

Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.
in Grub bei München
(Geschäftsführender Vorstand: Dr. G. Wittkowski)

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Dr. Jens Böttcher

Eingereicht über
Prof. Dr. W. Klee
Klinik für Wiederkäuer
mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

**Untersuchungen zur Eignung einer sequentiellen kombinierten Serodiagnostik
für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Infektionen
in bayerischen Milchviehbeständen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Doris Hoffmann
aus München

München 2007

**Gedruckt mit der freundlichen Genehmigung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München**

Dekan: Univ.-Prof Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. Klee

Korreferent: Univ-Prof. Dr. Erhard

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Meinen Eltern, Nico, Schorsch und Michaela

Aus dieser Arbeit wurden Ergebnisse bereits auszugsweise veröffentlicht in

BÖTTCHER, J., HOFFMANN, D., GANGL, A., KRABISCH, P., KLEES, S., MEIER, N., WITTKOWSKI, G. (2005):

Validation of Sequential *Mycobacterium Avium* ssp. *Paratuberculosis* Serology (SMAPS)

8th International Colloquium on Paratuberculosis, 14.-18.08.2005, Copenhagen, Denmark

(Vortrag und Poster)

BÖTTCHER, J., HOFFMANN, D., GANGL, A. (2006):

Sequential *Mycobacterium Avium* ssp. *Paratuberculosis* Serology (SMAPS) offers comparable serological results

XXIVth World Buiatric Congress, 15.-19.10.2006, Nice, France

(Vortrag)

Einige Aspekte aus dieser Arbeit wurden außerdem auf verschiedenen Tagungen vorgestellt.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG	6
2 SCHRIFTTUM	7
2.1 Erregertaxonomie	7
2.2 Spezielle Eigenschaften.....	7
2.3 Epidemiologie	8
2.4 Pathogenese und Pathologie.....	11
2.5 Klinik	12
2.6 Diagnostik	13
2.6.1 Direkter Erregernachweis	13
2.6.2 Indirekter Erregernachweis.....	16
2.7 Diagnostische Situation	18
2.8 Bekämpfung.....	20
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	22
3.1 Material und Methoden	22
3.1.1 Material.....	22
3.1.2 Methoden	24
3.2 Statistik	31
4 ERGEBNISSE	32
4.1 Einzeltiere	32
4.2 Herden	34
4.3 Vergleich von SMAPS mit der Paralleltestung	35
4.3.1 Einzeltiere.....	35
4.3.2 Herden.....	38
4.4 Auswertung der kulturellen Untersuchung	40
4.4.1 Überblick	40
4.4.2 Vergleich der SMAPS mit der Kultur.....	41
4.5 Longitudinalstudie	48
4.5.1 Überblick	48
4.5.2 Serologische Auswertung auf Einzeltierebene im Zeitraum 2003 bis 2004/3	49

4.5.3 Serologische Auswertung auf Herdenebene im Zeitraum 2003 bis 2004/3	57
5 DISKUSSION	65
5.1 Die Theorie hinter der sequentiellen Map Serologie (SMAPS)	65
5.2 Validierung von SMAPS anhand der vorliegenden Daten.....	66
5.3 Kulturelle Auswertung	67
5.4 Serologische Auswertung	70
5.5 SMAPS und Paralleltestung.....	72
5.6 Korrelation zwischen SMAPS und kulturellem Erregernachweis	73
5.7 Konstante Bewertungen als Vorteil von SMAPS.....	75
5.8 Einklang zwischen geringer Erregerprävalenz und Serokonversion	77
5.9 SMAPS in der Herdenbewertung	78
5.10 Anwendungsmöglichkeiten von SMAPS	79
5.11 SMAPS bei zwei A-Herden	82
6 ZUSAMMENFASSUNG	84
7 SUMMARY	87
8 LITERATURVERZEICHNIS	89
9 ANHANG.....	103
10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	105
11 TABELLENVERZEICHNIS	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	<u>Abbildung</u>
Abs.	<u>Absatz</u>
AG	<u>Antigen</u>
AGID	<u>Agargelimmunodiffusion</u>
α	Irrtumswahrscheinlichkeit
BHI	<u>brain-heart-infusion</u> (Gehirn-Herz-Boullion)
^{14}C	radioaktiv markiertes Kohlenstoffatom
Chi^2	<u>Chi-Quadrat</u>
et al.	<u>et alii</u> (und andere)
Δ	Differenz
Δ OD %	prozentuale Differenz optischer Dichte
DNA	<u>deoxy-ribo<u>nucleic-acid</u></u> (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	<u>Enzyme linked immunosorbent assay</u>
ETP	<u>Einzeltierprävalenz</u>
ETB	<u>Einzeltierbewertung</u>
GALT	<u>gut associated lymphatic tissue</u>
gbw	<u>grenzbereichswertig</u>
HEYM	<u>Herrold's Egg Yolk Medium</u>
HP	<u>Herdenprävalenz</u>
HPC	<u>Hexadecylpyridiniumchlorid</u>
HRPO	<u>Horseradish Peroxidase</u> (Meerrettichperoxidase)
Id	ELISA der Firma Idexx
IFN	<u>Interferon</u>
IFN γ	<u>Interferon gamma</u>
Ig	<u>Immunglobulin(e)</u>
IgM	<u>Immunglobulin M</u>
IL	<u>Interleukin</u>
IS	<u>Insertionssequenz</u> (= Insertionselement)
ISMav2	<u>Insertionssequenz Mav2</u>
IS900	<u>Insertionssequenz 900</u>
KBR	<u>Komplementbindungsreaktion</u>
KK	Auswertung der <u>kulturellen Kotuntersuchung</u>

KK+	<u>k</u> ulturell <u>p</u> ositive <u>K</u> otprobe
KK-	<u>k</u> ulturell <u>n</u> egative <u>K</u> otprobe
LAM	<u>L</u> ipo <u>a</u> rabinom <u>a</u> nnan
LOT	interne Bezifferung der Firma Becton, Dickenson und Co.
MAA	<u>M</u> ycobacterium <u>a</u> vium subspezies <u>a</u> vium
MAP	<u>M</u> ycobacterium <u>a</u> vium subspezies <u>p</u> aratuberculosis
M.	Mycobacterium
n	Anzahl
n.a.	<u>n</u> icht <u>a</u> uswertbar / <u>n</u> icht <u>a</u> ngegeben
n.d.	<u>n</u> icht <u>d</u> urchgeführt
neg	<u>n</u> egativ
ns	<u>n</u> icht <u>s</u> ignifikant
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
OD %	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte <u>p</u> rozentual
p	implizierte Signifikanz
PBS	<u>P</u> hosphated <u>b</u> uffered <u>S</u> aline (Waschpuffer)
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pq	ELISA der Firma Pourquier
pos	<u>p</u> ositiv
PS	<u>P</u> unkt <u>s</u> umme
PT	<u>P</u> arallel <u>t</u> estung
PW	<u>P</u> unkt <u>w</u> ert
RNA	<u>r</u> ibonucleic- <u>a</u> cid (Ribonukleinsäure)
®	registrierter Handelsname
S	Auswertung des <u>s</u> erologischen Ergebnisses
s	<u>s</u> ignifikant
SMAPS	<u>S</u> equentielle <u>M</u> ycobacterium <u>a</u> vium ssp. <u>p</u> aratuberculosis <u>S</u> erologie
S/P	OD <u>s</u> ample / OD <u>P</u> ositivkontrolle
S/P %	OD <u>s</u> ample / OD <u>P</u> ositivkontrolle <u>p</u> rozentual
ssp.	<u>s</u> ubspezies
Σ	Summe
Sv	ELISA der Firma Svanova
TierSG	<u>T</u> ierseuchengesetz

TMB	<u>T</u> etramethyl <u>b</u> enzidin
™	Trademark
t ₁	Zeitraum 1
t ₂	Zeitraum 2
VG	<u>V</u> ergleichsgröße
ZN-Färbung	<u>Z</u> iehl- <u>N</u> eelsen-Färbung
+	positiv
?	grenzbereichswertig
-	negativ
*	signifikant

1 Einleitung

Die Paratuberkulose des Rindes wird durch eine Infektion mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) ausgelöst. Die Infektion erfolgt im Kälberalter. Erst nach zwei bis fünf Jahren entwickelt sich eine chronisch-granulomatöse Entzündung des Darms, insbesondere des Ileums. Die pathomorphologischen Veränderungen des Darmes führen zu Eiweißverlust, unstillbarem Durchfall und schließlich zum Tode.

Auf hohe wirtschaftliche Schäden in den USA gehen beispielsweise JOHNSON-IFEARULUNDU et al. (1999) ein. BENEDICTUS et al. (1987), KÖHLER et al. (2003), PENCE et al. (2003) und COUSSENS (2004) nennen in verschiedenen Original- und Übersichtsarbeiten ebenfalls hohe finanzielle Verluste.

Auf eine mögliche Zoonosegefahr durch MAP im Zusammenhang mit Morbus Crohn des Menschen weisen GRANT et al. (2002) und BULL et al. (2003) hin.

Wirtschaftliche Verluste und Zoonosegefahr sind Gründe für eine wirkungsvolle Kontrolle, wozu valide, kostengünstige, rasch durchführbare und für hohe Tierzahlen verwendbare diagnostische Tests benötigt werden. Keine der momentan bekannten Methoden erfüllt alle diese Kriterien (HOMUTH, 2002). Ein ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP kommt jedoch den meisten Forderungen nach. Bei den zugelassenen ELISAs ist allerdings entweder die Sensitivität oder die Spezifität mangelhaft. BÖTTCHER und GANGL (2004) schlagen eine Kombination der verschiedenen ELISAs vor, um so die Vorzüge der einzelnen Tests für nachgeordnete Managementmaßnahmen voll ausschöpfen zu können. Diese Verfahrensweise (Sequentielle MAP Serologie – SMAPS) sieht ein Screening mit einem Test hoher Sensitivität vor. Positive Proben werden nachfolgend mit zwei Tests höherer Spezifität nachuntersucht. Eine abgestufte Bewertung der Einzelproben erfolgt aufgrund der Übereinstimmung der Testergebnisse und unter Berücksichtigung der jeweiligen Testspezifitäten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, SMAPS anhand der kulturellen Untersuchung von Kotproben zu validieren. Es soll geprüft werden, ob sich SMAPS und die abgeleitete Klassifizierung von Herden für die Bewertung von MAP-Infektionen in bayerischen Milchviehbeständen eignet.

2 Schrifttum

2.1 ERREGERTAXONOMIE

Die Klasse Actinobacteria enthält die Familie Mycobacteriaceae, zu denen die Gattung Mycobacterium gehört. Der Erreger der Paratuberkulose gehört zur Untergruppe *M. avium* und wird derzeit als *M. avium* ssp. *paratuberculosis* bezeichnet (MAP). Es handelt sich um ein säurefestes, 1-1,5 µm langes und 0,3-0,5 µm breites Stäbchen (SELBITZ, 1992).

Die Bebrütung auf anspruchsvollen Nährböden wie Löwenstein-Jensen oder Herrold Eidotter Medium (= Herrold's Egg Yolk Medium = HEYM) dauert bis zu 16 Wochen. Auf diesen Nährböden wächst MAP in kleinen, stecknadelkopf-großen, weißen, unregelmäßigen, krümeligen Kolonien.

Ein wesentliches Merkmal zur Abgrenzung anderer Mykobakterien ist die Abhängigkeit von Mycobactin J, das der Eisenaufnahme in die Zelle dient. MAP selbst kann kein Mycobactin J synthetisieren und ist auf eine externe Quelle angewiesen (QUINN, 2002).

2.2 SPEZIELLE EIGENSCHAFTEN

Mykobakterien zeichnen sich durch komplexen Wandaufbau aus, der trotz des grampositiven Färbeverhaltens eher dem gramnegativer Bakterien ähnelt (CONNELL und NIKAIDO, 1994); auf die innere Membran folgen nach außen hin Peptido- und Arabinogalaktane, danach eine Mycolsäureschicht. Diese Schichten werden immer wieder durch Porine und Lipoarabinomannan (LAM) durchzogen, wobei LAM ein Antigen von MAP darstellt und in neueren ELISAs als bindendes Antigen verwendet wird (JARK et al., 1997). LAM ist in der Bakterienwand verankert. Fettsäuren und Wachse machen mehr als 60 % der Trockenmasse aus, was einen wesentlichen Faktor für die hohe Tenazität darstellt (CONNELL und NIKAIDO, 1994; VALENTIN-WEIGAND, 2002). Dieser spezielle Wandaufbau wirkt sich auch auf das Färbeverhalten aus.

2.3 EPIDEMIOLOGIE

Vor allem Rinder, Ziegen und Schafe, aber auch Zoo- und Wildwiederkäuer können sich an Paratuberkulose infizieren (WEBER et al., 1992; SEVILLA et al., 2005). Bei den Wildwiederkäuern ist eher Gatterwild als frei lebendes Wild betroffen, da das Gatterwild über einen längeren Zeitraum auf engem, begrenztem Raum weidet. Neben den Wiederkäuern sind auch Wildkaninchen, die in Gebieten mit hohem Infektionsdruck regelmäßig Futter aufnehmen, empfänglich für den Erreger (JUDGE et al., 2005). Die Beteiligung von MAP an Morbus Crohn beim Menschen wird vermutet, konnte bisher aber noch nicht bewiesen werden (GRANT et al., 2002; BULL et al., 2003).

Die Infektion lässt sich grob in drei Phasen einteilen. In der frühen Phase der präklinischen Infektion scheiden infizierte Tiere nur intermittierend mit geringen Erregermengen kontaminierten Kot aus. In der späten präklinischen Phase erhöhen sich vor allem die Erregermengen bei weiterhin bestehender intermittierender Ausscheidung. Diese Tiere werden auch als "low shedders" bezeichnet. Je näher infizierte Tiere an das Stadium der klinischen Erkrankung kommen, desto höhere Erregermengen können sie ausscheiden. Solche Tiere werden neben klinisch auffälligen Tieren, die ständig massenhaft MAP über den Kot ausscheiden, als "high shedders" bezeichnet. "Super shedders" sind Tiere, die mehrere Millionen Erreger pro Gramm Kot ausscheiden (WHITLOCK et al., 2000).

Der Infektionszeitpunkt für eine Erkrankung liegt in den ersten sechs Lebensmonaten; danach sinkt die Chance für eine Infektion mit anschließendem Ausbruch der Krankheit erheblich (RANKIN, 1958; RANKIN 1961 a; RANKIN 1961 b; RANKIN, 1962). Bis zum klinischen Ausbruch vergehen oft Jahre. Es ist anzunehmen, dass die meisten infizierten Tiere jedoch zeitlebens völlig unauffällig bleiben oder nur unspezifische Anzeichen wie Erhöhung der Infektionsanfälligkeit und/oder Reduktion der Milchleistung im Vergleich zu nicht infizierten, sonst aber vergleichbaren Herdengenossinnen zeigen (KÖHLER et al., 2003).

Durch die hohe Tenazität ist unter günstigen Umständen für ein monatelanges Überleben des Erregers in der Umwelt gesorgt (JØRGENSEN, 1977).

Der Erreger ist auch in Milch und im Kolostrum, vor allem vor der Kalbung, nachweisbar (STREETER et al., 1995). Die Weiterverbreitung erfolgt über Kot, kontaminiertes Futter, erregerhaltige Milch und diaplazentar. Katzen und Mäuse, Wildtiere und Feldfrüchte spielen als Vektoren eine untergeordnete Rolle, sind aber in Betracht zu ziehen (DEUTZ et al., 2003; PALMER et al., 2005).

In vielen Ländern werden Prävalenzstudien zur Paratuberkulosesituation durchgeführt. Aufgrund unterschiedlicher Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen ELISAs lassen sich die ermittelten Prävalenzen der ELISAs nicht ohne weiteres miteinander vergleichen (KÖHLER und BURKERT, 2003). Neben Faktoren wie beispielsweise Region, Tierpool, Wirtschaftsrichtung und Herdengröße ist die scheinbare Prävalenz in einer Herde maßgeblich vom verwendeten Test und vom verwendeten Material abhängig. Tabelle 1 gibt einen Überblick über verschiedenen Einzeltier- und Herdenprävalenzen im internationalen Vergleich.

Tabelle 1: Einzeltier- und Herdenprävalenzen anderer Regionen und Länder im Vergleich.

Region	Material	Autor	n) ¹ Tiere	n) ¹ Herden	Test	ETP %) ²	HP %) ³
Bayern	Kot	WEBER et al. (2000)	1116	n.a.) ⁴	HEYM) ⁵	n.a.	10 - 15 (Schätzung)
Mecklenburg- Vorpommern	Serum Milch	HACKER et al. (2004)	2997	59	Svanova	12,2	84,7
Thüringen	Milch	"	n.a.	> 300	Svanova	12,7	95,4
Belgien	Serum	BOELAERT et al. (1999)	n.a.	549	Idexx	n.a.	18,0
Belgien	Serum	WALRAVENS et al. (2006)	n.a.	n.a.	Pourquier	n.a.	30 %
Österreich	Serum	GASTEINER et al. (1998)	11028	n.a.	Allied	n.a.	2,0
Österreich	Serum	KHOL et al. (2005)	n.a.	n.a.	Svanova	19,9	n.a.
Frosione / Italien	Serum	LILLINI et al. (2005)	2315	72	Idexx	1,6	28
Latina / Italien	Serum	"	4465	100	"	2,5	37
Rieti / Italien	Serum	"	2516	44	"	3,3	52
Roma / Italien	Serum	"	6105	100	"	2,6	40
Viterbo / Italien	Serum	"	4226	53	"	1,8	47
Dänemark	Milch	NIELSEN et al. (2000)	n.a.	900	nicht kommerziell	n.a.	70,0
USA / Georgia	Serum	PENCE et al. (2003)	5307	n.a.	Idexx	n.a.	4,7
USA / New York	Serum	van SCHAİK et al. (2003)	120	n.a.	Idexx	n.a.	32,9 -54,3 (2 Gruppen)

) ¹ Anzahl) ³ Herdenprävalenz) ⁵ Herrold's Egg Yolk Medium) ² Einzeltierprävalenz) ⁴ nicht angegeben

2.4 PATHOGENESE UND PATHOLOGIE

Der Erreger gelangt nach oraler Aufnahme in den Magen-Darm-Trakt des Tieres und von dort aus in die M-Zellen des Darms, die physiologischerweise Verdauungsenzyme in das Darmlumen abgeben. Sie nehmen den Erreger aktiv durch Endozytose auf. Durch Transzytose passiert MAP aktiv die M-Zellen, von denen das infektiöse Agens in intraepitheliale und subepitheliale Makrophagen der Peyerschen Platten gelangt (GARCIA MARIN et al., 1992). Erwachsene Tiere haben im Vergleich zu Kälbern nur noch etwa 10 % des Darm assoziierten lymphatischen Gewebes (gut associated lymphatic tissue = GALT). Deswegen wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit MAP und eine anschließende Manifestation der Krankheit bei Kälbern erheblich größer ist als bei adulten Tieren (RANKIN, 1961 a; RANKIN, 1961 b; NISBET et al. 1962).

In Makrophagen, den Zielzellen von MAP, sind die Erreger optimal gegen humorale Antikörper geschützt. Sie können sich ungestört vermehren und nach Abtötung ihres Wirtsmakrophagen weitere Makrophagen infizieren. Zudem behindern sie einige wichtige Aufgaben der Makrophagen, wie z.B. die Freisetzung von Interleukin 2 (IL-2) (ZUR LAGE et al., 2003).

Makrophagen sind im Körper frei beweglich. STREETER et al. (1995) berichten, dass Makrophagen als dominierende Zellen im präpartalem Eutergewebe vorliegen. Das Kalb nimmt mit dem Kolostrum eine hohe Zahl dieser Makrophagen, die möglicherweise MAP-infiziert sind, auf.

Makroskopische Veränderungen sind anfangs meistens auf das terminale Ileum und manchmal noch auf die Ileozäkklappe beschränkt. Eine chronische granulomatöse Enteritis geht mit chronischer intestinaler Lymphangitis und mesenterialer Lymphadenopathie einher. Die Mukosa erscheint verdickt und samtig, die Oberfläche schlägt typische hirnwindungsartige Falten (RANKIN, 1961 a; RANKIN, 1961 b).

Histologisch lassen sich Infiltrationen der Mukosa und Submukosa mit Plasmazellen, Makrophagen, Langerhansschen Riesenzellen und eosinophilen Granulozyten feststellen. In den Krypten befindet sich in epitheloiden Riesenzellen massenhaft MAP. Die Peyer'schen Platten zeigen alle Zeichen der Entzündung (COETSIER et al., 1998).

Die Zottenverkürzung und Zottenfusion führt zu erheblicher Verkleinerung der Oberfläche des Darmgewebes, woraus Durchfall und Abmagerung resultieren. In fortgeschrittenen klinischen Fällen ist Atrophie der Skelettmuskulatur und des Körperfettes zu sehen.

Manchmal lassen sich in der Leber und in den dazugehörigen Lymphknoten histologisch erregerhaltige Granulome nachweisen, in extremen Krankheitsverläufen auch in der Lunge, der Leber, den Nieren und weiteren Lymphknoten (RANKIN, 1958; RANKIN 1961 a; RANKIN 1961 b; RANKIN 1962; LARSEN, 1970), was als Spätgeneralisation bezeichnet wird und der Niederbruchsphase der menschlichen Tuberkulose gleichkommt. Die Tuberkulose des Menschen ähnelt der Paratuberkulose auch in anderen Aspekten. Neben der Vermutung, dass auch MAP ein Zoonoseerreger sein könnte (BULL et al., 2003), wurde zwischen den Erregern der Paratuberkulose und der humanen Tuberkulose eine hohe genetische Homologie nachgewiesen (HARRIS und BARLETTA, 2001). Zu den Erregern der Tuberkulose gehören *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* und *M. microti*. Sie vermehren sich wie MAP parasitär intrazellulär. Eine Übertragung erfolgt aerogen oder oral.

Weitere gemeinsame Eigenschaften sind die lange Inkubationszeit, für die Erkrankung unspezifische Symptome und Streuung der Krankheitserreger in andere Organe, wie z.B. Darm, Haut, Gelenke, Leber und Niere. Beginn sowie Verlauf der Erkrankung sind dagegen nicht miteinander vergleichbar. Bei der Tuberkulose kommt es nach der Bildung eines Primärkomplexes in der Lunge je nach Reaktionslage des Immunsystems zu verschiedenen Verläufen, wobei hämatogene Streuungen und fulminante Verläufe einer Lungentuberkulose ("galoppierende Schwindsucht") besonders gefürchtet sind (KRAUSS und WEBER, 1986).

2.5 KLINIK

Die Inkubationszeit der Paratuberkulose ist mit zwei bis vier Jahren extrem lang. Bei Bestandsinfektionen zeigt ein Großteil der Tiere untypische Symptome wie Umrindern und Reduktion der Milchleistung. Die Mehrzahl der infizierten adulten Tiere scheidet intermittierend Erreger aus (LARSEN et al.,

1970; MALMO, 1995) und legt damit den Grundstein für Neuinfektionen unter Kälbern.

Klinisch manifeste Paratuberkulose tritt oft im Anschluss an eine Stresssituation auf, typischerweise nach dem Kalben, aber auch bei Futterumstellungen, hohem parasitärem Befall, Hochlaktation, Transport oder Immunsuppression durch verschiedene Infektionen oder Medikamente (DOWNHAM, 1950, McINDOE, 1950). Die Tiere zeigen anfangs intermittierenden, später dauerhaften Durchfall bei unvermindertem Appetit, augenscheinlich ungestörtes Allgemeinbefinden und starken Gewichtsverlust. In Folge der Dehydratation wird das Fell stumpf und rau, die Haut trocken, (CHIODINI et al., 1984). Klinisch auffällige Tiere sterben an den Folgen ihrer Krankheit, wenn sie nicht getötet werden.

2.6 DIAGNOSTIK

2.6.1 Direkter Erregernachweis

2.6.1.1 Mikroskopie

Säurefeste Stäbchen lassen sich mit der Ziehl-Neelsen-Färbung (ZN-Färbung) in Kotasstrichen, Biopaten von Organen, vor allem aber von Darmschleimhaut oder von Mesenteriallymphknoten nachweisen. Typische Nester mit schlanken, leicht gekrümmten, in der ZN-Färbung rötlichen Stäbchen sprechen insbesondere in Zusammenhang mit der Klinik für eine MAP-Infektion. Neben MAP kommen häufig auch apathogene Mykobakterien auch im Kot gesunder Tiere vor. Hierbei handelt es sich um so genannte Grasbakterien wie z.B. *M. phlei* (CHIODINI et al., 1984). Im Ausstrich liegen apathogene Mykobakterien einzeln, wodurch sie sich von den schlankeren MAP, die typische Nester bilden, unterscheiden lassen.

Die ZN-Färbung eignet sich zur Erhärtung einer klinischen Verdachtsdiagnose. In einer Arbeit von ZIMMER et al. (1999) wurden im Rahmen einer Studie des Landesveterinäruntersuchungsamtes in Rheinland-Pfalz von 132 infizierten Rindern unter anderem Kotproben mittels ZN-Färbung untersucht. Bei diesen sicher infizierten Tieren konnten nur 68 Tiere als positiv detektiert werden.

Für die endgültige Identifizierung des Erregers muss eine Kultur angelegt werden.

2.6.1.2 Kultur und BACTEC™

MAP stellt hohe Ansprüche an die Nährböden. Neben einer geeigneten Lipidquelle, die in der Regel aus Eidotter hergestellt wird, ist der Zusatz von Mycobactin J für MAP essentiell. Diese Abhängigkeit von Mycobactin J wird diagnostisch zur Abgrenzung von anderen Mykobakterien genutzt. Aufgrund des langsamen Wachstums von MAP (Inkubationsdauer von bis zu 16 Wochen) ist die Begleitflora durch entsprechende Probenvorbereitungen zu eliminieren. Dies hat jedoch auch negative Auswirkungen auf die Sensitivität der Methode (MERKAL et al., 1972; QUINN, 2002).

Als Weiterentwicklung der kulturellen Anzucht stellt das BACTEC™-Verfahren eine gute Alternative dar. Das BACTEC™-12B-System ist ein Automat, in dem verschiedene für jeweilige Bakterien spezifische Medien bebrütet werden können. In einem Flüssigmedium (bei Mykobakterien: Middlebrook 7H9 mit verschiedenen Komplementen) dient das radioaktive ¹⁴C-Palmitat als Kohlenstoffquelle. Bei Bakterienwachstum wird ¹⁴CO₂ frei, das über der Flüssigkeit als Gasphase von einem Sensor gemessen wird. Der Automat meldet, sobald Radioaktivität gemessen wird. Eine Bebrütung von fünf bis acht Wochen ist ausreichend. COUSINS et al. (1995) konnten positive Nachweise bereits am neunten Tag führen.

Eine Alternative zum radioaktiven BACTEC™-12B-System ist das BACTEC™-MGIT™-System, bei dem der radioaktive Marker durch einen Fluoreszenzmarker ersetzt worden ist. Vorteil dieser Methode ist, dass ohne radioaktive Materialien gearbeitet werden kann. Der Nachteil besteht darin, dass nicht alle MAP-Isolate im Fluoreszenzsystem gedeihen (KÜHN und HELBING, 2000). Sowohl die Ergebnisse aus dem BACTEC™-12B- als auch aus dem BACTEC™-MGIT™-Verfahren müssen mit anderen diagnostischen Verfahren wie z.B. der Polymerasenkettenreaktion (PCR) verifiziert werden.

2.6.1.3 Polymerase Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die PCR ermöglicht in kurzer Zeit die Vervielfältigung geringer DNA- oder RNA-Mengen. Die Methodik besteht aus drei wesentlichen Teilen; zuerst werden die Wasserstoffbrückenbindungen des vorliegenden DNA-Strangs ge-

trennt (= Denaturierung), danach werden Primer angelagert (= Annealing), die eine bestimmte Basensequenz vervielfältigen sollen. Zum Schluss ergänzt die Polymerase die fehlenden Stücke (= Elongation). Die so erhaltenen DNA-Stränge bilden die Vorlage für weitere Zyklen. Das Ergebnis der PCR kann abgelesen werden, nachdem die erhaltenen DNA-Sequenzen auf einem Agarsegel elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt wurden (BERG et al., 2003). Der Erreger muss nicht vermehrungsfähig sein. Auch Bruchstücke von abgetöteten Bakterien liefern positive Ergebnisse (SAIKI et al., 1985).

Insertionselemente oder auch Insertionssequenzen (IS) können zur Differenzierung von MAP herangezogen werden. Insertionssequenzen sind kurze DNA-Stücke mit sich gegenläufig wiederholenden Sequenzen. Sie stellen die einfachsten transponierbaren Elemente aller bakteriellen Chromosomen und Plasmide dar (MAHILLON und CHANDLER, 1998). Lange Zeit galt IS900 als spezifisch für MAP, was bedeutet, dass nur Stämme von MAP erkannt werden sollten. COUSINS et al. (1999) und STROMMENGER et al. (2001) widerlegten dies. STROMMENGER et al. (2001) fanden in IS_{mav2} ein bisher unbekanntes, für MAP spezifischeres Insertionselement. Sie wiesen die Einzigartigkeit dieses IS durch den Vergleich einer PCR an 79 bekannten Feldisolaten von MAP, neun *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (MAA) - Isolaten und neun anderen Mykobakterienstämmen nach.

Die Sensitivität für den Nachweis von MAP aus dem Kot mittels PCR liegt zwischen 55 % und 65 % (WHIPPLE et al., 1992). Als Goldstandard dient die kulturelle Anzucht aus dem Kot.

STRATMANN et al. (2005) sehen mit der Entwicklung einer peptidmedierten "Capture"-PCR, bei der MAP durch ein Peptid gebunden und angereichert wird, für Milch eine Möglichkeit für eine sinnvolle Herdendiagnostik. Eine auf IS_{mav2} basierende PCR wird eingesetzt, die in der Lage ist, MAP in der Milch nachzuweisen. Die Nachweisgrenze liegt bei 10² Erregern pro ml Milch.

