

## INHALTSVERZEICHNIS

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

<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>40</b>
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 tierspezifischen 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 serologischer Tests und Berechnung des Kappawertes nach Cohen	63
3.8.8	Multinomiale logistische Regression	65

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>66</b>
<b><u>Untersuchungsbefunde</u></b>		
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 Milchvieherden	73
4.1.5	Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit zwei Paratuberkulose-ELISA-Testverfahren	74
<b><u>Ergebnisse der Sensitivitäts-, Spezifitätsberechnungen und der Ermittlung von Befundübereinstimmungen</u></b>		
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
<b><u>Ergebnisse der Untersuchungen von Einflussfaktoren</u></b>		
4.4	Einflussfaktoren auf die Kotkultivierung	86
4.4.1	<b>Methodenspezifische Einflussfaktoren</b>	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 der Kotkultivierung	88
4.4.1.3	Einfluss von Kontaminationen auf die Auswertung von Kotkultivierung	89
4.4.2	<b>Tierspezifische Einflussfaktoren</b>	90
4.4.2.1	Alter	90
4.4.2.2	Laktationsphase	91
4.4.2.3	Tagesmilchleistung	91

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

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