

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	12
2.	LITERATUR	13
2.1	Geschichte der Paratuberkulose	13
2.2	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	13
2.2.1	Taxonomie und Genetik	13
2.2.2	Erreger Eigenschaften und Kultivierung	14
2.2.3	Tenazität	14
2.3	Krankheitsbild der Paratuberkulose	16
2.3.1	Pathogenese und Immunologie	16
2.3.2	Erkrankungsstadien	18
2.3.3	Pathologisch-anatomische und histologische Veränderungen	19
2.4	Epidemiologie der Paratuberkulose	20
2.4.1	Erregerausscheidung	20
2.4.2	Übertragungswege	22
2.4.3	Wirtsspektrum und Empfänglichkeit der Wirtstiere	23
2.4.4	Geographische Verbreitung	24
2.4.5	Wirtschaftliche Bedeutung	26
2.5	Diagnostik der Paratuberkulose	28
2.5.1	Direkter Erregernachweis	28
2.5.1.1	Mikroskopische Untersuchung von Kotausstrichen und Organabklatschpräparaten	28
2.5.1.2	Kultureller Erregernachweis und Speziesidentifizierung mittels PCR aus Kulturmateri	28
2.5.1.3	Molekularbiologischer Erregernachweis in Organmaterial, Kot und Milch	31
2.5.2	Indirekter Erregernachweis	32
2.5.2.1	Johnin Hauttest	32
2.5.2.2	Interferon-γ-Test	32
2.5.2.3	Komplementbindungsreaktion (KBR)	33
2.5.2.4	Agarimmunodiffusionstest (AGIDT)	33
2.5.2.5	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	34
2.5.2.6	Protein Arrays	36
2.6	Bekämpfung der Paratuberkulose	37
2.6.1	Bekämpfung der Paratuberkulose in Deutschland und Thüringen	37
2.6.2	Bekämpfung der Paratuberkulose auf internationaler Ebene	38
2.6.3	Impfungen	38

3.	MATERIAL UND METHODEN	40
3.1	Allgemeine Projektbeschreibung	40
3.2	Tierbestände	40
3.3	Proben	45
3.4	Serologische Untersuchungen	45
3.4.1	Aufbereitung der Blut- und Milchproben für die serologischen Untersuchungen	45
3.4.2	Durchführung des Svanovir-ELISA	46
3.4.3	Durchführung des Pourquier-ELISA	47
3.5	Erregernachweis in Kotproben	49
3.5.1	Dekontamination der Kotproben im Projektzeitraum	49
3.5.2	Beimpfen und Bebrüten der Kotkulturröhrchen	49
3.5.3	Beurteilung der Kotkulturröhrchen	50
3.5.4	Mikroskopische Untersuchung von Koloniematerial	50
3.5.5	DNA-Isolierung aus Koloniematerial	51
3.5.6	IS900-PCR und Duplex-PCR der DNA-Proben	51
3.5.7	Agarosegel-Elektrophorese	54
3.6	Versuch zur Dekontamination von Kotproben	55
3.7	Erfassung der tierspezifischen Daten	58
3.8	Statistische Auswertung	58
3.8.1	Berechnung von Sensitivitäten	59
3.8.2	Berechnung von Spezifitäten	59
3.8.3	Kriterien für die Bildung von Tiergruppen zur Untersuchung der tier-spezifischen Einflussfaktoren auf die Diagnostik der Paratuberkulose	60
3.8.3.1	Bestände und Kotbefundgruppen	61
3.8.3.2	Altersgruppen	61
3.8.3.3	Laktationsphasen	61
3.8.3.4	Milchleistungsgruppen	61
3.8.3.5	Milchparameter	62
3.8.4	Berechnung von Konfidenzintervallen	62
3.8.5	Pearson's Chi-Quadrat Test	63
3.8.6	Fisher's exakt Test	63
3.8.7	Kontingenztafeln für die Prüfung der Übereinstimmungen serolo-gischer Tests und Berechnung des Kappawertes nach Cohen	63
3.8.8	Multinomiale logistische Regression	65

4. ERGEBNISSE 66

Untersuchungsbefunde

4.1	Befunde der Untersuchungen auf Paratuberkulose in drei Thüringer Milchviehbetrieben	66
4.1.1	Zusammenfassung der Kotbefunde in den Betrieben A, B und C	66
4.1.2	Kotbefunde für die Bestände A, B und C zu 4 verschiedenen Untersuchungszeitpunkten	67
4.1.3	Entwicklung der Kotbefunde in den Beständen A und B	70
4.1.4	Analyse des zeitlichen Auftretens von Map-Koloniewachstum bei der Untersuchung von Kotproben aus zwei Thüringer Milchviehherden	73
4.1.5	Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit zwei Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren	74

Ergebnisse der Sensitivitäts-, Spezifitätsberechnungen und der Ermittlung von Befund-übereinstimmungen

4.2	Ermittlung der diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten zweier ELISA-Testverfahren anhand der Untersuchungsergebnisse aus drei Thüringer Milchviehbetrieben	76
4.2.1	Berechnung der Sensitivitäten des Svanovir- und des Pourquier-ELISA für Blut- und Milchserum	76
4.2.2	Berechnung der Spezifitäten des Svanovir- und des Pourquier-ELISA für Blut- und Milchserum im Bestand C	82
4.3	Untersuchung der Übereinstimmungen der Befunde zweier Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren zu einem identischen Probennahmezeitpunkt	83
4.3.1	Vergleich der blutserologischen Befunde	83
4.3.2	Vergleich der milchserologischen Befunde	83
4.3.3	Vergleich von blut- und milchserologischen Befunden	84

