

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer

---

**Untersuchung zur Bedeutung und zum Vorkommen von**  
***Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis***  
**bei Rothirschen in Bayern**

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

von  
**Anna Jamila Schwarz**  
aus Dachau

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Scholz

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

## **Meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
2 Schrifttum.....	2
2.1 Mykobakterien.....	2
2.2 <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	2
2.2.1 Phänotyp .....	4
2.2.2 Antigene und Virulenzfaktoren .....	4
2.2.3 Tenazität.....	5
2.3 Paratuberkulose .....	6
2.3.1 Definition und historischer Rückblick.....	6
2.3.2 Wirtsspektrum.....	7
2.3.3 Verbreitung .....	9
2.3.4 Empfänglichkeit und Übertragung.....	15
2.3.5 Pathogenese, Pathologie und klinisches Bild der Paratuberkulose.....	17
2.3.6 Diagnose der Paratuberkulose .....	21
2.3.6.1 Direkter Erregernachweis.....	22
2.3.6.1.1 Mikroskopie .....	22
2.3.6.1.2 Kultur .....	22
2.3.6.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.3.6.2 Indirekter Erregernachweis .....	25
2.3.6.2.1 Serologische Tests zum Nachweis zellvermittelter Immunantwort.....	25
2.3.6.2.1.1 JOHNIN-Hauttest .....	25
2.3.6.2.1.2 Interferon Test.....	25
2.3.6.2.2 Serologische Tests zum Nachweis humoraler Immunantwort	26
2.3.6.2.2.1 Komplementbindungsreaktion (KBR) .....	26
2.3.6.2.2.2 Agargel-Immendiffusion (AGID).....	27
2.3.6.2.2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	27
2.3.7 Bekämpfung in Deutschland und Europa .....	30

---

2.3.8 MAP als potentieller Zoonoseerreger .....	34
2.4 Der Rothirsch ( <i>Cervus elaphus</i> ) im Nationalpark Bayerischer Wald .....	38
3 Material und Methoden .....	46
3.1 Probenmaterial .....	46
3.2 PCR .....	48
3.2.1 Vorversuch: Artifizielle Kontamination .....	48
3.2.2 Aufbereitung der Proben .....	49
3.2.2.1 Grundlagen der DNA-Extraktion .....	49
3.2.2.2 Extraktion genomischer DNA aus Lymphknoten .....	50
3.2.2.3 Extraktion genomischer DNA aus Faeces .....	51
3.2.3 Konventionelle PCR .....	52
3.2.3.1 Protokoll .....	53
3.2.3.2 Gelelektrophorese .....	54
3.2.3.3 Auswertung der Ergebnisse .....	54
3.2.4 Real-time PCR .....	55
3.2.4.1 Protokoll .....	55
3.2.4.2 Auswertung der Ergebnisse .....	56
3.3 ELISA .....	57
3.3.1 Aufbereitung der Proben .....	57
3.3.2 Bestimmung der Antikörperkonzentration .....	57
3.3.2.1 Vorbereitung .....	57
3.3.2.2 Testdurchführung .....	57
3.3.2.3 Auswertung der Messwerte .....	59
4 Ergebnisse .....	60
4.1 Makroskopische Befunde .....	61
4.2 PCR .....	62
4.2.1 Vorversuche .....	62
4.2.2 Ergebnisse der Untersuchung von Probenmaterial mittels konventioneller PCR .....	66

---

4.2.3 Ergebnisse der Untersuchung von Probenmaterial mittels Real-Time PCR.....	67
4.3 ELISA.....	68
5 Diskussion.....	69
5.1 Vorversuche.....	69
5.2 Untersuchung des Probenmaterials .....	71
5.2.1 Makroskopische Untersuchung der Rothirsche .....	72
5.2.2 Molekularbiologische und serologische Ergebnisse.....	73
6 Zusammenfassung.....	79
7 Summary .....	80
8 Anhang .....	81
8.1 Material .....	81
8.2 ELISA-Ergebnisse.....	87
9 Verzeichnisse .....	90
9.1 Abkürzungsverzeichnis .....	90
9.2 Abbildungsverzeichnis .....	91
9.3 Tabellenverzeichnis.....	92
9.4 Literaturverzeichnis.....	93
Danksagung.....	115

## 1 Einleitung

Die Paratuberkulose ist eine unheilbare, chronische, granulomatöse Enteritis bei Haus-, Zoo- und Wildwiederkäuern, die durch *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Die Erkrankung verläuft in drei Phasen. Die frühe und späte subklinische Phase, jeweils ohne klinische Symptome und die klinische Phase mit deutlichen klinischen Symptomen und einer hohen Erregersausscheidung über Faeces. Bereits in der subklinischen Phase, die beim Rind bis zu zehn Jahre andauern kann, entstehen in Rinderbetrieben hohe wirtschaftliche Verluste durch den Rückgang der Milchleistung (CHIODINI et al., 1984; KLEE, 1987; WHITLOCK und BUERGELT, 1996; OTT et al., 1999; KLEE, 2003; BÜTTNER et al., 2005; DEUTZ und SPERGSER, 2009).