2.6.2 Indirekter Erregernachweis

2.6.2.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

In der Diagnostik sind ELISAs für den Antikörpernachweis weit verbreitet. Bei den ELISAs, die bei der Paratuberkulose-Diagnostik eingesetzt werden, werden die Platten mit je nach Test verschiedenen MAP-Antigenen beschichtet. Serum oder Milch können auf vorliegende Antikörper geprüft werden.

Liegen spezifische Antikörper gegen MAP vor, werden diese als Antigen-Antikörper-Komplex am Boden eines Wells gebunden. Nach dem Waschen wird ein enzymgekoppelter Anti-Wiederkäuerimmunglobulin-Antikörper hinzugefügt. Dieses Konjugat bindet am Immunkomplex. Nach dem Waschen wird wiederum ein Substrat hinzu gegeben, das eine Farbreaktion hervorruft, falls das Anti-Wiederkäuerimmunglobulin-Antikörper-Konjugat am Komplex gebunden war.

Die späte Serokonversion im Rahmen der MAP-Infektion ist eine biologische Tatsache, aus der unweigerlich geringe Sensitivitäten der Antikörpernachweise resultieren (COUSSENS, 2004). Dieses Phänomen wird den verfügbaren Tests zu Unrecht als Nachteil angelastet. Hinzu kommt die Schwierigkeit, MAP-spezifische und kreuzreagierende Antikörper voneinander abzugrenzen (ROUSSEL et al., 2006). Durch verschiedene Lösungsansätze wird versucht, die immunologische Problematik auszugleichen und damit die Genauigkeit der ELISAs zu steigern.

MAP-spezifische Antigene sind kritisch zu betrachten, weil eine hohe genetische Homologie von 99 % zwischen MAP und beispielsweise MAA existiert (HARRIS und BARLETTA, 2001). Diese Tatsache legt nahe, dass spezifische Antigene für MAP kaum vorkommen oder zumindest sehr selten sind. Hinzu kommt die Schwierigkeit der reinen Darstellung der Antigene (VALENTIN-WEIGAND, 2002). LAM gilt als ein spezifisches Antigen. JARK et al. (1997) entwickelten auf der Basis des LAM einen ELISA, der von der Firma Svanova (Uppsala, Schweden) kommerzialisiert wurde.

Eine weitere Möglichkeit, die Spezifität eines ELISAs zu steigern, ist die Vorabsorption der Testseren mit *M. phlei*. Allerdings werden durch die Vorabsorption auch geringe Mengen MAP-spezifischer Antikörper in Testseren durch die Vorabsorption eliminiert, so dass dieses Verfahren mit einer Reduktion der

Sensitivität verbunden ist (BECH-NIELSEN et al., 1993). Weiterhin gilt es zu bedenken, dass die so genannten Grasbakterien, für die *M. phlei* stellvertretend steht, nicht antigenetisch einheitlich sind und eine komplette Absorption aller kreuzreagierender Antikörper illusorisch ist. Zudem ist eine Vorabsorption nicht unproblematisch, da theoretisch aufgrund einer Brückenbildung der divalenten oder pentavalenten Antikörper (Immunglobulin M, IgM) zwischen adsorbiertem Antigen in der Testplatte und Absorptionsantigen in der Flüssigphase (*M. phlei*) eine Verstärkung der Reaktion möglich ist, die als falsch positiv angesehen werden muss (TIJSSEN, 1985). Zwei kommerziell verfügbare Tests (Idexx, Ludwigsburg; Pourquier, Montpellier, Frankreich) bedienen sich der Vorabsorption mit *M. phlei*.

Eine reine Darstellung von Antigenen ist kaum möglich. Nicht nur die Beseitigung von kreuzreagierenden Erregerantigenen, sondern auch die Abtrennung von Antigenkontaminationen, die sich aus den verwendeten Kultursystemen ergeben (z.B. Zellkulturbestandteile, Eidotterkomponenten) sind entscheidend für die Testspezifität. Die Verwendung von Kontrollantigenen, welche die gleiche Matrix wie die Kultursysteme enthalten, hat sich bewährt. Derartige Kreuzreaktionen können eliminiert werden, indem die Differenz der Reaktion zwischen Kontrollantigen und Erregerantigen für die Bewertung herangezogen wird (TIJSSEN, 1985). Ein kommerzieller ELISA (Pourquier, Montpellier, Frankreich) basiert auf einem derartigen Kontrollantigen.

Die Festlegung der Grenzen für die Interpretation der Ergebnisse hat auf die Sensitivität und Spezifität sicherlich den größten Einfluss. Die Häufigkeit von Proben im grenzwertnahen Bereich bestimmt die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses, wenn es als positiv oder negativ klassifiziert wird. Schwankungen der serologischen Reaktionen werden gerade bei Paratuberkulose immer wieder angeführt und mit der Biologie des Erregers erklärt (COUSSENS, 2004). Neben antigenetischen Variationen zwischen verschiedenen MAP-Stämmen bedingt auch ein hoher Anteil von Proben im grenzwertnahen Bereich diese Schwankungen (BECH-NIELSEN et al., 1993; HARRIS et BARLETTA, 2001).

2.6.2.2 Johnin-Test, Interferontest γ (IFN - γ -Test), Komplement Bindungsreaktion (KBR), Agargelimmunodiffusion (AGID)

Diese Nachweisverfahren sollen nur der Vollständigkeit halber genannt werden. Sie wurden in Übersichtsartikeln von COLLINS und SOCKETT (1993), HOMUTH (2002) und KALIS (2003) beschrieben.

2.7 DIAGNOSTISCHE SITUATION

Die meisten Testverfahren eignen sich nur für ganz spezielle Fragestellungen der Paratuberkulosedagnostik.

Auf dem 8. Internationalen Kolloquium für Paratuberkulose in Kopenhagen wurden die Kombination von Methoden in den Vordergrund gestellt (ANTOGNOLI et al., 2005; KOREN et al., 2005; LIANDRIS et al., 2005), in denen neben dem ELISA auch die PCR eine wichtige Rolle spielen. Insertions-elemente können nach Familien geordnet werden, die nicht mit den Erregerfamilien übereinstimmen müssen. IS1626 ist bei *M. avium* und *M. intracellulare* zu finden, gehört aber zur selben Familien wie die IS900. HARRIS und BARLETTA veröffentlichten 2001, dass zwischen den beiden Insertionselementen eine Homologie von 82 % besteht. Bei einer PCR-Untersuchung mit der IS900 ist es daher nicht ausgeschlossen, dass aufgrund der hohen Homologie mit der IS1626 nicht MAP, sondern *M. avium* oder *M. intracellulare* nachgewiesen werden. Durch diese Kreuzreaktionen entstehen möglicherweise falsch positive Ergebnisse.

Auch STROMMENDER et al. (2001) beschrieben Kreuzreaktionen bezüglich der IS900. Alternativ stellten sie IsMav2 als spezifisches, neu entdecktes Insertionselement vor. MÖBIUS et al. (2005) konnten jedoch zeigen, dass auch hier Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien auftraten. Es gibt also auch in der PCR keine spezifischen Methoden zur Paratuberkulosedagnostik. Ein wesentlicher Vorteil der PCR liegt darin, dass sie kommerziell erhältlich ist. Zudem ist sie sehr schnell durchführbar und zur Bewältigung einer großen Probenanzahl geeignet.

Für den kulturellen Erregernachweis werden verschiedene Nährböden angeboten (z.B. HEYM, Löwenstein-Jensen). Außerdem werden für die Probenaufbereitung verschiedene Methoden beschrieben. Zudem wirken sich das ange-

legte Probenmaterial und die Vorselektion der Proben sowohl auf Sensitivitäten als auch auf Spezifitäten aus (SWEENEY et al., 1992) aus. Die Kotkultur gilt trotz ihrer geringen Sensitivität von 50 % (COLLINS, 1996) als Goldstandard. In der vorliegenden Studie wurde das Problem der geringen Sensitivität durch Mehrfachbeprobung der Tiere behoben. Theoretisch würde die Sensitivität von 50 % bei dreimaliger Beprobung auf 87,5 % angehoben werden, wenn die Wiederholungsuntersuchungen unabhängig voneinander wären. Praktisch ist die Unabhängigkeit nicht zu erwarten; zudem war eine dreimalige Beprobung nur bei 199 Tieren möglich, 375 Tiere wurden zwei Mal kulturell untersucht. Dennoch wurde dadurch die Sensitivität der kulturellen Untersuchung gesteigert.

Sowohl mit dem Interferon γ - Test als auch mit dem Johnin-Test kann eine Infektion mit Paratuberkulose früher als durch Antikörpernachweise detektiert werden, da Reaktionen in der zellulären Immunabwehr gemessen werden. Der Nachteil des Interferon γ - Tests ist, dass sehr frische Proben benötigt werden, damit überhaupt eine Aussage getroffen werden kann. Beim Johnin-Test wird sowohl ein hoher Kosten- als auch Arbeitsaufwand notwendig. Bei beiden Tests besteht außerdem das Problem, dass bei Anwesenheit von anderen Mykobakterien wie z.B. *M. avium* ssp. *tuberculosis* Kreuzreaktionen möglich sind (GILOT and COCITO, 1993; KALIS et al., 2003).

Die Spezifitäten von KBR und AGID fallen im Vergleich mit der von ELISAs geringer aus (SOCKETT et al., 1992); zudem lässt sich die KBR schlecht standardisieren.

AGID eignet sich bei kleinen Wiederkäuern und Kameliden laut DUBASH et al. (1996) aufgrund niedriger Kosten, der einfachen Anwendung und der hohen Spezifität hervorragend zur Paratuberkulosedagnostik. SOCKETT et al. (1992) wiesen aber nach, dass bei Rindern nur eine geringe Sensitivität von 25 % in den subklinischen Stadien der Krankheit vorlag.

Unbestritten kommt dem ELISA im Rahmen der Paratuberkulose-Serologie eine hohe Bedeutung zu. Die Zahl der Publikationen über verschiedene ELISAs ist immens. Allerdings wird schon bei Betrachtung allein der kommerziellen ELISAs deutlich, dass hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität erhebliche Diskrepanzen bestehen (KÖHLER et al., 2005). Daher ist die Kenntnis über die Qualitätsparameter der einzelnen ELISAs grundlegend für die Ergebnis-

terpretation. Mit dem ELISA ist es neben der Standardisierbarkeit auch möglich, ein hohes Probenaufkommen in kurzer Zeit zu bewältigen. Zudem eignen sich ELISAs nicht nur für blutserologische, sondern auch für milchserologische Untersuchungen. Jedoch zeigt sich auch hier, dass unterschiedliches Probenmaterial - ähnlich wie bei der kulturellen Untersuchung - einen erheblichen Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität des gewählten ELISAs hat (KÖHLER et al., 2005).

Bei den ELISAs existieren sowohl hochsensitive als auch hochspezifische Tests. Der Vorteil der hochsensitiven Tests liegt darin, dass sie als Anzeiger für früh infizierte Tiere geeignet sind. Beispielsweise wiesen SWEENEY et al. (2005) nach, dass unter Idexx-fraglichen Resultaten auch kulturell positive Tiere zu finden waren. COLLINS et al. (2005) schlagen daher vor, dass innerhalb infizierter Herden hochsensitive Tests eingesetzt werden, damit alle potentiell infizierten Tiere entdeckt werden können.

Der Nachteil hochsensitiver Tests ist die geringe Spezifität, wodurch ein hoher Anteil der Herden möglicherweise falsch positiv eingeschätzt wird. Zudem berichteten ROUSSEL et al. (2006) von einer Vielzahl anderer Mykobakterien, die für Kreuzreaktionen bei ELISAs verantwortlich gemacht werden können und das Testergebnis beeinflussen.

2.8 BEKÄMPFUNG

Von einer Behandlung erkrankter Tiere ist abzusehen. Das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft gab am 17.01.2005 die Leitlinien für den Umgang mit Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen heraus, die im Wesentlichen auf folgenden Maßnahmen basiert:

I. Hygienemaßnahmen in jedem Bestand zur Vermeidung der Weiterverbreitung von Paratuberkuloseerregern

Dieser Abschnitt betrifft allgemeine Bestandsmaßnahmen, Abkalben, Ablammen, Aufzucht, Kolostrummanagement, Remontierung, klinische Maßnahmen, Weidemanagement sowie Auktionen und Reiseverkehr der Tiere außerhalb der Schlachtung. Der Grundtenor in diesem Abschnitt ist eine Forderung nach einem Durchbrechen der Infektionswege durch strikte Trennung von großen

und kleinen Wiederkäuern, von Jungtieren und Alttieren, von zugekauften Tieren unbekanntem Status' von denen, deren Status bekannt ist.

II. Bestandsüberwachung mittels klinischer Überwachung und serologischer sowie bakteriologischer Untersuchung

In diesem Abschnitt werden die Kriterien für den Status eines Bestandes vergeben (Status I: Basismaßnahmen, Status II: fortgeschrittene Überwachung, Status III: Bekämpfung/Sanierung, Status IV: Paratuberkuloseunverdächtig).

Als diagnostische Möglichkeiten werden ELISAs mit einer Spezifität von mindestens 99 %, die PCR und die kulturelle Anzucht genannt. Außerdem ist genau geregelt, wann welche Proben mit welchen Tests untersucht werden müssen.

III. Vorbereitung einer flächendeckenden, bundesweiten Überwachung bzw. Erfassung der Verbreitung der Paratuberkulose

Eine Eignungsempfehlung zur Anwendung zugelassener Diagnostika wird angestrebt. Zurzeit existiert keine Zulassung als Massendiagnostikum, "welche die Voraussetzung für ein zuverlässiges Screening und Monitoring der Betriebe darstellt" (Leitlinien für den Umgang mit Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen vom 17.01.2005).

Die Ziele der Leitlinie sind:

- Eine Vereinheitlichung der Maßnahmen in Deutschland
- Reduktion der Klinik und der Schäden einer Infektion in den Betrieben
- Eindämmung der Weiterverbreitung der Erreger
- Senkung der Prävalenz der Paratuberkulose

3 Eigene Untersuchungen

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 Material

Im Jahre 2003 wurden bayerische Landwirte im Rahmen eines freiwilligen Projektes dazu eingeladen, Serumproben aus ihrem Rinderbestand auf Paratuberkulose testen zu lassen.

2004 wurden sowohl alle Landwirte aus 2003 als auch neue Landwirte zum nächsten Untersuchungsdurchgang eingeladen. Neben drei serologischen Untersuchungen in diesem Jahr sollten auch bis zu drei kulturelle Untersuchungen stattfinden. Nicht alle Landwirte waren bereit, an der Studie über 36 Monate hinweg teilzunehmen.

Alter, Kalbedaten und Ursache abgegangener oder verendeter Tiere wurden festgehalten. Ein Fragebogen über Bestandsgröße, Haltungsform, Leistungsdaten der Tiere, Aufstallung, hygienische Verhältnisse und Wasser- und Futtersversorgung wurde ausgegeben (Anhang 1).

Im Jahre 2003 nahmen 119 Betriebe mit insgesamt 2738 Einzeltieren teil. Im ersten Durchgang 2004 (=2004/1) ließen 107 Betriebe mit 2881 Tieren eine Untersuchung auf MAP durchführen. 2004/2, im zweiten Durchgang, nahmen noch 104 Betriebe mit 2522 Tieren teil. Im dritten Durchgang, 2004/3, verringerte sich die Zahl der Landwirte auf 89, die der Tiere auf 1935. Insgesamt konnten 10076 Seren untersucht werden, die sich auf 4307 Tiere aus 134 Betrieben verteilten. 1580 Tiere wurden einmal, 632 Tiere zweimal, 1144 dreimal und 950 Tiere viermal serologisch untersucht.

Die Kotprobenentnahme wurde soweit möglich mit der Blutentnahme gekoppelt. Im ersten Durchgang wurden 430 Kotproben von Tieren genommen, von denen bei 13 kein serologisches Ergebnis vorlag. 2004/2 waren es 667 Kotproben, 18 davon ohne serologisches Pendant. Im dritten Durchgang wurden 649 Tieren kulturell untersucht, von denen bei 38 Tieren ausschließlich eine Kotkultur, aber keine serologische Untersuchung vorlag.

Zusätzlich wurden alle Tiere, die schon einmal im laufenden Jahr kulturell untersucht wurden, unabhängig vom serologischen Ergebnis kulturell verfolgt. Von 1830 angelegten Kulturen konnten 1747 ausgewertet werden. Die Diffe-

renz ergab sich aus der Überwucherung von Kulturen oder nicht gekennzeichneten Proben.

Eine komplette dreimalige kulturelle Untersuchung aller Tiere war aus finanziellen Gründen nicht möglich.

Von 134 Fragebögen wurden 107 beantwortet und konnten ausgewertet werden. Die nachfolgende Darstellung der wichtigsten Punkte aus diesem Fragebogen dient lediglich dazu, einen kurzen Eindruck von den untersuchten Herden zu vermitteln.

Die durchschnittliche Tierzahl pro Bestand betrug 53 Kühe, 45 Kälber und Jungtiere. Der gewichtete Mittelwert der Milchleistung lag bei 6833 kg Milch pro Jahr. Bezüglich der Haltungsformen wurden 77 reine Milchbetriebe, 23 Milch- und Mastbetriebe und sieben Ammenkuhhaltungen, die zusätzlich Milch und Fleisch vermarkteten, festgestellt.

Hinsichtlich der Weide- und Stallhaltung zeichnete sich eine Trennung in Nord- und Südbayern ab. Die Mehrzahl der Landwirte nördlich der Donau tendierte zu reiner Stallhaltung, wohingegen bei den meisten Landwirten südlich der Donau die Tiere neben der Stallhaltung zumindest auch im Sommer Weidegang hatten. Bei Betrieben mit Stallhaltung überwog die Anbindehaltung. In 16 Betrieben beweideten Kälber gemeinsam mit den Kühen Grünflächen.

Bei den Kühen überwog die Anbindehaltung ($n = 45$) gegenüber der Haltung im Laufstall ($n = 36$) und gemischten Formen ($n = 26$). In den meisten Betrieben wurden die Kälber in Gruppen gehalten ($n = 70$). Auf den restlichen Höfen variierten verschiedene Formen der Kälberhaltung (Kälberbox, Laufstall, Anbindehaltung, gemischte Formen).

Maßnahmen rund um die Geburt sind gerade im Hinblick auf die Paratuberkulose von großem Interesse. 42 Landwirte gaben an, die Abkalbeboxen zu reinigen, 48 sonderten die Kuh zum Kalben ab, 58 säuberten die Kuh vor dem Kalben und 80 Landwirte trennten das Kalb nach der Geburt sofort von der Kuh. In 50 Betrieben erfolgte die Kolostrumaufnahme direkt an der Mutterkuh, 57 gaben den Kälbern Kolostrum aus der Kolostrumbank.

95 Landwirte achteten auf Tränkehygiene. Milchaustauscher wurde anschließend an Vollmilch in 67 Betrieben getränkt.

Auf die Frage, ob ein Verdacht auf Paratuberkulose in der Herde bestünde, antworteten neun Landwirte mit "ja". Bei 18 Betrieben wurde MAP schon ein-

mal im Laufe der Zeit nachgewiesen. Es war nicht ersichtlich, ob dieser Nachweis auf kultureller, serologischer oder klinischer Ebene erhoben wurde. Insbesondere der serologische Nachweis wurde häufig mit der MAP-Diagnose gleichgesetzt.

43 Landwirte eigneten sich im Laufe der Zeit Fachwissen über MAP an, 16 hatten bereits Maßnahmen gegen Paratuberkulose ergriffen.

Von 129 Betrieben konnten Angaben über die hofeigene Rinderrasse eingeholt werden. Gemäß der regionalen Gepflogenheiten überwog die Haltung von Fleckvieh (n = 99). Auf den Betrieben in Schwaben wurden bis auf eine Ausnahme, bei der eine Jersey-Herde gehalten wurde, Braunvieh-Herden betreut (n = 6). Neben reinen Schwarzbunten-Herden (n = 11) gab es auch verschiedene Kombinationen der einzelnen Rassen innerhalb einer Herde (n = 12).

3.1.2 Methoden

3.1.2.1 Serologie

Zur serologischen Untersuchung der Blutproben wurden drei in Deutschland zugelassene ELISAs verwendet: SVANOVIR® Paratuberkulose ELISA (Para-TB-Ab) von Svanova Biotech, Uppsala, Schweden, der in Deutschland über die IVD GmbH in Hannover vertrieben wird, HerdCheck™ Mycobacterium paratuberculosis von IDEXX Scandinavia AB, Österbybruk, Schweden (Vertrieb in Deutschland über IDEXX, Ludwigsburg) und "ELISA Bovine Paratuberculosis serum verification" von Institut Pourquier, Montpellier, Frankreich.

In der nachfolgenden Tabelle werden die wichtigsten Charakteristika dieser Tests zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung wichtiger Details der in der Arbeit verwendeten ELISAs.

	Svanova	Idexx	Pourquier
Testart	monophasisch	monophasisch	biphasisch
Vorabsorption	nein	ja	ja
Proben	Serum, Milch	Serum	Serum, Plasma, Milch
Verwendetes Antigen	LAM) ¹	Ganzzellantigen von MAP	protoplasmatisches AG) ²
Konjugat	HRPO) ³	HRPO-Protein G	HRPO-Protein G
Substratlösung	TMB/H ₂ O ₂) ⁴	TMB/H ₂ O ₂	TMB/H ₂ O ₂
Waschpuffer	PBS) ⁵	PBS	PBS
Stopplösung	H ₂ SO ₄) ⁶	HCl) ⁷	H ₂ SO ₄
Waschzyklen	2 x 3	2 x 5	2 x 3
Inkubationszeit (Proben)	30 min	60 min	Tagesansatz: 1h oder Nachtansatz: nachts
Inkubationstemperatur (Proben)	18 °C - 25°C	18 °C - 25°C	Tagansatz: 21 °C Nachtansatz: 5 °C
Inkubationszeit (Konjugat)	30 min	30 min	30 min
Inkubationstemperatur (Konjugat)	18 °C - 25°C	18 °C - 25°C	18 °C - 25°C
Inkubationszeit (Substrat)	10 min	10 min	20 min
Inkubationstemperatur (Substrat)	18 °C - 25°C	18 °C - 25°C	18 °C - 25°C

Eigene Untersuchungen

	Svanova	Idexx	Pourquier
Messung	sofort	sofort	sofort
Messung bei	450 nm OD) ⁸	450 nm OD oder 450 nm + 620 nm OD	450 nm OD
Angabe der Ergebnisse	OD %) ⁹	S/P) ¹⁰	S/P %) ¹¹
Positivkontrolle	OD > 1	Differenz zwischen Mittelwert pos. und neg. Kontrolle ≥ 0,15	≥ 0,350
Negativkontrolle	< 10 % der Positivkontrolle	≤ 0,2	Mindestverhältnis zw. Mittelwert pos. und neg. Kontrolle 3,5:1
Sensitivität %) ¹²	59,2	38,9	40,8
Spezifität %) ¹²	73,2	97,4	99,8
Cut-Off-Werte	31-52	0,15-0,3	60-70 % (Serum/Plasma) 30-40 % (Milch)
Wahre Prävalenzen) ¹³	-0,156	-0,027	0

)¹ Lipoarabinomannan

)³ Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)

)⁵ Phosphated buffered Saline (Waschpuffer)

)⁷ Salzsäure

)⁹ Optische Dichte prozentual

)¹¹ OD Probe / OD Kontrolle prozentual

)¹³ errechnet aus Prävalenzen siehe Tabelle 5 und Sensitivitäten und Spezifitäten aus Tabelle 2

)² Antigen

)⁴ Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid

)⁶ Schwefelsäure

)⁸ Optische Dichte

)¹⁰ OD Probe / OD Kontrolle

)¹² nach KÖHLER und BURKERT (2003)

Im Tierseuchengesetz (TierSG) ist die Zulassung der ELISAs geregelt. Im § 17c Abs. 1 des TierSG werden sowohl das Paul-Ehrlich-Institut als auch das Friedrich-Löffler-Institut dazu berechtigt, Zulassungen für "Antigene, die in Kliniken und Instituten der tierärztlichen Lehranstalten oder anderen wissenschaftlichen Erforschungen oder der staatlichen Bekämpfung von Tierseuchen dienenden Instituten hergestellt werden", auszusprechen (§ 17, Absatz 4. b)). Das Bundesministerium kann bei Gefahr im Verzug bestimmen, dass von der Zulassung durch die oben genannten Institute abgesehen wird (§ 17, Absatz 3). Zur Herstellung der Antigene für den Antikörper-ELISA benötigt man laut §17 d die Erlaubnis der zuständigen Behörde des Landes, in dem das jeweilige Labor liegt.

Es müssen Herstellung, Lagerung, Verpackung, beteiligte Personen und Ausstattung der Räume etc. dokumentiert werden.

Betriebe und Einrichtungen, in denen Mittel nach § 17c Abs. 1 Satz 1 hergestellt, geprüft, gelagert, verpackt oder abgegeben werden, unterliegen der Überwachung durch den beamteten Tierarzt.

3.1.2.2 Kultureller Erregernachweis

Als Kulturmedium für die Anzüchtung von MAP aus dem Kot wird Herrolds Egg Yolk Medium (= HEYM) Schrägagar mit Mycobactin J (REF: 222233, LOT: 5075648) und ohne Mycobactin J (REF: 222241, LOT: 5047716) eingesetzt. Die Nährböden wurden von der Firma Becton, Dickenson and Co., 7 Loveton Circle, Sparks, MD 21152 USA, L006381 (0900) bezogen.

Von jeder Kotprobe werden drei Gramm in einen Erlenmeyerkolben abgewogen, mit 30 ml 0,75 % Hexadecylpyridiniumchlorid (= HPC), der Firma Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England, möglichst homogen vermischt und einige Minuten stehen gelassen. Danach werden 20 ml vom Überstand in Sputumröhrchen abgefüllt, die nach 30 Minuten auf dem Schüttler über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert werden.

Am nächsten Tag wird der Überstand weitgehend dekantiert. Aus dem Bodensatz werden 150 µl in jeweils ein HEYM-Röhrchen mit und eines ohne Mycobactin J-Zusatz pipettiert.

Im Brutraum trocknen die Röhrchen eine Woche mit losem Deckel bei 37°C in Schräglage, danach werden sie fest verschraubt und senkrecht aufgestellt.

Nach vier, acht, zwölf und 16 Wochen erfolgt eine Beurteilung. Bei Wachstum von weißen, erhabenen und krümelig aussehenden Kolonien wird eine Ziehl-Neelsen-Färbung (= ZN-Färbung) durchgeführt. Dadurch können zufälliger Weise langsam wachsende Kulturen anderer Bakterienspezies von MAP unterschieden werden.

3.1.2.3 Paralleltestung und SMAPS

Für die serologische MAP-Diagnostik standen drei kommerzielle ELISA-Testsysteme zur Verfügung (ELISAs der Firmen Svanova, Idexx und Pourquier), die sich sowohl hinsichtlich ihrer Sensitivität als auch ihrer Spezifität unterschieden (KÖHLER und BURKERT, 2003).

Wie von BÖTTCHER und GANGL (2004) beschrieben, sollte versucht werden, sowohl Sensitivität als auch Spezifität zunächst durch Paralleltestung, danach mit der sequenziellen Testung zu erhöhen.

In der Paralleltestung wurde jedes Serum mit allen drei Tests untersucht. Jedes Serum erhielt pro Test eine Bewertung, die entweder positiv (+), negativ (-) oder grenzbereichswertig (?) ausfallen konnte. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse eines Testes mit Punktwerten belegt und diese pro Tier und Test aufaddiert. Die Punktwerte der einzelnen Testergebnisse wurden so gewählt, dass aus der Punktsomme ein eindeutiger Rückschluss auf die einzelnen ELISA-Ergebnisse möglich war (Tabelle 3).

Zur Erstellung der Punktwerte wurden negative Ergebnisse in allen Systemen mit "0" bedacht. Positive Ergebnisse beim Svanova-ELISA wurden mit einer "1", im Idexx-ELISA mit einer "5" und im ELISA der Firma Pourquier mit einer "8" bewertet. Grenzbereichswertige Proben wurden im Svanova-ELISA den negativen und im Pourquier-ELISA den positiven Proben zugerechnet. Allein im Idexx-ELISA wurden grenzbereichswertige Proben eigenständig mit einer "3" belegt.

Das Tier oder die Tiere innerhalb einer Herde mit der höchsten Einzeltierbewertung waren ausschlaggebend für die Herdenbewertung (Tabelle 3).

Die Punktwerte wurden nach einem Schema von BÖTTCHER und GANGL (2004) in Bewertungen wie neg., (+), +, ++ und +++ umgesetzt. Die Einführung von Punktsommen erlaubt sowohl einen genauen Rückschluss auf die Ergebnisse der eingesetzten ELISAs als auch eine leichtere Handhabung der

Daten für die Auswertung als die Einzeltierbewertungen. Die Einführung von Einzeltierbewertungen wie -, (+), +, ++ und +++ sind in praxi leichter eingängig und vereinfachen die Befundinterpretation.

Tabelle 3: Schema zur Beurteilung der Ergebnisse für die MAP-Serologie bei paralleler Testdurchführung. Jedem Einzeltierbefund wird ein Punktwert (PW) zugeordnet. Die Bewertung ergibt sich aus der Punktsomme, die höchste Einzelbewertung innerhalb einer Herde definiert den Herdenstatus.

