenz und dem Anteil infizierter Tiere, die erfasst und anschließend gekeult wurden (Camanes et al., 2018).

Das Keulen der Nachkommen von infizierten Kühen, stellt eine weitere Kontrollmaßnahme dar, da bei MAP auch intrauterine Infektionen beschrieben sind. Zusätzlich kann verstärkt Weidepflege betrieben werden, um die Exposition für Weidetiere zu verringern (Whittington et al., 2019).

Ein weiterer Aspekt im Rahmen der Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen stellt die erhöhte Biosicherheit zwischen verschiedenen Herden dar, um MAP-negative Herden vor einem Eintrag des Erregers zu schützen. Den größten Risikofaktor stellen dabei subklinisch infizierte Tiere dar (Rangel et al., 2015). Darum bräuchte es Zertifikate für den MAP-Herdenstatus, um das Risiko für eine Übertragung besser abschätzen zu können (Whittington et al., 2019).

Wie Studien gezeigt haben, ist bei den Maßnahmen zur Bekämpfung der Paratuberkulose die Compliance der LandwirtInnen und auch der TierärztInnen ein limitierender Faktor. Dies liegt zum einen am erhöhten Arbeitspensum, der langen Dauer und dem eingeschränkten Erfolg der Bekämpfungsprogramme (Khol und Baumgartner, 2012). Zum anderen sind die Eradikation aber auch die Dekontamination der Umgebung mit hohen Kosten verbunden (Kennedy und Benedictus, 2001).

Eine wichtige Rolle in der MAP-Kontrolle- und Bekämpfung spielt die Kommunikation mit den LandwirtInnen und TierärztInnen über die Wichtigkeit und den Ablauf verschiedener Programme (Whittington et al., 2019). Ein Basisprogramm, bestehend aus drei Schritten, wird als Minimum für die Paratuberkulosebekämpfung vorgeschlagen. Im ersten Schritt werden alle adulten Tiere mit Durchfall identifiziert und Rinder mit klinischer Paratuberkulose gekeult. Als zweites wird versucht, je nach Möglichkeit, einfache Managementmaßnahmen in einem Betrieb zu etablieren. Schritt drei beinhaltet die regelmäßige Ermittlung des MAP-Herdenstatus mit dem Fokus auf ausscheidende Tiere. Diese Vorgehensweise verursacht nur geringe Kosten und wenig Arbeitsaufwand und sollte in jedem Land als Mindestmaß für die Paratuberkulosebekämpfung herangezogen werden (Khol und Baumgartner, 2012).

### **2.10.2 Österreich**

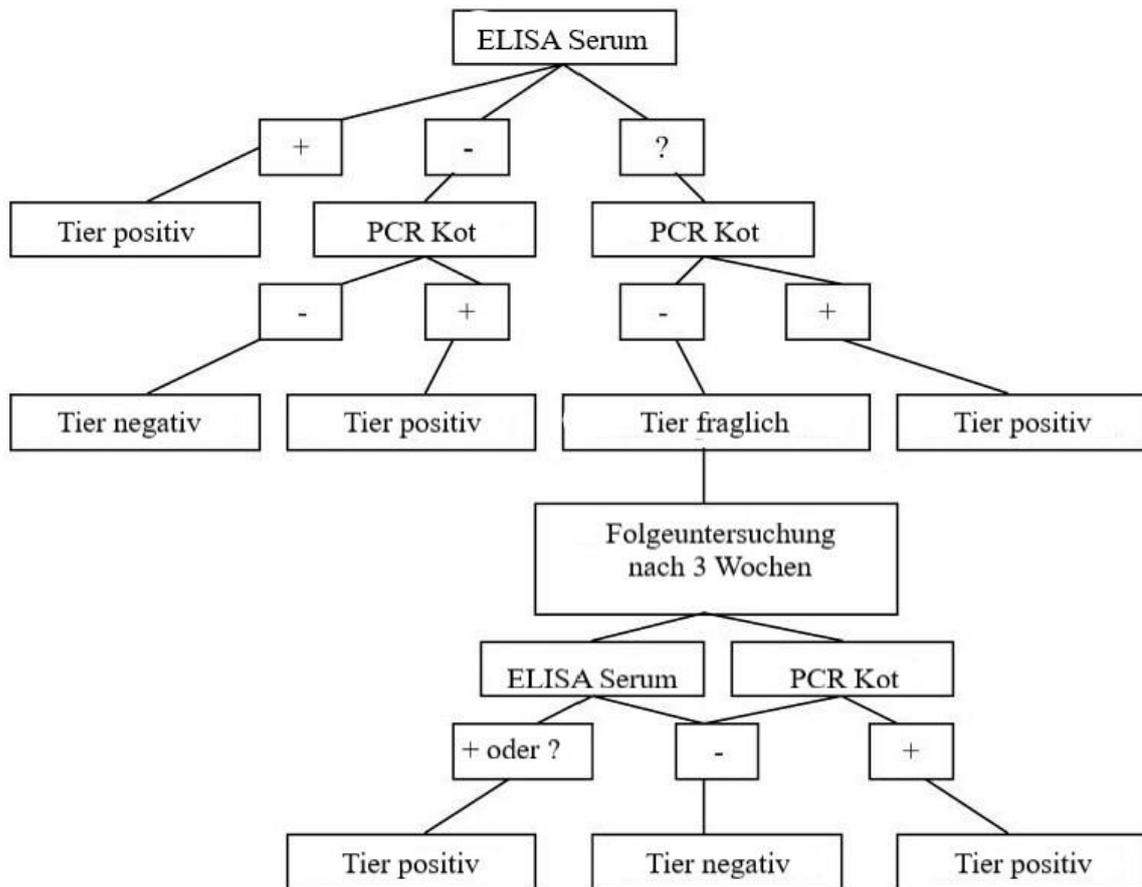
In Österreich ist am 03. April 2006 die Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über ein Überwachungsprogramm zur Bekämpfung der klinischen Paratuberkulose bei Wiederkäuern (Paratuberkulose-Verordnung) in Kraft getreten. Diese Verordnung gilt für alle landwirtschaftlichen Betriebe, die Rinder, Schafe, Ziegen oder in Gattern gehaltene Wildwiederkäuer halten.

Wenn Tiere klinische Symptome einer Infektion mit MAP aufweisen, muss dies bei der zuständigen Bezirksverwaltungsbehörde angezeigt werden. Die spezifischen Symptome für Paratuberkulose werden im Anhang der Verordnung ausgewiesen. Klinisch verdächtige Tiere müssen von der Herde abgesondert werden und deren Milch darf nicht in Verkehr gebracht werden. Wird der klinische Verdacht in einem Laborverfahren, gemäß Verordnung, bestätigt, ist das Tier innerhalb von drei Werktagen einer tierschutzgerechten Tötung zuzuführen. Anschließend müssen im betroffenen Betrieb Reinigungs-, Desinfektions-, Hygiene- und Managementmaßnahmen, die ebenfalls im Anhang der Verordnung ausgewiesen sind,

durchgeführt werden. Wird bei der Schlachttier- und Fleischuntersuchung Paratuberkulose festgestellt, ist der Tierkörper als untauglich zu bewerten (Khol et al., 2007).

Die Überwachung erfolgt durch AmtstierärztInnen, die im Zuge ihrer Tätigkeiten alle Rinder ab zwei Jahren sowie Schafe, Ziegen und Farmwild ab zwölf Monaten auf klinische Anzeichen von Paratuberkulose kontrollieren müssen. Wird bei der Schlachttieruntersuchung deutliche Abmagerung festgestellt und der Verdacht auf Paratuberkulose ausgesprochen, muss das Tier gesondert geschlachtet werden und einer bakteriologischen Fleischuntersuchung unterzogen werden. Dabei sind zusätzlich Leber- und Darmlymphknoten, sowie Darmteile des distalen Jejunums und Ileums zu entnehmen und zu untersuchen. Alle gefallenen Rinder ab zwei Jahren und Schafe, Ziegen und Farmwild ab zwölf Monaten, welche pathologisch-anatomische Veränderungen zeigen, die auf Paratuberkulose hindeuten, sind einer labordiagnostischen Untersuchung zu unterziehen. Beim Nachweis von MAP wird eine Betriebskontrolle durchgeführt, um mögliche weitere klinische Fälle zu identifizieren (Khol et al., 2007).

Bei pathologisch-anatomischen Verdachtsfällen werden Leber- und Darmlymphknoten sowie Darmteile mittels PCR auf MAP-spezifische Nukleinsäuren untersucht. Bei klinischen Verdachtsfällen wird zuerst eine blutserologische Untersuchung mittels ELISA angeordnet. Ist das Ergebnis negativ oder fraglich wird zusätzlich eine Kotprobe mittels PCR auf MAP-spezifische Nukleinsäuren untersucht. Die weitere Vorgehensweise bei klinischen Verdachtsfällen wird in Tab. 1 erläutert. Alle Untersuchungen werden im Nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose, der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) -Linz durchgeführt (Paratuberkulose-Verordnung. BGBl. II, 2006/48).



**Abb. 1:** Testschema für klinische Verdachtsfälle von Paratuberkulose laut der österreichischen Paratuberkulose-Verordnung, modifiziert nach Khol et al., 2007; ELISA: enzyme linked immuno sorbent essay; +: positives Ergebnis; -: negatives Ergebnis; ?: fragliches Ergebnis

## Tirol

In Tirol gibt es seit 2013 das Programm zum Schutz und zur Überwachung der Paratuberkulose (MAP) in Milchviehbetrieben, bei dem die TierhalterInnen freiwillig teilnehmen können und die Kosten vom Tiergesundheitsdienst Tirol übernommen werden (Khol et al., 2019).