Die Erkrankung kommt beim Wiederkäuer vor, der Erreger konnte aber auch bei monogastrischen Tieren und beim Menschen isoliert werden. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Paratuberkulose und dem Morbus CROHN des Menschen wird seit langem diskutiert und kann nicht komplett ausgeschlossen werden (DALZIEL, 1913; CHIODINI et al. 1984; SALEH 2004 et al; BÜTTNER et al., 2005). Seit dem Jahr 2002 wurde in der Steiermark (Österreich) ein Anstieg der Paratuberkulose bei Wildwiederkäuern beobachtet. Es wird davon ausgegangen, dass eine gegenseitige Übertragung des Erregers zwischen Rindern und Wildtieren über die gleiche Nutzung kontaminierter Weide bzw. Äsungsflächen sehr wahrscheinlich ist (CORN et al., 2005; DEUTZ und SPERGSER, 2009).

Es ist wichtig, einen weitreichenden Überblick über das Vorkommen des Erregers, auch bei klinisch unauffälligen Tieren in Rinder- und Wildtierbeständen zu erhalten. Die bedeutendsten Gründe hierfür sind die hohe Anzahl subklinisch infizierter Tiere, die wirtschaftliche Bedeutung der Erkrankung, der potentiell zoonotische Charakter und die mögliche gegenseitige Übertragung des Erregers zwischen Wildwiederkäuern und Rindern.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, neben einer umfassenden Literaturrecherche einen Einblick in das Vorkommen von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* im Rothirschbestand des Nationalparks Bayerischer Wald zu erhalten und damit einen Beitrag zur Erforschung des Erregers in der Rothirschpopulation ganz Bayerns zu leisten.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Mykobakterien

Mykobakterien sind grampositive, säurefeste, stäbchenförmige und obligat aerobe Bakterien. Sie kommen ubiquitär in der Umwelt vor und gehören zur normalen Mikrobiota im Boden, im Oberflächenwasser und im Abwasser. Laut dem Bundesinstitut für Risikobewertung kann von ca.  $10^2$  bis  $10^5$  Mykobakterien je Gramm Boden ausgegangen werden (HARRIS und BARLETTA, 2001; N.N., 2011d). Mykobakterien besitzen einen charakteristischen Zellwandaufbau, gekennzeichnet durch den hohen Lipidgehalt der Zellwand, der die hohe Säurefestigkeit und große Tenazität der Mykobakterien bedingt (BRENNAN und NIKAIDO, 1995; MANNING et al., 2001).

### 2.2 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) bildet zusammen mit *Mycobacterium avium* subspecies *avium* (MAV) und *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* den *Mycobacterium avium*-Komplex. Die Gensequenzen aller Mitglieder dieses Komplexes besitzen einen Homologie Grad von über 90 %. Der Sequenzvergleich von MAP und MAV ergab sogar einen noch höheren Homologie Grad von 99 %. Der *Mycobacterium avium*-Komplex ist innerhalb der Systematik der Mykobakterien in die Gruppe der nichttuberkulösen Mykobakterien, die MOTT (engl. **m**ycobacteria **o**ther **t**han **t**uberculosis) eingegliedert (HARRIS und BARLETTA, 2001; MOTIWALA et al. 2006).

Man unterscheidet bei den MAP Isolaten zwei Biotypen. Isolate des Biotyps I zeigen ein engeres Wirtsspektrum und sind vor allem bei Schafen nachzuweisen. Sie lassen sich aufgrund ihres sehr langsamen Wachstums nur schlecht kultivieren, Kolonien können hier oft erst nach vier Monaten beobachtet werden. MAP-Isolate des Biotyps I werden entwicklungsgeschichtlich als Zwischenstadium zwischen *M. avium* und MAP-Isolaten des Biotyps II betrachtet. Isolate des Biotyps II wachsen im Vergleich schneller, die Kolonien sind hier meist nach sechs bis zwölf Wochen makroskopisch sichtbar. Sie kommen vorwiegend bei Rind, Wildwiederkäuern und Ziege vor. Die beiden Biotypen der MAP-Isolate unterscheiden sich auch in der Anzahl der ribosomalen DNA

(rDNA) Operons. Isolate des Biotyps I besitzen eines, Isolate des Biotyps II zwei dieser rDNA Operons (HARRIS und BARLETTA, 2001; DOHMANN et al., 2003; MOTIWALA et al., 2006).