Ergebnis Svanova	Svanova (PW) ¹	Ergebnis Idexx	Idexx (PW)	Ergebnis Pourquier	Pourquier (PW)	Punktsumme	Punkt-wert	Herdenstatus
+	1	+	5	+/?	8	14	+++	A
-/?	0	+	5	+/?	8	13	+++	A
+	1	?	3	+/?	8	12	+++	A
-/?	0	?	3	+/?	8	11	+++	A
+	1	-	0	+/?	8	9	++	B
-/?	0	-	0	+/?	8	8	++	B
+	1	+	5	-	0	6	++	B
-/?	0	+	5	-	0	5	++	B
+	1	?	3	-	0	4	+	C
-/?	0	?	3	-	0	3	+	C
+	1	-	0	-	0	1	(+)	D
-/?	0	-	0	-	0	0	neg	E

)¹ Punktwert

Die Paralleltestung ist relativ kosten- und zeitintensiv, da jedes Serum mit drei verschiedenen Tests überprüft werden muss. Hingegen verspricht SMAPS (sequentielle MAP-Serologie) sowohl eine Kosten- als auch eine Zeitersparnis, da nur im Screeningtest positive Seren mit den beiden spezifischeren ELISAs nachgetestet werden (Abbildung 1).

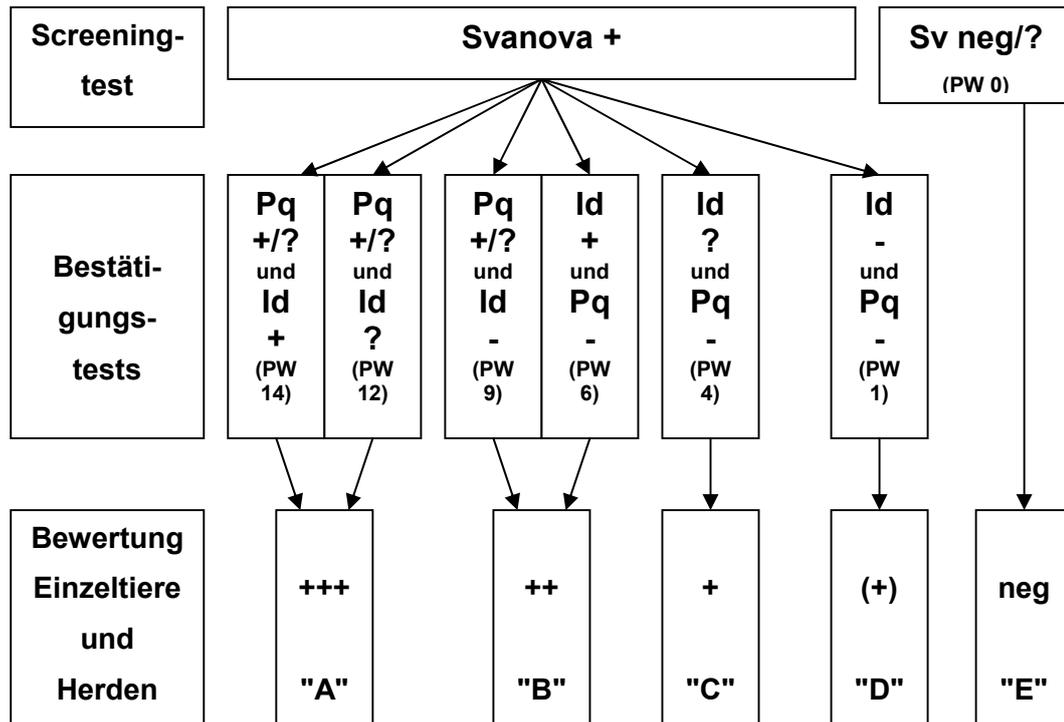


Abbildung 1: Schema der sequenziellen Testung von Seren mit den Testsystemen der Firmen Pourquier, Idexx und Svanova. sowie der Bewertung durch Punktwerte (PW) und Einzeltierwertung (neg, +, ++, +++) sowie verschiedener Kombinationen der Ergebnisse.

Bei SMAPS fallen die Punktwerte 3,5,8 und 11 gegenüber der Paralleltestung heraus, da der Svanova-ELISA negativ reagierte. Es wurden zwei Tests zur Bestätigung verwendet, weil sehr häufig positive Ergebnisse des Svanova-ELISAs zwar mit einem, nicht aber mit dem anderen spezifischeren Test erkannt wurden (KÖHLER und BURKERT, 2003).

Die Validierung von SMAPS anhand von Untersuchungen in bayerischen Rinderbeständen wurde mittels kultureller Kotuntersuchung als Goldstandard durchgeführt. Die Auswahl der Tiere für die Kotprobennahme geschah in Abhängigkeit vom serologischen Ergebnis auf Einzeltierebene in der Paralleltestung (Tabelle 4). Aus finanziellen Gründen wurden in Herden mit Reagenten nur Tiere kulturell untersucht geführt, die serologisch auffällig waren. Ziel war es, in diesen Herden kulturell positive Tiere zu entdecken. Im Gegensatz dazu wurden in Herden der Kategorie E alle Tiere kulturell untersucht.

Tabelle 4: Schema der Kotprobennahme abhängig vom serologischen Ergebnis auf Einzeltierebene.

Tiere aus Herdenkategorie	A	B	C	D	E
Kotprobe von	allen +, ++, +++ Reagenten	allen + und ++ Reagenten	allen + Reagenten	allen (+) Reagenten	allen Tieren im Bestand

Erregerausscheidung und Auftreten von Serumantikörpern fallen zeitlich nicht immer zusammen. Durch mehrmalige Beprobung war es möglich, ein Profil für jedes Tier zu erstellen, das Rückschlüsse auf den Verlauf der Erregerausscheidung und der Antikörperproduktion zulässt.

Im Rahmen der Studie wurden meist nicht alle Tiere einer Herde beprobt, sondern maximal nur jene Tiere, die zu Beginn der Studie älter als zwei Jahre waren. Daher basiert der Begriff Herdenprävalenz allein auf der in einem Bestand untersuchten Tierzahl.

3.2 STATISTIK

Zur statistischen Berechnung wurden verschiedene Tests eingesetzt.

Bei Tabelle 7 kam der Chi²-Test mit $\alpha = 0,05$ zur Anwendung. In Tabelle 11 musste aufgrund der vorliegenden multiplen Testung eine Bonferroni-Korrektur angewandt werden, weswegen sich α hier nicht auf 0,05 sondern auf 0,01 beläuft.

Bei Tabelle 14 wurde wieder ein Chi²-Test mit $\alpha = 0,05$ verwendet. Bei der letzten Spalte (4306 Tiere im Vergleich zu den anderen Durchgängen) musste wieder die Bonferroni-Korrektur mit $\alpha = 0,01$ eingesetzt werden.

Zur Signifikanzprüfung wurden die Daten aus Tabelle 16 im t-Test, Wilcoxon-Test und in der Vierfeldertafel berechnet.

In Tabelle 12 wurde zur Überprüfung signifikanter Ergebnisse der exakte Fisher-Test angewandt ($\alpha = 0,05$).

Die positiven prädiktiven Werte aus Abbildung 7 wurden über Vierfeldertafeln erstellt. Als Literaturquelle diente SACHS (2002).

4 Ergebnisse

4.1 EINZELTIERE

Insgesamt wurden 4306 Tiere aus 134 Herden untersucht. In den nachstehenden Darstellungen wird zunächst ein Überblick über die Verteilung der Einzeltierreaktionen getrennt nach Testsystemen gegeben. Da 2796 der 4306 Tiere aus 134 Herden mehrmals serologisch auf Paratuberkulose untersucht wurden, ging zur Vermeidung einer Verzerrung der Daten durch Doppelnennungen das jeweils erste serologische Ergebnis pro Tier in die folgenden Auswertungen ein.

Tabelle 5 ist eine Darstellung über die prozentuale Verteilung der Tiere auf die einzelnen ELISA - Bewertungen (negativ, grenzbereichswertig und positiv). Zwischen den Ergebnissen der einzelnen Tests existierten extreme Unterschiede.

Tabelle 5: Verteilung der 4306 Tiere aus 134 Herden auf die jeweiligen Bereiche eines jeden Tests. Die Werte wurden zum besseren Vergleich prozentual angegeben.

	Svanova	Idexx	Pourquier
Bewertung		n) ¹ = 4306	
negativ	63,6 %	94,4 %	98,7 %
grenzbereichswertig (gbw)	14,2 %	3,5 %	0,2 %
positiv	22,2 %	2,1 %	1,1 %

)¹ Anzahl

In Abbildung 2 wurde die Verteilung der Proben über die OD % - Klassen dargestellt. Mit dieser Art der Darstellung ließ sich die Lage der negativen und positiven Proben relativ zum jeweiligen Testgrenzwert darstellen. Die S/P - Werte des Idexx-ELISA wurden aus Gründen der Darstellung mit 100 multipliziert. Werte < 0 sind aufgrund der Ergebnisdarstellungen in den ELISAs der Firmen Pourquier und Idexx möglich. Das Resultat eines Serums wird hier auf die positive Kontrolle bezogen (S/P-Werte).

Bei Betrachtung der Säulengraphik ist ersichtlich, dass sich die drei Tests deutlich unterscheiden. Bei der Verteilung der Proben im Svanova-ELISA fiel

die gedachte Kurve über den Säulen im Vergleich zu den anderen Tests sehr flach aus. Ein Maximum lag zwischen 11 bis 20 OD %.

Die ELISAs der Firmen Idexx und Pourquier zeigten einander ähnliche Häufigkeitsverteilungen, wobei das Maximum der Verteilung klar im negativen Bereich lag und nur wenige Seren sowohl auf den grenzbereichswertigen als auch auf den positiven Bereich entfielen.

Aufgrund der Errechnung des S/P -Wertes nach der Formel $S/P = (OD \text{ Proben} - OD \text{ Mittelwert der negativen Kontrollen}) / (OD \text{ Mittelwert der positiven Kontrollen} - OD \text{ Mittelwert der negativen Kontrollen})$ sind auch Werte im negativen Bereich möglich; daher existieren in Abbildung 2 auch Werte < 0 .

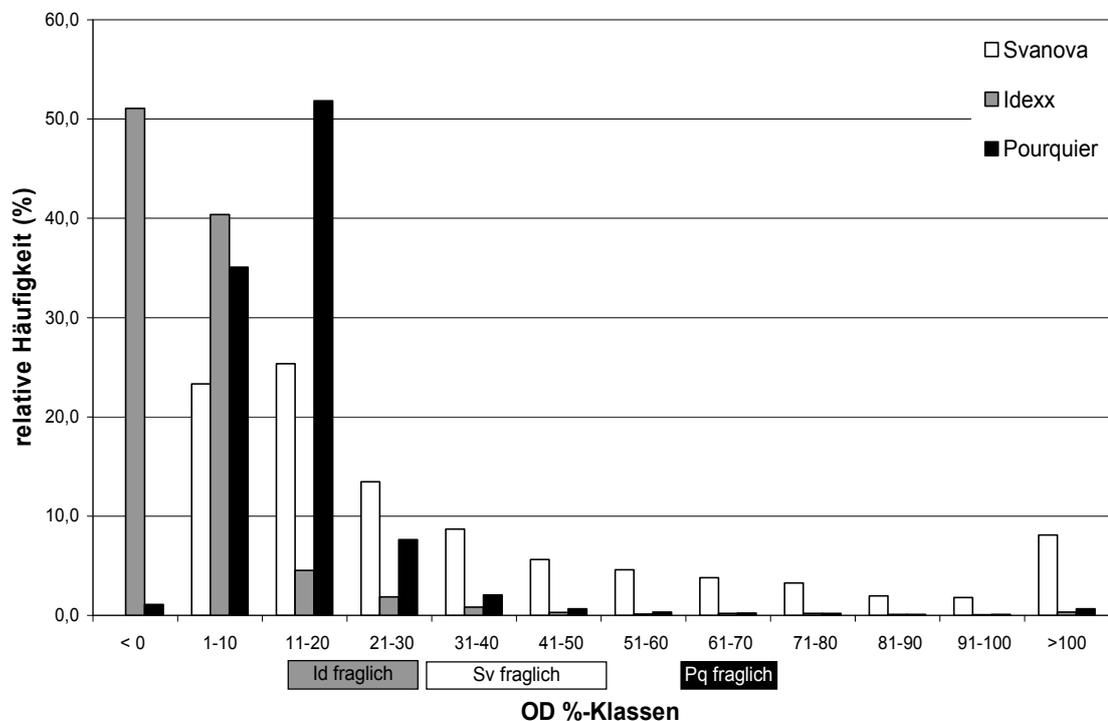


Abbildung 2: Vergleichende Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilungen von 4306 Proben in Prozent über Klassen der optischen Dichten (OD%) für die ELISAs der Firmen Svanova (Sv), Idexx (Id), Pourquier (Pq). Die S/P-Werte des Idexx-ELISA wurden aus Gründen der Darstellung mit 100 multipliziert. Die grenzbereichswertigen Bereiche für jeden Test sind unterhalb der Abszisse als unterlegte Kästchen dargestellt. Rechts der Kästchen befindet sich jeweils der positive Bereich, links davon der negative Bereich.

4.2 HERDEN

Zur Berechnung der Intraherdenprävalenzen wurden grenzbereichswertige Proben im Falle des Svanova-ELISA zu den negativen Proben gezählt, die im Falle des ELISAs der Firma Pourquoi wurden den positiven aufgerechnet. Fragliche Proben im Idexx-ELISA wurden aufgrund ihrer Sonderstellung innerhalb SMAPS einmal den positiven und einmal den negativen Proben zugerechnet.

In Abbildung 3 ist die Verteilung der 134 Herden für jedes Testsystem über den Intraherdenprävalenzen abgebildet. Die Anteile negativer Herden für die einzelnen Tests fielen sehr unterschiedlich aus. Im Testsystem der Firma Svanova konnten nur sechs antikörperfreie Herden ermittelt werden (4,5 %), wohingegen im Test der Firma Pourquoi 103 (76,9 %) negative Herden gefunden wurden. Wurden grenzbereichswertige Proben im Idexx-ELISA negativ gewertet, lag die Anzahl negativer Herden bei 93 (69,4 %), wurden die grenzbereichswertigen Proben den positiven angerechnet, sank die Anzahl negativer Herden auf 54 (40,3 %). Im Gegensatz zu den ELISAs der Firmen Pourquoi und Idexx, deren Verteilung über die Prävalenzen ein deutliches Maximum mit einem steil abfallenden rechten Schenkel der Kurve darstellte, fiel beim ELISA der Firma Svanova kaum ein Maximum auf. Außerdem konnten nur wenige geringprävalente Herden ermittelt werden ($n = 11$). Maximale Herdenprävalenzen bis 20 % wurden für die Tests der Firmen Idexx (positive Bewertungen) und Pourquoi (positive Bewertungen) ermittelt. Wurden fraglich bewertete Seren im ELISA der Firma Idexx mit einbezogen, konnten maximale Herdenprävalenzen um 30 % errechnet werden.

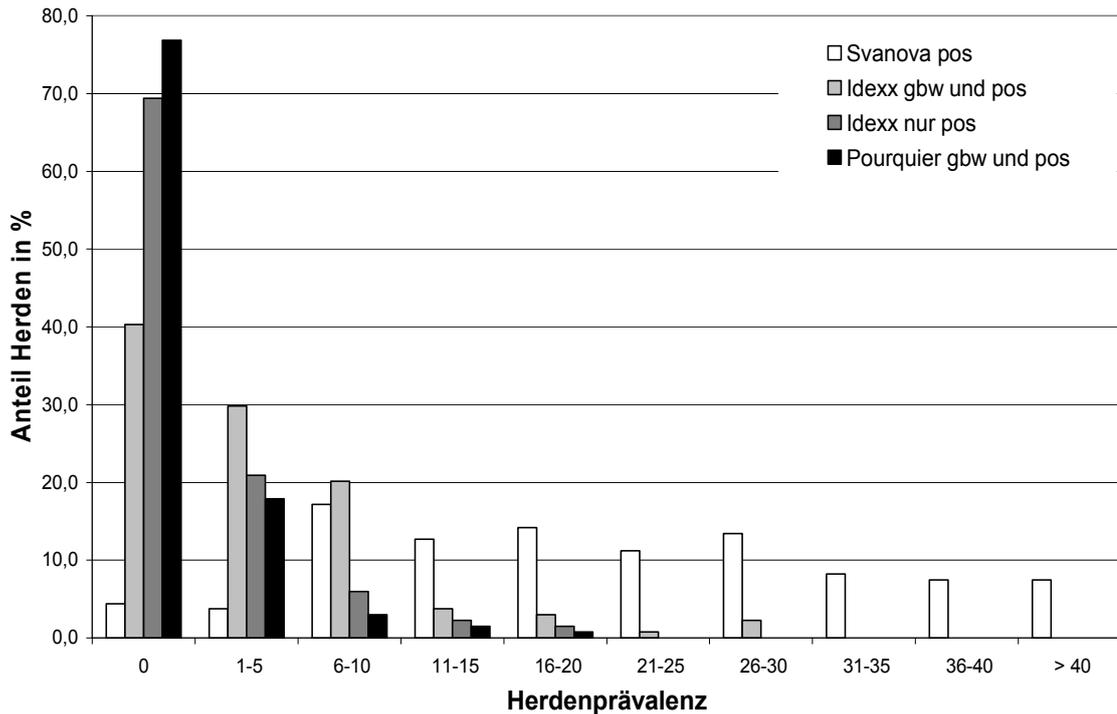


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilungen von 134 Herden über Herdenprävalenzklassen, wie sie mit den ELISAs der Firmen Svanova, Idexx und Pourquoier ermittelt wurden. Grenzbereichswertige (gbw) Proben wurden beim ELISA der Firma Svanova negativ, beim ELISA der Firma Pourquoier positiv bewertet. Beim Idexx-ELISA erfolgte eine Aufteilung nach nur positiven (pos) und nach positiven und grenzbereichswertigen Seren.

4.3 VERGLEICH VON SMAPS MIT DER PARALLELTESTUNG

4.3.1 Einzeltiere

Innerhalb von SMAPS kommt dem Screeningtest eine große Bedeutung zu, da dieser im optimalen Fall jede Probe, die in den beiden Bestätigungstests positiv reagiert, auch als positiv vorselektieren sollte. Zur Ermittlung, ob dies gewährleistet ist, wurden alle Proben in allen drei Tests untersucht (Paralleltestung). Ein Vergleich der Daten von SMAPS mit der Paralleltestung erlaubt eine Einschätzung, ob durch den Screeningtest Information verloren geht.

Abbildung 4 zeigt auf Basis der 4306 getesteten Tiere die Unterschiede zwischen SMAPS und der Paralleltestung. Die Seren mit den Punktskoren 3, 5, 8, 11 und 13 wurden nur in der Paralleltestung positiv gewertet. Bei SMAPS fielen diese 56 Seren negativ aus, da der Screeningtest negativ reagierte.

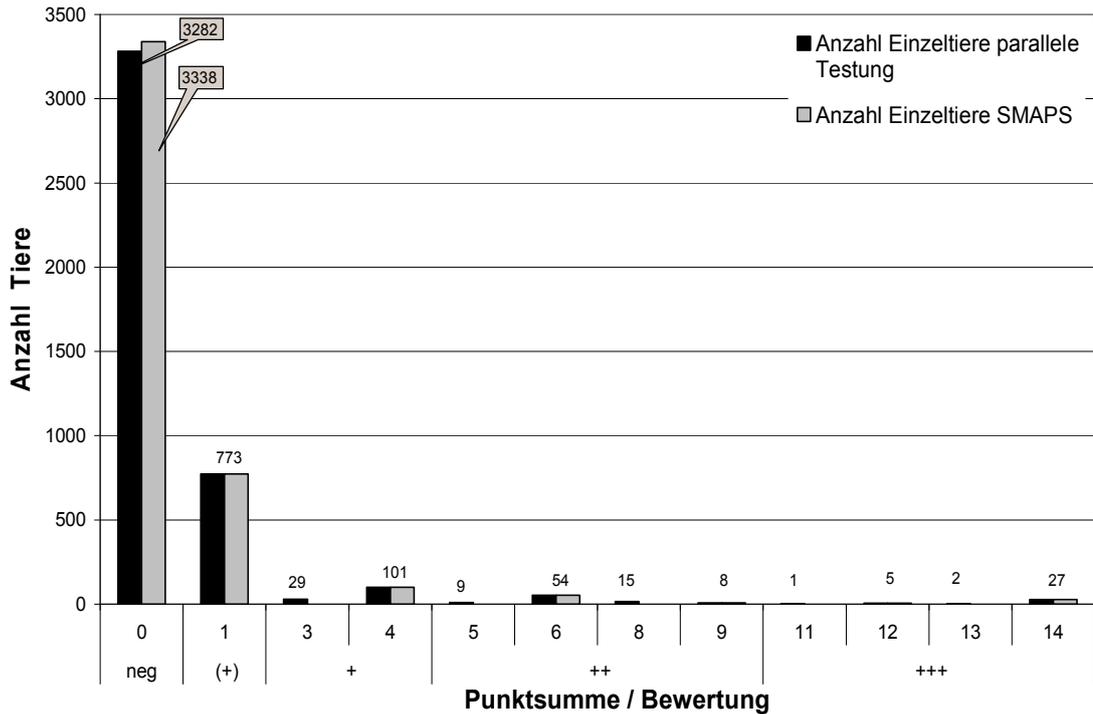


Abbildung 4: Verteilung der getesteten Seren in der Paralleltestung (schwarz) und die Bewertung derselben Seren durch SMAPS (grau) sowohl über der Punktschme als auch über der Bewertung. Die Punktschmen 3, 5, 8, 11 und 13 markieren die Unterschiede zwischen SMAPS und Paralleltestung (56 Seren).

In Abbildung 5 sind in einem Venn-Diagramm die Überschneidungen der einzelnen Tests angegeben. Zusätzlich wurden die prozentualen Anteile berechnet und die Anzahl der Tiere jeweils in Klammern dazugesetzt. Die Verteilungen auf die einzelnen Tests beziehen sich auf die Verteilung der Resultate in der Paralleltestung aus Abbildung 4. Beim ELISA der Firma Idexx wurden grenzbereichswertige Resultate bei den positiven Ergebnissen angegeben.

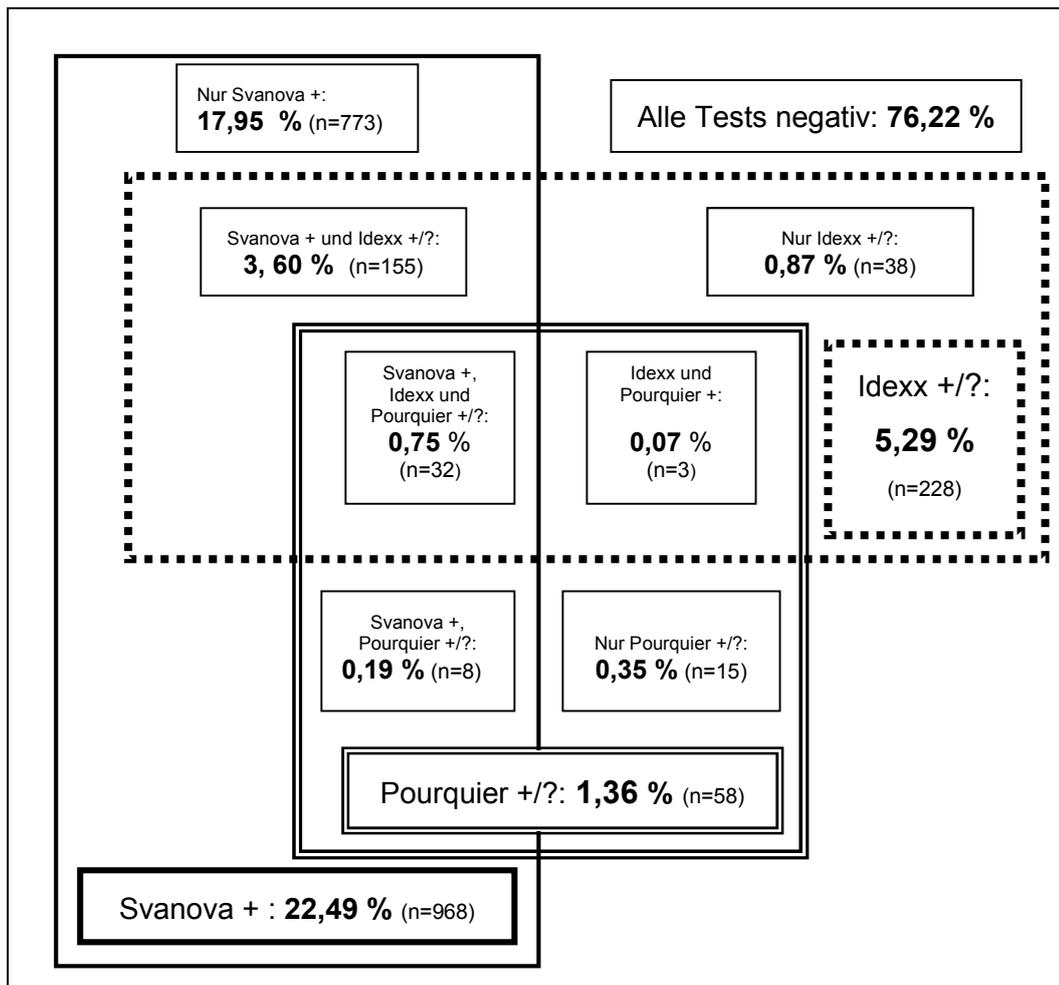


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Überschneidungen der einzelnen Tests mit prozentualen und absoluten Angaben bezogen auf 4306 Einzelseren.

In Tabelle 6 werden Seren mit unterschiedlicher Bewertung in den beiden Testsystemen dargestellt. Insgesamt wurden 56 Seren (1,3 %) nicht durch den Screeningtest erfasst. Die Verteilungen der Einzeltierbewertungen nach paralleler und sequentieller Testung unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,0863$). Würden allerdings z.B. die drei Gruppen +, ++, +++ zusammengefasst, wäre der Unterschied signifikant ($p = 0,02347$).

Bei den "+++"-Tieren, die das Definitionskriterium für die Herdenkategorie in "A" bilden, gab es keinen signifikanten Informationsverlust ($p = 0,0863$).

In Tabelle 7 wird die Reaktion dieser 56 Proben in den beiden Bestätigungstests aufgelistet. Der Großteil dieser Seren entfiel auf Idexx-grenzbereichswertige (29) und ausschließlich Pourquoier-positive (15) Bewertungen. 38 Seren reagierten allein im Idexx-ELISA, drei Seren sowohl im

Idexx- als auch im Pourquoi-ELISA. Nur 8,6 % der +++ - Tiere wurden durch SMAPS negativ bewertet, obwohl sie in der Paralleltestung positiv ausfielen. Bezogen auf 4306 Seren betrug der Verlust 0,07 %. Der ELISA der Firma Svanova reagierte bei diesen drei Proben negativ und wurde daher bei SMAPS nicht als positiv berücksichtigt.

Tabelle 6: Verteilung der 4306 Seren auf die Einzeltierbewertungen bei der Paralleltestung und bei SMAPS. Die Veränderung bei SMAPS gegenüber der Paralleltestung ist prozentual angegeben.

ETB) ¹	PT) ² (n)) ³	SMAPS (n)	Veränderung durch SMAPS in der ETB
neg	3282	3338	+ 1,7 %
(+)	773	773	0
+	130	101	- 22,3 %
++	86	62	- 27,9 %
+++	35	32	- 8,6 %

)¹ Einzeltierbewertung
)² Paralleltestung
)³ Anzahl

Tabelle 7: Verteilung der nicht durch SMAPS erkannten Seren auf die Tests, die in der Paralleltestung positiv ausfielen. Das Testergebnis der Paralleltestung wurde neben dem Einzeltierergebnis angegeben. Die Anzahl der Seren wurde prozentual auf 56 und 4306 Seren umgerechnet.

durch SMAPS nicht erfasst	ETB) ¹	n) ²	% (n = 56)	% (n = 4306)
Id ?) ³	+	29	51,8	0,7
Id +) ⁴	++	9	16,1	0,6
Pq +) ⁵	++	15	26,8	
Id? und Pq +	+++	1	1,7	0,07
Id+ und Pq +	+++	2	3,6	

)¹ Einzeltierbewertung
)³ Idexx grenzbereichswertig
)⁵ Pourquoi positiv
)² Anzahl
)⁴ Idexx positiv

4.3.2 Herden

Im vorliegenden Abschnitt sollte analysiert werden, welchen Einfluss die bei 4.3.1 dargestellten Abweichungen zwischen SMAPS und der Paralleltestung auf die Herdenbewertung hatten. Eine Abweichung auf Einzeltierebene muss

nicht zwangsläufig in einer abweichenden Herdenbewertung resultieren. Zwar bedingt allein das Tier mit der höchsten Punktzahl den Herdenstatus, jedoch ist vorstellbar, dass in einer Herde mehrere Tiere die höchste Punktzahl besitzen, die zusammen für den Herdenstatus verantwortlich sind (siehe Tabelle 3).

Tabelle 8 stellt die Herdenbewertung für SMAPS der der Paralleltestung gegenüber.

Tabelle 8: Darstellung der Verschiebung der Kategorien bezüglich Paralleltestung und SMAPS. In der zweiten Spalte unter "n" steht die Anzahl der Herden für die jeweilige Kategorie in der Paralleltestung. In den Spalten rechts daneben sind für die Herdenbewertungen aus der Paralleltestung die Bewertungen aus SMAPS angegeben.

Kategorie PT) ¹	n) ²	SMAPS				
		A	B	C	D	E
A) ³	12	12				
B	42		31	5	6	
C	33			26	6	1
D	42				42	
E	5					5

)¹ Paralleltestung

)² Anzahl

)³ Zur Definition der Kategorien siehe Tabelle 3 und Abbildung 1

Tabelle 9 ist zu entnehmen, welche Herden mit SMAPS im Vergleich zur Paralleltestung in andere Kategorien eingeordnet wurden, obwohl einer der Bestätigungstests reagierte. Es war stets jeweils nur eine Probe für die Verschiebung verantwortlich.

Tabelle 9: Aufschlüsselung der Verschiebungen der Kategorien zwischen Paralleltestung und SMAPS unter Beachtung des für die Veränderung verantwortlichen Tests.

n) ¹	PT) ²	SMAPS	Test
3	B	C	Pourquier pos) ³
2	B	C	Idexx pos
5	B	D	Pourquier pos
1	B	D	Idexx pos
6	C	D	Idexx ?) ⁴
1	C	E	Idexx ?