Bei den teilnehmenden Betrieben werden alle zwei Jahre Kotproben mittels Sockentupfern entnommen und mit einem kombinierten Verfahren aus Erregerkultivierung und PCR der MAP-Herdenstatus erhoben (Köchler et al., 2017). Sollten im Zuge dieser Untersuchung positive Ergebnisse vorliegen, kann der Betrieb von der gesamten Herde Einzeltierkotproben entnehmen lassen. Erst beim Vorliegen dieser Ergebnisse, müssen sich die LandwirtInnen

entscheiden, ob sie am Paratuberkulose-Überwachungsprogramm teilnehmen möchten. Verpflichten sie sich dazu, müssen alle Tiere über 24 Monate über drei Jahre hinweg einer jährlichen Einzeltierkotuntersuchung unterzogen werden. Positiv getestete Tiere, müssen innerhalb der Merzungsfrist geschlachtet werden, bei einer Prävalenz von bis zu 10 % innerhalb von drei Monaten, bei höheren Prävalenzen innerhalb neun Monaten.

Eine zusätzliche Empfehlung ist der Zuchtausschluss von Kälbern von MAP-Ausscheidern, die Umsetzung von Hygienemaßnahmen sowie der Zukauf von Tieren ausschließlich aus MAP-unverdächtigen Betrieben. Den Status MAP-unverdächtig erlangt ein Betrieb, wenn innerhalb von drei Jahren bei keinem Tier in der Einzeltierkotprobe MAP nachgewiesen wurde. Bei den Sockentupferproben wird zweimal hintereinander ein negatives Ergebnis benötigt, um als MAP-unverdächtig eingestuft zu werden.

Zu Beginn des Programms 2013 wurden bei 4679 Betrieben Kotproben mittels Sockentupfern entnommen. Das entspricht insgesamt 61,4 % der Tiroler Rinderbetriebe und etwa 70 % der Milchviehbetriebe. 78,8 % der positiv getesteten Betriebe entschieden sich anschließend Einzeltierkotproben durchführen zu lassen. Auch 2016/17 (4206 Betrieben) und 2018/19 (>4000 Betriebe) konnten erneut hohe Beteiligungen verzeichnet werden. 2018 entschlossen sich 131 Betriebe zur Teilnahme am MAP Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm (Khol et al., 2019).

### **3 Material und Methode**

#### **3.1 Datenmaterial**

Das Ausgangsmaterial für die Datenauswertung wurde vom Tiergesundheitsdienst (TGD) Tirol zur Verfügung gestellt. Die Daten stammen aus dem Tiroler MAP Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm, welches 2013 gestartet wurde und bei dem zu Beginn über 4700 Rinderbetriebe mittels Sockentupferproben auf MAP untersucht wurden. In positiven Betrieben wurden anschließend alle Tiere mittels Einzeltierkotproben wiederum auf MAP getestet. Diese Ergebnisse lieferten das Datenmaterial für diese Arbeit.

Die Daten aus dem Jahr 2015 umfassten die PCR-Ergebnisse von Einzeltierkotproben von 3665 Tieren. In den darauffolgenden Jahren 2016/2017 wurden Einzeltierkotproben von 2151 Tieren mittels PCR und Kotkultur untersucht. Im Rahmen der dritten Untersuchung von Einzeltierproben im Zuge des Tiroler MAP Überwachungs- und Bekämpfungsprogrammes wurden 2017 und 2018 Einzelkotproben (PCR und Kulturversuch (KV)), sowie Blutproben mittels ELISA von 1910 Tieren untersucht. Eine weitere Untersuchung von Einzeltieren aus Betrieben mit einer positiven Sockentupferprobe fand von Herbst 2018 bis Mitte 2019 statt und umfasste 2072 Tiere, die mittels KV (Kot) sowie ELISA (Blut) untersucht wurden. Im Zuge der letzten in die vorliegende Arbeit einfließenden Beprobung wurden 2019 und 2020 1194 Tiere, wiederum mittels KV von Einzelkotproben und Blut-ELISA-AK untersucht.

Die Proben aus den Jahren 2015 und 2016/17 wurden am Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien untersucht. In den folgenden Jahren wurden sowohl die Kultur/PCR als auch der ELISA im Nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose, der AGES Linz, Österreich durchgeführt.

Für die Kot-AG-Untersuchung wurde ein kombiniertes Verfahren aus Kultivierung und PCR verwendet. Dabei wurde die Kotprobe zuerst in einigen Arbeitsschritten homogenisiert und auf vier Reagenzröhrchen aufgeteilt. Anschließend wurden alle Proben für zwölf Wochen bei 37 °C auf HEYM versehen mit Mycobactin J (Pourquier®, IDEXX Labor, Deutschland) bebrütet. Nach vier Wochen wurde eines der vier Reagenzröhrchen entnommen und mit dem vorhandenen Material eine PCR (VetMAX® MAP real-time PCR screening kit, Applied Biosystems von Lief Technologies, Deutschland) durchgeführt.

Die Blutproben wurden mittels ELISA auf MAP-AK untersucht. Dazu wurden die Proben zentrifugiert und das Serum mit dem IDEXX® Paratuberculosis screening antibody test (IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Deutschland) untersucht.

### **3.2 Datenaufbereitung**

Für die Zwecke dieser Arbeit wurden aus den jeweiligen Dateien lediglich die Ohrmarkennummern, das Datum der Probenentnahme, die Ergebnisse des ELISA und die Ergebnisse der PCR sowie des KV herangezogen. Alle Prozentangaben wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

Zu Beginn wurde die Anzahl der getesteten Tiere aus den jeweiligen Jahren ermittelt. Danach wurden alle Tiere, die entweder ELISA und/oder PCR und/oder im KV positiv waren identifiziert und die Ergebnisse nach Jahren sortiert. Dabei zeigte sich, dass mehrerer Tiere in einem Jahr zweimal getestet wurden und davon mindestens einmal positiv waren. Daher wurden die Jahre 2017 und 2019 in 2017/1 und 2017/2 sowie 2019/1 und 2019/2 aufgeteilt.

Um eine bessere Übersicht zu erlangen, wurde eine Tabelle (Übersichtstabelle) erstellt und jedes Tier mit einer internen Laufnummer versehen. In der ersten Spalte wurde die Ohrmarkennummer notiert und in den folgenden Spalten zuerst das jeweilige Jahr mit Datum der Probenentnahme und danach die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen (ELISA, PCR, KV). Da die Ergebnisse der PCR und des KV entweder übereinstimmten oder der KV nicht auswertbar oder MAP nicht nachweisbar war, aber die PCR ein positives Ergebnis lieferte, wurden PCR und KV unter dem Begriff Antigennachweis zusammengefasst. Außerdem wurde die Klassifizierung des KVs in geringgradig, mittelgradig und hochgradig nicht für die weiteren Analysen verwendet, sondern das Tier wurde lediglich als positiv gewertet. Nur in einigen Einzelfällen wurde die Klassifizierung für die Interpretation herangezogen.

Für die Fragestellung dieser Arbeit war es relevant, ob ein Rind im Zuge der vorliegenden Ergebnisse jemals positiv getestet wurde, ob danach noch weiterer Untersuchungsergebnisse vorliegen und wie diese ausfielen. Dazu wurden alle Tiere ermittelt, die mindestens einmal positiv getestet wurden und danach die Daten dahingehend analysiert, ob und wie oft diese Rinder nachuntersucht wurden und wie die Ergebnisse der Nachuntersuchung(-en) ausgefallen sind. Dabei wurden die Rinder in AG- und AK-positiv unterteilt, alle Tiere ermittelt, die einmal,

zweimal oder dreimal nachuntersucht wurden und die Ergebnisse schriftlich und in tabellarischer Form zusammengefasst.

Im zweiten Schritt wurde anhand der Ohrmarkennummer der Verbleib der positiv (AK und/oder AG) getesteten Tiere ermittelt. Dabei wurde zwischen Schlachtung, Verendung und Abgang EU (Europäische Union)-Land mit dem jeweiligen Datum oder lebend unterschieden. „Lebend“ bedeutete dabei, dass die Tiere mit Stand 01.09.2020 (Kontrolldatum) noch am Betrieb waren. Im Zuge der Analyse mussten drei Tiere aus der Auswertung genommen werden, da bei einem die Ohrmarkennummer ungültig war und bei zwei Tieren mit deutscher Ohrmarkennummer keine Meldungen vorhanden waren. Die Ergebnisse wurden in die Übersichtstabelle zu den jeweiligen Jahren eingearbeitet.

Anschließend wurde das Abgangsdatum (Schlachtung/Verendung/Abgang EU-Land) vom Datum der ersten positiven Testung subtrahiert und somit die Zeit von erster positiver Testung bis zum Abgang des Tieres ermittelt. Das Ergebnis wurde in Monaten angegeben. Daraus resultierend wurde eine Tabelle mit den positiv getesteten Tieren der jeweiligen Jahre und den entsprechenden Monaten bis zu deren Abgang aus dem Betrieb erstellt. Hier wurde darauf verzichtet eine Einteilung in 2017/1 und 2017/2 und 2019/1 und 2019/2 vorzunehmen, da nur das Datum der ersten positiven Testung relevant und somit ein mögliches zweites Testergebnis im selben Jahr hier nicht von Bedeutung ist. Im letzten Schritt wurden noch ermittelt, wie viele Tiere in den ersten drei, sechs und zwölf Monaten nach erstmaliger positiver Testung aus dem Betrieb abgingen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Antigen- und Antikörpernachweis

In Tab. 1 wird die Anzahl an positiven AG-, AK- sowie AG- und AK-Ergebnissen der jeweiligen Jahre in absoluten Zahlen und in Prozent der Gesamttieranzahl des entsprechenden Jahres aufgelistet. AG- und AK-Ergebnisse zeigen Tiere, die zum selben Zeitpunkt sowohl AG als auch AK-positiv waren. Im Jahr 2015 wurden insgesamt 3665 Tiere untersucht. 2016 wurden 980 Tiere getestet. Bei der Testung 2017/1 wurden 1171 Tiere und 2017/2 1703 Tiere untersucht. Im Jahr 2018 wurden 1632 Tiere getestet. Bei der Untersuchung 2019/1 wurden 647 Tiere getestet und bei 2019/2 waren es 1797 Tiere. 2020 wurden 44 Tiere getestet. Insgesamt lagen 10.659 Testergebnisse vor, wovon 356 (3,3 %) AG-positiv, 40 (0,4 %) AK-positiv und 47 (0,4 %) AG- und AK-positiv zum gleichen Zeitpunkt waren.