Das komplette Genom von MAP mit 48,3 Mb wurde 2005 in den USA sequenziert (Gendatenbank Nr.NC002944). Bei dem hier sequenzierten Stamm handelt es sich um K10, einen typischen bovinen Stamm vom Biotyp II. MAP unterscheidet sich von den anderen Mykobakterien durch seine Abhängigkeit von Mycobaktin und durch das Insertionselement IS900, das in 14 bis 18 Kopien im MAP-Genom vorkommt, nicht aber bei anderen Mykobakterien. Insertionselemente sind kleine, mobile DNA-Abschnitte, die das offene Leseraster eines Gens unterbrechen, so dass kein funktionelles Protein gebildet wird. Zudem ist MAP von den anderen Spezies des *Mykobakterium avium*-Komplexes durch die langsamere Wachstumszeit zu unterscheiden. Die Generationszeit beträgt zwischen 1,3-4,4 Tage abhängig von der Ausgangsbakterienmenge (LAMBRECHT et al., 1988; GREEN et al., 1989; HARRIS und BARLETTA, 2001; JANNING und KNUST, 2004; BÜTTNER et al., 2005; Li et al., 2005; MOTIWALA et al., 2006).

Mit Hilfe des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) konnten verschiedene Varianten des MAP nachgewiesen werden. Bei einer Untersuchung von 1008 unterschiedlichen MAP-Stämmen, isoliert aus Probenmaterial von 13 Tierarten, aus 22 Ländern konnten 28 RFLP-Typen unterschieden werden. Alle MAP-Stämme können in gleicher Weise die für MAP empfänglichen Tierarten infizieren, jedoch kommen einzelne MAP-Stämme bei einzelnen Tierarten vermehrt vor (MANNING et al., 2001).

### 2.2.1 Phänotyp

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) ist ein 0,3-2 x 0,3-0,5 µm großes, grampositives, unbewegliches, säurestabiles und obligat aerobes Stäbchenbakterium. Da die Generationszeit von MAP, wie unter Kapitel 2.2 ausgeführt, bis 4,4 Tage betragen kann, sind die Kolonien oft erst nach fünf bis sechs Wochen makroskopisch erkennbar. Die halbkugeligen, weißlich-grauen Kolonien besitzen einen Durchmesser von bis zu 5mm. Bei kleinen Wiederkäuern und Wildtieren können extrem langsam wachsende, gelb-orange pigmentierte Kolonien von MAP auftreten. MAP wird vor allem auf mycobaktinhaltigen Nährböden kultiviert, da das Wachstum von MAP von dem Siderophor (griechisch: Eisenträger) Mycobaktin abhängig ist (LAMBRECHT et al., 1988; PROBST und KUBITZA, 2011).

### 2.2.2 Antigene und Virulenzfaktoren

Das Hauptantigen von MAP ist Lipoarabino-Mannan (LAM), das für viele serologische Tests verwendet wird. LAM ist eine Zellwandkomponente von MAP. Es wird vermutet, dass LAM durch Interaktion mit CD14 und dem Mannoserezeptor an der Aufnahme des Erregers in die Zelle beteiligt ist. Ein weiteres Hauptantigen, das als Hauptstimulator der humoralen Immunantwort gilt, ist ein 34 kDa großes Zellwandprotein. Dieses Antigen zeigt jedoch hohe Homologien zu Antigenen anderer Mykobakterien und kann daher nicht zum spezifischen MAP-Antikörper Nachweis herangezogen werden (STROHMEIER und FENTON, 1999; HARRIS und BARLETTA, 2001).

Das Antigen p26, ein weiteres MAP-Antigen, wurde als Indikator für MAP Infektionen bei Morbus CROHN Patienten angenommen, jedoch konnte sein Vorkommen bei allen *M. avium* Spezies bewiesen werden. Als ein weiteres MAP-spezifisches Antigen wurde HspX, ein hitzeschockproteinähnliches Protein, beschrieben. Es wird vermutet, dass es bei der Anheftung und der anschließenden Phagozytose des Erregers eine entscheidende Rolle spielt (JARK et al., 1997; ELLINGSON et al., 1998; COUSSENS et al., 2003; BÜTTNER et al., 2005).