)¹ Anzahl

)³ positiv

)² Paralleltestung

)⁴ grenzbereichswertig

4.4 AUSWERTUNG DER KULTURELLEN UNTERSUCHUNG

4.4.1 Überblick

Der Vergleich von SMAPS mit der Paralleltestung war ein Hilfsmittel zur Beurteilung der Effizienz des Screeningtests. Größere Bedeutung besitzt der Vergleich zwischen SMAPS und der Kotkultur. Im Jahre 2004 wurden serologische durch kulturelle Untersuchungen nach Tabelle 4 ergänzt. Insgesamt wurden im Rahmen des Projekts 1747 Kotproben aus 134 Beständen untersucht. Diese Proben entfielen auf 974 Tiere. Es wurden 199 Tiere dreimal, 375 zweimal und 400 Tiere lediglich einmal kulturell untersucht. Die Unterschiede in der Anzahl der kulturell untersuchten Proben von Durchgang zu Durchgang kamen aus mehreren Gründen zustande, wie zum Beispiel Freiwilligkeit der Teilnahme, Abgänge und Zukäufe in den einzelnen Betrieben und Zeitmangel der Landwirte im Spätsommer. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Verteilung positiver und negativer Kotproben im Jahre 2004.

Tabelle 10: Darstellung der kulturell negativen und positiven Tiere im Zeitraum 2004/1 bis 2004/3.

Kulturen 2004/1			Kulturen 2004/2			Kulturen 2004/3		
pos	neg	Σ) ¹	pos	neg	Σ	pos	neg	Σ
9	421	430	11	657	668	6	643	649

)¹ Summe

Der Anteil positiver Kotkulturen belief sich auf 2 % (2004/1), 1,6 % (2004/2) und 0,9 % (2004/3). 5,5 % (n = 22) der einmal untersuchten Tiere und 0,5 % (n = 2) der zweimalig untersuchten Tiere reagierten positiv. Diese beiden Tiere waren bereits im ersten Durchgang kulturell positiv. Von den Tieren, die drei Mal untersucht wurden, konnte keine positive Kultur nachgewiesen werden. Von 69 Tieren existierte kein serologisches, sondern ausschließlich ein kulturelles Ergebnis. Eines dieser Tiere wurde als Ausscheider identifiziert, daher belaufen sich die ausgewerteten Probenzahlen in den Auswertungen, in denen die Serologie der Kultur gegenübergestellt wurde, nicht auf 974, sondern auf 973.

4.4.2 Vergleich der SMAPS mit der Kultur

In diese Auswertung gingen 973 Tiere ein, die sowohl serologisch als auch kulturell untersucht wurden. Ein Tier wurde als Ausscheider bezeichnet, wenn eine Kotkultur unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt positiv bewertet wurde. Die Validierung von SMAPS wurde durch einen nur geringen Anteil positiver Proben erschwert. Daher wurden bei der kulturellen Untersuchung die drei Durchgänge aus 2004 zusammengefasst. Da für viele Tiere mehrere serologische Bewertungen vorlagen, wurde zur Vermeidung von Doppelbenennungen grundsätzlich das erste serologische dem oder den kulturellen Ergebnissen gegenübergestellt. Lagen für ein Tier sowohl negative als auch positive kulturelle Ergebnisse vor, wurde das positive in die Auswertung einbezogen. Eine derartige Auswertung benachteiligt zwar einerseits das serologische Testverfahren, andererseits spiegelt dieses Vorgehen durchaus Feldbedingungen wider.

4.4.2.1 Einzeltiere

In Abbildung 6 wurden die prozentualen Verteilungen der kulturell positiven ($n = 23 = 100\%$) und negativen Tiere ($n = 950 = 100\%$) über den serologischen SMAPS-Bewertungen dargestellt. Kulturell positive Tiere entfielen entweder auf die extrem niedrigen Punktschichten 0 bis 4 oder aber auf die höchste Punktschicht 14. Zwei kulturell positive Tiere wurden in der Paralleltestung mit den Punktschichten 5 und 13 bewertet. Sie konnten vom Screeningtest nicht erkannt werden und wurden daher mit SMAPS negativ befundet. Kein einziges von den ++-Tieren war kulturell positiv.

Für die folgenden Auswertungen wurden die 973 Serumproben der kulturell untersuchten Tiere herangezogen. Im Laufe der Untersuchungen reagierten jedoch viele Tiere, die 2003 negativ bewertet wurden, serologisch positiv (Abbildung 7). Aus diesem Grund existiert in Abbildung 6 ein hoher Anteil kulturell negativer Ergebnisse, der auf negative serologische Bewertungen entfiel. Die Verteilung der vielen kulturell negativen Proben auf die serologisch negative Bewertung ist ein Artefakt der Auswertung (siehe auch Punkt 4.4.2).

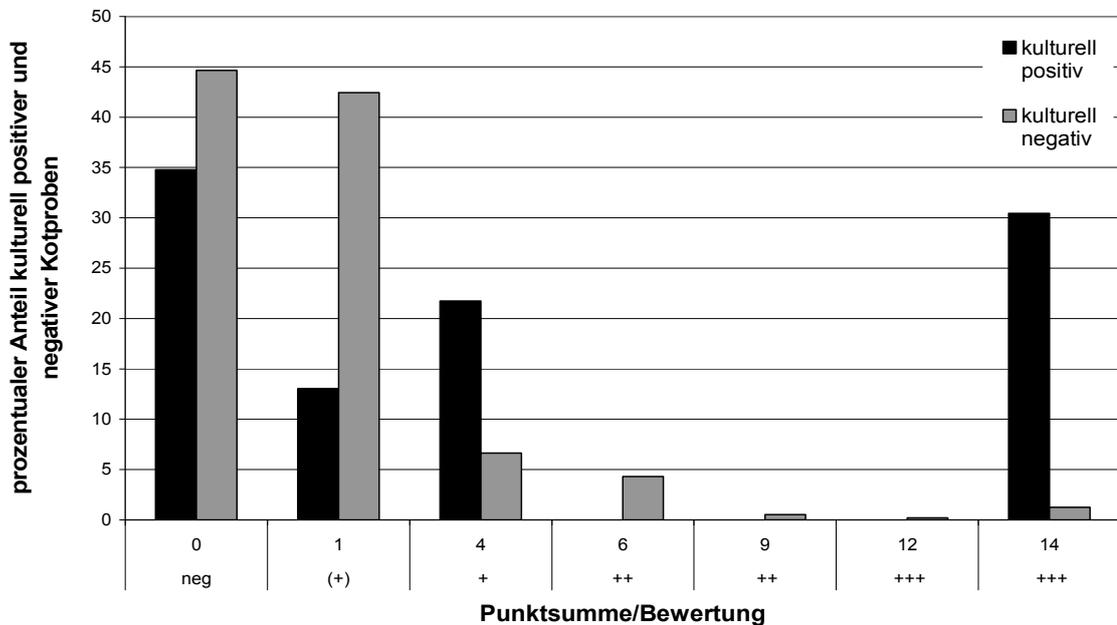


Abbildung 6: Prozentuale Verteilung der positiven (n = 23 = 100 %) und negativen (n = 950 = 100%) Kotkulturen auf die entsprechenden serologischen Punktsommen / Bewertungen (erste serologische Bewertung).

In Abbildung 7 ist dargestellt, wie sich die Verteilung der kulturell positiven und negativen Tiere auf die serologischen Ergebnisse verändert, wenn jeweils das höchste serologische Ergebnis zur Auswertung herangezogen wird. Der hohe Anteil kulturell positiver Tiere auf serologisch negativen Bewertungen sank erheblich ab. Auch bei ++-Tieren konnten kulturell positive Tiere gefunden werden. Nahezu 45 % der kulturell positiven Tiere wurden nun den +++-Tieren zugeordnet.

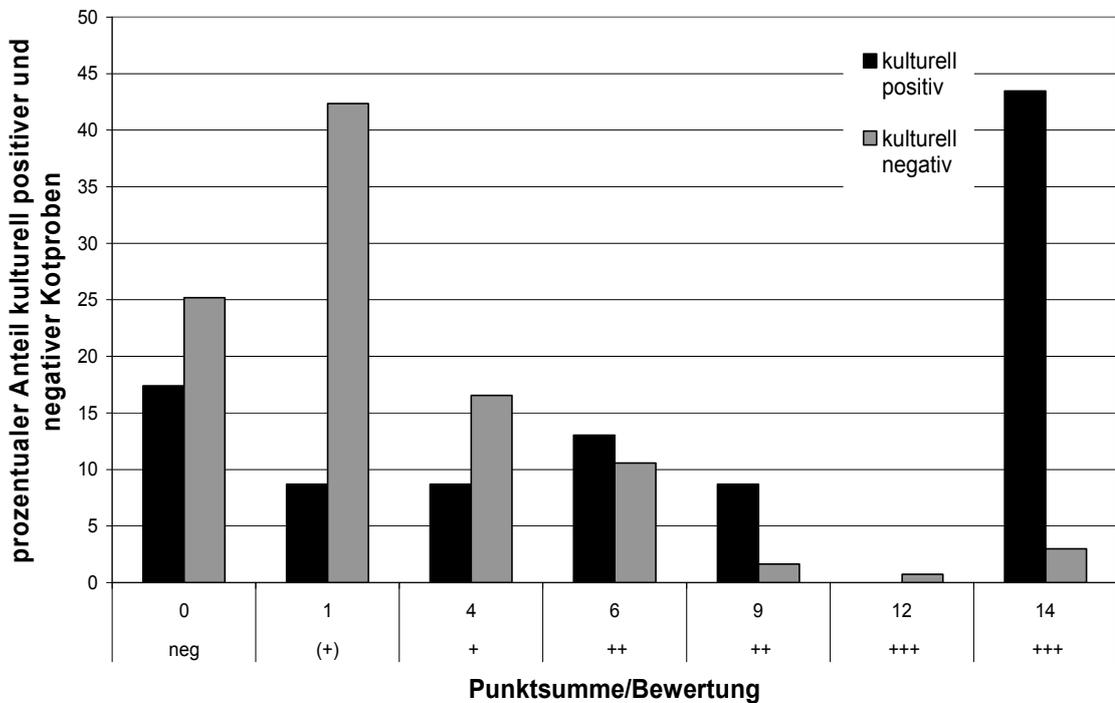


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der positiven (n = 23 = 100 %) und negativen (n = 950 = 100%) Kotkulturen auf die entsprechenden serologischen Punktsommen / Bewertungen (höchste serologische Bewertung).

Für die nächste Auswertung wurde wieder nur das jeweils erste serologische Resultat pro Tier herangezogen. Zur Darstellung der positiven prädiktiven Werte wurde Abbildung 8 angefertigt. Der relative Anteil der Tiere, die kulturell positiv ausfielen, wurde pro SMAPS-Bewertung angegeben. Die positiven prädiktiven Werte für die +++-, ++-, +-, (+) und negative Bewertung sind 33,3 %, 0 %, 7,9 %, 0,7 % und 2,1 %.

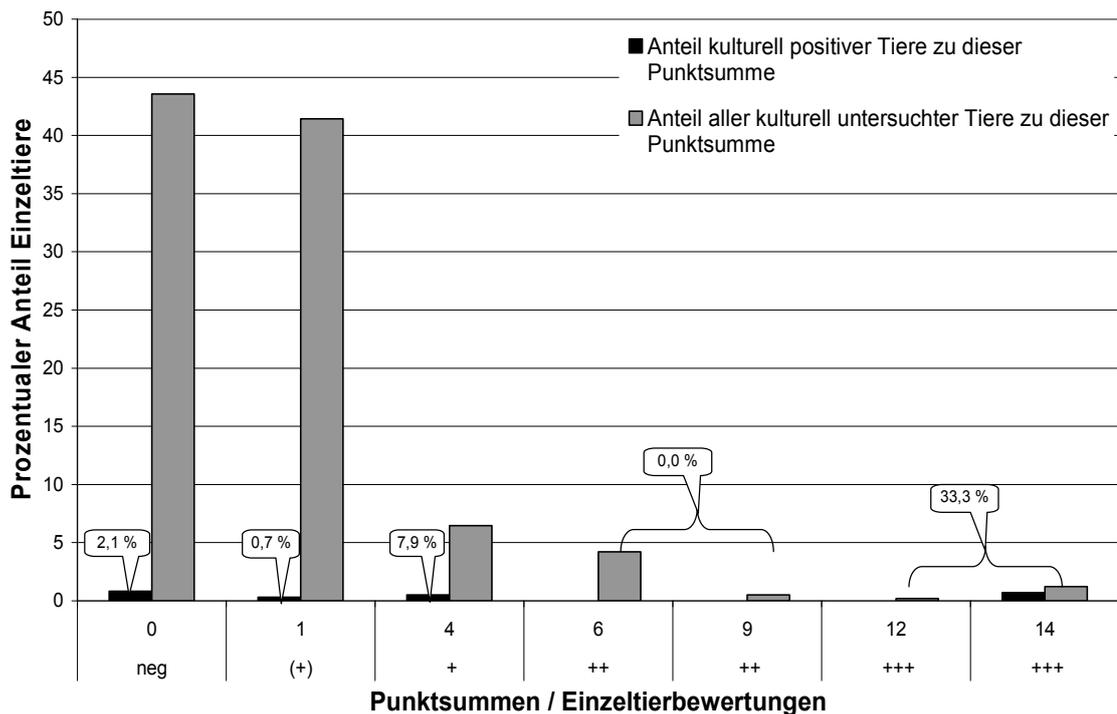


Abbildung 8: Darstellung der prozentualen Verteilung der kulturell positiven und negativen (n = 973) Tiere auf die entsprechenden serologischen Punktsummen / Bewertungen. Die graue Säule repräsentiert jeweils alle kulturellen Bewertungen über der Einzeltierbewertung. Die schwarze Säule daneben repräsentiert den prozentualen Anteil kulturell positiver Tiere. In den Blasen über den kulturell positiven Tieren sind die jeweiligen positiven prädiktiven Werte in % angegeben.

4.4.2.2 Herden

Wie bei der Einzeltierbewertung wurde zunächst die Verteilung der kulturell positiven und negativen Herden auf die einzelnen Herdenkategorien nach SMAPS angegeben. Für 111 Herden lagen kulturelle Ergebnisse vor. Kulturell positive Tiere entfielen auf nur vier Herden (3,6 % (Abbildung 9)). Drei Herden mussten der Kategorie A zugeordnet werden, eine kulturell positive Herde war in Kategorie C zu finden. In der Longitudinalstudie (siehe unten) stellte sich

heraus, dass diese Kategorie C-Herde bei den folgenden Untersuchungen der Kategorie B zugeordnet werden musste. Ausschlaggebend hierfür war ein kulturell positives Tier, das im ersten Durchgang vom Screeningtest als falsch negativ, in der Paralleltestung allerdings im Idexx-ELISA als positiv bewertet wurde. Im darauf folgenden Durchgang detektierte auch der Screeningtest zusammen mit dem Test der Firma Idexx das Tier als positiv (++) . Insgesamt machte diese Herde einen serologisch eher unauffälligen Eindruck; es wurden 56 Tiere beprobt, davon 41 drei Mal. Für die Kategorisierung in Klasse B waren nur drei Tiere verantwortlich, die zwischen den Durchgängen von + auf ++ anstiegen.

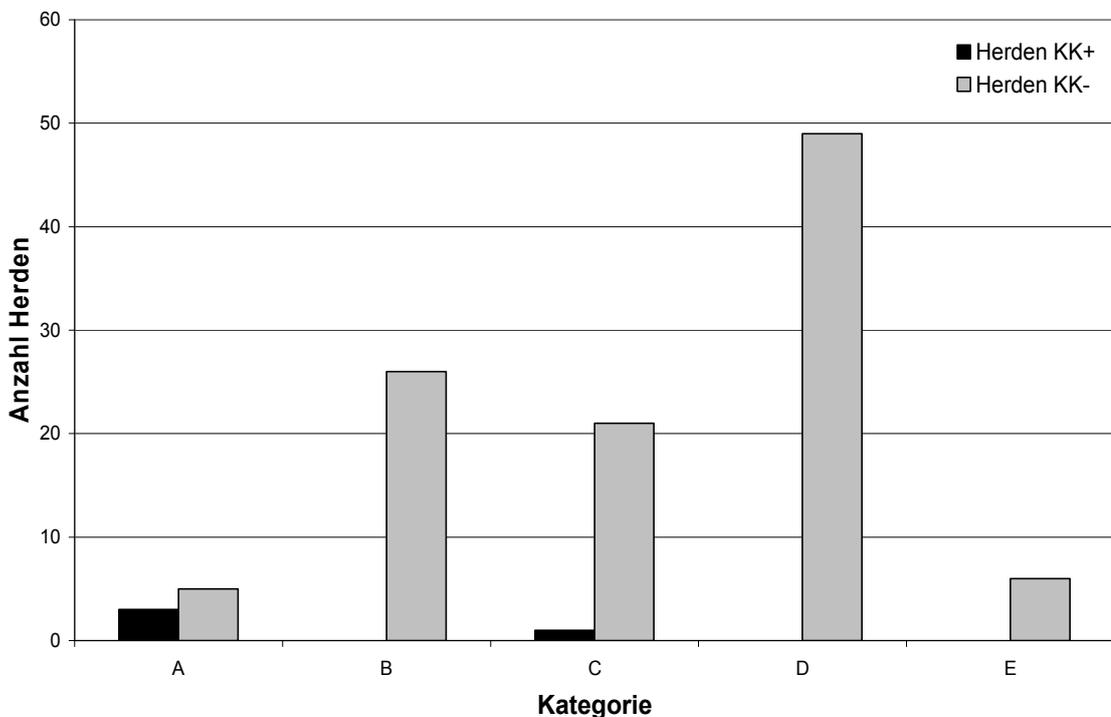


Abbildung 9: Verteilung der 950 negativen kulturellen Ergebnisse bei 107 Herden und der 23 positiven Tiere bei 4 Herden auf Kategorien bei SMAPS. Die kulturell positive Herde bei C stellte sich bei nachfolgender Untersuchung als kulturell positive B-Herde heraus.

In Tabelle 11 wurden die Verteilungen der Tiere über serologische Bewertungen für A-Herden und Nicht-A-Herden zusammenfassend dargestellt. Eine A-Herde ist eine Herde, in der mindestens ein +++-Tier gefunden wird, eine Nicht-A-Herde ist eine Herde, in der sich nur Tiere befinden, deren maximale Einzeltierbewertung kleiner als "+++" ist (Kategorien B-E).

Durch diese Einteilung ergaben sich 10 A-Herden und 101 Nicht-A-Herden. Auffällig war, dass 21 von 23 kulturell positiven Tieren in A-Herden gefunden wurden.

Die Verteilung der positiven Kotkulturen auf die serologischen Bewertungen in den A-Herden zeigte wieder, dass auf die Extreme besonders viele kulturell positive Kulturen entfielen (7 bei "+++"-Tieren, 8 bei serologisch negativen Tieren). Bei den Bewertungen "(+)" und "+" wurden nur wenige positive Kotkulturen gefunden, bei der Bewertung "++" konnte keine ermittelt werden.

Bei der Nicht-A-Herde konnten die beiden kulturell positiven Proben nur serologisch niedrigen Bewertungen zugeordnet werden.

Zwischen A- und Nicht-A-Herden wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich positiver kultureller Ergebnisse für serologisch (+) und negativ bewertete Tiere gefunden. Das bedeutet, dass in den A-Herden signifikant mehr kulturell positive Tiere in der Gruppe mit niedrigen oder negativen serologischen Einzeltierbewertungen vorkamen. Zur Berechnung wurde die Bonferroni-Korrektur herangezogen; daher beträgt α in diesem Fall nicht 0,05 sondern 0,01.

Tabelle 11: Einteilung der Herden in A-Herden und Nicht-A-Herden bei SMAPS. Es gehen nur Tiere in die Bewertung ein, bei denen sowohl kulturelle als auch serologische Daten vorliegen. Es wurden die Anzahl der untersuchten Tiere pro Bewertung für die A- und Nicht-A-Herden und die Anzahl der kulturell positiven Tiere (KK+) angegeben. In der letzten Spalte wurde angegeben, ob bezüglich der kulturell positiven Tiere in A- und Nicht-A-Herden ein signifikanter Unterschied besteht.

SMAPS	A-Herden (n) ¹ = 10			Nicht-A-Herden (n = 101)			p) ⁴ $\alpha = 0,01$
	Anzahl der Einzeltiere	KK+) ²	KK-) ³	Anzahl der Einzeltiere	KK+	KK-	
+++	21	7	12	---	---	---	
++	10	0	10	36	0	36	n.a.) ⁵
+	21	4	17	47	1	46	p = 0,04
(+)	37	3	34	369	0	369	p = 0,0009
neg	41	7	33	391	1	390	p = 0,00002
Summe	130	21	106	843	2	841	

)¹ Anzahl

)³ kulturell negative Tiere

)⁵ nicht auswertbar

)² kulturell positive Tiere

)⁴ Irrtumswahrscheinlichkeit

In Tabelle 12 wurden anstatt der ersten serologischen die maximalen serologischen Bewertungen pro Tier zur Auswertung herangezogen. Die Anzahl der A-Herden stieg dadurch von zehn auf 13. Außerdem entfielen hier auch kulturell positive Tiere auf die Einzeltierbewertung "++".

Tabelle 12: Einteilung der Herden in A-Herden und Nicht-A-Herden bei SMAPS. Es gehen nur Tiere in die Bewertung ein, bei denen sowohl kulturelle als auch serologische Daten vorliegen. Im Gegensatz zu Tabelle 11 wurde anstatt der ersten serologischen Bewertung die maximale serologische Bewertung herangezogen.

SMAPS	A-Herden (n) ¹ = 13			Nicht-A-Herden (n = 98)		
	Anzahl der Einzeltiere	KK+) ²	KK -) ³	Anzahl der Einzeltiere	KK+	KK -) ³
+++	36	10	26	--	--	--
++	35	3	32	84	2	82
+	35	2	33	126	0	126
(+)	35	2	33	377	0	377
neg	36	4	32	209	0	209
Summe	177	21	156	796	2	794

Nachdem sich aus den vorangegangenen Daten die A-Herden deutlich heraus kristallisierten, stellte sich die Frage, ob sich die Herdenprävalenzen in kulturell positiven Herden von den kulturell negativen signifikant unterscheiden. In Tabelle 13 werden die vier kulturell positiven Herden den 130 kulturell negativen Herden gegenübergestellt. In den Herden mit Ausscheidern konnten für $\alpha = 0,05$ signifikante Abweichungen zu den Herden ohne Ausscheidern ermittelt werden.

Tabelle 13: Abbildung der mittleren Herdenprävalenzen pro Test in kulturell positiven und negativen Herden.

Test	Herden KK +) ⁵	Herden KK -) ⁶	s) ⁷
Sv) ¹	28,20%	22,20%	*) ⁸
Id ?) ²	6,90%	2,20%	*
Id +) ³	8,90%	1,50%	*
Pq) ⁴	7,90%	0,60%	*
Tiere gesamt	202	4104	

¹ Seren von Tieren mit Punktwert 1 (Svanova-ELISA)

² Seren von Tieren mit Punktwert 3 (Idexx - ELISA)

³ Seren von Tieren mit Punktwert 5 (Idexx - ELISA)

⁴ Seren von Tieren mit Punktwert 8 (Pourquier - ELISA)

⁵ kulturell positiv

⁶ kulturell negativ

⁷ Signifikanz ($p = 0,05$)

⁸ signifikant

4.5 LONGITUDINALSTUDIE

4.5.1 Überblick

Die bisherigen Darstellungen zeigten eine Momentaufnahme. Im Rahmen des vorliegenden Abschnittes wurde analysiert, wie sich kulturell untersuchte Tiere in der weiteren Entwicklung serologisch verhielten. Das Datenmaterial bot zudem auch die Möglichkeit, Veränderungen der serologischen Reaktivität und die sich daraus ergebenden Veränderungen auf Herdenebene darzustellen. Die Stabilität der Herdenkategorisierung war von besonderem Interesse. Hierfür wurden die Daten von 950 Tieren aus 82 Herden, die über einen Zeitraum von zwei Jahren viermal beprobt wurden (2003, 2004/1, 2004/2, 2004/3) ausgewertet. Lediglich eine von vier kulturell positiven Herden konnte daher in die Longitudinalstudie mit einbezogen werden. Die kulturell positiven Tiere dieser Herde sind mit allen Ergebnissen für den Zeitraum der Untersuchungen in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Darstellung der zehn kulturell positiven Tiere der einzigen Herde mit kulturell positiven Tieren in der Longitudinalstudie unter Berücksichtigung sowohl der serologischen Ergebnisse zu allen vier Untersuchungszeitpunkten als auch der kulturellen Ergebnisse 2004.

Tier	S) ¹ 2003	S 2004/1	KK) ² 04/1	S 2004/2	KK 04/2	S 2004/3	KK 04/3
1	(+)	++	neg.) ³	neg.	neg.	neg.	pos) ⁴
2	+	neg.	pos	neg.	neg.	neg.	neg.
3	neg.	neg.	pos	neg.	n.d.) ⁵	neg.	n.d.
4	neg.	(+)	pos	neg.	n.d.	neg.	n.d.
5	neg.	+++	n.d.	+++	neg.	+++	pos
6	neg.	++	n.d.	neg.	pos	neg.	neg.
7	+	++	n.d.	+++	pos	+++	neg.
8	+++	+++	n.d.	+++	pos	+++	neg.
9	+++	+++	n.d.	+++	pos	+++	pos
10	(+)	neg.	n.d.	+++	pos	+++	n.d.

)¹ Auswertung des serologischen Ergebnisses
)³ negativ
)⁵ nicht durchgeführt

)² Auswertung der Kotkultur
)⁴ positiv

4.5.2 Serologische Auswertung auf Einzeltierebene im Zeitraum 2003 bis 2004/3

In Tabelle 15 wird die prozentuale Verteilung der 950 Tiere auf positive, grenzbereichswertige und negative Bewertungen der einzelnen Testsysteme in vier Durchgängen dargestellt. Im Vergleich wurde die Verteilung von 4306 Seren aus Tabelle 6 als letzte Spalte in Tabelle 15 integriert und geprüft, ob die beobachteten Verteilungen signifikant von der Verteilung aller 4306 Seren abweichen. Dabei wurde die Verteilung der 4306 Seren mit der Verteilung der Seren zum Zeitpunkt 2003 verglichen.

Die prozentualen Verteilungen waren mit einer Ausnahme ähnlich. Für den Idexx-ELISA drehte sich das Verhältnis von positiven zu grenzbereichswertigen Seren gegenüber den 4306 Seren um. Dieser Effekt war signifikant ($p < 0,05$). Weiterhin war auffällig, dass die Verteilungen im Durchgang 2004/1 gegenüber der Verteilungen der 4306 Seren alle signifikant unterschiedlich ausfielen.

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der 950 Tiere auf positive, grenzbereichswertige und negative Bereiche der einzelnen Testsysteme.

Test	Ergebnis	2003) ¹	s) ²	2004/1) ¹	s	2004/2) ¹	s	2004/3) ¹	s	4306 Seren) ³
Sv) ⁴	pos) ⁵	26,1	ns) ⁶	26,7	*) ⁷	24,0	ns	25,5	ns	22,2
	?) ⁸	14,1	ns	13,4	*	13,9	ns	14,4	ns	14,2
	neg) ⁹	59,8	ns	59,9	*	62,1	ns	60,1	ns	63,6
Id) ¹⁰	pos	1,1	*	2,2	*	3,2	*	2,3	*	2,1
	?	0,8	*	1,0	*	1,5	*	1,5	*	3,5
	neg	98,1	*	96,8	*	95,3	*	96,2	*	94,4
Pq) ¹¹	pos	1,0	ns	0,6	*	1,1	ns	1,4	ns	1,1
	?	0,3	ns	0,8	*	0,6	ns	0,4	ns	0,2
	neg	98,7	ns	98,6	*	98,3	ns	98,2	ns	98,7

)¹ alle Angaben in % bezogen auf 950 Tiere
)³ alle Angaben in % bezogen auf 4306 Tiere
)⁵ positiv
)⁷ signifikant
)⁹ negativ
)¹¹ Pourquoi-ELISA

)² Signifikanz
)⁴ Svanova-ELISA
)⁶ nicht signifikant
)⁸ grenzbereichswertig
)¹⁰ Idexx-ELISA

Die nächsten Tabellen und Auswertungen wurden zur Untersuchung einer möglicher Serokonversion der Tiere erstellt. In Bayern existieren bisher keine Daten darüber. Zur Untersuchung der Raten an Serokonversion wurden Differenzen der optischen Dichten ($\Delta OD \%_{(t_2 - t_1)}$) pro ELISA über den Zeitraum 2003 bis 2004/3 gebildet. Ein positiver Wert reflektiert einen Anstieg, ein negativer Wert eine Abnahme der Extinktion. Dabei gilt, dass sich die Seren im Laufe der Durchgänge nicht von Null AUF, sondern UM denjenigen $\Delta OD \%$ -Wert veränderten. Seren mit einer Veränderung von 0 OD % fielen daher nicht einfach negativ aus, sondern schwankten lediglich nicht innerhalb ihres OD %-Wertes. So war von Durchgang zu Durchgang nachvollziehbar, wie sich die Seren im Laufe der Zeit veränderten.

In Tabelle 16 werden die Daten für den längsten Zeitraum (2003 (= t_1)) auf 2004/3 (= t_2)) für die einzelnen Tests in absoluten Zahlen dargestellt. Die Verteilung der Proben über die ermittelte $\Delta OD \%_{(t_2 - t_1)}$ wird getrennt nach Abnahme $\Delta OD \%_{(t_2 - t_1)} < 0$ und Zunahme $\Delta OD \%_{(t_2 - t_1)} > 0$ abgebildet. In der dritten Spalte (Δ) eines jeden Tests wurde die Differenz zwischen Abnahme und Zunahme gebildet.