**Tab. 1:** Ergebnisse von positiven AG-Testung, positiven AK-Testung, sowie positiven AG und AK-Testung zum gleichen Zeitpunkt der jeweiligen Jahre

JAHR	TIERE	AG <sup>1</sup>	AK <sup>2</sup>	AG UND AK
2015	3665	246 (6,7 %)	0	0
2017/1	1171	50 (4,3 %)	0	0
2017/2	1703	15 (0,9 %)	16 (0,9 %)	5 (0,3 %)
2018	1632	11 (0,7 %)	18 (1,1 %)	3 (0,2 %)
2019/1	647	16 (2,5 %)	6 (0,9 %)	20 (3,1 %)
2019/2	1797	17 (1 %)	0	19 (1,1 %)
2020	44	1 (2,3 %)	0	0
<b>GESAMT</b>	<b>10 659</b>	356 (3,3 %)	40 (0,4 %)	47 (0,4 %)

<sup>1</sup>AG: Antigen; <sup>2</sup>AK: Antikörper

### Antigennachweis, Wiederholungsuntersuchungen

Bei 388 Kühen (3,3 %) wurde MAP mindestens einmal direkt nachgewiesen. Nach einem positiven Ergebnis bei PCR/Kultur wurden 54 Tiere (14%) noch einmal untersucht. Davon wurden 31 (8 %) Tiere einmal, neun (2,3 %) Tiere zweimal und 14 (3,6 %) Tiere dreimal

nachuntersucht. Von den 31 einmal nachuntersuchten Tieren wiesen 13 (41,9 %) Tiere erneut ein positives Ergebnis auf, 18 Tiere wurden negativ getestet (58,1 %). Von den neun zweimal nachuntersuchten Tieren wiesen neun Tiere (100 %) bei Nachuntersuchung (NUS) I und acht Tiere (89 %) bei NUS II ein negatives Ergebnis auf. Von den 14 dreimal nachuntersuchten Tieren wiesen 13 Tiere (92,9 %) bei NUS I ein negatives Ergebnis auf. Bei NUS II und NUS III wiesen wieder alle 14 Tiere (100 %) ein negatives Ergebnis auf. Von den 388 positiv getesteten Tieren wurden demnach 40 Tiere (10,3 %) noch mindestens einmal negativ getestet. Die Ergebnisse der zweimal nachuntersuchten Tiere werden in Tab. 2 aufgelistet, die der dreimal nachuntersuchten in Tab. 3.

### Antikörpernachweis, Wiederholungsuntersuchungen

Bei 65 Kühen (1,1 %) wurden mindestens einmal Antikörper gegen MAP nachgewiesen. Nach einem positiven AK-Ergebnis wurden 22 Tiere (33,9 %) noch einmal untersucht. Davon wurden 20 Tiere (91 %) einmal nachuntersucht, zwei Tiere (9 %) zweimal nachuntersucht und kein Tier dreimal nachuntersucht. Von den 20 einmal nachuntersuchten Tieren wiesen 13 Tiere (65 %) erneut ein positives Ergebnis auf, sieben Tiere (35 %) wurden negativ getestet. Von den zwei zweimal nachuntersuchten Tieren (100 %) wiesen beide bei NUS I und NUS II ein negatives Ergebnis auf. Diese beiden Rinder waren bei der Untersuchung 2017/1, also vor der positiven AK-Erstuntersuchung, AG-negativ. Von den 65 positiv getesteten Rindern wurden neun Tiere (11,8 %) noch mindestens einmal negativ getestet. Die Ergebnisse der zweimal nachuntersuchten Tiere werden in Tab. 2 aufgelistet.

**Tab. 2:** Ergebnisse von Nachuntersuchung 1 und Nachuntersuchung 2 nach einem positiven MAP<sup>1</sup> Antigen- (AG) oder Antikörper- (AK) Ergebnis

Tier	Erstuntersuchung		Nachuntersuchung I		Nachuntersuchung II	
	AG <sup>2</sup>	AK <sup>3</sup>	AG	AK	AG	AK
191*	positiv	nv <sup>4</sup>	negativ	negativ	negativ	negativ
199	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ
200	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ

311	positiv	nv	negativ	nv	negativ	negativ
25	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ
27	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ
30	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
31	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
34	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
68	positiv	nv	negativ	positiv	positiv	positiv
80	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ

<sup>1</sup>*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; <sup>2</sup>AG: Antigen; <sup>3</sup>AK: Antikörper; <sup>4</sup>nv: nicht vorhanden;  
\*: interne Laufnummer

**Tab. 3:** Ergebnisse von Nachuntersuchung 1, Nachuntersuchung 2 und Nachuntersuchung 3 nach einem positiven MAP<sup>1</sup> Antigen- (AG) oder Antikörper- (AK) Ergebnis

Tier	Erstuntersuchung		Untersuchung I		Untersuchung II		Untersuchung III	
	AG <sup>2</sup>	AK <sup>3</sup>	AG	AK	AG	AK	AG	AK
33*	positiv	nv <sup>4</sup>	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
48	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
49	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
57	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
59	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
60	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
76	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
77	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
79	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
171	positiv	nv	negativ	nv	negativ	negativ	negativ	negativ
174	positiv	nv	negativ	nv	negativ	negativ	negativ	negativ
175	positiv	nv	negativ	nv	negativ	negativ	negativ	negativ

186	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
188	positiv	nv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ

<sup>1</sup>*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; <sup>2</sup>AG: Antigen; <sup>3</sup>AK: Antikörper; <sup>4</sup>nv: nicht vorhanden;  
\*: interne Laufnummer

## 4.2 Abgangsdaten

### Abgänge Gesamtergebnis

In den Jahren 2015, 2017, 2018, 2019 und 2020 gab es insgesamt 422 erstmals positiv getestete Tiere. Diese Rinder können MAP-AG-positiv sein und/oder MAP-spezifische AK aufweisen. Davon sind 13 Tiere (3,1 %) noch innerhalb eines Monats nach dem positiven Befund aus dem Bestand ausgeschieden (Monat 0). Detaillierte Ergebnisse dazu finden sich in Tab. 4. Insgesamt sind mit Stand 01.09.2020 (Kontrolldatum) 342 positiv getestete Rinder (81 %) aus den jeweiligen Beständen ausgeschieden worden. 96 Tiere (22,8 %) sind innerhalb der ersten drei Monate nach erstmaliger positiver Testung verendet oder wurden geschlachtet bzw. verkauft. Nach sechs Monaten hatten 168 Rinder (39,8 %) den Betrieb verlassen und innerhalb von zwölf Monaten sind 249 Tiere (59 %) aus den Beständen ausgeschieden worden. Weitere 93 Tiere (22 %) sind 13 Monate oder später verendet, geschlachtet oder verkauft worden. Zum Zeitpunkt des Kontrolldatums befinden sich noch 80 positiv getestete Tiere (19 %) auf den jeweiligen Betrieben. In Abb. 2 wird veranschaulicht, wie viele Tiere in den einzelnen Quartalen aus den Beständen ausgeschieden wurden. Dabei ist zu erkennen, dass in den ersten beiden Quartalen 96 bzw. 72 Tiere abgegangen sind, was jeweils 22,8 % und 21,1 % der Gesamtabgänge entspricht. Weitere Ergebnisse finden sich in Abb. 2.

### Abgänge 2015

Im Jahr 2015 wurden 246 Tiere erstmals AG-positiv auf MAP getestet. Von diesen Tieren wurden 223 (90,7 %) bis zum 01.09.2020 aus dem Bestand ausgeschieden (Schlachtung, Verendung, Abgang EU-Land). Zehn Tiere (4,1 %) sind noch innerhalb eines Monats aus dem Bestand ausgeschieden worden (Monat 0). 62 Tiere (25,2 %) sind innerhalb von drei Monaten nach erstmaliger positiver Testung entweder verendet, geschlachtet oder verkauft worden. Innerhalb von sechs Monaten nach positivem Ergebnis haben 104 Tiere (42,3 %) den Betrieb

verlassen und innerhalb von zwölf Monaten sind 146 Tiere (59,4 %) aus den Beständen ausgeschieden worden. Weitere 77 Tiere (31,3 %) haben nach 13 Monaten oder später den Betrieb verlassen. Detaillierte Ergebnisse dazu finden sich in Tab. 4. Zum Zeitpunkt des Kontrolldatums waren noch 23 der 2015 positiv getesteten Tiere (9,3 %) am Leben.

### **Abgänge 2016**

Im Jahr 2016 wurden keine Tiere erstmal positiv getestet. Daher gibt es von diesem Jahr auch keine Abgangsdaten.

### **Abgänge 2017**

Im Untersuchungsjahr 2017 wurden 80 Tiere erstmal positiv auf MAP-AG- und/oder positiv auf MAP-AK getestet. Bis zum Kontrolldatum sind 60 Tiere (75 %) entweder verendet, wurden geschlachtet oder verkauft. In den ersten drei Monaten nach positiver Testung sind 17 Tiere (21,3 %) aus dem Bestand ausgeschieden. 34 Tiere (42,5 %) haben den Betrieb innerhalb von sechs Monaten verlassen und nach zwölf Monaten sind 52 Tiere (65 %) aus dem Bestand ausgeschieden worden. Weitere acht Tiere (10 %) sind 13 Monate oder später entweder verendet, geschlachtet worden oder in ein EU-Land abgegangen. Detaillierte Ergebnisse dazu finden sich in Tab. 4. Mit Stand 01.09.2020 befanden sich noch 20 positiv getestete Tiere (25 %) auf den jeweiligen Betrieben.

### **Abgänge 2018**

Im Jahr 2018 wurden 31 Tiere erstmals AG-positiv auf MAP getestet und/oder wiesen MAP-spezifische AK auf. Insgesamt wurden 20 positive Tiere (64,5 %) bis zum 01.09.2020 geschlachtet. Fünf Tiere (16,1 %) wurden innerhalb von drei Monaten und acht Tiere (25,8 %) innerhalb von sechs Monaten aus dem Bestand ausgeschieden. Nach zwölf Monaten hatten 18 Tiere (58,1 %) den jeweiligen Betrieb verlassen. Zwei Tiere (6,5 %) sind nach 18 bzw. nach 19 Monaten aus dem Bestand ausgeschieden worden. Detaillierte Ergebnisse dazu finden sich in Tab. 4. Zum Zeitpunkt des Kontrolldatums waren 11 positiv getestete Tiere (35,5 %) noch am Leben.