Bislang wurden wenige Virulenzfaktoren beschrieben. Vermutlich erfolgt die Anheftung an die Darmschleimhaut mit Hilfe eines Fibronektin bindenden Proteins. Zudem wurde ein 35kDa großes Membranprotein beschrieben, welches ebenfalls eine Rolle bei der Invasion boviner Epithelzellen spielt. Die

Antigenfamilie Ag85, bestehend aus Ag85A, Ag85B und Ag85C ist in der Lage, an die C-Untereinheit von Fibronektin zu binden, weshalb vermutet wird, dass Ag85 ebenfalls eine Rolle bei der Invasion der Wirtszelle spielt (SECOTT et al., 2001; SECOTT et al., 2002; KUO et al., 2012).

### 2.2.3 Tenazität

MAP besitzt eine sehr hohe Tenazität und kann einen Zeitraum von bis zu neun Monate im stehenden Gewässer und bis zu elf Monate in den Faeces erkrankter Rinder auf der Weide überleben. Das Vorkommen des Erregers soll in Gegenden mit niedrigem Boden-pH und hohem Eisengehalt erhöht sein. (LARSEN et al., 1956; ROSENBERGER, 1978; KLEE, 2003).

Aufgrund seiner hohen Thermostabilität kann der Erreger sowohl niedrige, als auch hohe Temperaturen lange überleben. So gelang LARSEN et al. (1956) die kulturelle Anzüchtung von MAP aus Rinderfaeces bei einer Lagertemperatur der Proben von  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  noch nach 365 Tagen. In einer Studie von RAIZMAN et al. (2011) lag die Überlebenszeit von MAP in Faeces bei Temperaturen von  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  jeweils bei 740 Tagen im Mittel (Maximum: 1042 Tage, Minimum: 112 Tage). MAP kann aber auch hohe Temperaturen, wie sie bei der Pasteurisierung angewendet werden, überleben. In der Milchwirtschaft werden unterschiedliche Erhitzungsverfahren angewendet. Die traditionelle Pasteurisierung der Milch erfolgt z. B. durch die Kurzerhitzung (**high-temperature, short-time**) bei  $+72\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $+75\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 bis 30 Sekunden. Ultrahecherhitze Milch wird durch das UHT-Verfahren (**ultra-high-temperature**) bei über  $+135\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mindestens eine Sekunde erzeugt. Bei ultrahecherhitzter Milch wird das Überleben vermehrungsfähiger MAP nach dem Erhitzungsprozess ausgeschlossen. MAP kann jedoch, wie oben erwähnt, das traditionelle Pasteurisierungsverfahren überleben (BÜTTNER et al., 2005). So beschrieb GRANT et al. (1996) die Isolierung und Kultivierung von MAP aus natürlich kontaminierter Milch, die einem Pasteurisierungsverfahren unterzogen wurde. Jedoch konnte HAMMER (2011) mit Hilfe artifiziell kontaminierter Milch nachweisen, dass durch das Pasteurisierungsverfahren eine Reduktion vermehrungsfähiger Paratuberkuloseerreger um mindestens vier Zehnerpotenzen erfolgt.

## 2.3 Paratuberkulose

Im Gegensatz zur Erforschung der Paratuberkulose bei Rindern, gibt es bei Wildwiederkäuern nur wenig Literatur. Da beide Tierarten jedoch mit dem Biotyp II des Erreger infiziert werden können und eine gegenseitige Übertragung des Erregers angenommen wird, wurden in der vorliegenden Arbeit Rinder als Vergleichstierart zum Rothirsch herangezogen, sofern keine Literatur zu Wildwiederkäuern vorlag (SELBITZ, 2002; CORN et al., 2005; DEUTZ und SPERGSER, 2009).

### 2.3.1 Definition und historischer Rückblick

Die Paratuberkulose ist eine chronische Enteritis der Haus-, Wild- und Zoowiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* hervorgerufen wird. Es handelt sich hier um eine weltweit verbreitete, ansteckende, bislang unheilbare Erkrankung des Magen-Darm-Trakts, deren klinischer Verlauf durch chronische Durchfälle und Kachexie gekennzeichnet ist und stets einen tödlichen Verlauf nimmt (KLEE, 2003; WINKELMAYER et al., 2008).