Im Svanova-ELISA konnten in diesem Zeitintervall Zunahmen um bis zu 80 % OD verzeichnet werden. Diskrepanz dazu stehen die Ergebnisse aus dem Idexx-ELISA. Dort wurden ausschließlich Abnahmen oder keine Veränderung in den OD %-Klassen verzeichnet. Die Schwankungen fanden größtenteils in einem sehr engen Rahmen von unter 20 % OD statt, denn hier wurden die meisten Seren ($n = 873$) gemessen.

Im Pourquier-ELISA wurden zwar 57 Proben mit Zunahmen erkannt, aber diese Proben entfielen auf einen Bereich unter 40 % OD. Von den drei Tests wurde beim ELISA der Firma Idexx bei 91,8 % der Seren eine maximale Schwankung von bis zu 20 % OD vom Anfangswert gemessen. Damit lieferte dieser Test die reproduzierbarste Bewertung von Einzelseren. Die Reproduzierbarkeit einzelner Testergebnisse im Pourquier-ELISA lag immerhin noch bei 82,5 %, die des Svanova-ELISAs lediglich bei 45,8 %.

Tabelle 16: Darstellung sowohl der Reaktivitätszunahmen und -abnahmen als auch der Differenzen für die einzelnen Tests für 950 Seren im Zeitraum von 2003 bis 2004/3 (grau unterlegt die Netto-Zunahmen).

$\Delta OD \%_{(t2-t1)}$ ¹	Svanova 2003 auf 2004/3			Idexx 2003 auf 2004/3			Pourquier 2003 auf 2004/3		
	<0) ²	> 0) ³	Δ) ⁴	<0	> 0	Δ	< 0	> 0	Δ
bis 20%			436			873			784
bis 40%	95	166	71	43	16	-27	35	92	57
bis 60%	45	81	36	7	3	-4	20	7	-13
bis 80%	29	37	8	4	1	-3	1	5	4
bis 100 %	21	15	-6	3	0	-3	3	1	-2
bis 120%	6	6	0	0	0	0	1	0	-1
bis 140%	10	0	-10	0	0	0	1	0	-1
>140%	2	1	-1	0	0	0	0	0	0

)¹ Differenz des OD-Wertes

)³ Reaktivitätszunahme

)² Reaktivitätsabnahme

)⁴ Differenz der Werte von)² und)³

Durch Tabelle 16 waren die Reaktivitätszunahmen innerhalb OD % - Klassen ersichtlich. Bisher wurden aber noch keine Aussagen getroffen, auf welche Einzeltierbewertungen sich die Differenzen in den Extinktionen niederschlagen.

In Abbildung 10 werden die Verteilungen der Seren über die erzielten Punktschichten bei SMAPS für die einzelnen Durchgänge aufgetragen.

Die Masse der Seren entfiel in allen vier Durchgängen auf Punktschicht 0. Die Verteilungen auf die Bewertungen 12 und 14 ("+++") machten - bezogen auf 950 Seren - je nach Durchgang zwischen 0,4 % und 0,8 % aus. Im Durchgang 2004/2 war ein höherer Anteil von Seren mit den Punktschichten 4 und 6 ("+" und "++") zu ungunsten der Punktschicht 1 zu verzeichnen. Diese Tendenz war aber 2004/2 auf 2004/3 wieder rückläufig.

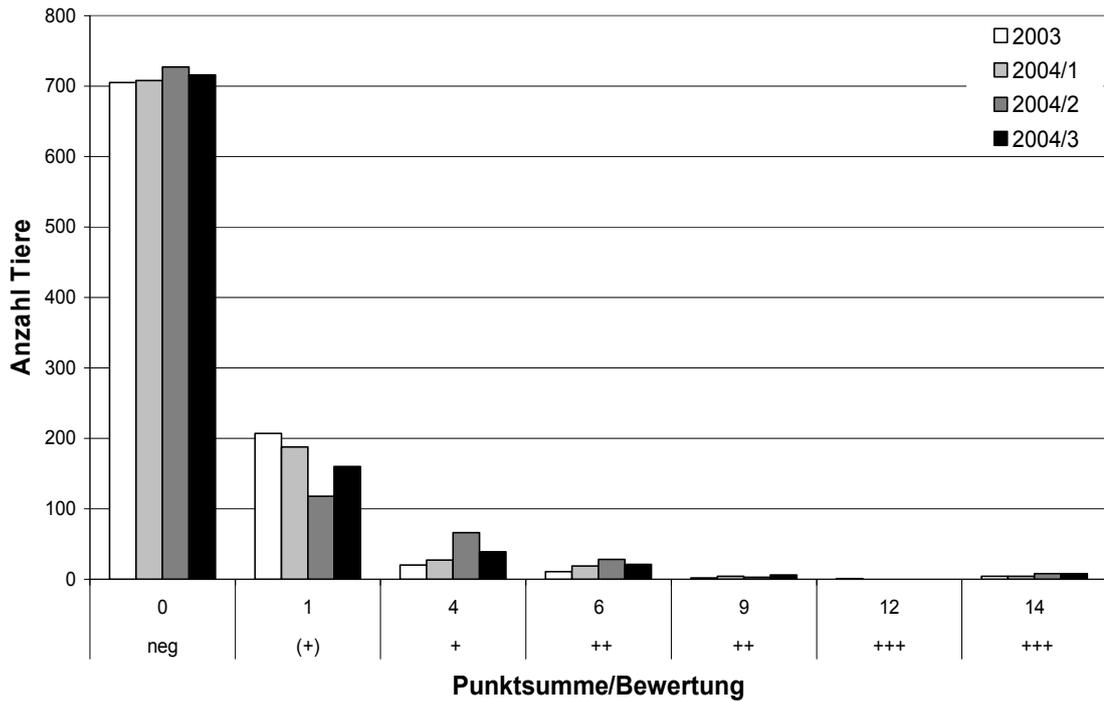


Abbildung 10: Verteilung der 950 Seren auf die jeweiligen Punktsummen / Bewertungen in allen vier Durchgängen bei SMAPS.

Wie bereits für die Auswertung der Einzeltests beschrieben, wurden auch die SMAPS-Daten hinsichtlich eines Reaktivitätsanstiegs überprüft. Analog zu Tabelle 16 wurden hier die Differenzen über die Punktsummen ($\Delta PS_{(t_2 - t_1)}$) zweier Untersuchungszeitpunkt t_1 und t_2 gebildet. In Abbildung 11 wird die Häufigkeitsverteilung der Proben über die Veränderung $\Delta PS_{(t_2 - t_1)}$ für die verschiedenen Entnahmezeitpunkte dargestellt. Dabei ist wieder zu beachten, dass ein Anstieg eines Serums um beispielsweise Punktsumme 5 bedeutet, dass dieses Serum UM die Punktsumme 5 gestiegen ist, nicht AUF die Punktsumme 5. Seren, die in Abbildung 11 über der Punktsumme 0 abgebildet wurden, sind Seren, die sich von einem Durchgang auf den anderen serologisch nicht veränderten.

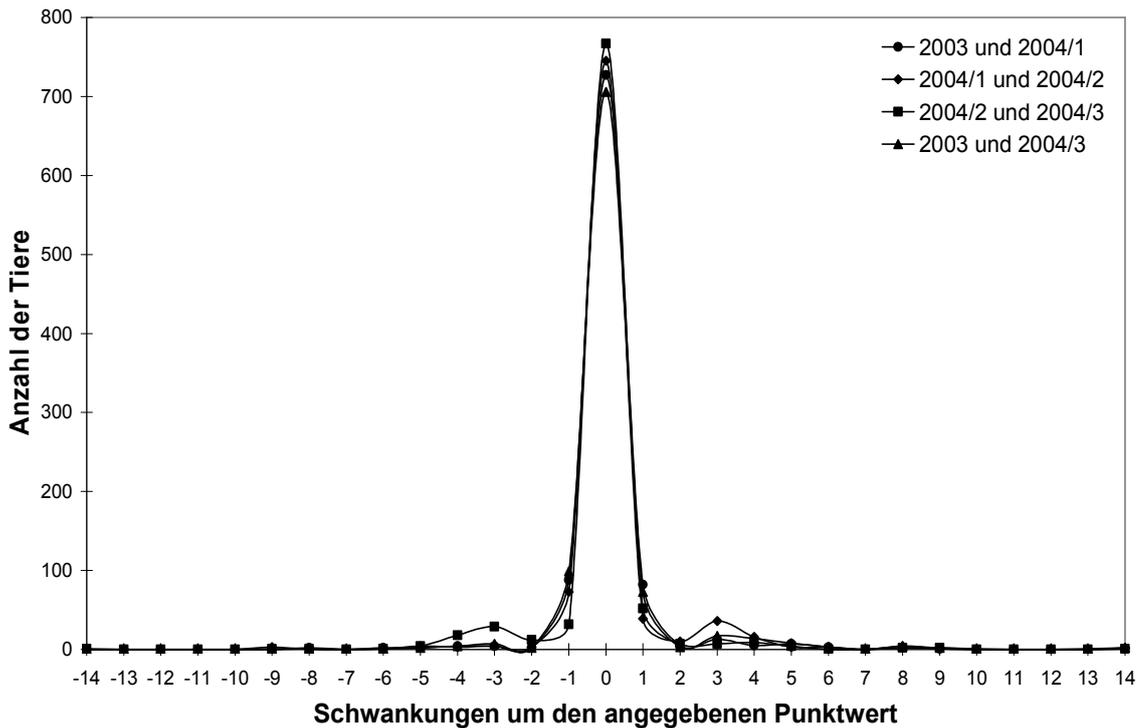


Abbildung 11: Darstellung der Schwankungen der Einzeltierbewertungen sowohl von Durchgang zu Durchgang als auch übergreifend vom ersten zum letzten Durchgang. Auf der Abszisse sind die Werte der Schwankungen aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der Tiere.

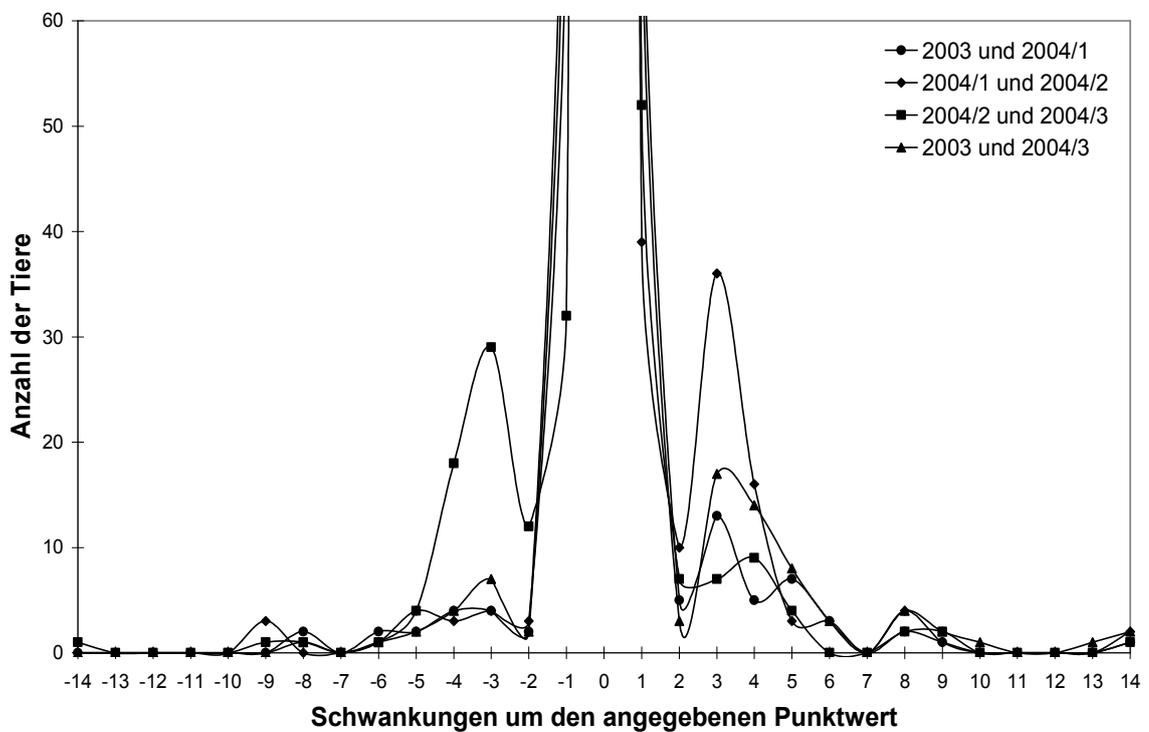


Abbildung 12: Vergrößerung eines Ausschnitts wichtiger Details aus Abbildung 10.

Ein Serum, das im ersten Durchgang mit beispielsweise der Punktsomme 6 belegt wurde, wurde auch im nächsten Durchgang mit der Punktsomme 6 bewertet. Wurde nun ein Serum in einem Durchgang als negativ bewertet, stieg aber im nächsten Durchgang um beispielsweise auf Punktsomme 9 an, weil sowohl der ELISA der Firma Svanova als auch der der Firma Pourquier positiv ausfiel, bekam das Serum in der Graphik den Punktwert +9. Fiele das Serum wiederum in den ELISAs der Firmen Pourquier und Svanova positiv aus, würde es den Punktwert 0 erhalten, weil es sowohl beim ersten als auch beim zweiten Durchgang die Punktsomme 9 erhalten hatte. Würde nun bei diesem Serum im nächsten Durchgang der Test der Firma Pourquier wieder negativ ausfallen, würde das Serum in der Graphik bei Punktwert 1 zu finden sein. Durch diese Graphik kann nicht nur auf der Basis von SMAPS verfolgt werden, ob die Seren im Verlauf dieser beiden Jahre insgesamt vermehrt in hohe serologische Bewertungen fielen, sondern auch, welche Tests besonders an den Veränderungen beteiligt waren. Außerdem können Verschiebungen pro Punktsomme von Durchgang zu Durchgang beobachtet werden, was in einer Balkengraphik nicht möglich gewesen wäre.

Aus der Darstellung von Abbildung 11 geht hervor, dass die meisten serologischen Bewertungen gut reproduzierbar waren (Anzahl der Tiere über dem Punktwert 0). 74,3 bis 80,7 % der untersuchten Tiere zeigten bei der zweiten Untersuchung das gleiche Ergebnis. Abbildung 12 dient der detaillierten Darstellung, wie viele Seren sich bei einem Punktwert von Durchgang zu Durchgang verschlechterten oder verbesserten. Tabelle 16 dient zum besseren Verständnis. Dort wurden die Schwankungen über den längsten Untersuchungsintervall von 2003 auf 2004/3 in Zahlen dargestellt.

Bei den Punktwerten bis -7/+7 wurden kleinere Schwankungen meist zwischen grenzbereichswertig und positiv oder negativ im ELISA der Firma Idexx oder Schwankungen im Bereich des Svanova-ELISAs festgestellt. Bei Punktwert -8/+8 und Punktwert -9/+9 waren einige wenige Seren betroffen, die in der Punktsomme von 0 oder 1 auf 8 bzw. 9 stiegen oder umgekehrt. Interessant waren die Punktwerte -14/14. Ein Serum, das im Durchgang 2004/2 in allen drei Tests positiv bewertet wurden, fiel im Durchgang 2004/3 auf die

Punktsumme 0. Dagegen konnten in allen Durchgängen ein oder zwei Seren bemerkt werden, die von Punktsumme 0 auf Punktsumme 14 stiegen.

In Tabelle 17 wird hinsichtlich der Serokonversion der längste Untersuchungszeitraum 2003 auf 2004/3 ausgewertet. In der ersten Spalte ist der Betrag der Veränderungen der Punktsumme ΔPS eines Serums aufgetragen. Die zweite und dritte Spalte sind die Zahlenwerte des rechten und linken Schenkels aus den Abbildungen 11 und 12. In der vierten Spalte steht die Anzahl der Seren, die sich um den entsprechenden Punktwert aus Spalte 1 verändert hat. Von 950 Tieren zeigten 706 keinerlei serologische Veränderungen (Tabelle 17). Den Blutproben dieser Tiere konnte 2003 serologisch die gleiche Einzeltierbewertung wie auch 2004/3 zugeteilt werden ($\Delta PS_{(t_2 - t_1)} = 0$). Ein leichter Rückgang der Anzahl positiver Seren ($n = 26$) ließ sich nur im Test der Firma Svanova verzeichnen, alle anderen Tests detektierten 2004/3 mehr positive oder grenzbereichswertige Seren als 2003. Allerdings war der Anstieg minimal und konnte lediglich als Trend formuliert werden, da nur für 17 Seren eine Veränderung um eine $\Delta PS > 4$ ermittelt wurde (letzte Spalte der Tabelle 17, Summe der Seren von $\Delta PS 5$ bis $\Delta PS 14$). Das bedeutet, dass sich in der Einzeltierbewertung eine Veränderung von negativ oder (+) bewertete auf ++ - oder +++ - Tiere ergab, denn hinter dieser Differenz stehen ausschließlich Seren, die im Pourquier-ELISA oder Idexx-ELISA positiv gewertet wurden. Seren mit einem Anstieg von $\Delta PS \leq 5$ sind mit einer Ausnahme Seren, die durch grenzbereichswertige Idexx-Resultate oder positive Svanova-Ergebnisse an Seropositivität gewannen. Die negativen Bewertungen bei $\Delta PS 1$ beziehen sich ausschließlich auf Seren, die im Svanova-ELISA im ersten Durchgang als positiv, im letzten aber als negativ detektiert wurden. Keiner dieser Unterschiede fiel signifikant aus.

Tabelle 17: Differenzen für die Punktsommen (Δ PS) bei SMAPS im Zeitraum von 2003 bis 2004/3. Die Anzahl der Werte des linken Schenkels wurde von der Anzahl der Werte des rechten Schenkels subtrahiert. Positive Werte bedeuten einen Anstieg der Einzeltierbewertung, negative Werte eine Verringerung der Einzeltierbewertung um diesen Punktwert in diesem Zeitraum.

Betrag der Veränderungen (Δ PS) ¹	Werte des linken Schenkels aus Abb.) ² . 10	Werte des rechten Schenkels aus Abb. 10	Differenz der Werte aus Spalte 2 und 3
0			706
1	99	73	-26
2	2	3	1
3	7	17	10
4	4	14	10
5	2	8	6
6	1	3	2
7	0	0	0
8	1	4	3
9	0	2	2
10	0	1	1
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	1	1
14	0	2	2

)¹ Differenz des Punktsomme

)² Abbildung

Aus den Abbildungen 11 und 12 geht hervor, dass ein Großteil der Seren von Durchgang zu Durchgang konstant bewertet wurde. Aus diesen Abbildungen geht nicht hervor, auf welche Einzeltierbewertungen sich die konstanten Seren verteilten. Es könnten beispielsweise ausschließlich negative Seren sein, die stabil bewertet wurden.

Zur Analyse, auf welche Bewertungen sich die Tiere mit konstanten Einzeltierbewertungen verteilten, dient Abbildung 13. Die Verteilungen sind bis auf kleine Unterschiede zwischen den Durchgängen sehr ähnlich, daher wurde als Grundlage für die graphische Darstellung repräsentativ für alle Durchgänge Durchgang 2004/2 auf 2004/3 gegenübergestellt. Wie aus den Abbildungen 11 und 12 schon hervorging, konnten 80,7 % der Seren aus 2004/2 auf 2004/3 wieder in dieselbe Bewertung eingeordnet werden. Aus dieser Graphik ergibt sich, dass 91 % bzw. 88 % der Seren, die in den Einzeltierbewertungen

als "negativ" bzw. "+++" im Durchgang 2004/2 befundet wurden, auch 2004/3 wieder gleich bewertet wurden.

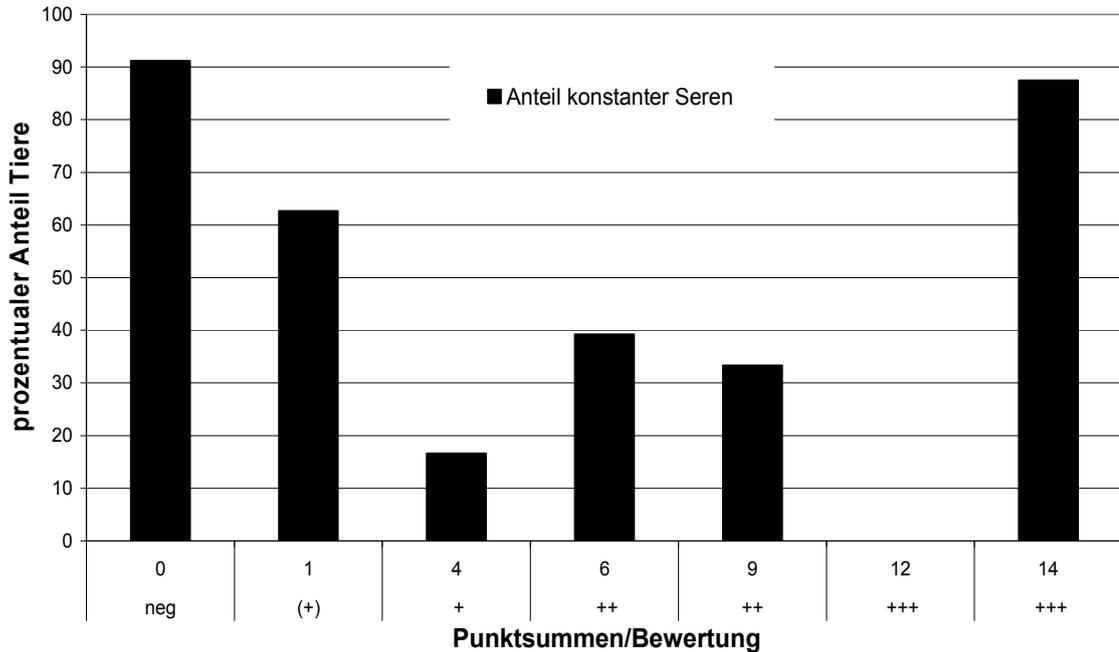


Abbildung 13: Darstellung der von 2004/2 auf 2004/3 konstant bewerteten Seren. Die Verteilung auf die Einzeltierbewertungen wurde prozentual angegeben.

Die Berechnungen wurden für alle Durchgänge wie für Abbildung 13 durchgeführt. Insgesamt konnten 2003 auf 2004/1 76,5 %, 2004/1 auf 2004/2 78,4 %, 2004/2 auf 2004/3 80,7 % und 2003 auf 2004/3 74,3 % der Seren als konstant bewertet werden. Außerdem ergab sich, dass Tiere mit negativen Bewertungen maßgeblich an der Konstanz beteiligt waren, wohingegen sich die positiven Bewertungen(+), + und ++ in der Regel weniger konstant verhielten. Für die +++-Reaktionen war ein hohes Maß an Konstanz zu verzeichnen. Die Zahl der +++-bewerteten Tiere stieg von vier (2003) auf acht (2004/2) bzw. sieben (2004/3) an.

4.5.3 Serologische Auswertung auf Herdenebene im Zeitraum 2003 bis 2004/3

In Tabelle 18 sind die Verteilungen der Kategorisierungen im Zeitraum 2003 auf 2004/3 von 78 Herden, für die mindestens zehn Tiere vier Mal untersucht wurden, in Mehrfeldertafeln einander gegenüber gestellt. Die Diagonale (grau

unterlegte Felder) steht für konstante Bewertungen. Unterhalb der Diagonalen stehen Herden, die im Vorjahr in einer besseren Kategorie bewertet wurden und im aktuellen Durchgang schlechter kategorisiert wurden. Oberhalb der Diagonalen sind Herden dargestellt, die im Vorjahr eine schlechtere Kategorie erzielten und im aktuellen Durchgang besser bewertet wurden. Zum besseren Verständnis wurden im Durchgang 2003 - 2004/1 exemplarisch drei Kästchen eingerahmt, die folgend zur Erklärung der Lesart der Tabelle dienen. Das unterste eingerahmte Kästchen mit der Ziffer "5" bedeutet, dass im Durchgang 2003 fünf Herden bei Kategorie D eingeordnet wurden, die im darauf folgenden Durchgang 2004/1 mit Kategorie B bewertet wurden. Das nächste eingerahmte Kästchen ist grau unterlegt und liegt in der Diagonale, was bedeutet, dass sechs Herden, die sich 2003 in Kategorie C befanden, auch 2004/1 wieder in Kategorie C fielen. Das eingerahmte Kästchen über der Diagonalen, wieder sechs Herden, wurden 2003 als Kategorie B bewertet, 2004/1 wurden sie als D-Herden kategorisiert.

Die größten Veränderungen wurden von 2003 auf die drei Untersuchungszeitpunkte in 2004 festgestellt, die bis zu drei Kategorien Unterschied vom Entnahmezeitpunkt 2003 zu den anderen Entnahmezeitpunkten ausmachten. Die Schwankungen innerhalb des Jahres 2004 waren deutlich geringer.

Der prozentuale Anteil der Bestände, die auf die Diagonale entfallen, kann als Maß der Konstanz herangezogen werden. Werden Schwankungen um höchstens eine Herdenkategorie toleriert, ergaben sich deutlich höhere Werte (Tabelle 19, Zahlenwerte ohne Klammern). Eine besonders hohe Übereinstimmung der Herdenkategorisierung ließ sich ausschließlich bei der Gegenüberstellung der Daten von 2004/2 mit 2004/3 finden. Hierbei handelte es sich um den kürzesten Zeitraum. Sie lag dort bei 100 %. Die niedrigste Übereinstimmung fiel im Vergleich der Durchgänge 2003 mit 2004/3 mit 82 % auf.

Tabelle 18: Darstellung der Konstanz der Herdenbewertung von Durchgang zu Durchgang. Grau unterlegt ist die Anzahl der Herden, die jeweils in die gleiche Herdenkategorie eingeordnet wurde.

	2004/1					2004/2					2004/3							
2003	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E			
A	3	1				3		1			3	1						
B		7	2	6			10	5				8	5	2				
C	1	7	6	4		1	11	5	1		1	4	9	4				
D		5	10	18	1	2	7	14	6	5		8	13	11	2			
E		1		3	3		2		3	2		2	1	1	3			
		2004/1						2004/2						2004/3				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E			
	A	3	1			2	1	1			2	1	1					
	B	2	16	2	1	2	11	8			2	11	8					
	C	1	8	6	2	1	7	6	5			7	6	5				
	D		5	17	5	4	4	13	12	2		4	13	12	2			
	E				2	2				1	3				3			
							2004/2						2004/3					
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E			
	A	4	2			4	2				4	2						
	B		21	9			21	9				21	9					
	C			19	6			19	6				19	6				
	D				10				10					10				
	E					2	5			2	5				5			

Tabelle 19: Darstellung der Kategorien in % bezogen auf 78 Herden, die in den jeweiligen Durchgängen wieder in dieselbe eingeordnet wurden (grau unterlegte Felder aus Tabelle 17). Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die prozentualen Anteile der Herden, die wieder in dieselbe +/- eine Kategorie wie im Vorjahr eingeordnet wurden.

	2004/1	2004/2	2004/3
2003	47,4 (83,3)	30,8 (83,3)	43,6 (82,1)
2004/1		41,0 (89,7)	43,6 (93,6)
2004/2			75,6 (100)

Neben der Konstanz der Kategorisierung interessierte die Schwankung der Herden, die sich nicht wieder in der gleichen Kategorie fanden. Eine Verschlechterung um eine Kategorie bedeutet, dass eine Herde im nächsten Durchgang in eine höhere Kategorie eingeteilt wurde, beispielsweise von Kategorie C nach B. Eine Verbesserung einer Kategorie bedeutet, dass eine Herde im nächsten Durchgang in eine niedrigere Kategorie eingeteilt wurde, beispielsweise von Kategorie A in Kategorie B.

Auffällig war, dass es Verschlechterungen um drei Kategorien gab, Verbesserungen aber höchstens um zwei Kategorien (Tabelle 18).

Der prozentuale Anteil der Verschlechterungen nahm ab, je enger die Entnahmezeitpunkte zusammen lagen. Bei der Gegenüberstellung des Entnahmezeitpunktes 2003 mit denen von 2004/1, 2004/2 und 2004/3 verschlechterten sich in einem Zeitraum von zwei Jahren Herden maximal um drei Kategorien. Bei den Durchgängen 2003 und 2004/2 konnte die höchste Fluktuation von Herden in andere Kategorien beobachtet werden. Bei den Gegenüberstellungen in den Durchgängen 2004/1, 2004/2 und 2004/3 gab es keine Verschlechterungen um drei Kategorien. Bei den Verbesserungen ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den Verschlechterungen. Je weiter die Entnahmezeitpunkte auseinander lagen, desto größer wurden die Schwankungen. Auch hier ist der prozentuale Anteil der Verbesserung um zwei Kategorien deutlich geringer als bei einer Verbesserung um eine Kategorie.

Bisher wurden noch keine Aussagen über die steigende Positivität von Herden getroffen, wie sie bei den Einzeltieren schon angesprochen wurde. Wie bei den Einzeltieren wurde hier eine Auswertung mit einer Kurvenschar durchgeführt (Abbildung 14). Analog zu Punkt 4.4.2 wurde die Kategorie einer Herde im ersten Durchgang mit einer Null bewertet und die Abweichungen um eine Kategorie mit 1 bzw. -1, um zwei Kategorien mit 2 bzw. -2 und um drei Kategorien mit 3 bzw. -3 bedacht.

Insgesamt traten keine extremen Verschiebungen auf. Lediglich eine leichte Rechtsverschiebung kann von Durchgang 2004/1 auf 2004/2 festgestellt werden, die aber im Gesamtbild 2004/2 auf 2004/3 durch eine Linksverschiebung wieder aufgehoben wird.