### Abgänge 2019

Im Untersuchungsjahr 2019 gab es insgesamt 64 positive Tiere. Diese können wiederum entweder AG- und/oder AK-positiv auf MAP gewesen sein. Zum Zeitpunkt des Kontrolldatums wurden insgesamt 38 dieser Tiere (59,4 %) aus dem Bestand ausgeschieden. Innerhalb von drei Monaten sind elf Tiere (17,2 %) verendet, geschlachtet oder verkauft worden. 21 Tiere (32,8 %) hatten innert sechs Monaten den Betrieb verlassen und 32 Tiere (50 %) sind nach zwölf Monaten aus dem Bestand ausgeschieden worden. Weitere sechs Rinder (9,4 %) haben 13 Monate oder später den Betrieb verlassen. Detaillierte Ergebnisse dazu finden sich in Tab. 4. Mit Stand 01.09.2020 befanden sich noch 26 positiv getestete Tiere (40,6 %) in den jeweiligen Betrieben.

### Abgänge 2020

Im Jahr 2020 wurde nur bei einem Tier MAP-AG nachgewiesen. Dieses Tier wurde zwei Monate nach der positiven Testung geschlachtet (siehe Tab. 4).

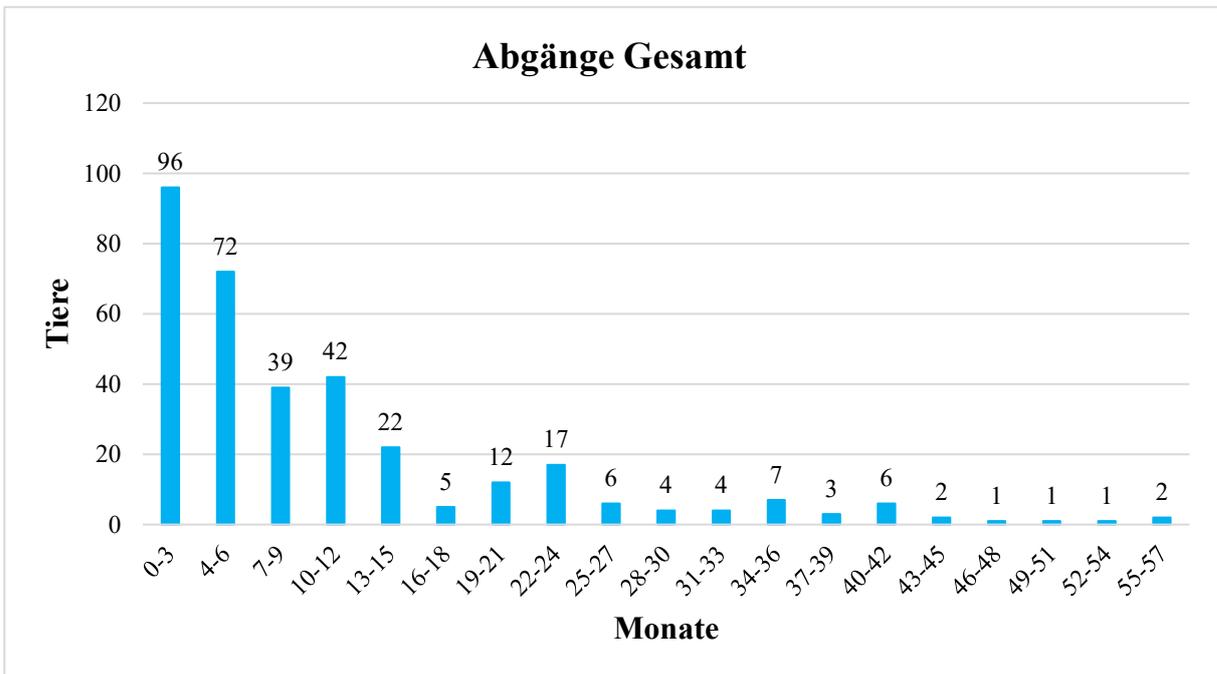
**Tab. 4:** Abgänger (erstmalig Paratuberkulose positiv getestete Tiere) der einzelnen Jahre unterteilt nach Monaten (positive Testung bis zum Abgang)

Monat	Abgänger					Gesamt
	2015	2017	2018	2019	2020	
0*	10	1	0	2	0	13
1	3	4	1	3	0	11
2	30	1	2	1	1	35
3	19	11	2	5	0	37
4	11	6	0	6	0	23
5	9	2	0	2	0	13
6	22	9	3	2	0	36
7	3	4	2	3	0	12
8	4	4	0	1	0	9
9	10	6	1	1	0	18

<b>10</b>	13	2	2	0	0	17
<b>11</b>	6	1	5	2	0	14
<b>12</b>	6	1	0	4	0	11
<b>13</b>	7	2	0	2	0	11
<b>14</b>	7	0	0	3	0	10
<b>15</b>	1	0	0	0	0	1
<b>16</b>	1	0	0	0	0	1
<b>17</b>	2	0	0	0	0	2
<b>18</b>	0	1	1	0	0	2
<b>19</b>	4	0	1	1	0	6
<b>20</b>	1	0	0	0	0	1
<b>21</b>	5	0	0	0	0	5
<b>22</b>	6	2	0	0	0	8
<b>23</b>	2	1	0	0	0	3
<b>24</b>	6	0	0	0	0	6
<b>25</b>	2	1	0	0	0	3
<b>26</b>	1	0	0	0	0	1
<b>27</b>	2	0	0	0	0	2
<b>28</b>	4	0	0	0	0	4
<b>29</b>	0	0	0	0	0	0
<b>30</b>	0	0	0	0	0	0
<b>31</b>	1	0	0	0	0	1
<b>32</b>	2	0	0	0	0	2
<b>33</b>	1	0	0	0	0	1
<b>34</b>	2	0	0	0	0	2
<b>35</b>	2	0	0	0	0	2

<b>36</b>	3	0	0	0	0	3
<b>37</b>	0	0	0	0	0	0
<b>38</b>	2	1	0	0	0	3
<b>39</b>	0	0	0	0	0	0
<b>40</b>	3	0	0	0	0	3
<b>41</b>	0	0	0	0	0	0
<b>42</b>	3	0	0	0	0	3
<b>43</b>	0	0	0	0	0	0
<b>44</b>	1	0	0	0	0	1
<b>45</b>	1	0	0	0	0	1
<b>46</b>	0	0	0	0	0	0
<b>47</b>	0	0	0	0	0	0
<b>48</b>	1	0	0	0	0	1
<b>49</b>	1	0	0	0	0	1
<b>50</b>	0	0	0	0	0	0
<b>51</b>	0	0	0	0	0	0
<b>52</b>	0	0	0	0	0	0
<b>53</b>	0	0	0	0	0	0
<b>54</b>	1	0	0	0	0	1
<b>55</b>	1	0	0	0	0	1
<b>56</b>	0	0	0	0	0	0
<b>57</b>	1	0	0	0	0	1
<b>Gesamt</b>	223	60	20	38	1	342

\*: 0 bedeutet, dass das Tier noch innerhalb eines Monats (28,29,30 oder 31 Tage) nach positiver Testung aus dem Bestand ausgeschieden ist



**Abb. 2:** Übersicht über die Gesamtabgänge kumuliert nach 3 Monaten

## 5 Diskussion

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse von MAP-AG-Einzeltieruntersuchungen aus den Jahren 2015-2020 sowie von MAP-AK-Untersuchungen aus den Jahren 2017-2020, die im Rahmen des Tiroler Paratuberkulose Überwachungs- und Bekämpfungsprogramms erhoben wurden, analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen insgesamt 403 positive AG-Nachweise, aber lediglich 87 positive AK-Ergebnisse auf. Obwohl in den Jahren 2015, 2016 und 2017/1 keine AK-Nachweise stattgefunden haben, ist dies dennoch ein nicht zu vernachlässigender Unterschied. Dies könnte daran liegen, dass der ELISA eine geringere Sensitivität als der AG-Nachweis aufweist und einige Tiere daher als falsch negativ gewertet wurden. In einer Veröffentlichung von Nielsen und Toft (2008) variierte die Sensitivität der ELISA von 7 % bis 94 %. Diese große Varianz könnte damit begründet sein, dass verschiedene ELISA-Testsysteme mit unterschiedlichen cut-offs verwendet wurden und dass die untersuchten Herden sich stark in ihrer Größe und Altersstruktur unterscheiden. Weiters könnte angenommen werden, dass (noch) keine Serokonversion stattgefunden hat und die Tiere den Erreger lediglich mit dem Kot ausscheiden. Aufgrund der langen Inkubationszeit und dem subklinischen Stadium der Erkrankung, bei dem noch keine AK vorhanden sind (Fecteau, 2010), könnten die Tiere bei den durchgeführten Untersuchungen schon AG-positiv gewesen sein und erst zu einem späteren Zeitpunkt AK aufgewiesen haben. Von den 87 Tieren mit positivem AK-Nachweis, wiesen 47 (54 %) auch ein positives AG-Ergebnis auf. Im Gegensatz dazu stehen 40 Rinder (46 %), die lediglich AK aufwiesen. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass mit höheren MAP-Konzentrationen im Kot auch die Wahrscheinlichkeit für einen positiven ELISA steigt. So konnten Collins et al. (2005) zwischen 6,9 % und 28,6 % positive ELISA-Ergebnisse bei niedrigen Erregermengen im Kot erzielen. Stieg die MAP-Konzentration im Kot an, zeigten alle fünf eingesetzten ELISA durchschnittlich 27,3 %, 54,9 % und 78,4 % positive Ergebnisse an (Collins et al., 2005). Ein AK- bzw. ein AG-Nachweis allein liefert oft eine niedrige Sensitivität, da die Serokonversion erst etwas später im Krankheitsverlauf stattfindet bzw. die Erregerausscheidung im Kot intermittierend erfolgen kann (Fecteau, 2010; Whittington et al., 2012). Durch regelmäßige Wiederholungsuntersuchungen, zum Beispiel mit Sockentupferproben, kann der MAP-Herdenstatus besser überwacht werden (Khol und Baumgartner, 2012) und durch eine Kombination aus direktem und indirektem

Nachweisverfahren eine höhere Sensitivität und somit eine bessere Überwachung und Bekämpfung erzielt werden. In einer Publikation von Geraghty et al. (2014) wurde in fünf von sechs untersuchten Ländern eine Kombination aus direkten und indirekten Nachweisverfahren für die MAP-Überwachung angewandt. Auch im Datenmaterial dieser Arbeit sind ab dem Jahr 2017 sowohl AG- als auch AK-Ergebnisse enthalten, die im Rahmen des Tiroler Paratuberkuloseprogramms erhoben wurden.