Ergebnisse der Untersuchungen von Einflussfaktoren

4.4	Einflussfaktoren auf die Kotkultivierung	86
4.4.1	Methodenspezifische Einflussfaktoren	86
4.4.1.1	Einfluss der Dekontaminationsmethode auf das Ergebnis der Kotkultivierung	86
4.4.1.2	Einfluss der Anzahl der Kulturröhrchen auf das Ergebnis d der Kotkultivierung	88
4.4.1.3	Einfluss von Kontaminationen auf die Auswertung von Kotkultivierung	89
4.4.2	Tierspezifische Einflussfaktoren	90
4.4.2.1	Alter	90
4.4.2.2	Laktationsphase	91
4.4.2.3	Tagesmilchleistung	91

4.5	Einflussfaktoren auf die serologische Diagnostik	99
4.5.1	Tierspezifische Einflussfaktoren	99
4.5.1.1	Alter	100
4.5.1.2	Laktationsphase	104
4.5.1.3	Tagesmilchleistung	106
4.5.1.4	Milchparameter	110
4.6	Multinomiale logistische Regressionen der Einflussfaktoren	113
4.6.1	Multinomiale logistische Regression der Einflussfaktoren auf die Kotuntersuchung	113
4.6.2	Multinomiale logistische Regression der Einflussfaktoren auf die ELISA-Untersuchungen	113
<u>Ergebnisse der Wiederholungsuntersuchungen bei identischen Tieren</u>		
4.7	Wiederholung koprologischer Untersuchungen	114
4.7.1	Verlauf der Kotbefunde bei mehrfach untersuchten Tieren aus dem Bestand A und Einfluss der Wiederholung auf die Testsensitivität	114
4.7.2	Verlauf der Kotbefunde bei mehrfach untersuchten Tieren aus dem Bestand B und Einfluss der Wiederholung auf die Testsensitivität	115
4.8	Mehrfache Wiederholung serologischer Untersuchungen von Einzeltieren – Einflüsse auf Sensitivitäten und Spezifitäten der ELISA-Verfahren	117
4.8.1	Einfluss der Wiederholung blutserologischer Untersuchungen auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren	118
4.8.2	Einfluss der Wiederholung milchserologischer Untersuchungen auf die Sensitivität der ELISA-Testverfahren	120
4.8.3	Einfluss der Wiederholung blutserologischer Untersuchungen auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren	121
4.8.4	Einfluss der Wiederholung milchserologischer Untersuchungen auf die Spezifität der ELISA-Testverfahren	122
5.	DISKUSSION	124
5.1	Paratuberkuloseprävalenzen in den Beständen A und B	124
5.2	Entwicklung der Kotbefunde in den Beständen A und B	124
5.3	Wiederholung kotkultureller Untersuchungen	125
5.4	Methodische Einflüsse auf die kotkulturelle Paratuberkulosedagnostik	126
5.4.1	Einfluss der Lagerung der Kotproben auf die Vitalität von Map	126

5.4.2	Einfluss der Dekontamination auf das Wachstum von Myzeten	127
5.4.3	Einfluss der Dekontamination auf das Wachstum von Map	129
5.4.4	Einfluss der Anzahl eingesetzter Kulturröhrchen auf die Ergebnisse der Kotkultivierung und Auswertung der Map-Wachstumszeiten	130
5.5	Tierspezifische Einflüsse auf die kotkulturelle Paratuberkulosedagnostik	131
5.5.1	Alter	131
5.5.2	Laktationsphase	132
5.5.3	Tagesmilchleistung	133
5.6	Kotkultur als Goldstandardverfahren	134
5.7	Serologische Untersuchungen in den Beständen A, B und C	136
5.7.1	Sensitivitäten der untersuchten ELISA-Testverfahren	136
5.7.2	Spezifitäten der untersuchten ELISA-Testverfahren	139
5.7.3	Einfluss der Milchparameter auf die milchserologischen Untersuchungsbefunde	142
5.7.4	Wiederholung serologischer Untersuchungen	144
5.7.5	Übereinstimmungen der Ergebnisse zweier ELISA-Testverfahren	145
5.8	Empfehlungen zur Untersuchung und Bekämpfung der Paratuberkulose in mittleren bis großen subklinisch infizierten Herden	146
6.	ZUSAMMENFASSUNG	148
7.	SUMMARY	150
8.	LITERATURVERZEICHNIS	152
9.	ANHANG	183
9.1	Blut- und Milch-ELISA-Befunde nach den Klassen der tierspezifischen Parameter	183
9.2	Mehrfache Wiederholung serologischer Untersuchungen von Einzeltieren	188
9.3	Untersuchungsbefunde des Dekontaminationsversuches	191
9.4	Ergebnisse der multinomialen logistischen Regressionen	192
9.5	Abbildungsverzeichnis	197
9.6	Tabellenverzeichnis	198
10.	Publikationsverzeichnis	203
11.	Danksagung	204
12.	Selbstständigkeitserklärung	205