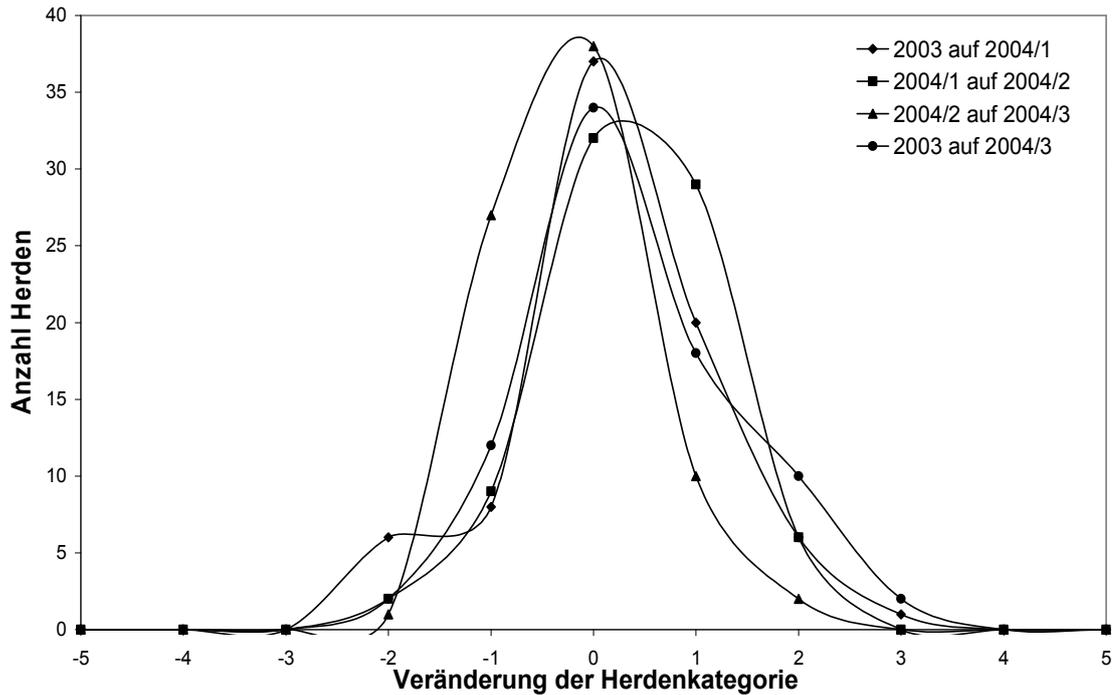


Abbildung 14: Darstellung der Schwankungen der Herdenkategorien sowohl von Durchgang zu Durchgang als auch übergreifend vom ersten zum letzten Durchgang.

Alle Herden, die mindestens einmal als A-Herde kategorisiert wurden, sind in Tabelle 20 aufgeführt. Zusätzlich ist die Verschiebung betreffender Herden in andere Kategorien in den folgenden Durchgängen angegeben, die serologisch und kulturell untersuchte Tierzahl, die maximale Tierzahl pro Herde und sowohl kulturell untersuchte positive als auch negative Tiere.

Diese Auswertung beschränkt sich nicht mehr allein auf Tiere, die in allen vier Durchgängen untersucht wurden, sondern auf alle Tiere einer A-Herde, die vier Mal untersucht wurde. Manchen Herden wurden zwar viermal serologisch überprüft, jedoch variierte die Tierzahl von Durchgang zu Durchgang. So konnte es geschehen, dass in einer Herde weniger als zehn Tiere viermal getestet wurden. Würden nur die Tiere, die viermal untersucht wurden, in die Auswertung eingehen, wären manche Herden nicht repräsentativ dargestellt.

Zwei Herden (Herde 1 und 2) wurden durchgängig als Kategorie A bewertet, in Herde 2 konnten als einziger A-Herde der Longitudinalstudie kulturell positive Tiere nachgewiesen werden. Herde 3 wurde deshalb beim letzten Durchgang in Kategorie B eingeordnet, weil das +++-Tier, das in den vorangegangenen Durchgängen für die Kategorisierung in A verantwortlich war, im letzten

nicht mehr untersucht wurde. Bei Herde 4 wurde im ersten Durchgang ein einziges +++-Tier nachgewiesen, das im zweiten Durchgang nur noch im Svanovir- und Idexx-ELISA (++) positiv bewertet wurde. Im dritten Durchgang wurde es nicht in die Untersuchung einbezogen. Im vierten Durchgang erzielte es wieder eine +++-Bewertung. Die Herden 5 und 6 stehen stellvertretend für jene Herden, die aufgrund zu wenig beprobter Tiere zunächst in eine niedrigere Kategorie eingestuft wurden. Durch die Untersuchung weiterer Tiere konnten in diesen Herden auch +++-Tiere ermittelt werden. In Herde 7 wurden im ersten Durchgang zum Großteil andere Tiere zur Untersuchung herangezogen als in den folgenden Durchgängen. Ein einzelnes +++-Tier, das 2004/1 für Kategorie A verantwortlich war, wurde in den folgenden Durchgängen serologisch negativ bewertet.

Tabelle 20: In dieser Tabelle sind die Profile der sieben Herden, die im Laufe der Durchgänge mindestens einmal als Kategorie A-Herde bewertet wurden, angegeben. Neben der Veränderung der Kategorisierung wurden der prozentuale Anteil der untersuchten Tiere, der prozentuale Anteil der Einzeltierbewertungen und die Ergebnisse aus der kulturellen Untersuchung berücksichtigt.

Herde	Durchgang	Anzahl Tiere Pro Herde	Herdenkategorie	% Anteil untersuchter Tiere	% +++	% ++ / +	% (+)	KK +	KK -	Abgangsursachen der +++ - Tiere
1	2003	57	A	42,1	3,5	8,8	15,8			Fruchtbarkeit
	2004/1		A	78,9	5,3	3,5	24,6	---	5	
	2004/2		A	78,9	5,3	19,3	10,5	---	7	
	2004/3		A	75,4	1,8	8,8	14,0	---	15	
2	2003	66	A	66,7	10,6	12,1	12,1			Paratuberkulose
	2004/1		A	86,4	7,6	13,6	15,2	4	12	
	2004/2		A	83,3	12,1	10,6	4,5	6	18	
	2004/3		A	75,8	13,6	15,2	7,6	4	14	
3	2003	37	A	27,0	2,7	0	0			keine Angaben
	2004/1		A	78,4	2,7	2,7	18,9	---	---	
	2004/2		A	64,9	2,7	5,4	10,8	---	2	
	2004/3		B	56,8	0,0	5,4	10,8	---	3	
4	2003	34	A	91,2	2,9	0,0	8,8			Keine Tiere abgegangen (Wechsel von +++ zu neg)
	2004/1		B	94,1	0,0	5,9	11,8	---	4	
	2004/2		C	88,2	0,0	2,9	5,9	---	8	
	2004/3		A	85,3	2,9	5,9	8,8	---	4	
5	2003	72	D	34,7	0,0	0	9,7			Keine Tiere abgegangen (Wechsel von +++ zu (+))
	2004/1		C	90,3	0,0	1,4	9,7	---	5	
	2004/2		A	86,1	1,4	4,2	5,6	---	10	
	2004/3		B	79,2	0,0	6,9	4,2	---	13	

Ergebnisse

Herde	Durchgang	Anzahl Tiere pro Herde	Herdenkategorie	% Anteil untersuchter Tiere	% +++	% ++ / +	% (+)	KK +	KK -	Abgangsursachen der +++ - Tiere
6	2003	36	D	58,3	0	0	8,3			Keine Tiere abgegangen (Wechsel von +++ zu ++)
	2004/1		B	72,2	0	2,8	11,1	---	3	
	2004/2		A	69,4	2,8	2,8	2,8	---	4	
	2004/3		B	50,0	0	2,8	8,3	---	2	
7	2003	90	C	62,2	0	2,2	10,0			keine Angaben
	2004/1		A	55,6	1,1	1,1	7,8	---	8	
	2004/2		B	61,1	0,0	3,3	6,7	---	14	
	2004/3		C	55,6	0,0	1,1	5,6	---	13	

)¹ prozentualer Anteil an +++-Reaktionen gemessen zur maximalen Tierzahl pro Herde

)² prozentualer Anteil an +/++-Reaktionen gemessen zur maximalen Tierzahl pro Herde

)³ prozentualer Anteil an (+)-Reaktionen gemessen zur maximalen Tierzahl pro Herde

)⁴ kulturell positive Tiere

)⁵ kulturell negative Tiere

5 Diskussion

5.1 DIE THEORIE HINTER DER SEQUENTIELLEN MAP SEROLOGIE (SMAPS)

Die Interpretation der verschiedenen ELISAs, die in der Paratuberkulosedagnostik zum Einsatz kommen, ist schwierig und oft verwirrend (siehe auch Literaturteil, Punkt 2.8). SMAPS ist ein Versuch, diesem diagnostischen Dilemma durch eine Ordnung der widersprüchlichen Resultate entgegen zu wirken und die Ergebnisinterpretation zu vereinfachen. BÖTTCHER und GANGL (2004) entwarfen aufgrund theoretischer Überlegungen das Konzept. Basierend auf bekannten Sensitivitäten und Spezifitäten gewichteten sie die serologischen Ergebnisse der Einzeltests (siehe Tabelle 3). Grundlage für ihre Überlegungen war, dass eine Absicherung positiver Resultate über Nachuntersuchungen in weiteren Tests, auch wenn sie nicht unabhängig voneinander sein können, in der Routinediagnostik üblich ist (z.B. Bovines Herpesvirus, Aujeszkyvirus). Die kulturelle Erregeranzucht aus dem Kot serologisch verdächtiger Tiere gibt weitere diagnostische Sicherheit.

SMAPS ordnet lediglich Befunde, daher können die Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Tests nicht verbessert werden. Jedoch wird durch SMAPS die Spezifität gegenüber den Einzeltests erhöht, da die Ergebnisse konjunktiv interpretiert werden.

Im Svanova-Test wurden durchgehend sehr hohe Einzeltier- und Herdenprävalenzen ermittelt (Tabelle 5, Abbildung 2, Abbildung 3). Daher wurden durch SMAPS im Screeningtest (ELISA der Firma Svanova) ausschließlich positive Tiere als positiv betrachtet und die fraglichen Resultate den negativen zugerechnet. Der ELISA der Firma Idexx erhielt in der SMAPS-Bewertung eine Mittelstellung. Bei einer Zusammenfassung der Idexx-positiven und - grenzbereichswertigen Proben wurden weniger Herden in unteren Herdenprävalenzklassen und erheblich mehr Herden in den höheren Herdenprävalenzklassen ermittelt, als es der Fall gewesen wäre, würden allein positive Tiere in die Berechnung der Herdenprävalenzklassen eingehen (Abbildung 3). Das bedeutet, dass im Idexx-ELISA viele Seren grenzbereichswertig ausfallen und dadurch gesondert betrachtet werden müssen. SWEENEY et al. (2005) veröffentlichten, dass sich unter Idexx-fraglichen Bewertungen Ausscheider befanden. Dies ist ein zweiter Punkt, warum den Idexx-fraglichen Resultaten eine

Sonderstellung innerhalb SMAPS zugebilligt wurde. Die fraglichen Ergebnisse im Pourquier-ELISA wurden den positiven zugerechnet, weil aufgrund der hohen Spezifität dieses ELISAs nur wenig positive Tiere gefunden werden.

Wie sowohl in Abbildung 5 als auch in den Tabellen 6 und 7 gezeigt werden konnte, reicht ein spezifischer Test allein als Bestätigungstest nicht aus, da ein vergleichsweise hoher Anteil an Seren nur in einem der beiden Tests zusätzlich zum Svanova-ELISA fraglich oder positiv reagierte.

Sowohl Einzeltiere als auch Herden werden in fünf Risikostufen eingeteilt. Dadurch ergibt sich ein Profil für jedes Tier und jede Herde, in dem die serologischen Ergebnisse über einen längeren Zeitraum hinweg verfolgt werden können.

5.2 VALIDIERUNG VON SMAPS ANHAND DER VORLIEGENDEN DATEN

In der vorliegenden Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, SMAPS anhand der Untersuchungsergebnisse aus bayerischen Rinderbeständen zu validieren. Hierfür wurden zwei Ansätze verfolgt: Zum einen wurden alle drei Tests parallel für jedes Serum angesetzt (Paralleltestung). Dies diente zur Prüfung der Effizienz des Screeningtests. Zum anderen wurden die serologischen Ergebnisse mit denjenigen der Erregeranzucht verglichen; die kulturelle Anzucht des Erregers wurde als Referenz gewählt.

Die Studie war im Wesentlichen von der Kooperation freiwillig beteiligter Landwirte abhängig, die sich für eine mehrmalige Bestandsuntersuchung auf Paratuberkulose interessierten. Dadurch wurden wahrscheinlich besonders viele Landwirte angesprochen, die ein Paratuberkulose-Problem in ihrem Bestand vermuteten. Die ausgewerteten Daten stellten daher keine repräsentative Stichprobe dar. Die Prävalenz der Paratuberkulose in Bayern wurde somit möglicherweise überschätzt.

KÖHLER und BURKERT (2003) validierten bereits in einer Arbeit die hier angewandten Tests. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf eine weitere Prüfung der angewandten Tests verzichtet. Aus finanziellen Gründen konnten nicht alle Tiere kulturell untersucht werden. Daher wurden kulturelle Nachweise auf serologisch positive Tiere der Kategorien A-C (+, ++, +++) und (+) aus D-Herden beschränkt (Tabelle 4). Dieser Auswahl liegt die Annahme zugrunde, dass serologisch auffällige Tiere mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Er-

reger ausscheiden als serologisch unauffällige Tiere. Durch diese Vorselektion wurden die Tiere, die mit hoher Wahrscheinlichkeit negativ ausfielen, ausgegrenzt. Zur Sensitivitätsprüfung diente die kulturelle Untersuchung aller Tiere der serologisch negativen Herden (E-Herden).

Wie bereits erwähnt, ist der Einsatz der Kotkultur als Referenz nicht unumstritten. Die komplexe immunologische Situation und die intermittierende Ausscheidung erschweren einen MAP-Nachweis in infizierten Tieren (COUSSENS et al., 2004). Dieser Umstand wurde durch eine wiederholte kulturelle Untersuchung ausgeglichen. Die Abstände zwischen den einzelnen kulturellen Nachweisen waren im Vergleich zu WHITLOCK et al. (2000) enger gefasst.

5.3 KULTURELLE AUSWERTUNG

Es wurden 1747 Kotproben von 973 Tieren kulturell untersucht. In 26 Proben von 23 Tieren (2,36 %) konnte MAP nachgewiesen werden (Tabelle 10). Die kulturell positiven Tiere entfielen auf 4 von 111 getesteten Herden (3,6 %). Gemessen an einer bayerischen Studie von WEBER et al. (2000) und im internationalen Vergleich ist diese beobachtete Prävalenz bis auf eine Ausnahme als sehr gering anzusehen (Tabelle 21, Ausnahme: Norwegen).

Tabelle 21: Vergleich von Auswertungen der Anzucht von MAP im internationalen Vergleich

Region	Autor	n) ¹ Herden	n) ¹ Tiere	Mate- rial	Test	ETP) ³	HP) ³
Bayern	WEBER et al. (2000)	52	1116	Kot	HEYM) ⁴	11,2 %	10 - 15 %
Niederlande	MUSKENS et al. (2003)	161	422	Kot	LJM) ⁵	17,3 %	n.a.) ⁶
Norwegen	FREDERIKSEN et al. (2004)	47	198	Kot	Dubos Medium	0 %	0 %
USA	OBASANJO et al. (1997)	33	n.a.	Kot	HEYM	n.a.	5,2 %
USA	WHITLOCK et al. (2000)	n.a.	954	Kot	HEYM	n.a.**	n.a.

)¹ Anzahl

)³ Herdenprävalenz

)⁵ Löwenstein-Jensen Medium

** Eigene Berechnungen, Erklärung dazu im Text.

)² Einzeltierprävalenz

)⁴ Herrold's Egg Yolk Medium

)⁶ nicht angegeben

In einem innerbayerischen Vergleich zwischen der vorliegenden Arbeit und der genannten Studie von WEBER et al. (2000) kristallisierten sich konträre Ergebnisse heraus. WEBER et al. (2000) untersuchten nur Kotproben von Tieren, die aufgrund eines begründeten Verdachts zur Untersuchung auf Paratuberkulose eingesandt wurden und ermittelten Prävalenzen von 10 % - 15 %. Sie wiesen 11,2 % (n = 125/1116) Ausscheider in 28,8 % der Bestände (n = 15/52) nach und vertraten aufgrund dieser Ergebnisse die Meinung, dass in Deutschland zwischen 10 % und 15 % der Tiere mit MAP infiziert seien. Die Vorselektion führte zu einer Überschätzung der Situation.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Vorselektion der Tiere getroffen. Die 2,36 % beziehen sich auf nur 973 Tiere, die serologisch auffällig waren und nach Tabelle 3 ausgewählt wurden. Es ist nicht zu erwarten, dass bei der Masse der serologisch unauffälligen Tiere viele kulturell positive Tiere ermitteln worden wären. Bei einer hypothetischen Hochrechnung von 23 kulturell positiven Tiere auf 4306 insgesamt untersuchten Tiere ergäbe sich ein Anteil von 0,5 %, der dem Anteil der +++-Tiere in der Größenordnung entspricht.

MUSKENS et al. (2003) führten eine Studie zur kulturellen Anzucht von MAP als Bestätigungstest für den Idexx-ELISA durch. Sie ermittelten Einzeltierprävalenzen von 17,3 % unter den seropositiven Tieren. Allerdings ist diese Studie nicht direkt mit der vorliegenden zu vergleichen, da zur Anzucht Löwenstein-Jensen Medium und zur Dekontamination der Proben 4 % NaOH und eine Mischung verschiedener Antibiotika verwendet wurde. Außerdem untersuchten MUSKENS et al. (2003) ausschließlich Kotproben von seropositiven Tieren.

Aus Norwegen wurde von FREDERIKSEN et al. (2004) eine Studie veröffentlicht, in der auch bei seropositiven Tieren keinerlei kulturell positive Nachweise des Erregers gelangen, obwohl von einigen Tieren Darmbeinlymphknoten in der Histologie untersucht wurden. Kleine, granulomatöse Läsionen in Lymphknoten oder im Dünndarm zeigten immerhin sieben Tiere. Der kulturelle Erregernachweis aus Kot und auch Organproben (62 Tiere) erfolgte auf Dubos Medium und ist wiederum nicht direkt mit der hier angewandten Methode vergleichbar.

OBASANJO et al. (1997) wandten eine weitere Methode hinsichtlich der Aufbereitung der Kotproben an. Sie inkubierten die Proben in HPC und Brain-

Heart-Infusion (BHI) für 24 Stunden, zentrifugierten und nahmen das Pellet wiederum in BHI auf. Zusätzlich wurden verschiedene Antibiotika zugesetzt (Nalidixinsäure, Vancomycin, Amphoterin B). Nach weiteren 24 Stunden wurde das Gemisch auf HEYM inokuliert. Sie fanden 17,3 % positive Tiere. Zu erwähnen ist, dass die Tiere serologisch und über eine Fragebogenaktion vorselektiert worden waren.

WHITLOCK et al. (2000) zogen in ihrer Studie aufgrund einer Arbeit von SWEENEY et al. (1992) ähnliche Rückschlüsse, dass offenbar immer wieder transient infizierte Tiere in einer Herde existieren. Aus diesem Grund stellten sie in ihrer Studie die Spezifität von 100 % der Kultur aus dem Kot in Frage. Eine Berechnung der Prävalenzen bezüglich kulturell positiver Tiere fand in ihrer Studie nicht statt. Die ermittelten 210 positiven Tiere stammten aus zehn Herden mit insgesamt 954 Tieren, von denen in einem Zeitraum von vier Jahren insgesamt 3379 Kotproben kulturell angesetzt wurden. Manche Tiere fielen mehrmals kulturell positiv aus. Aus den Daten von WHITLOCK et al. (2000) konnte nachträglich eine Prävalenz von 6,21 % bei den Einzeltieren errechnet werden.

Wird beim Vergleich der kulturellen Anzucht und den sich daraus ergebenden Prävalenzen außer Acht gelassen, dass die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Methodik nicht unbedingt miteinander vergleichbar sind und von COLLINS et al. (1996) der Gedanke aufgenommen, dass die einmalige kulturelle Anzucht eine Sensitivität von 50 % besitzt, sind die Prävalenzen in Bayern als vergleichsweise gering einzustufen. In den beiden Herden der vorliegenden Studie, in denen mehrere Ausscheider ermittelt wurden, konnte auch eine deutlich erhöhte Intraherdenprävalenz nachgewiesen werden.

Natürlich stellte sich die Frage, ob bei derart wenig kulturell positiven Tieren die kulturelle Anzucht auf HEYM korrekt durchgeführt wurde. Als Referenz für eine Überprüfung dienten Kotproben von zehn serologisch hoch positiven Tieren eines außerbayerischen Bestandes, in dem bereits klinische Fälle von Paratuberkulose aufgetreten waren. Von allen zehn Tieren konnte innerhalb von sechs bis acht Wochen (üblicherweise bis 16 Wochen) kulturelles Wachstum von MAP beobachtet werden. Ein schnelleres Wachstum von bestimmten MAP-Isolaten wurde auch von KÖHLER et al. (2006) beobachtet. Die hier angewandte Methode zur Erregerisolierung war also nicht der Grund für die ge-

ringe Anzahl kulturell positiver Proben. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass ein nicht unerheblicher Teil der Tiere drei Mal kulturell untersucht wurde. Die Validierung von SMAPS mit fünf Stati sowohl in der Einzeltierbewertung als auch in der Herdenkategorisierung anhand des vorliegenden Datenmaterials war aufgrund der geringen Zahl von Ausscheidern eingeschränkt.

5.4 SEROLOGISCHE AUSWERTUNG

4306 Tiere aus 134 Herden wurden mit drei verschiedenen serologischen Tests untersucht. Der Anteil positiver Ergebnisse pro Test fiel sehr unterschiedlich aus. Aus Tabelle 5 geht hervor, dass der Svanova-ELISA 22,2 %, der Idexx-ELISA 2,1 % und der Pourquier-ELISA 1,1 % der Tiere positiv bewertete. Auf Herdenebene wurde im Svanova-ELISA eine Prävalenz von 95,5 %, im Idexx-ELISA 31,6 % und im Pourquier-ELISA von 23,1 % festgestellt (siehe Punkt 4.2). Da drei serologische Tests verwendet wurden, lassen sich die bayerischen Daten mit Daten anderer Regionen vergleichen. Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über verschiedene Einzeltier- und Herdenprävalenzen in Deutschland, Europa und den USA.

In Mecklenburg-Vorpommern untersuchten HACKER et al. (2004) 2997 Tiere aus 59 Herden mit dem Svanova-ELISA. Sie ermittelten eine Einzeltierprävalenz von 12,2 % und eine Herdenprävalenz von 84,7 %. Sie liegen damit unter den Prävalenzen für den Svanova-ELISA, wie sie in Bayern errechnet wurden. Mit den Ergebnissen ihrer Untersuchungen stimmten sie weitgehend mit den Ergebnissen einer Studie aus Thüringen überein, die sie in ihrer Arbeit zum Vergleich heranzogen. In HACKERs et al. (2004) Studie wurden sowohl blutserologische als auch milchserologische Ergebnisse zusammengefasst und die Prävalenzen daraus errechnet. KÖHLER et al. (2005) und BÖTTCHER et al. (2006) wiesen aber unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten für Milch- und Blutserum-ELISAs nach, so dass die Prävalenzen aus HACKERs et al. (2004) Studie das Bild verzerren und die Prävalenzen nach oben korrigiert werden müssten. Sowohl KÖHLER et al. (2005) als auch BÖTTCHER et al. (2006) testeten mit dem Svanova- und dem Pourquier-ELISA bzw. ausschließlich dem Svanova-ELISA sowohl Blut als auch Milch mehrerer Tiere auf MAP-Antikörper.

BOELAERT et al. (2000) testeten in Belgien 549 Herden mit dem Idexx-ELISA. Sie stellten eine durchschnittliche Herdenprävalenz von 18 % fest. Vordergründig betrachtet lag diese Prävalenz weitaus niedriger als die der bayerischen Herden dieser Studie. Im weiteren Verlauf der belgischen Studie stellte sich jedoch heraus, dass die Herdenprävalenzen bei Milchviehherden mit 32 %, bei gemischten Milch- und Mastvieh Herden mit 30 % durchaus mit der Prävalenz von 31,6 % dieser Arbeit vergleichbar sind. Lediglich für Mastbestände wurden geringere Prävalenzen ermittelt.

Dass Prävalenzen regional unterschiedlich ausfallen können, stellten auch LILLINI et al. (2005) in einer italienischen Studie dar. Sie untersuchten in vier Regionen Rinder mit dem Idexx-ELISA. Die Einzeltierprävalenzen schwankten zwischen 1,8 % und 3,3 %, die Herdenprävalenzen lagen zwischen 37 % und 52 %.

Das Problem der regionalen Unterschiede teilen auch die USA. In zwei Arbeiten von PENCE et al. (2003) und van SCHAİK et al. (2003) wurden in zwei unterschiedlichen Gebieten mit dem Idexx-ELISA Herdenprävalenzen von 4,7 % und 32,9 - 54,3 % ermittelt.

Von van SCHAİK et al. (2005) stammt auch eine Studie aus Holland, in der der ELISA der Firma Pourquier zum Einsatz kam. Die Arbeit wurde durchgeführt, um die Validität des Pourquier-ELISAs zur Detektion von ausscheidenden Tieren zu prüfen. Sie testeten 1027 Tiere aus 16 infizierten Herden und 1057 Tiere aus 22 nicht infizierten Herden. Sie fanden heraus, dass der S/P-Wert des ELISAs und die Prävalenz von positiven Ergebnissen der kulturellen Kotuntersuchung assoziiert waren.

Wenn auch unterschiedliche Einzeltier- und Herdenprävalenzen aus verschiedenen Ländern vorliegen und oft aufgrund der Umstände wie etwa Bestandsgröße, Haltungsform und Rasse kein direkter Vergleich gezogen werden konnte, so fielen Herdenprävalenzen für Herden, die mit dem Svanova-ELISA getestet wurden, immer höher aus als Herdenprävalenzen derselben Herden, wenn sie mittels Idexx- und auch Pourquier-ELISAs untersucht wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aufgrund serologischer Ergebnisse keine deutlichen Unterschiede zwischen den Ländern/Regionen erkennbar waren. Norwegen gilt allerdings als paratuberkulosefrei, obwohl ca. 5 % Tiere serologisch auffällig reagierten, wohingegen in Belgien, den Nieder-

landen und der norddeutschen Tiefebene der Paratuberkulose ein hoher Stellenwert beigemessen wird.

5.5 SMAPS UND PARALLELTESTUNG

Dem Screeningtest kommt eine große Bedeutung innerhalb von SMAPS zu, da er im Idealfall alle Seren, die in den anderen Tests positiv bewertet wurden, vorselektieren sollte. Daher wurde der sensitivste ELISA als Screeningtest eingesetzt. Auch SWEENEY et al. (1995, 2006) halten den Einsatz eines sensitiven Tests für die sinnvollste Methode für eine Herdenuntersuchung. In der Studie von 1995 testeten sie verschiedene Gruppen von Tieren mit dem Idexx-ELISA. Die Einteilung der Tiere in Gruppen erfolgte nach klinischem Status, der vor Beginn der Studie erhoben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität des Tests maßgeblich vom klinischen Status des Tieres abhängig war. So wurde bei Gruppen mit klinisch erkrankten Tieren eine erheblich höhere Testsensitivität (Sensitivität: $87 \% \pm 8,4 \%$) festgestellt als bei Tieren, die klinisch unauffällig waren (Sensitivität: $15 \% \pm 6,6 \%$).

Tatsächlich konnten nicht alle Proben, die im Idexx- bzw. Pourquier-ELISA reagierten, durch den Screeningtest positiv bewertet werden. Von hohem Interesse war, welche Proben im Screeningtest negativ ausfielen, in einem der beiden Bestätigungstests aber positiv reagierten. Diese Diskrepanz wurde durch den Vergleich von Paralleltestung mit SMAPS ersichtlich und wird im Folgenden als Informationsverlust bezeichnet. In Abbildung 4 und den folgenden Tabellen 6 und 7 wird deutlich, dass nur ein sehr geringer und nicht signifikanter Informationsverlust zwischen SMAPS und der Paralleltestung bestand.

Definitionsgemäß fallen (+) - Bewertungen bei beiden identisch aus. Der höchste Informationsverlust wurde bei der Einzeltierbewertung "+" festgestellt. 51,8 % (29/56) nicht durch den Screeningtest gefundene Seren wurden im Idexx-ELISA grenzwertig bewertet (Tabelle 7). Dies wird bei der Betrachtung der Probenbewertung über die Reaktionsschwankungen verständlich. Der Cut-Off des Idexx-ELISAs lag sehr nahe am Maximum der Verteilung im negativen Bereich (Abbildung 2). Kleine, vom Antikörperspiegel des Tieres abhängige Schwankungen einer Extinktion können daher ein negatives Serum in

den fraglichen Bereich anheben und umgekehrt (SWEENEY et al., 2006). Wichtiger erschienen die ++-Bewertungen, die vom Screeningtest negativ bewertet wurden. Sie bildeten mit 42,9 % den zweithöchsten Anteil an Informationsverlust. Augenfällig war aber der hohe Anteil an Seren, die im Pourquier-ELISA positiv reagierten, aber im Screeningtest nicht erkannt wurden. Im Gegensatz zu den schwankenden Resultaten im Idexx-ELISA lassen sich diese Proben nicht aufgrund der Verteilung der Proben und der relativen Lage des Cut-Offs erklären (Abbildung 2).

Besonders wichtig waren +++-Bewertungen, da diese das Kriterium für die Herdenbewertung "Kategorie A" darstellten. In Kategorie-A-Herden wurde das Risiko von Paratuberkulose im Bestand aufgrund der serologischen und kulturellen Bewertungen (s.u.) als sehr hoch eingeschätzt. Hier hielt sich der Informationsverlust mit 5,4 % (3/56) sehr gering.