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit fallen einige Tiere auf, die mehrmals untersucht wurden und nach einem positiven MAP-AG-Nachweis ein- oder mehrmals negative Ergebnisse aufwiesen. Insgesamt wurden 10,3 % der Tiere nach einem positiven AG-Nachweis mindestens einmal negativ getestet. Besonders auffällig sind die Tiere aus Tab. 3 und Tab. 4, die zweimal bzw. dreimal nachuntersucht wurden. Wie in Tab. 3 ersichtlich, konnte bei acht Rindern in beiden Nachuntersuchungen MAP nicht mehr nachgewiesen werden. Außerdem wiesen diese Tiere zu keinem Zeitpunkt spezifische AK auf bzw. liegt siebenmal kein Ergebnis vor. In Tab. 4 sind 13 Rinder angeführt, die in allen drei Nachuntersuchungen negativ auf MAP getestet wurden. Keines dieser Tiere wies jemals AK gegen MAP auf, 16-mal liegt jedoch kein Ergebnis vor. Ein Tier wurde zweimal positiv und danach zweimal negativ auf MAP-AG getestet. Bis auf ein fehlendes Untersuchungsergebnis wies es auch zu keinem Zeitpunkt MAP-spezifische AK auf. Diese acht Tiere aus Tab. 3 und 14 Tiere aus Tab. 4 legen die Vermutung nahe, dass sie MAP eventuell nur passiv ausgeschieden haben, ohne jemals selbst infiziert zu werden.

Im Zusammenhang mit dem Auftreten von MAP in einer Herde wird vermutet, dass es Tiere gibt, die den Erreger nur passiv ausscheiden. Das bedeutet, dass der Erreger oral aufgenommen wird, den Magen-Darm-Trakt passiert und wieder ausgeschieden wird, ohne eine Infektion zu verursachen. Dabei spricht man vom sogenannten „passive shedding“ (Kralik et al., 2015).

Bei Kralik et al. (2015) konnte dieses Phänomen beobachtet werden, nachdem aus einer Herde zwei Kultur und qPCR ( $>10^4$  MAP Zellen/g) positive Tiere entfernt wurden und die Prävalenz von 63,4 % auf 42,1 % reduziert wurde und später auf 15,6 % bzw. 6,7 % sank. Nachdem weitere verdächtige Tiere ausgemerzt wurden, konnte MAP nur mehr sporadisch nachgewiesen werden, was auf eine verminderte Präsenz des Erregers in der Umwelt und somit einen geringeren Infektionsdruck mit möglicher passagerer Ausscheidung bei anderen Tieren zurückzuführen sein könnte. Zudem wiesen zwölf von 16 qPCR positiven Tieren bei der

Schlachtung sowohl beim Kot- als auch Lymphknoten-KV negative Ergebnisse auf und zeigten keinerlei pathologische Veränderungen (Kralik et al., 2015). Bei Tier Nr. 30, 31 und 34 der vorliegenden Untersuchung konnte nachvollzogen werden, dass sie bei ihren positiven Testungen lediglich geringgradig positive Ergebnisse im KV aufwiesen. Bei Tier Nr. 33 war das zweite positive Testergebnis ebenfalls nur geringgradig positiv, das erste konnte leider nicht genauer nachvollzogen werden, da keine Quantifizierung der Ausscheidung vorgenommen wurde. Auch bei allen übrigen, mehrmals positiv getesteten Tieren, sind keine Aufzeichnungen über die Quantifizierung der MAP-Ausscheidung im KV vorhanden. Die geringgradig positiven KV-Ergebnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass diese Tiere auch bei einer qPCR niedrige Werte aufgewiesen hätten. Wenn Tiere identifiziert werden, die bei der qPCR geringe Erregermengen aufweisen, könnte es sich daher lediglich um passive Ausscheider handeln und nicht um infizierte Tiere (Kralik et al., 2015). Schon Sweeney et al. (1992) konnte ähnliches feststellen, nachdem er sechs Kalbinnen einmalig oral Kot einer infizierten Kuh verabreichte. Nach 18 Stunden konnte der Erreger bei allen Tieren im Kot festgestellt werden. Nach sieben Tagen war er bei keiner der Kalbinnen mehr nachweisbar. Eine zweite orale Gabe brachte ähnliche Ergebnisse. Alle Tiere blieben stets seronegativ und hatten negative Ergebnisse beim Intradermalen Tuberkulin-Test. 28 Tage nach erstmaliger oraler Verabreichung von MAP wurden die Tiere geschlachtet und der Erreger konnte weder in den Mesenteriallymphknoten noch im Bereich der Ileozäkalklappe nachgewiesen werden. Lediglich aus der Ileumschleimhaut konnte bei allen Kalbinnen MAP isoliert werden (Sweeney et al., 1992). „Passive shedding“ konnte auch bei Ziegen nachgewiesen werden. Bei elf Tieren wurde MAP in der Milch nachgewiesen und bei zwei Ziegen im Kot. Bei vier der insgesamt 13 Tiere wurden nach einem Jahr zweimal Kot- und Milchproben im Abstand von drei Monaten entnommen. Dabei konnte der Erreger weder im KV noch in der PCR nachgewiesen werden. Auch bei der pathologischen und histopathologischen Untersuchungen konnten keine typischen Veränderungen für Paratuberkulose gefunden werden (Schwarz et al., 2017).

Es könnte auch angenommen werden, dass die Tiere, die im Rahmen der vorliegenden Studie nur einmal ein positives AG-Ergebnis aufweisen, als falsch positiv (kontaminiert) gewertet wurden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da bei der Probenentnahme gewissenhaft vorgegangen wurde, das verwendete Testsystem validiert ist und die Proben im Nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose untersucht wurden. Die Ergebnisse der Daten, die für diese

Arbeit verwendet wurden, lassen vermuten, dass einige Tiere MAP lediglich passiv ausgeschieden haben, ohne dabei jemals selbst infiziert zu werden. Um diese Hypothese stützen zu können, bedarf es jedoch weiterer, eingehender Untersuchungen.

Diese Tiere, die nur einmal positiv getestet wurden, könnten auf ein „fadeout“, also auf ein Verschwinden, von MAP aus der Herde hindeuten. In einem Model konnte in 66 % der Fälle nach dem Eintrag eines positiven Tieres in eine naive Herde ein spontanes „fadeout“ beobachtet werden. In 43 % der Fälle fand das „fadeout“ dabei schon innerhalb von zwei Jahren statt (Marcé et al., 2011). Es ist zu beachten, dass viele Tiere nach einem positiven AG-Ergebnis zeitnah aus dem Bestand ausgeschieden wurden (Näheres s. unten) und somit die gesamte Herde einen negativen MAP-Status erreichen hätte können, sprich nicht durch ein spontanes „fadeout“ wie oben beschrieben. Weiters ist zu bedenken, dass die Tiere in den Tiroler Betrieben über den Sommer gealpt werden. Ältere Tiere oder Tiere mit schlechtem Gesundheitszustand werden davor meist zur Schlachtung gebracht. Diese Tiere können sich potenziell in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden und werden so aus dem Bestand ausgeschieden, was zu einem spontanen „fadeout“ von MAP in der gesamten Herde beitragen kann. Beim Model von Marcé et al. (2011) durfte die Anzahl an klinisch infizierten Tieren nur knapp über eins liegen, damit ein spontanes „fadeout“ stattfinden konnte. Wenn aber nur das klinisch betroffene Tier aus der Herde ausgeschieden wurde, die Umgebung jedoch nicht gereinigt wurde, konnte kein „fadeout“ beobachtet werden (Marcé et al., 2011). In der alpinen Viehwirtschaft werden während der Sommerzeit, wenn der Stall leer ist, von den LandwirtInnen meist umfassende Reinigungsmaßnahmen durchgeführt, der Stall nicht eingestreut und der Futterbarren über Monate nicht befüllt. Damit kann der Erregerdruck von MAP in der Umwelt deutlich gesenkt werden, was zu einem spontanen „fadeout“ beitragen kann. Dennoch kann MAP mittels qPCR auch 24 Monate nach dem Entfernen der gesamten Herde und umfassenden Dekontaminationsmaßnahmen in der Umgebung noch nachgewiesen werden, auch wenn die Erregermenge nach 12, 18 und 24 Monaten kontinuierlich reduziert werden konnte (Moravkova et al., 2012).

Die Ergebnisse der MAP-Untersuchungen im Zuge der vorliegenden Studie von Kuh Nr. 68 aus Tab. 3 deutet vermutlich auf einen typischen Infektionsverlauf hin. Zuerst war sie AG positiv, bei der nächsten Untersuchung wies sie lediglich AK auf und zuletzt war sie sowohl

MAP-AG- als auch AK-positiv. Bei der Nachuntersuchung I war das Tier AG-negativ, dies könnte ein Hinweis auf die intermittierende MAP-Ausscheidung sein, wie sie bei Tieren im subklinischen Stadium der Infektion beschrieben ist (Whittington et al., 2012). Die erste Phase der Ausscheidung kann von einer Periode gefolgt sein, bei der der Erreger nur in sehr geringen Mengen oder überhaupt nicht ausgeschieden wird (de Lisle et al., 1980). Auch bei Schafen konnte die intermittierende Ausscheidung von MAP beobachtet werden (Whittington et al., 2000). Bei der Nachuntersuchung II zeigte sich Kuh 68 sowohl AG- als auch AK-positiv, was darauf hindeuten könnte, dass sich das Tier zu diesem Zeitpunkt am Übergang zum klinischen Stadium der Erkrankung befunden haben könnte. Diese Rinder weisen im Kot-KV und in der Kot-PCR fast durchwegs positive Ergebnisse auf und haben erhöhte AK-Titer, die mittels ELISA oder Agargel-Immunodiffusionstest detektiert werden können (Sweeney, 2011). Klinisch infizierte Tiere zeigen auch die für Paratuberkulose typischen Symptome, wie Durchfall und Gewichtsverlust (Sweeney, 2011). Anhand des für diese Arbeit verwendeten Datenmaterials kann kein Rückschluss auf die möglichen klinischen Symptome des Tieres gezogen werden.

Die im Zuge der vorliegenden Analyse identifizierten Tiere Nr. 25 und 27 aus Tab. 3 wiesen bei einer Untersuchung AK, aber kein MAP-AG auf. Danach wurden sie jeweils zweimal negativ sowohl auf AK als auch auf AG getestet. Vor der positiven AK-Erstuntersuchung (Untersuchung 2017/1) waren beide Tiere auch negativ in der Kultur und der PCR. Die Ergebnisse der beiden Tiere sind schwierig zu interpretieren und es können nur Vermutungen darüber geäußert werden. Man könnte annehmen, dass die Rinder bei der Untersuchung 2017/1 den Erreger intermittierend oder in sehr geringen Mengen ausgeschieden haben und er daher bei Kultur/PCR nicht erkannt werden konnte (Whittington et al., 2012; de Lisle et al., 1980). Dennoch dürfte eine Serokonversion stattgefunden haben, da beide Tiere bei der Erstuntersuchung AK-positiv waren. Es könnte weiters angenommen werden, dass dieses Ergebnis der AK-Untersuchung ein falsch positives ist. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da es zumindest zwei Tiere betrifft und der ELISA hohe Spezifitäten aufweist, 84,7 % bis 100 % bei Collins et al. (2005) sowie 79 % bis 100 % bei Nielsen und Toft (2008). Dass die Rinder bei den NUS I und II AK-negativ waren, konnte auf sehr niedrige Titer hinweisen, die vom ELISA nicht erkannt wurden. Es werden für verschiedene ELISA bestimmte cut-offs laut Herstellerangaben festgelegt. Danach wird bestimmt, ob ein Tier als positiv oder als negativ

gewertet wird (Tavornpanich et al., 2008). Weiters könnte angenommen werden, dass Nr. 25 und 27 durch ein stabiles Immunsystem die Infektion in Schach halten konnten oder den Erreger vollständig eliminieren und somit die Infektion selbst kurieren konnten. Beide Vermutungen sind in der Literatur höchst umstritten und müssten Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein, um diese Hypothesen untermauern zu können.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war, zu ermitteln, wann die einzelnen Tiere nach einem positiven AG- oder AK-Ergebnis aus dem Bestand ausgeschieden worden sind. Sehr beachtlich ist dabei, dass über 80 % der positiven Rinder mit Stand 01.09.2020 aus der Herde abgegangen sind. Über 20 % der Tiere sind bereits nach drei Monaten verendet, geschlachtet oder verkauft worden und nach neun Monaten hatten knapp 50 % der positiven Rinder den Bestand verlassen. Der Mittelwert von 20 % aus den analysierten Jahren 2015-2019 korreliert auch in etwa mit den Ergebnissen der einzelnen Jahre. So wurden 2015 25 % der Tiere innerhalb von drei Monaten ausgemerzt, 2017 waren es 21 %, 2018 16 % und 2019 17 %. Das Jahr 2020 ist für diese Auswertung nicht repräsentativ, da nur ein positives Tier gefunden wurde und dieses ebenfalls innert drei Monaten den Bestand verlassen hat. Die Vorgaben des Tiroler MAP Überwachungs- und Bekämpfungsprogrammes lauten, dass positive Tiere bei einer Intraherdenprävalenz bis zu 10 % innert drei Monaten und bei einer Intraherdenprävalenz über 10 % nach neun Monaten ausgemerzt werden müssen (Khol et al., 2019). Im Rahmen des Programms werden geschlachtete Rinder mit einer Merzungsbeihilfe für die LandwirtInnen entschädigt (Khol et al., 2019), was zusätzlich zum zügigen Ausscheiden der positiven Tiere beitragen könnte. Im vorhandenen Datenmaterial können auch Betriebe dabei sein, die nicht oder noch nicht am Überwachungsprogramm teilnehmen und somit auch nicht verpflichtet sind, die positiven Tiere innerhalb der vorgegebenen Frist zu schlachten. Daher gibt es auch etwa 12 % positive Rinder, die erst nach einem Jahr und ca. 16 % die erst nach 24 Monaten aus den Beständen ausgeschieden wurden.

Weiters ist zu beachten, dass die Prävalenz im Verlauf der Jahre deutlich reduziert werden konnte. So lag die AG-Prävalenz 2015 noch bei 6,7 %, ging 2016 auf 0, 2017/1 war sie bei 4,3 % und 2017/2 schon bei 1,2 % sowie 2018 bei 1,1 %. 2019/1 wurde ein geringer Anstieg auf 5,6 % festgestellt. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorbehalt zu betrachten, da die Gesamtanzahl der getesteten Tiere lediglich bei 647 Rindern lag. 2019/2 wurde wiederum eine

niedrige Prävalenz von 2,1 % errechnet. Ebenso 2020 (2,3 %) wobei hier die Stichprobengröße bei 44 Tieren lag und diese 2,3 % einem einzigen positiven Tier entsprechen. Somit kann dieses Ergebnis ebenfalls nicht als repräsentativ angesehen werden. Die Seroprävalenz von MAP war in den Jahren, in denen ein ELISA durchgeführt wurde, konstant niedrig. So lag sie 2017/2 bei 1,2 %, 2018 bei 1,3 % und 2019/2 bei 1,1 %. Zwei Ausreißer von 4 % 2019/1 und 0 % 2020 können beobachtet werden, wobei hier wie bei den AG-Ergebnisse die Stichprobengrößen sehr klein ist und sie müssen somit mit Vorsicht interpretiert werden. Da das Tiroler Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm darauf abzielt, MAP-Ausscheider zu identifizieren und auszumerzen (Khol et al., 2019), kann im Zuge der beobachteten Prävalenzsenkung durchaus von einem Erfolg des Programms gesprochen werden. Dies zeigt sich auch an der im Zuge des Bekämpfungs- und Überwachungsprogrammes ermittelten Prävalenz auf Herdenebene. Diese sank von 7,5 % im Jahr 2013 auf 0,97 % bei der 2. Sockentupferuntersuchung 2016/17 (Khol et al., 2019).

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass MAP passiv ausgeschieden werden kann, ohne eine Infektion zu verursachen und dass der Erreger über spontanes „fadeout“ aus einer Herde verschwinden kann. Das Paratuberkulose Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm in Tirol scheint seine gesetzten Ziele erreichen zu können. Um weitere Indizien für „passive shedding“ und „fadeout“ zu finden, bedarf es dazu aber weiterer einschlägiger Untersuchungen.

## 6 Zusammenfassung

Die Paratuberkulose ist eine chronische, unheilbare Durchfallerkrankung der Wiederkäuer, die zu hohen wirtschaftlichen Verlusten und vermindertem Tierwohl führt, wenn sie nicht überwacht und bekämpft wird. Im Rahmen von Untersuchungen wurden dabei wiederholt Tiere identifiziert, die MAP (*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*) ausscheiden und nach dem Ausmerzen von „high shedder“ Tieren aus dem Bestand negative Ergebnisse in der Kotuntersuchung aufweisen. Außerdem konnte in manchen Fällen nach dem Eintrag von MAP in einen naiven Bestand ein spontanes „fadeout“ des Erregers beobachtet werden. Daher bedarf es gezielter Überwachungs- und Bekämpfungsprogramme, deren Erfolg auch regelmäßig kontrolliert werden sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus den Ergebnissen des Tiroler Programms zur Überwachung der Paratuberkulose Tiere identifiziert, die nach positiven MAP-AG-Nachweisen erneut getestet wurden und anschließend negative Ergebnisse lieferten. Dabei konnten 40 Tiere gefunden werden, die nach einem positiven AG-Test noch mindestens einmal negativ auf MAP nachuntersucht wurden. Das entspricht 10,3 % der mindestens einmal positiv getesteten Rinder. Acht Tiere wurden nach positivem AG-Nachweis zweimal negativ getestet und 14 Tiere dreimal.

Weiters wurde ermittelt, wann die Tiere nach positivem AG- und/oder AK-Nachweis aus den Betrieben abgegangen sind. Dabei hat sich gezeigt, dass 22,8 % der Tiere schon innerhalb von drei Monaten aus dem Bestand ausgeschieden wurden und nach neun Monaten waren bereits 49,1 % der Rinder ausgemerzt. Außerdem kann eine Reduktion der MAP-AG-Prävalenz beobachtet werden. Daher kann das Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm in Tirol durchaus als wirkungsvoll beschrieben werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es durch diese Arbeit weitere Hinweise auf „passive shedding“ und „fadeout“ von MAP in Rinderbeständen gibt und das Tiroler Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm seine Ziele zu erreichen vermag.

## 7 Summary

Paratuberculosis is a chronic, incurable diarrhoeal disease in ruminants, which causes high economic losses and reduced animal welfare, if it is not monitored and controlled. Several studies showed that cattle which shed MAP (*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*) had negative faecal PCR results after high shedder animals were removed from the herd. In addition, spontaneous fadeout of MAP was reported after the introduction of one infected animal into a naive herd.

The aim of this study was to use the results of the Tyrolean control program for paratuberculosis to identify animals which showed one or more negative test results, after they have been tested MAP-positive in faecal PCR or culture. Altogether, 40 cows were identified which got at least one negative test result after a positive faecal PCR or culture. This conforms 10.3% of the cows tested positive at least once. Eight animals were tested negative twice, 14 showed negative test results at three times.