Der Informationsverlust innerhalb der +++-Bewertungen war im Gegensatz zu den +- bzw. ++-Tieren nicht signifikant ($p > 0,05$). Bedauerlicherweise wurde eines der +++-Tiere (Paralleltestung) als Ausscheider identifiziert.

5.6 KORRELATION ZWISCHEN SMAPS UND KULTURELLEM ERREGERNACHWEIS

SMAPS wurde aus rein theoretischen Überlegungen konzipiert. BÖTTCHER und GANGL (2004) erwarteten, dass die positiven prädiktiven Werte mit abnehmender serologischer Bewertung ebenfalls sinken würden.

Die Tiere, die kulturell untersucht wurden, wurden fast immer mehrfach auch serologisch untersucht. Daher wurde für fast alle Auswertungen (Ausnahmen: Tabelle 12, Abbildung 7) bei mehreren für ein Serum vorliegenden Resultaten immer nur das jeweils erste serologische Ergebnis verwendet. Die Konsequenz daraus ist, dass ein Teil der vielen serologisch negativen Seren im Laufe der Studie noch positiv oder zumindest fraglich reagierte. Zu einem späteren Zeitpunkt konnten also durchaus höhere Einzeltierbewertung erzielt werden (Tabelle 12, Abbildung 7). Durch diese Vorgehensweise wird das serologische Testverfahren im Vergleich zu einer zeitgleichen Auswertung der Proben schlechter bewertet, andererseits spiegelt diese Vorgehen die realistische Anforderung an die Serologie, einen Ausscheider möglichst frühzeitig zu erkennen, besser wider.

Bei Betrachtung der Verteilung der Tiere mit positivem Erregernachweis über den ersten serologischen Reaktionen (Abbildung 6) wird deutlich, dass eine U-förmige Verteilung zustande kam. In der genannten Darstellung der Ergebnisse verteilten sich kulturell positive Ergebnisse entweder auf negative/geringe oder sehr hohe Einzeltierbewertungen (neg., (+), +, +++), nicht aber auf die Bewertung "++" (Abbildung 6). Dem gegenüber steht Abbildung 7, bei der das jeweils maximale serologische Ergebnis in die Auswertung mit einbezogen wurde. Dort konnte gezeigt werden, dass bei dieser Art der Darstellung die U-förmige Verteilung nicht mehr gegeben war.

In vier Herden wurden kulturell positive Tiere nachgewiesen. 21 von 23 kulturell positiven Tieren verteilten sich auf drei A-Herden, die übrigen kulturell positiven Tiere stammten aus einer C-Herde (Tabelle 11, Abbildung 9).

Außerdem wird durch Tabelle 11 deutlich, dass in Herden, die in dieser Studie als A-Herden eingestuft wurden, bei niedrigen Einzeltierbewertungen signifikant mehr kulturell positive Tiere vorhanden waren als in Nicht-A-Herden. Tabelle 12, bei der dieselben Tiere wie in Tabelle 11 bewertet wurden mit dem Unterschied, dass hier das maximale serologische Ergebnis in die Auswertung einging, unterstreicht diese Tatsache. In den Herden, in denen geringe serologische Einzeltierprävalenzen vorlagen, war die Wahrscheinlichkeit gering, kulturell positive Tiere zu finden. Bei Herden, die hohe serologische Einzeltierprävalenzen aufwiesen und zudem viele Ausscheider beherbergten, waren falsch positive Resultate in der Kultur gerade vor dem Hintergrund der möglichen transienten Infektion in hoch kontaminiertem Umfeld nicht auszuschließen (Tabellen 11, 12 und 13; WHITLOCK et. al., 2000). Als praktisches Beispiel kann eine an der Studie teilnehmende Jersey-Herde angeführt werden. In der kulturellen Auswertung zeigte dieser Bestand mit zehn kulturell positiven Tieren unter 33 viermal getesteten die höchste Quote an Ausscheidern (Tabelle 14). Bei näherer Betrachtung der kulturell positiven Tiere und der dazugehörigen serologischen Werte stellte sich heraus, dass sechs der Erreger ausscheidenden Tiere im Laufe der Untersuchung serologische Ergebnisse von "+++" erhalten hatten. Zwei Tiere wechselten trotz Erregerausscheidung immer wieder zwischen negativer und "+" - bzw. "++" -Bewertung. Möglicherweise handelt es sich um Tiere, deren zelluläre Immunität absank und durch die humorale Immunität Antikörper in gerade nachweisbaren Mengen gebildet

wurden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Tests Unregelmäßigkeiten aufwiesen, wie auch SWEENEY et al. (1995) am Beispiel des Idexx-ELISAs nachwiesen. Bei den restlichen beiden Tieren war ein stetig niedriges serologisches Ergebnis bei positivem kulturellem Ergebnis zu sehen. Bei diesen Tieren könnte es sich um transient infizierte Tiere gehandelt haben (WHITLOCK et al. 2000).

Nach Angabe des Besitzers wurden jährlich einige Tiere wegen klinischer Paratuberkulose aus dem Bestand entfernt. Es konnten vier Tiere gefunden werden, die zu Beginn nur schwach positiv reagierten, am Ende aber hochpositive Ergebnisse zeigten. Somit beträgt die Rate der Serokonversion in dieser Herde etwa 10 % (4/33).

Der höchste prädiktive Wert mit 33,3 % für kulturell positive Tiere entfiel auf +++-Tiere, was die diagnostische Sicherheit der +++-Bewertung bei SMAPS unterstreicht (Abbildung 8). Bei diesen Tieren ist das Risiko einer Paratuberkuloseinfektion sehr hoch. Für die übrigen Einzeltierbewertungen (++, +, (+), neg.) ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede. Eine Merzung aller serologisch positiven Tiere ist jedoch aufgrund der relativ niedrigen positiven prädiktiven Werte auch aus wirtschaftlicher Sicht nicht vertretbar. Die Wahrscheinlichkeit, bei serologisch niedrig bewerteten Tieren in A-Herden ausscheidende Tiere zu finden, war signifikant höher als in Nicht-A-Herden. Diese Beobachtung lässt mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu. Es könnte sich, wie oben schon beschrieben, um transient infizierte Tiere handeln. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich um infizierte Tiere handelt, die aufgrund ihres momentanen immunologischen Status' mit ihrem Antikörpertiter unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

5.7 KONSTANTE BEWERTUNGEN ALS VORTEIL VON SMAPS

Mangelnde Reproduzierbarkeit der Befunde wird immer wieder im Zusammenhang mit der Paratuberkulose angeführt. Erklärt werden derartige Feldbeobachtungen mit der komplizierten Biologie der Paratuberkulose (COUSSINS, 2004). In der Longitudinalstudie wurden 950 Tiere über einen Zeitraum von zwei Jahren sowohl serologisch als auch kulturell untersucht. Dadurch konnte verfolgt werden, wie konstant die Bewertungen von Einzeltieren und Herden

innerhalb dieses Zeitraums waren. COLLINS et al. (1993) berichteten in ihrer Studie von schwankenden Resultaten, die durch die Biologie des Erregers erklärt wurde, COLLINS et al. (1993) verwendeten nur den Idexx-ELISA. Auch SWEENEY et al. (2006) erklärten, dass in ihrer Longitudinalstudie vom Antikörperspiegel des Tieres abhängige Schwankungen der Seren bezüglich des ELISA-Ergebnisses festgestellt wurden.

In Tabelle 15 wurden die Verteilungen der Seren auf die Testergebnisse "positiv", "grenzbereichswertig" und "negativ" für jeden Test dargestellt und hinsichtlich signifikanter Unterschiede von Zeitpunkt zu Zeitpunkt und bezogen auf 4306 Seren betrachtet. Zwischen dem Untersuchungszeitpunkt 2004/1 und 2004/2 wurde für alle Tests ein signifikanter Unterschied beobachtet.

Der Idexx-ELISA fiel nochmals auf, weil im Gegensatz zu den anderen Tests bezogen auf 4306 Seren das Verhältnis von positiven zu grenzwertigen Seren umgedreht ist (Tabelle 15).

Für die signifikante Abweichung aller Tests 2004/1 auf 2004/2 gibt es keine plausible Erklärung. STRICKLAND et al. (2005) stellten ebenfalls saisonale Abweichungen im Lauf eines Jahres bezüglich ihrer Testergebnisse fest. Sie gingen in ihrer Studie auf den Zusammenhang zwischen klimatischen Bedingungen und dem Einfluss auf den Nachweis von Paratuberkulose ein. Ein signifikanter saisonaler Effekt ließ sich nicht bestätigen, jedoch wird durch diese Studie deutlich, dass schon öfter unerklärliche Schwankungen in Nachweisverfahren beobachtet und mit klimatischen Bedingungen in Verbindung gebracht wurden.

Innerhalb der Longitudinalstudie reagierten zwischen 74,3 und 80,6 % der Tiere von Durchgang zu Durchgang konstant (Abbildungen 11 und 12). Etwa 80 % der negativ bewerteten Tiere und 90 % der "+++"-Tiere wurden durchgehend gleich bewertet (Abbildung 13). Die Masse der inkonstant bewerteten Seren schwankte nur um einen geringen Betrag in beide Richtungen (Abbildungen 11 und 12) und betrifft hauptsächlich schwach positiv bewertete Seren mit Einzeltierbewertung "+" und "++". Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass serologische Untersuchungen mitunter starken Schwankungen unterlegen sind (COLLINS et al., 1993; SWEENEY et al., 2006), weil die Antikörpermenge im Blut eines Tieres unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Schwankungen der Extinktion eines Serums sind maßgeblich vom Cut-off ab-

hängig. Je enger der fragliche Bereich gefasst wird und je näher er am Maximum der Verteilung im negativen Bereich liegt, desto wahrscheinlicher ist es, dass ein Serum in der Bewertung schwankt (siehe auch 5.6, Abbildung 3). In jüngster Zeit tritt aber eine andere Auffassung in den Vordergrund. TIJSSEN (1985) und ROUSSEL et al. (2006) vertreten die Meinung, dass es sich gerade bei den Tieren mit schwankenden Messdaten um Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien handeln könnte.

5.8 EINKLANG ZWISCHEN GERINGER ERREGERPRÄVALENZ UND SEROKONVERSION

Neben der hohen Reproduzierbarkeit der negativen und +++-Ergebnisse konnte auch gezeigt werden, dass im Laufe der beiden Jahre kaum Serokonversionen auftraten. In Tabelle 16 wurden die Nettozunahmen der optischen Dichten von 2003 auf 2004/3, einem Zeitraum von gut einem Jahr dargestellt. Die Nettozunahmen wurden berechnet, indem die Differenz der gemessenen Extinktion jedes Serums pro Zeitpunkt ausgerechnet wurde. Die prozentualen Anteile eines jeden Tests wurden in allen vier Durchgängen einander gegenübergestellt.

Beim Svanova- und Pourquoi-ELISA konnten Nettozunahmen verzeichnet werden, im Idexx-ELISA gab es nur Nettoabnahmen (Tabelle 16). Da der Svanova-ELISA ohne Vorabsorption und Kontrollantigen bearbeitet wurde, waren auch größere Schwankungen innerhalb einer Bewertung durchaus plausibel, die auch bis hin zu falsch positiven Ergebnissen reichen können (TIJSSEN, 1985). Beim Pourquoi-ELISA, der weitaus spezifischer ist, ist den Nettozunahmen vor allem um 80 % deutlich mehr Aufmerksamkeit zu widmen ($n = 4$). Insgesamt zeigten zwar einzelne Seren Nettozunahmen um vergleichsweise niedrige Extinktionswerte, aber vor allem war in den hohen Extinktionsbereichen eine Nettoabnahme zu verzeichnen. Wäre in Bayern, wie WEBER et al. (2000) vermuteten, Paratuberkulose ein Problem, würden sich Nettozunahmen in allen ELISAs verzeichnen lassen. Das ist in dieser Studie nicht der Fall. Das Bild, das WEBER et al. (2000) zur Verbreitung der Paratuberkulose zeichneten, konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl serologisch als auch kulturell nicht bestätigt werden.

Bei Betrachtung der Verteilung der einzelnen Seren pro Durchgang auf die je-

weiligen Einzeltierbewertungen zeigte sich für 2004/1 auf 2004/2 ein leichter Anstieg, der aber 2004/3 wieder rückläufig war (siehe Abbildung 10). Dieser Effekt wurde auch schon in Tabelle 14 beobachtet (signifikante Abweichung 2004/2 in allen Tests). Möglicherweise hängen diese Effekte mit dem Klima zusammen, wie auch schon STRICKLAND et al. (2005) vermuteten.

Tabelle 17 verdeutlicht, um welche Punktwerte die Schwankungen der Ergebnisse erfolgten. Insgesamt nahmen die positiven Ergebnisse über das längste Untersuchungsintervall von 2003 auf 2004/3 im Svanova-ELISA ab; weiter oben wurde jedoch beschrieben, dass im Svanova-ELISA besonders viele Nettozunahmen von bis zu 60 % stattgefunden hätten. Dabei darf nicht vergessen werden, dass die Nettozunahmen nicht vom Wert "0" eines Serums, sondern von einer schon bestehenden Extinktion aus gemessen wurden. Das bedeutet, dass bei den meisten Resultaten der Cutoff von den Schwankungen unberührt blieb und ein kleiner Anstieg der Extinktion nicht ausreichte, um die Bewertung im Vergleich zum vorangegangenen Durchgang zu ändern. Die geringe Serkonversion auf die Einzeltierbewertung "+++", die bei einer fortgeschrittenen Paratuberkulosesituation, wie WEBER et al. (2000) sie vermuteten, viel höher hätte ausfallen müssen, steht im Einklang mit der geringen kulturellen Nachweisrate von MAP.

5.9 SMAPS IN DER HERDENBEWERTUNG

Analog zur Einzeltierbewertung wurde auch in der Herdenbewertung SMAPS mit der Paralleltestung verglichen. 86,6 % der Herden wurden bei SMAPS in die gleiche Kategorie wie bei der Paralleltestung eingeordnet (Tabelle 9). Alle A-Herden wurden in beiden Systemen als A-Herden erkannt. Ebenso gab es wenig Veränderung bei den D- und E-Herden. Den größten Schwankungen unterlagen die C- und B-Herden, was sich auf die Inkonzanz der Einzeltierbewertung im Bereich der Bewertung "+" und "++" zurückführen lässt. In etwa $\frac{2}{3}$ der Fälle sind positive Resultate im Idexx- und Pourquier-ELISA für die Abweichungen verantwortlich (Tabelle 8). Wird eine Verschiebung um eine Kategorie bei SMAPS toleriert, liegt die Abweichung der Kategorisierung zwischen SMAPS und Paralleltestung bei nur 5,2 %, was ein akzeptables Ergebnis darstellt, vor allem vor dem Hintergrund, dass die A-Herden alle durch SMAPS

erkannt wurden (Tabelle 8).

Hinsichtlich der kulturellen Auswertung konnten nur 3,6 % der 111 kulturell untersuchten Herden als positiv bewertet werden ($n = 4$; Abbildung 9). Die Masse der positiven Tiere entfiel auf zwei Herden. Die serologischen Bewertungen im Vergleich zu den kulturellen Ergebnissen ließen verschiedene Rückschlüsse zu, die schon in Punkt 5.7 zur Sprache kamen (transiente Infektion und geringe Sensitivität).

In der Longitudinalstudie wurde deutlich, dass, je kürzer der Abstand der serologischen Untersuchung ausfiel, die Ergebnisse in der Herdenbewertung von Durchgang zu Durchgang besser übereinstimmten (siehe Tabellen 18 und 19, Abbildung 13).

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass in Herden, in denen Tiere Erreger ausschieden, erheblich höhere Seroprävalenzen mit den einzelnen Tests ermittelt wurden als bei Herden ohne Erreger ausscheidende Tiere (Tabelle 20). Mit einer Ausnahme wurden relativ hohe Anteile des Gesamtbestandes untersucht. Eine Herde, in der Ausscheider ermittelt wurden (Herde 2), fiel durch einen deutlich höheren Anteil an +++- Tieren, aber auch im Vergleich zu den anderen Herden durch mehr +- und -Tiere auf. In der genannten Herde wurden auf 44 Kotkulturen 14 positive Ergebnisse erzielt, während in den übrigen A-Herden der Longitudinalstudie kein positiver Erregernachweis geführt werden konnte. Dieser Umstand unterstreicht, dass Kategorie-A-Tiere mit einem erhöhten Risiko behaftet sind. Dennoch sollten die serologischen Befunde zusätzlich durch aussagekräftige kulturelle Untersuchungen diagnostisch abgesichert werden.

5.10 ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN VON SMAPS

In der Herdendiagnostik stellt SMAPS eine verlässliche Methode dar, Herden zu kategorisieren und über einen längeren Zeitraum diagnostisch zu begleiten. Andere Systeme, die auf Anwendung von Einzeltests ausgelegt sind, orientieren sich an der Prävalenz serologischer Reagenten (ANONYMUS, 2002). In ihrer Studie wurden Bestände mit mehr als 15 % Reagenten im Idexx-ELISA als Hochrisikobetriebe klassifiziert. Bei einem Prozentsatz unter 5 % wird von einem geringen Risiko ausgegangen. Erst die Abwesenheit von Reagenten

eröffnet die Möglichkeit der Anerkennung als unverdächtiger Bestand. Aufgrund weit verbreiteter Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien ist ein derartiges Klassifizierungsschema allerdings nicht umsetzbar (ROUSSEL et al., 2006). Im Gegensatz hierzu besteht mit SMAPS die Möglichkeit, einzelne Hochrisikotiere in einer Herde zu identifizieren. Dadurch kann einer weiteren Erregerausbreitung relativ früh ein wirkungsvoller Riegel vorgeschoben werden.

Durch die Kategorisierung mittels SMAPS können Herden über einen längeren Zeitraum serologisch verfolgt werden. Die fünf Kategorien sind für einen Landwirt ein Anhaltspunkt für die Höhe des Risikos. Die erhobenen Daten können z.B. im Rahmen eines Sanierungs- oder Monitoringprogramms oder auch beim Handel wichtige Informationen liefern.

Durch den Einsatz des Svanova-ELISA als Screeningtest und zwei Bestätigungstests zur Erhärtung des Screeningergebnisses entsteht ein sehr genaues Bild über den serologischen Status einer Herde, verursacht aber einen hohen Kostenaufwand.

Eine mögliche Variante wäre, Herden zur Risikoabschätzung mit dem spezifischsten ELISA (Pourquier) zu untersuchen, da Pourquier-positive Resultate doch starken Schwankungen unterliegen, sollten sie durch den Idexx-ELISA abgesichert werden. Dadurch ergibt sich als Vorteil gegenüber dem Einsatz mit einem sensitiven Screeningtest und nachfolgenden spezifischen Bestätigungstests eine erhebliche Kostenreduktion. Der Nachteil liegt darin, dass mit dem Einsatz eines hochspezifischen Screeningtests der serologische Status der übrigen Tiere aus dieser Herde weitgehend unbeachtet bleibt.

Eine weitere, kostengünstige und dabei genügend differente Variation von SMAPS ist die Anwendung des Idexx-ELISAs als Screeningtest. Der Idexx-ELISA ist sensitiver als der Pourquier-ELISA. Innerhalb SMAPS erhält er drei Bewertungsstufen (negativ/grenzbereichswertig und positiv) anstatt zwei (siehe Pourquier-ELISA und Svanova-ELISA). Diese Variation ist bei vergleichsweise geringem Kostenaufwand immer noch effektiv genug zur langfristigen Herdenüberwachung.

Handlungsbedarf besteht bei A-Herden und +++-Tieren. Dieses Ergebnis wird ausschließlich durch ein positives Resultat im Pourquier-ELISAs erreicht. Die Auswertungen zeigen, dass +++-Tiere die höchsten positiven prädiktiven Wer-

te aufweisen (Abbildung 8). Alle +++-Tiere, die durch SMAPS über einen längeren Zeitraum als +-Tiere bewertet wurden und möglicherweise auch kulturell positiv ausfielen, sollten gemerzt werden. Was Erreger ausscheidende Tiere mit durchgehend niedrigen serologischen Bewertungen betrifft, ist abzuwägen, ob sie aus dem Bestand zu eliminieren sind. In A-Herden scheiden signifikant mehr Tiere als in Nicht-A-Herden Erreger aus (Tabelle 11). Auch WHITLOCK et al. (2000) beschrieben in ihrer Arbeit ein solches Phänomen und benannten es als transiente Infektion. Dabei nehmen Tiere große Mengen erregerhaltigen Materials auf. Ohne sich an Paratuberkulose zu infizieren, scheiden sie Erreger wieder mit dem Kot aus, die aufgrund ihrer hohen Tenazität die Darmpassage unbeschadet überleben. Neben der transienten Infektion könnten auch immunologische Gründe bei serologisch niedrig bewerteten, aber Erreger ausscheidenden Tieren eine Rolle spielen (COUSSENS et al., 2004).

Der Status der übrigen Tiere der Herde ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Es müssen vor allem potentielle +++-Tiere (+-Tiere) und der serologische Status dieser Tiere in diesen Herden abgeklärt werden. Es macht zudem einen Unterschied im Infektionsgeschehen, ob nur einzelne Tiere mit hohen serologischen Resultaten entdeckt oder ein Großteil der Herde als serologisch hochpositiv eingestuft wurde. Bei Herden mit einzelnen hochpositiven Reagenten gibt es noch keinen so hohen Infektionsdruck wie in Herden mit vielen serologisch hochpositiven Reagenten. Eine Sanierung ist hier möglicherweise leichter und schneller durchzuführen. Außerdem ist es wichtig, von möglichst serologisch niedrig bewerteten Tieren (am besten negative Tiere) Kolostrumbänke anzulegen.

Die Merzung der +++-Tieren senkt zwar konsequent den Infektionsdruck in einem Bestand, hat aber auch zur Folge, dass ein Kategorie-A-Bestand unter Umständen in eine bessere Kategorie aufsteigen würde. Als Lösung dieses Problems wäre beispielsweise ein zeitlich verzögerter Aufstieg in bessere Kategorien möglich.

Wird SMAPS beim Handel herangezogen, so ist der Herdenstatus der Verkaufsherde zu beachten. Es sollten nur Tiere zugekauft werden, die aus einer Herde stammen, die in eine bessere oder gleiche Kategorie eingeordnet wurde.

In der Einzeltierdiagnostik kann SMAPS dann eingesetzt werden, wenn ein Tier zur Zucht geeignet ist oder zum Verkauf stehen soll. Für beide Fälle ist es wichtig, den Status der Herde, aus der dieses Tier stammt hinsichtlich des Paratuberkuloserisikos zu kennen. Für die Zucht sollten nur wiederholt antikörperfreie Tiere aus geringprävalenten Herden verwendet werden. Allerdings gilt zu beachten, dass Handel meistens bei Tieren, die deutlich jünger als zwei Jahre sind, betrieben wird und auch die Entscheidung zur Zucht früher fällt. Aufgrund der Biologie der Erkrankung und der Unsicherheit der serologischen Diagnostik bei Tieren unter 24 Monaten ist die Einzeltierdiagnostik dort nur zusammen mit einer Herdendiagnostik zu empfehlen.

5.11 SMAPS BEI ZWEI A-HERDEN

Dass SMAPS ein sinnvolles Instrument zur Herdendiagnostik ist, kann an zwei Herden, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, gezeigt werden. In einem Bestand, der hauptsächlich Holstein-Frisian führte, wurde für die Studie ungefähr die Hälfte der Tiere vier Mal serologisch und kulturell untersucht. Der Bestand wurde ausschließlich in Kategorie E und Kategorie D eingeordnet. Im Jahre 2005, als die Studie schon abgeschlossen war, ließ der Landwirt interessehalber alle Tiere sowohl serologisch als auch teilweise kulturell untersuchen. Es wurden zwei Tiere mit der Einzeltierbewertung "+++" und ein Erreger ausscheidendes Tier detektiert. Nach Befragung des Landwirts stellte sich heraus, dass er im Laufe der Studie jene zwei +++-Tiere zugekauft hatte, die nicht in das Projekt mit einbezogen worden waren. Diese beiden Tiere waren nachweislich für die Einschleppung von Paratuberkulose in den Bestand verantwortlich. Diese Tatsache unterstreicht die Notwendigkeit, einzelne Hochrisikotiere frühzeitig zu erkennen, was im Gegensatz zu ANONYMUS' (2002) Behauptung steht, dass nur in Herden, die mehr als 15 % Prävalenz aufweisen, Handlungsbedarf besteht. Zwar würde die Eliminierung dieser Tiere den Bestand wieder in einen unverdächtigen Status "E" oder "D" verbringen, aber die zwischenzeitlich stattgefundene Erregerausscheidung setzte möglicherweise eine Infektion bei Kälbern, die sich unter Umständen erst in einigen Jahren offenbaren wird. Unter fachlichen Gesichtspunkten wäre eine sichere Beurteilung des Bestandes daher erst nach fünf Jahren möglich.

Diese Situation wird durch einen weiteren Betrieb verdeutlicht. Die Herde dieses Betriebes wurde serologisch in Kategorie C eingeordnet. Es konnten aber zwei Erreger ausscheidende Tiere diagnostiziert werden. Im Verlauf der Studie stieg die Herdenbewertung von "C" auf "B" an (Abbildung 9). Eines der MAP-ausscheidenden Tiere stieg von "+" auf "++" an. Das Reaktionsmuster dieses Bestandes markierte die Grenzen der MAP- Diagnostik, unterstreicht jedoch den Nutzen von SMAPS, da zumindest ein Anstieg der serologischen Reaktion zu erkennen war.

6 Zusammenfassung

Für die serologische Diagnostik der *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)-Infektion stehen mehrere kommerzielle ELISAs zur Verfügung, die sich hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität stark unterscheiden. Daher ist die Kenntnis dieser Qualitätsparameter grundlegend für die Ergebnisinterpretation. In der vorliegenden Arbeit "Untersuchungen zur Eignung einer sequentiellen kombinierten Sero-diagnostik für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Infektionen in bayerischen Milchviehherden" erfolgte die Prüfung einer sequentiellen Serologie.

In der Sequentiellen MAP-Serologie (SMAPS) werden Seren zuerst mit einem sensitiven ELISA (= Screeningtest; z.B. Svanova-ELISA) untersucht. Danach werden positive Seren mit zwei spezifischeren ELISAs (z.B. Idexx- und Pourquier-ELISA) nachuntersucht. Es wurden 4306 Tiere aus 134 Beständen serologisch parallel in allen drei Tests untersucht. Goldstandard war die kulturelle Anzucht des Erregers aus dem Kot.

Die Ergebnisinterpretation bei SMAPS erfolgt auf Basis der Übereinstimmung der Testergebnisse. Im Screeningtest negative Seren werden als negativ befundet und mit keinem weiteren Test nachuntersucht. Seren, die ausschließlich im Screeningtest positiv ausfallen, werden als "(+)" bewertet. Proben, die in nur einem der beiden Bestätigungstests reaktiv sind, werden mit "+" (Idexx-ELISA grenzbereichswertig) oder "++" (Idexx-ELISA positiv oder Pourquier-ELISA positiv/grenzbereichswertig) gewertet. Als "+++" werden diejenigen Tiere bezeichnet, deren Seren in den beiden spezifischeren ELISAs zusätzlich reaktiv ausfallen (Svanova-ELISA positiv, Idexx-ELISA positiv oder grenzbereichswertig und Pourquier-ELISA positiv oder grenzbereichswertig). Das höchste Einzeltierergebnis einer Herde bestimmt den Herdenstatus (negativ → E, (+) → D, + → C, ++ → B und +++ → A).

Die Analyse der 4306 Einzeltierseren aus 134 Herden resultierte in einen Anteil von 0,7 % an +++-, 1,4 % an ++-, 2,4 % an +- 18,0 % an (+)- und 77,5 % an negativen Seren. 9,0 %, 23,1 %, 23,1 %, 40,3 % und 4,5 % der Herden wurden als A-, B-, C-, D- und E-Herden klassifiziert.

Ein Vergleich von Paralleltestung und SMAPS ergab, dass durch den Einsatz des Screeningtests kein signifikanter Informationsverlust resultierte. Jedoch nahm die

Anzahl der Proben, die nicht durch den Screeningtest vorselektiert wurde, von der Bewertung „+++“ nach „+“ zu.

974 Tiere wurden kulturell auf MAP überprüft. Zur kulturellen Untersuchung wurden von A-, B-, und C-Herden alle Tiere mit einem Einzeltierstatus von mindestens "+" herangezogen. Bei D- und E-Herden wurden Tiere mit einem Einzeltierstatus von "(+)" bzw. negativ für die Kultur gewählt.

Zur Steigerung der Sensitivität der kulturellen Anzucht wurden 20,4 % der Tiere drei und 38,5 % zwei Mal kulturell auf MAP untersucht.

Es konnten nur 23 (2,4 %) kulturell positive Tiere ermittelt werden, wobei jedoch der höchste positive prädiktive Wert von 33 % auf +++-Tiere entfiel. Die positiven prädiktiven Werte für Tiere mit einer Einzeltierbewertung \leq "+" sanken rapide unter 8 %. Im Vergleich von A- und Nicht-A-Herden fielen die positiven prädiktiven Werte für serologisch "+", "(+)" und negativ bewertete Tiere höher für A-Herden aus ($p < 0,01$).

Die Mehrzahl kulturell positiver Tiere (20/23) wurde in hoch infizierten Herden nachgewiesen. Serologisch schwache oder negative Bewertungen bei Tieren mit positiven kulturellem Nachweis in diesen beiden Herden könnten Ausdruck einer verzögerte Serokonversion oder einer passageren Ausscheidung von MAP aufgrund des hohen Infektionsdrucks in diesen Herden sein.