Furthermore, it was determined at what time animals tested positive for MAP antibodies or antigens were removed from the herd. In the present study, 22.8 % of infected animals were culled within the first three months, after nine months 49.1 % of the cows were removed from the herd. Additionally, a reduction of MAP antigen prevalence can be reported. According to this the surveillance and control program in Tyrol, Austria seems to be effective.

To conclude, the results of this work suggest that passive shedding and fadeout of MAP may occur in cattle herds and that the Tyrolean surveillance and control program seems to be able to achieve its aims.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abdellrazeq, G. S., Elnaggar, M. M., Bannantine, J. P., Schneider, D. A., Souza, C. D., Hwang, J., Mahmoud, A. H. A., Hulubei, V., Fry, L. M., Park, K.-T., Davis, W. C. (2019). A peptide-based vaccine for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vaccine*, 37: 2783-2790.
- AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, sowie Bundesamt für Ernährungssicherheit), 1220 Wien, Spargelfeldstrasse 191, [www.ages.at](http://www.ages.at)
- Bastida, F., Juste, R. A. (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J. Immune Based Ther. Vaccines*, 9: 8.
- Baumgartner, W., Khol, J. L. (2006). Paratuberculosis (Johne's disease) in ruminants-an ongoing story. *Slov. Vet. Res.*, 43(1): 5-10.
- Brumbaugh, G., Edwards, J. F., Roussel, A. J., Thomson, T. D. (2000). Effect of monensin sodium on histological lesions of naturally occurring bovine paratuberculosis. *J. Comp. Path.*, 123: 22-28.
- Büttner, M., Gerbermann, H., Naumann, L., Neuendorf, E., Rinder, H., Wildner, M., Zapf, A. (2005). Paratuberkulose beim Rind-Morbus Crohn beim Menschen: ein ursächlicher Zusammenhang? Bericht des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.
- Camanes, G., Joly, A., Fourichon, C., Ben Romdhane, R., Ezanno, P. (2018). Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach. *Vet. Res.*, 49(1): 60.
- Clarke, C. J. (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J. Comp. Path.*, 116: 217-261.
- Collins, D. M., Gabric, D. M., de Lisle, G. W. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 51: 175-178.
- Collins, M. T., Angulo, A., Buergelt, C. D., Hennager, S. G., Hietala, S. K., Jacobson, R. H., Whipple, D. L., Whitlock, R. H. (1993). Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 52-55.

- Collins, M. T., Gardner, I. A., Garry, F. B., Roussel, A. J., Wells, S. J. (2006). Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *Vet. Med. Today: Special Report*, 229(12): 1912-1919.
- Collins, M. T., Wells, S. J., Petrini, K. R., Collins, J. E., Schultz, R. D., Whitlock, R. H. (2005). Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(6): 685-692.
- Crowther, J. R. (2001). The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology*, 149: 9.
- Dore, E., Pare, J., Cote, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Roy, J. P., Fecteau, G. (2012). Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. *J. Vet. Intern. Med.*, 26(1):32-45.
- Dorshorst, N. C., Collins, M. T., Lombard, J. E. (2006). Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 75(1-2): 92-122.
- Doyle, T. (1964). Vaccination against Johne's disease. *Vet. Rec.*, 76: 73-76.
- Eisenberg, S. W. F., Koets, P., Nielen, M., Heederik, D., Mortier, R., De Buck, J., Orsel, K. (2011). Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Res.*, 42(1): 117.
- Emery, D. L., Whittington, R. J. (2004). An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.*, 104: 143-155.
- Englund, S. (2003). IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguish *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from closely related mycobacteria. *Vet. Microbiol.*, 96: 277-287.
- Fawzy, A., Zschöck, M., Ewers, C., Eisenberg, T. (2018). Genotyping methods and molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6: 258-264.
- Fecteau, M.-E. (2010). Paratuberculosis in Cattle. In: Behr, M. A., Collins, D. M. Hrsg. *Paratuberculosis: organism, disease, control*. 1. Aufl., Wallingford: CAB International, 149-159.
- Fecteau, M.-E. (2018). Paratuberculosis in Cattle. *Vet. Clin. Food Anim.*, 34: 209-222.
- Geraghty, T., Graham, D. A., Mullowney, P., More, S. J. (2014). A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev. Vet. Med.*, 116: 1-11.

- Ghosh, P., Shippy, D. C., Talaat, A. M. (2015). Superior protection elicited by live-attenuated vaccines in the murine model of paratuberculosis. *Vaccine*, 33: 7262-7270.
- Grant, I. R., Hitchings, E. I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M. T. (2002). Effect of Commercial-Scale High-Temperature, Short-Time Pasteurization on the Viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in Naturally Infected Cows' Milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2): 602-607.
- Gschaider, S., Köchler, J., Sperser, J. (2019). Johne's disease (paratuberculosis) status in small cattle herds - evidence of spontaneous fadeout and relation of boot swab samples to the number of animals shedding *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within the herd. *Veterinaria Italiana*. (im Druck).
- Hasonova, L., Pavlik, I. (2006). Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Veterinarni Medicina*, 51(5): 193-211.
- Hilbink, F., West, D. M., de Lisle, G. W., Kittelberger, R., Hosie, B. D., Hutton, J., Cooke, M. M., Penrose, M. (1994). Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet. Microbiol.*, 41: 107-116.
- Huda, A., Jungersen, G., Lind, P. (2004). Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 104: 43-53.
- Johne, H. A., Frothingham, L. (1895). Ein eigentümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Z. Thiermed. Vergl. Path.*, 21: 438-454.
- Kalis, C. H. J., Collins, M. T., Hesselink, J. W., Barkema, H. W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.*, 97: 73-86.
- Kennedy, D. J., Benedictus, G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20(1): 151-179.
- Khol, J. L., Baumgartner, W. (2012). Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. *Jpn. J. Vet. Res.*, 60: 1-7.

- Khol, J. L., Damoser, J., Dünser, M., Baumgartner, W. (2007). Paratuberculosis, a notifiable disease in Austria—Current status, compulsory measures and first experiences. *Prev. Vet. Med.*, 82: 302-307.
- Khol, J. L., Eisenberg, S., Noll, I., Zschöck, M., Eisenberg, T., Donat, K. (2019). Zweistufige Paratuberkulosebekämpfung in der Praxis: Überwachung auf Herdenebene als Basis für betriebliche Maßnahmen zur Prävalenzsenkung, Erfahrungen aus Niedersachsen, Hessen, Thüringen und Tirol. *Tierärztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere*, 47: 171-183.
- Khol, J. L., Pinedo, P. J., Buergelt, C. D., Neumann, L. M., Owen Rae, D. (2014). Lymphatic fluid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows by PCR, compared to fecal sampling and detection of antibodies in blood and milk. *Vet. Microbiol.*, 172: 301-308.
- Khol, J. L., Wassertheurer, M., Sodoma, E., Revilla-Fernández, S., Damoser, J., Österreicher, E., Dünser, M., Kleb, U., Baumgartner, W. (2013). Long-term detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual and bulk tank milk from a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. *J. Dairy. Sci.*, 96: 3517-3524.
- Kirkeby, C., Graesboll, K., Nielsen, S. S., Christiansen, L. E., Toft, N., Rattenborg, E., Halasa, T. (2016). Simulating the epidemiological and economic impact of paratuberculosis control actions in dairy cattle. *Front. Vet. Sci.*, 3: 90.
- Klee, W. (2006): Paratuberkulose (JOHNE'sche Krankheit). In: Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. Hrsg. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 5. Aufl., Parey, Stuttgart, S. 586-591.
- Konboon, M., Bani-Yaghoub, M., Pithua, P. O., Rhee, N., Aly, S. S. (2018). A nested compartmental model to assess the efficacy of paratuberculosis control measures on US dairy farms. *PLoS One*, 13(10): e0203190.
- Köchler, J., Gschaidner, S., Spargser, J., Tichy, A., Mader, C., Vill, M., Ortner, P., Kössler, J., Khol, J. L. (2017). Reproducibility of negative boot swab samples for paratuberculosis in cattle herds in Tyrol (Austria). *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 130(1/2): 29-33.

- Kralik, P., Pribylova-Dziedzinska, R., Kralova, A., Kovarcik, K., Slana, I. (2014). Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a Limousin cattle herd. *The Vet. J.*, 201: 91-94.
- Kudahl, A. B., Nielsen, S. S., Østergaard, S. (2011). Strategies for time of culling in control of paratuberculosis in dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 94(8): 3824-34.
- Laurin, E. L., Sanchez, J., Chaffer, M., McKenna, S. L. B., Keefe, G. P. (2017). Assessment of the relative sensitivity of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infectious dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 100: 598-607.
- de Lisle, G. W., Samagh, B. S., Duncan, R. J. (1980). Bovine Paratuberculosis II. A Comparison of Fecal Culture and the Antibody Response. *Can. J. comp. Med.*, 44: 183-191.
- Logar, K., Kopinč, R., Bandelj, P., Starič, J., Lapanje, A., Ocepek, M. (2012). Evaluation of combined high-efficiency DANN extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC Vet. Res.*, 8(49): 1-10.
- Lu, Z., Mitchell, R. M., Smith, R. L., Van Kessel, J. S., Chapagain, P. P., Schukken, Y. H., Grohn, Y. T. (2008). The importance of culling in Johne's disease control. *J. Theor. Biol.*, 254(1):135-46.
- Machackova, M., Svastova, P., Lamka, J., Parmova, I., Liska, V., Smolik, J., Fischer, O. A., Pavlik, I. (2004). Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999–2001). *Vet. Microbiol.*, 101: 225-234.
- Magombedze, G., Ngonghala, C. N., Lanzas, C. (2013). Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne's Disease through Mathematical Modelling. *PLoS ONE*, 8(11): e76636. DOI 10.1371/journal.pone.0076636 (Zugriff 30.09.2020).
- Manning, E. J. B., Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20(1): 133-150.
- Manning, E. J. B., Collins, M. T. (2010). History of Paratuberculosis. In: Behr, M. A., Collins, D. M. Hrsg. *Paratuberculosis: organism, disease, control*. 1. Aufl., Wallingford: CAB International, 1-7.