Ständig schwankende serologische Resultate werden der MAP-Serologie immer wieder als Nachteil angelastet. Daher wurden im Rahmen einer Longitudinalstudie 950 Tiere aus 82 Herden über einen Zeitraum von 36 Monaten vier Mal geprüft. Die Auswertung dieser Longitudinalstudie belegte, dass 91 % der "+++"-Ergebnisse und 88 % der negativen Ergebnisse über mehrere Untersuchungen hinweg stabil ausfielen. Die Reproduzierbarkeit der +- und ++-Ergebnisse hingegen fiel weniger konstant aus (< 50 %). Die Herdeneinstufung betreffend wurde gezeigt, dass die Übereinstimmung der Bewertungen für das kürzeste Untersuchungsintervall (2-3 Monate) 100 % betrug, wenn Schwankungen um eine Herdenkategorie toleriert wurden. Je weiter die Untersuchungsintervalle gefasst wurden, desto geringer war die Übereinstimmung (82 % im längsten Untersuchungsintervall von 36 Monaten).

Insgesamt wurde eine sehr geringe Anzahl kulturell positiver Tiere nachgewiesen. Allerdings stand diese geringe Prävalenz in Einklang mit der geringen Prävalenz der +++-Tiere und einer nicht nachweisbaren Serokonversion.

SMAPS erwies sich als ein wertvolles Instrument für die serologische MAP- Diagnostik. Tiere mit einem +++-Ergebnis können als Indikator für Hochrisikoherden angesehen werden. Im Gegensatz zu Systemen, deren Herdenklassifikation auf der Seroprävalenz festgesetzt wird, werden durch SMAPS auch Herden mit Einzelreagenten oder einzelnen Ausscheidern sicher erkannt.

Es ist eine Frage weiterer Diskussionen, ob SMAPS nicht auf die beiden Bestätigungstests reduziert werden kann, da nur mit beiden Tests ein +++-Ergebnis erzielt wird.

Jedoch ist SMAPS dazu geeignet, in A-Herden die Tiere herauszufiltern, die ein erhöhtes Paratuberkuloserisiko aufweisen. Diese Tiere könnten beispielsweise in weitere Mangementmaßnahmen einbezogen werden.

7 Summary

Investigations to determine the suitability of a sequential combined serological diagnostic procedure for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infections in Bavarian dairy herds.

Several commercial ELISA tests are available for the serological detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), but these tests vary greatly in sensitivity and specificity; results can thus be interpreted correctly only if these parameters are known.

Sequential MAP serology (SMAPS) involves screening with a highly sensitive ELISA (e.g. Svanova) and subsequent confirmatory testing of positive results with two tests of higher specificity (e.g. Idexx and Pourquier).

A total of 4306 cows from 134 herds were tested serologically in three tests to validate SMAPS. Faecal culture was used as a reference. ELISA results were interpreted on the basis of agreement between tests. Screening-negative samples were considered negative, and were not tested further. Four grades of positive results were distinguished: "(+)", "+", "++", and "+++". Unconfirmed screening-positive samples were considered weak positive ("(+)"). Reactivity in only one of the two confirmatory tests was scored as "+" (Idexx equivocal) or "++" (Idexx positive or Pourquier positive/equivocal). Finally, cows with the same results for the two more specific tests were rated as "+++ (Svanova positive, Idexx positive or equivocal, and Pourquier positive or equivocal). The herd level was defined according to the highest individual result in the herd (negative → E, (+) → D, + → C, ++ → B and +++ → A).

Analysis of 4306 individual samples from 134 herds showed 0.7% "+++ animals, 1.4% "++", 2.4% "+", 18.0% "(+)", and 77.8% negative animals. Thus 9.0% of the herds were classified as "A", 23.1% as "B", 23.1% as "C", 40.3% as "D", 4.5% as "E". Comparison of parallel testing and SMAPS showed that the screening procedure did not result in a significant loss of information. However, there reliability differed among the groups: it was best for the "+++ animals, poorer for the "++ group, and worst for the "+" animals.

Subsequently faecal cultures were made for 973 animals from "A", "B" and "C" herds; these animals had tested + or higher. In the "D" and "E" herds, faecal cultures were conducted for the animals with "(+)" and negative serological results, respectively.

In order to increase sensitivity of faecal culture, a number of the animals were tested three (20.4 %) and two times (38.5%). Accuracy of seroconversion and reproducibility of test results were estimated by testing 950 animals from 82 herds on four occasions over a 36-month period.

Comparison of SMAPS and faecal culture was limited by the fact that faecal cultures were positive for only 23 animals (2.4%). Nevertheless the highest positive predictive values were observed for +++ animals (33%), whereas these values rapidly decreased to below 8% for animals scoring \leq ++. When animals from "A" and "non-A" herds were compared, the positive predictive values for "+", "(+)" and even negative serological results were higher for the A herds ($p < 0.01$). Most culture-positive animals (20/23) were found in two heavily infected herds. Both the low and the negative serological results of positive faecal cultures in these two herds might be explained by retarded seroconversion or intestinal passage of MAP because of the high rate of infection in those herds.

Changes in serological results over time in individual animals are generally regarded as a major drawback of MAP serology. Data from the longitudinal study revealed that the reproducibility of negative and "+++" results was 91% and 88%, respectively, while that of "+" and "++" results was less than 50%. Complete (100%) agreement in herd classification was found for the shortest interval between two tests (2 to 3 months), if a one-step score change was tolerated. Longer intervals between two tests resulted in poorer agreement (82% for the longest period, 36 months).

Overall, the number of culture positive animals was unexpectedly low (2.4%). However, this low prevalence corresponds to the low prevalence of +++ animals and an undetectable level of seroconversion to "+++" during the longitudinal study. In contrast, the level of seroconversion to "+++" was 10% in one heavily infected herd.

SMAPS was thus found to be a valuable tool for serological MAP testing. Samples with "+++" results indicated high-risk herds. In contrast to systems based on herd classification according to seroprevalences, SMAPS pinpointed herds with single reactors or even herds in which MAP shedding animals had been introduced most recently. It remains to be determined whether SMAPS might be restricted to the confirmatory tests, as these two tests are crucial for "+++" classification. However, at least in A herds, SMAPS is a valuable tool for identifying the animals at risk which should be included in further management measures.

8 Literaturverzeichnis

ANONYMUS (2002):

Uniform program standards for the voluntary bovine Johne's Disease control program
United States department of Agriculture
APHIS 91-45-014

ANTOGNOLI, M.C., JEMMI, T., HILL, A.E., OCHS, H., SALMAN, M.D. (2005):

Evaluation of intervention strategies for control of Johne's Disease in Switzerland
Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen,
9-14

BECH-NIELSEN, S., JORGENSEN, J.B., AHRENS, P., FELD, N.C. (1993):

Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked
immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows
J. Clin. Microbiol. 30, 613-618

BENEDICTUS, G., DIJKHUIZEN, A.A., STELWAGEN, J. (1987):

Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle
Vet. Rec. 121, 142-146

BERG, J.M., TYMOZCO, J.L., STRYER, L. (2003):

Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag, 2003

BOELAERT, F., WALRAVENS, K., BIRONT, P., VERMEERSCH, J.P., BERKVENS,
D., GODFROID, J. (1999):

Prevalence of Paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population
Proceedings of the 6th international Colloquium on Paratuberculosis, Melbourne, 76-
88

BÖTTCHER, J., GANGL, A. (2004):

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* – Combined serological testing and classification of individual animals and herds

J. Vet.Med. B. 51, 443-448

BULL, T.J., McMINN, E.J., SIDI-BOUMEDINE, K., SKULL, A., DURKIN, D., NEILD, P., RHODES, G., PICKUP, R., HERMON-TAYLER, J. (2003):

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

J. Clin. Microbiol. 41, 2915-2923

CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL, R.S. (1984):

Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects
Cornell Vet. 74, 218-262

COETSIER, C., HAVAUX, X., MATTELARD, F., SADATTE, S., CORMONT, F., BUERGELT, C., LIMBOURG, B., LATINNE, D., BAZIN, H., DENEFF, J.F., COCITO, C. (1998):

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissue by new species-specific immunohistological procedures

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 446-451

COLLINS, M.T., SOCKETT, D.C. (1993):

Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked-immunosorbent assay for bovine paratuberculosis

J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 1456-1463

COLLINS, T.M. (1996):

Diagnosis of paratuberculosis

Vet. Clin. North. Food Anim. Pract. 12, 357-370

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, 685-692

CONNELL, N.D. und NIKAIDO, H. (1994):

Membrane permeability and transport in *Mycobacterium tuberculosis* In:
BLOOM, B.R. (ed): Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control
ASM press, Washington, DC, 333-352

COUSINS, D.V., EVANS, R.J., FRANCIS, B.R. (1995):

Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissue for *Mycobacterium paratuberculosis*
Aust. Vet. J. 72, 458-462

COUSINS, D.V., WHITTINGTON, R., MARSH, I., MASTERS, A., EVANS, R.J., KLUVER, P. (1999):

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

Mol Cell Probes. 13, 431-42

COUSSENS, P.M. (2004):

Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle

Infect. Immun. 72, 3089-3096

DEUTZ, A., SPERGSER, J., WAGNER, P., STEINECK, TH., KÖFER, J., ROSENGARTEN, R. (2003):

Paratuberkulose bei Wildtieren – Häufung klinischer Fälle in freier Wildbahn
Tierärztl. Umschau 58, 482-489

DOWNHAM, K.D. (1950):

Johne's disease in cattle

Vet. Rec. 64, 441

DUBASH, K., SHULAW, W.P., BECH-NIELSEN, S., STILLS, H.F., SLEMONS, R.D.
(1996):

Evaluation of an agar gel immunodiffusion test kit for detection of antibodies to
Mycobacterium paratuberculosis in sheep

J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 401-403

FREDERIKSEN, B., DJØNNE, S., SIGURÐARDÓTTIR, Ò., THARALDSEN, J.,
NYBERG, O., JARP, J. (2004):

Factors affecting the herd level of antibodies against *Mycobacterium avium*
subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle

Vet. Rec. 154, 522-526

GARCIA MARIN, J.F., BENAZZI, S., PEREZ, V., BADIOLA, J.J. (1992):

Study of the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* in the lamb's intestinal
mucosa using immunohistochemical methods for antigen detection

Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis, Orlando, 370-
377

GASTEINER, J., WENZEL, H., FUCHS, K., JARK, U., BAUMGARTNER, W. (1998):

Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria

J. Vet. Med. B. 46, 457-566

GILOT, P., COCITO, C. (1993):

Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis
and paratuberculosis in cattle

FEMS Microbiol. Lett. 110, 307-312

GRANT, I.R., BALL, H.J., ROWE, M.T. (2002):

Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercial pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom

Appl. Environ. Microbiol. 68, 2428-2435

HACKER, U., HÜTTNER, K., KONOW, M. (2004):

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

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

HARRIS, N.B., BARLETTA, R.G. (2001):

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine

Clin. Microbiol. Rev. 14, 489-512

HOMUTH, M. (2002):

Diagnostik der Paratuberkulose

Dtsch. tierärztl. Wschr. 109, 516-519

JARK, U., RINGENA, I., FRANZ, B., GERLACH, G.F., BEYERBACH, M. (1997):

Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis.

Vet. Microbiol. 51, 189-198

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y., KANEENE, J.B., LLOYD, J.W. (1999):

Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds

J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 822-825

JØRGENSEN, J.B. (1977):

Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry

Nord. Vet. Med. 29, 267-70

JUDGE, J., KYRIAZAKIS, I., GREIG, A., ALLCROFT, D.J., HUTCHINGS M.R. (2005):

Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot?

App. Environ. Microbiol. 71, 6033-6038

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

KÖHLER, H., BURKERT, B. (2003):

Validierung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Rindern

IVD-Info 1 der BFAV der Insel Riems 3, 6-9

KÖHLER, H., GEUE, L., CONRATHS, F.J. (2003):

Zur Paratuberkulosesituation in Deutschland

Amtstierärztl. Dienst und Lebensmittelkontrolle 10, 40-44

KÖHLER, H., BURKERT, B., PAVLIK, I., MOSER, I., MÖBIUS, P., MARTIN, G. (2005):

Validation of commercially available ELISA tests for the serodiagnosis of paratuberculosis in Germany

Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 560

KÖHLER H., GIERKE, F. (2006)

Ist die Flüssigkultur die Methode der Wahl für die Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Kotproben von Rindern?

Tagungsunterlagen der 3. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Jena, ohne Seitenangabe

KHOL, J.L., DREIER, S., STEIN, B., FUCHS, K., GÜTLER, K., BAUMGARTNER, W.
(2005):

Prevalence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Austrian cattle 2002/03
in comparison to 1997/98

Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen,
699

KOREN, O., ELAD, D., SCHAFER, M., GARAZI, S., MELTSER, R., KLEMENT, E.
(2005):

Johne's disease control programs in the Israeli dairy herds

Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen,
26-29

KRAUSS, H., WEBER, A. (Hrsg.) (1986):

Zoonosen

Deutscher Ärzte-Verlag, 1986

KÜHN, T., HELBLING, H. (2000):

Neue methodische Ansätze in der Kultivierung von *M. paratuberculosis* und erste
Erfahrungen mit dem System MGIT in der veterinärmedizinischen Diagnostik

Tagungsunterlagen der 1. Arbeitstagung des veterinärmedizinischen Referenzlabors
für Tuberkulose, Jena, ohne Seitenangabe

zur LAGE, S., GOETHE, R., DARJI, A., VALENTIN-WEIGAND, P., WEISS, S.
(2003):

Activation of macrophages and interferences with CD4+ T-cell stimulation by
Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium*
subspecies *avium*

Immunol. 108, 62-69

LARSEN, A.B., KOPECKY, K.E. (1970):

Mycobacterium paratuberculosis in reproductive organs and semen of bulls

Am. J. Vet. Res. 31, 255-257

LIANDRIS, E., PICCININI, R., DAPRÀ, V., ZECCONI, A. (2005):

Application of a pilot paratuberculosis control program in an alpine area in northern Italy

Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 30-35

LILLINI, E., BITONI, G., GAMBERALE, F., CERSINI, A. (2005):

Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy)

Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 638-644

MAHILLON, J., CHANDLER, M. (1998):

Insertion sequences

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 725-774

MALMO, J. (1995):

The clinical diagnosis of Johne's disease

Proceedings of Johne's disease diagnosis standardisation workshop, Melbourne, ohne Seitenangabe

McINDOE, R.H.F. (1950):

What can we do about Johne's disease?

Aust. Vet. J. 26, 216-220

MERKAL, R.S., RICHARDS, W.D. (1972):

Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of Mycobacteria

App. Microbiol. 24, 205-207

MÖBIUS, P., GOTTSCHALDT, J., HELBING, H., RAßBACH, A., HOTZEL, H., KÖHLER, H. (2006):

Untersuchungen zum molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* beim Rind

Tagungsunterlagen der 3. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Jena, ohne Seitenangabe

MUSKENS, J., ELBERS, A.R.W., van WEERING, H.J., NOORDHUIZEN, J.P.T.M. (2003):

Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds

J. Vet. Med. B 50, 372-377

NIELSEN, S.S., THAMSBORG, S.M., HOUE, H., BITSCH, V. (2000):

Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds

Prev. Vet. Med. 44, 1-7

NISBET, D.I., GILMOUR, N.J., BROTHERSTON, J.G. (1962):

Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep

J. Comp. Pathol. 72, 80-91

OBASANJO, I.O., GRÖHN, Y.T., MOHAMMED, H.O. (1997):

Farm factors associated with the presence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Programm

Prev. Vet. Med. 32, 243-251

PALMER, M.V., STOFFERGEN, W.C., CARPENTER, J.G., STABEL, J.R. (2005):

Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle

J. Wildl. Dis. 41, 629-35

PENCE, M., BALDWIN, C., BLACK, C.C. III (2003):

The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle

J. Vet. Diagn. Invest. 15, 475-477

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R. (2002):

Clinical Veterinary Microbiology

Mosby Reprinted 2002, ORT

RANKIN, J. D. (1958):

The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*, I. Calves inoculated intravenously

J. Comp. Path. 6, 331-337

RANKIN, J. D. (1961a):

The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*, II. Adult cattle inoculated intravenously

J. Comp. Path. 71, 6-9

RANKIN, J. D. (1961b):

The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*, III. Calves maintained in an infectious environment

J. Comp. Path. 71, 10-14

RANKIN, J. D. (1962):

The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*, III. Adult cattle maintained in an infectious environment

J. Comp. Path. 72, 113-117

ROUSSEL, A., FOSGATE, G.T., MANNING E.J.B., COLLINS, M.T. (2006):

Association of atypical mycobacteria with positive ELISA results for paratuberculosis

Tagungsunterlagen des 24. Welt-Buiatrik-Kongress, Nizza

SACHS, L. (2002):

Angewandte Statistik

Elfte, überarbeitete und aktualisierte Auflage

Springer-Verlag 2004

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., EHRLICH, A.H., ARNEHIM, N. (1985):

Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia

Science 230, 1340-1354

van SCHAIK, G., SCHUKKEN, Y.H., CRAINICEANU, C., MUSKENS, J., van LEEUWEN, J.A. (2003):

Prevalence estimates for paratuberculosis adjusted for test variability using Bayesian analysis

Prev. Vet. Med. 60, 281-295

van SCHAIK, G., van MAANEN, C., FRANKEN, P. (2005):

Field validation of the Pourquier ELISA to detect fecal shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Dutch dairy cows

Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 580

SELBITZ, H.J. (1992):

Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie

Gustav Fischer Verlag, 1992

SEVILLA, I., SINGH, S.V., GARRIDO, J.M., ADURIZ, G., RODRIGUEZ, S., GEIJO, M.V., WHITTINGTON, R.J., SAUNDERS, V., WHITLOCK, R.H., JUSTE, R.A. (2005):

Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions

Rev. Sci. Tech. 24, 1061-6

SOCKETT, D.C., CONRAD, T.A., CHESTER, B.T., COLLINS, M.T. (1992):

Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis

J. Clin. Microbiol. 30, 1134-1139

STRATMANN, J., HEINZMANN, J., GERLACH, G.F. (2005):

The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific peptide aMptD and its potential as a diagnostic tool

Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 422-430

STRICKLAND, S.J., SCOTT, H.M., LIBAL, M.C., ROUSSEL Jr., A.J., JORDAN, E.R. (2005):

Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle

J. Dairy Sci. 88, 2432-2440

STREETER, R.N., HOFFSIS, G.F., BECH-NIELSEN, S., SHULAW, W.P., RINGS, D. (1995):

Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows

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

STROMMENGER, B., STEVENSON, K., GERLACH, G.F. (2001):

Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

FEMS Microbiol. Lett. 196, 31-37

SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H., HAMIR, A.N., ROSENBERGER, A.E., HERR, S.A. (1992):

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

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

SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H., ROSENBERGER, A.E. (1992):

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

J. Clin. Microbiol. 30, 166-171

SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H., BUCKLEY, C.L., SPENCER, P.A. (1995):

Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle

J. Vet. Diagn. Invest. 7, 488-493

SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H., McADAMS, S., FYOCK, T. (2006):

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

J. Vet. Diagn. Invest. 18, 2-6

TIJSSEN, P. (1985):

Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology

Practice and theory of enzyme immunoassays

Elsevier, 1985

VALENTIN-WEIGAND, P. (2002):

Pathomechanismen und Immunreaktionen bei der Paratuberkulose

Dtsch. tierärztl. Wschr. 109, 501-509

WALRAVENS, K., SAEGERMAN, C., GOVAERTS, M., VANHOLME, L., FAUVILLE DUFAUX, M., LETESSON, J.J., GODFROID, J. (2006):

Control program of *M. bovis* in Belgium. The place of new diagnostic and typing tools
3. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Jena, ohne Seitenangabe

WEBER, A., GURKE, R., BAUER, K., SCHREYER, K. (1992):

Bacterial studies on the occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* in fecal samples of zoo ruminants

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

WEBER, A., SCHÄFER-SCHMIDT, R., FUCHS, D., WEIGL, U. (2000):
Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Kotproben aus bayerischen Beständen

Tierärztl. Umschau 55, 97-99

WHIPPLE, D.L. KAPKE, P.A., ANDERSEN, P.R. (1992):

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

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

WHITLOCK, R.H., WELLS, S.J., SWEENEY, R.W., van TIEM, J. (2000):

ELISA and fecal culture: sensitivity and specificity of each model

Vet. Microbiol. 77, 387-398

ZIMMER, K., DRAGER, G., KLAWONN, W., HESS, R.G. (1999):

Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, fecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle

Zentralbl. Veterinärmed. B 46, 137-140

Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft vom 17.01.2005 (Paratuberkuloseleitlinien)

BAnz, Nr. 28, 10.02.2005, S. 2156

Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene nach dem Tierseuchengesetz (TierGS) § 17 c

Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (BGBl. I S. 1260; 3588) zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 21. Dezember 2006 (BGBl. I S. 3294)

Geburtshygiene

Reinigung der Abkalbebox	ja	nein
Absonderung der Kuh	ja	nein
Reinigung der Kuh	ja	nein
sofortige Trennung des Kalbes	ja	nein
Kolostrumaufnahme	ja	nein
Saugen	ja	nein
von der Mutterkuh	ja	nein
Kolostrumbank	ja	nein

Haltung der Kälber bis 3. Lebensmonat

Kontakt zur Kuhherde	ja	nein
Einzelbox	ja	nein
Gruppenhaltung Tiefstall	ja	nein
Gruppenhaltung Spalten	ja	nein
Anbindehaltung	ja	nein

Tränke

Tränkehygiene	ja	nein
Milchaustauscher	ja	nein
Vollmilch	ja	nein
Wasserversorgung	ja	nein

Kälberweide

Nutzung durch Jungtiere/Kühe	ja	nein
Wasserversorgung	ja	nein
offenes Gewässer	ja	nein
Selbsttränker	ja	nein
Überschwemmungen	ja	nein

Fachwissen MAP

ja	nein
----	------

bisherige Massnahmen

ja	nein
----	------

Anmerkungen

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema der sequenziellen Testung von Seren mit den Testsystemen der Firmen Pourquoi, Idexx und Svanova. sowie der Bewertung durch Punktwerte (PW) und Einzeltierwertung (neg, (+), +, ++, +++) sowie verschiedener Kombinationen der Ergebnisse	S. 30
Abbildung 2:	Vergleichende Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilungen von 4306 Proben in Prozent über Klassen der optischen Dichten (OD%) für die ELISAs der Firmen Svanova (Sv), Idexx (Id), Pourquoi (Pq)	S. 33
Abbildung 3:	Vergleichende Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilungen von 134 Herden über Herdenprävalenzklassen, wie sie mit den ELISAs der Firmen Svanova, Idexx und Pourquoi ermittelt wurden	S. 35
Abbildung 4:	Verteilung der getesteten Seren in der Paralleltestung (schwarz) und die Bewertung derselben Seren durch SMAPS (grau) sowohl über der Punktsomme als auch über der Bewertung	S. 36
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Überschneidungen der einzelnen Tests mit prozentualen und absoluten Angaben bezogen auf 4306 Einzeleren	S. 37
Abbildung 6:	Prozentuale Verteilung der positiven (n = 23 = 100 %) und negativen (n = 950 = 100%) Kotkulturen auf die entsprechenden serologischen Punktsommen / Bewertungen (erste serologische Bewertung)	S. 42
Abbildung 7:	Prozentuale Verteilung der positiven (n = 23 = 100 %) und negativen (n = 950 = 100%) Kotkulturen auf die entsprechenden serologischen Punktsommen / Bewertungen (höchste serologische Bewertung)	S. 43
Abbildung 8:	Darstellung der prozentualen Verteilung der kulturell positiven und negativen (n = 973) Tiere auf die entsprechenden serologischen Punktsommen / Bewertungen .	S. 44
Abbildung 9:	Verteilung der 950 negativen kulturellen Ergebnisse bei 107 Herden und der 23 positiven Tiere bei 4 Herden auf Kategorien bei SMAPS	S. 45

Abbildung 10: Verteilung der 950 Seren auf die jeweiligen Punktsu- mmen / Bewertungen in allen vier Durchgängen bei SMAPS	S. 51
Abbildung 11: Darstellung der Schwankungen der Einzeltierbewertun- gen sowohl von Durchgang zu Durchgang als auch übergreifend vom ersten zum letzten Durchgang	S. 53
Abbildung 12: Vergrößerung eines Ausschnitts wichtiger Details aus Abbildung 10	S. 53
Abbildung 13: Darstellung der von 2004/2 auf 2004/3 konstant bewer- teten Seren	S. 57
Abbildung 14: Darstellung der Schwankungen der Herdenkategorien sowohl von Durchgang zu Durchgang als auch über- greifend vom ersten zum letzten Durchgang	S. 61

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einzeltier- und Herdenprävalenzen anderer Regionen und Länder im Vergleich	S. 10
Tabelle 2:	Zusammenfassung wichtiger Details der in der Arbeit verwendeten ELISAs	S. 25/26
Tabelle 3:	Schema zur Beurteilung der Ergebnisse für die MAP-Serologie bei paralleler Testdurchführung	S. 29
Tabelle 4:	Schema der Kotprobennahme abhängig vom serologischen Ergebnis auf Einzeltierebene	S. 31
Tabelle 5:	Verteilung der 4306 Tiere aus 134 Herden auf die jeweiligen Bereiche eines jeden Tests	S. 32
Tabelle 6:	Verteilung der 4306 Seren auf die Einzeltierbewertungen bei der Paralleltestung und bei SMAPS	S. 38
Tabelle 7:	Verteilung der nicht durch SMAPS erkannten Seren auf die Tests, die in der Paralleltestung positiv ausfielen ...	S. 38
Tabelle 8:	Darstellung der Verschiebung der Kategorien bezüglich Paralleltestung und SMAPS	S. 39
Tabelle 9:	Aufschlüsselung der Verschiebungen der Kategorien zwischen Paralleltestung und SMAPS unter Beachtung des für die Veränderung verantwortlichen Tests	S. 39
Tabelle 10:	Darstellung der kulturell negativen und positiven Tiere im Zeitraum 2004/1 bis 2004/3	S. 40
Tabelle 11:	Einteilung der Herden in A-Herden und Nicht-A-Herden bei SMAPS (erstes serologisches Ergebnis)	S. 46
Tabelle 12:	Einteilung der Herden in A-Herden und Nicht-A-Herden bei SMAPS (maximales serologisches Ergebnis)	S. 47
Tabelle 13:	Abbildung der mittleren Herdenprävalenzen pro Test in kulturell positiven und negativen Herden	S. 47
Tabelle 14:	Darstellung der zehn kulturell positiven Tiere der einzigen Herde mit kulturell positiven Tieren in der Longitudinalstudie	S. 48

Tabelle 15:	Prozentuale Verteilung der 950 Tiere auf positive, grenzbereichswertige und negative Bereiche der einzelnen Testsysteme	S. 49
Tabelle 16:	Darstellung sowohl der Reaktivitätszunahmen und -abnahmen als auch der Differenzen für die einzelnen Tests für 950 Seren im Zeitraum von 2003 bis 2004/3 (grau unterlegt die Nettozunahmen)	S. 51
Tabelle 17:	Differenzen für die Punktsommen (Δ PS) bei SMAPS im Zeitraum von 2003 bis 2004/3	S. 56
Tabelle 18:	Darstellung der Konstanz der Herdenbewertung von Durchgang zu Durchgang	S. 59
Tabelle 19:	Darstellung der Kategorien in % bezogen auf 78 Herden, die in den jeweiligen Durchgängen wieder in dieselbe eingeordnet wurden (grau unterlegte Felder aus Tabelle 17)	S. 59
Tabelle 20:	In dieser Tabelle sind die Profile der sieben Herden, die im Laufe der Durchgänge mindestens einmal als Kategorie A-Herde bewertet wurden, angegeben	S. 63/64
Tabelle 21:	Vergleich von Auswertungen der Anzucht von MAP im internationalen Vergleich	S. 67

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die in den letzten drei Jahren wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Allen voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. W. Klee, der mir das Thema überließ und mit Geduld, Einfühlungsvermögen und Verständnis eine große Hilfe war.

Herrn Dr. J. Böttcher danke ich sehr für die kompetente und engagierte Betreuung und die konstruktive Kritik, die diese Arbeit erst ermöglichten.

Ich danke Herrn Dr. G. Wittkowski für die Ermöglichung meiner Dissertation und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.

Vielen Dank an Frau P. Herzog für die hervorragende Hilfe bei der Durchführung der verschiedenen ELISAs und an die gesamte Abteilung der Bakteriologie, die mir bei der Anzucht und Auswertung der Paratuberkulosekulturen zur Seite stand.

Herrn Dr. M. Ziller vom Friedrich-Loeffler-Institut danke ich vielmals für die großartige Betreuung meiner statistischen Auswertung.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. F.J. Conraths, der mir die statistische Auswertung am FLI in Wusterhausen ermöglichte. An Herrn Dr. L. Geue und Herrn Dr. J. Teuffert ebenfalls herzlicher Dank, die durch eine Einschätzung meiner Daten den Grundstein einiger Ideen für die Diskussion legten.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. H. Köhler für die Korrespondenz und den fachlichen Austausch sehr bedanken.

Ich danke Frau J. McAlister, die schnell, unkompliziert und kompetent meine Summary von englischen Pferdefüßen befreite.

Meinen Kollegen Frau Dr. M. Alex und Herrn Dr. A. Gangl danke ich für ihre Kollegialität und die Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit.

Vielen Dank an meine Freunde Michaela und Carmen, die mich durch Trost, Geduld und guten Zuspruch in schweren Stunden davon abgehalten haben, die Dissertation allzu stiefmütterlich zu behandeln.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder Nico, die mir während der gesamten Zeit meiner Dissertation in verschiedenen Funktionen treu zur Seite standen: objektive Beurteilung, Korrekturlesen meiner Arbeit, emotionale Unterstützung und gelegentliche ablenkende und erfrischende Besuche.

Schorschi danke ich sehr für seine tiefe Zuneigung, sein Verständnis, dass er viele Abende und Wochenende ohne mich verbringen musste und seine Geduld, die er mir in schwierigen Situationen entgegenbrachte.

Diese Dissertation enthält Daten, die mit Mitteln des Freistaates Bayern und der bayerischen Tierseuchenkasse gefördert wurden.