- Marcé, C., Ezanno, P., Weber, M. F., Seegers, H., Pfeiffer, D. U., Fourichon, C. (2010). Modeling within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.*, 93(10): 4455-70.
- McAloon, D. G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H. W., Whyte, P., More, S. J., O'Grady, L., Green, M. J., Doherty, M. L. (2019). A review of paratuberculosis in dairy herds-Part 1. *Epidemiology. The Vet. J.*, 246: 59-65.
- Mita, A., Mori, Y., Nakagawa, T., Tasaki, T., Utiyama, K., Mori, H. (2015). Comparison of fecal pooling methods and DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbiol. Open*, 5(1): 134-142.
- Narnaware, S. D., Periasamy, S., Tripathi, B. N. (2016). Studies on pathology, cytokine gene expression and molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of naturally occurring Johne's disease in bullocks. *Res. Vet. Sci.*, 106: 74-80.
- Nielsen, S. S. (2010). Immune-based diagnosis of Paratuberculosis. In: Behr, M. A., Collins, D. M. Hrsg. *Paratuberculosis: organism, disease, control*. 1. Aufl., Wallingford: CAB International, 284-292.
- Nielsen, S. S., Kolmos, B., Christoffersen, A. B. (2004). Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 149-153.
- Nielsen, S. S., Toft, N. (2006). Age-Specific Characteristics of ELISA and Fecal Culture for Purpose-Specific Testing for Paratuberculosis. *J. Dairy Sci.*, 89: 569-579.
- Nielsen, S. S., 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. (2014). Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*: Correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. *Prev. Vet. Med.*, 113: 96-102.
- Olsen, I., Siguroardottir, Ó. G., Djonne, B. (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle-A review. *Vet. Quarterly*, 24(1): 12-28.
- Paolicchi, F. A., Zumarraga, M. J., Gioffre, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A., Romano, M. (2003). Application of Different Methods for the Diagnosis of Paratuberculosis in a Dairy Cattle Herd in Argentina. *J. Vet. Med. B*, 50: 20-26.

- Patterson, D. S., Allen, W. M., Lloyd, M. K. (1967). Clinical Johne's as a protein losing enteropathy. *Vet. Rec.*, 81: 717-718.
- Patterson, S., Bond, K., Green, M., van Winden, S., Guitian, J. (2020). *Mycobacterium avium* paratuberculosis infection of calves-The impact of dam infection status. *Prev. Vet. Med.*, 181: 104634.
- Plain, K. M., Marsh, I. B., Waldron A. M., Galea, F., Whittington, A.-M., Saunders, V. F., Begg, D. J., de Silva, K., Purdie, A. C., Whittington, R. J. (2014). High-Throughput Direct Fecal PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Sheep and Cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 52(3): 745-757.
- Prendergast, D. M., Pearce, R. A., Yearsley, D., Ramovic, E., Egan, J. (2018). Evaluation of three commercial PCR kits for the direct detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in bovine faeces. *The Vet. J.*, 241: 52-57.
- Rangel, S. J., Pare, J., Dore, E., Arango, J. C., Cote, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Fairbrother, J. H., Roy, J. P., Wellemans, V., Fecteau, G. (2015). A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. *Can. Vet. J.*, 56(2): 169-77.
- Reddacliff, L., Eppeleston, J., Windsor, P., Whittington, R., Jones, S. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.*, 115(13): 7790.
- Schwarz, D. G. G., Lima, M. C., Barros, M., Valente, F. L., Scatamburlo, T. M., Rosado, N., Oliveira, C. T. S. A. M., Oliveira, L. L., Moreira, M. A. S. (2017). Passive shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in commercial dairy goats in Brazil. *J. Dairy Sci.*, 100: 8426-8429.
- Selbitz, H.-J. (2007): Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Mayer, A., Hrsg. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Aufl., Enke, Stuttgart, S. 532-534.
- Sergeant, E. S. G., Nielsen, S. S., Toft, N. (2008). Evaluation of test-strategies for estimating probability of low prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 85: 92-106.
- Smith, R. L., Al-Mamun, M. A., Grohn, Y. T. (2017). Economic consequences of paratuberculosis control in dairy cattle: a stochastic modeling study. *Prev. Vet. Med.*, 138: 17-27.

- Stabel, J. R. (2000). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 77(3-4): 465-73.
- Stephan, R. (2007). Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2(2): 222-227.
- Stinson, K. J., Duffield, T. F., Kelton, D. F., Baquero, M. M., Plattner, B. L. (2019). A preliminary study investigating effects of oral monensin sodium in an enteric *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection model of calves. *J. Dairy Sci.*, 102: 9097-9106.
- 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.
- Sweeney, R.W. (2011). Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*, 12: 537-546.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Hamir, A. N., Rosenberger, A. E., Herr, S. A. (1992). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 53(8): 1312-1314.
- Tavornpanich, S., Muñoz-Zanzi, C. A., Wells, S. J., Raizman, E. A., Carpenter, T. E., Johnson, W. O., Gardner, I. A. (2008). Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in Midwestern US dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 83: 65-82.
- 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 pseudotuberculous enteritis of bovines. *Proc. Roy. Soc. London*, 84: 517-543.
- Vallee, H., Rinjard, P. (1926). Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovides. *Rev. Gen. Med. Vet.*, 35: 1-9.
- Vannuffel, P., Gilot, P., Limbourg, B., Naerhuyzen, B., Dieterich, C., Coene, M., Machtelinckx, L., Cocito, C. (1994): Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 1211-1216.

- Waddell, L. A., Rajic, A., Stärk, K. D. C., McEwen, S. A. (2015). The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis*: A systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol. Infect.*, 143(15): 3135-3157.
- Whitlock, R. H., Buergelt, C. (1996). Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*, 12(2): 345-356.
- Whitlock, R. H., Sweeney, R. W., Fyock, T. (2005). MAP Super-shedders: Another Factor in the Control of Johne's Disease. *The AABP Proceedings*, 38: 193-194.
- 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., Begg, D. J., de Silva, K., Plain, K. M., Purdie, A. C. (2012). Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 148: 29-47.
- Whittington, R., Donat, K., Weber, M. F., Kelton, D., Nielsen, S. S., Eisenberg, S., Arrigoni, N., Juste, R., Sáez, J. L., Dhand, N., Santi, A., Michel, A., Barkema, H., Kralik, P., Kostoulas, P., Citer, L., Griffin, F., Barwell, R., Moreira, M. A. S., Slana, I., Koehler, H., Singh, S. V., Yoo, H. S., Chávez-Gris, G., Goodridge, A., Ocepek, M., Garrido, J., Stevenson, K., Collins, M., Alonso, B., Cirone, K., Paolicchi, F., Gavey, L., Rahman, M. T., de Marchin, E., Van Praet, W., Bauman, C., Fecteau, G., McKenna, S., Salgado, M., Fernández-Silva, J., Dziejzinska, R., Echeverría, G., Seppänen, J., Thibault, V., Fridriksdottir, V., Derakhshandeh, A., Haghkhah, M., Ruocco, L., Kawaji, S., Momotani, E., Heuer, C., Norton, S., Cadmus, S., Agdestein, A., Kampen, A., Szteyn, J., Frössling, J., Schwan, E., Caldow, G., Strain, S., Carter, M., Wells, S., Munyeme, M., Wolf, R., Gurung, R., Verdugo, C., Fourichon, C., Yamamoto, T., Thapaliya, S., Di Labio, E., Ekgatat, M., Gil, A., Nuñez Alesandre, A., Piaggio, J., Suanes, A., de Waard, J. H. (2019). Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.*, 15(198).
- Whittington, R. J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsch I., Sergeant, E., Taragel, C. A., Marshall, D. J., Links, I. J. (2000). Use of Pooled Fecal Culture for Sensitive and

- Economic Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection in Flocks of Sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 38(7): 2550-2556.
- Whittington, R. J., Reddacliff, L. A., McAllister, S., Saunders, V. (2000). Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.*, 78(1): 34-37.
- Whittington, R. J., Sergeant, E. S. (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust. Vet. J.*, 79(4): 267-78.
- Whittington, R. J., Windsor, P. A., (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *The Vet. J.*, 179: 60-69.
- Wilesmith, J. (1982). Johne's disease: a retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. *Br. Vet. J.*, 138: 321-330.
- Windsor, P. A., Whittington, R. J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Vet. J.*, 184: 37-44.
- Woo, S.-R., Czuprynski, C. J. (2008). Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *J. Vet. Sci.*, 9(1): 1-8.
- Zimmer, K., Dräger, K. G., Klawonn, K., Hess, R. G. (1999). Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe Test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *J. Vet. Med.*, 46: 137-140.

Gesetze und Verordnungen:

48. Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über ein Überwachungsprogramm zur Bekämpfung der klinischen Paratuberkulose bei Wiederkäuern (Paratuberkulose-Verordnung), 7. Februar 2006, Österreichisches Bundesministerium für Gesundheit, BGBl. II, 2006/48.

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Testschema für klinische Verdachtsfälle von Paratuberkulose laut der österreichischen Paratuberkulose-Verordnung, modifiziert nach Khol et al., 2007.....	23
<b>Abb. 2:</b> Übersicht über die Gesamtabgänge kumuliert nach 3, 6 und 12 bzw 8 Monaten .....	36
<b>Tab. 1:</b> Ergebnisse von positiven AG-Testung, positiven AK-Testung, sowie positiven AG und AK-Testung zum gleichen Zeitpunkt der jeweiligen Jahre .....	28
<b>Tab. 2:</b> Ergebnisse von Nachuntersuchung 1 und Nachuntersuchung 2 nach einem positiven Antigen- (AG) oder Antikörper- (AK) Ergebnis .....	29
<b>Tab. 3:</b> Ergebnisse von Nachuntersuchung 1, Nachuntersuchung 2 und Nachuntersuchung 3 nach einem positiven Antigen- (AG) oder Antikörper- (AK) Ergebnis .....	30
<b>Tab. 4:</b> Abgänger (erstmal positiv getestete Tiere) der einzelnen Jahre unterteilt nach Monaten (positive Testung bis zum Abgang).....	33