Erstmals beschrieben wurde die Paratuberkulose von dem Veterinärpathologen JOHNE, als „*ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose*“ im Jahr 1895. Ihm gelang zusammen mit FROTHINGHAM der Nachweis von säurefesten Stäbchen im veränderten Gewebe. Von JOHNE leitet sich auch das häufig verwendete Synonym der JOHNESCHEN Krankheit für die Paratuberkulose ab. Seit dem Jahr 1906 gilt die Paratuberkulose aufgrund eines Vorschlages von BANG als eigenständige Krankheit abgetrennt von der Tuberkulose. Erst im Jahre 1912 gelang TWORT und INGRAM die Anzüchtung des Erregers durch den Zusatz von hitzeinaktiviertem, getrocknetem Koloniematerial von *Mycobacterium phlei* zum ursprünglichen Nährmedium. SIGURDSSON definierte 1954 den Begriff der „slow infections“, die sich u. a. durch ihre lange Inkubationszeit auszeichnen. Neben Paratuberkulose zählte er auch Maedi und Scrapie dazu (HARRIS und BARLETTA, 2001; BÜTTNER et al., 2005; N.N., 2011a).

### 2.3.2 Wirtsspektrum

Von der Paratuberkulose sind primär Haus- und Wildwiederkäuer betroffen, daneben wurden positive Erregernachweise auch aus Untersuchungsmaterial vieler monogastrischer Tiere, wie z.B. Pferd, Hund, Schwein, Esel und Affen geführt. Bei den zuletzt genannten Tieren bleiben klinische Symptome jedoch meist aus (CHIODINI et al., 1984). BEARD et al. (2001a) gelang, MAP aus Untersuchungsmaterial von Füchsen, Krähenvögeln, Ratten, Waldmäusen, Hasen und Dachsen zu isolieren.

In einer Studie in der Steiermark wurden zwischen Juni 2002 und August 2008 Proben von insgesamt 717 Wildtieren mittels PCR auf MAP untersucht. Es wurden vierzehn verschiedene Wildtierspezies beprobt. Lediglich aus Untersuchungsmaterial von Wildkaninchen, Dachs und Feldhase konnte kein MAP isoliert werden. Bei den übrigen elf Wildtierspezies konnte bei mindestens einem Tier MAP nachgewiesen werden. Die Proben, Mesenterial- und Portallymphknoten, stammten sowohl von gefallenem, als auch von erlegtem Wild. Die Tiere waren bis auf zwei Exemplare Damwild, die in Gattern gehalten wurden, alle aus freier Wildbahn. Tabelle 1 zeigt die zwischen Juni 2002 und August 2008 in der Steiermark untersuchten Wildtierspezies und die Anzahl der MAP positiven Tiere (DEUTZ und SPERGSER, 2009).

**Tabelle 1: PCR-Ergebnisse einer Studie in der Steiermark zum Vorkommen von MAP, Juni 2002 bis August 2008 [Quelle: DEUTZ und SPERGSER, 2009].**

<b>Spezies</b>	<b>Anzahl gesamt</b>	<b>Mittels PCR positiv auf MAP getestet</b>
<b>Rotwild</b>	127	34
<b>Rehwild</b>	357	99
<b>Gamswild</b>	69	12
<b>Mufflon</b>	16	5
<b>Damwild</b>	4	3
<b>Steinwild</b>	4	3
<b>Fuchs</b>	106	4
<b>Dachs</b>	1	0
<b>Feldhase</b>	3	0
<b>Schneehase</b>	1	1
<b>Wildkaninchen</b>	1	0
<b>Murmeltier</b>	1	1
<b>Mäuse</b>	18	1
<b>Vögel</b>	9	1
<b>Gesamt</b>	717	164

### 2.3.3 Verbreitung

Die Paratuberkulose ist weltweit verbreitet. In Deutschland ist die Paratuberkulose bei klinisch erkrankten Rindern meldepflichtig. Die Anzahl der Meldungen stieg von 290 im Jahr 2005 auf 429 im Jahr 2010 an (PROBST und KUBITZA, 2010; KÖHLER und MÖBIUS, 2011).

Tabelle 2 zeigt das Vorkommen von gemeldeten Neuausbrüchen in Rinderbetrieben in Deutschland im Laufe des Jahres 2010 (KÖHLER und MÖBIUS, 2011).

**Tabelle 2: Anzahl der gemeldeten Neuausbrüche von Paratuberkulose in Rinderbeständen in Deutschland im Jahr 2010 [Quelle: KÖHLER UND MÖBIUS, 2011]**

<b>Tierart</b>	<b>Anzahl der Meldungen</b>
<b>Rinder</b>	411
<b>Schafe</b>	10
<b>Ziegen</b>	6
<b>Wild</b>	1
<b>Sonstige</b>	1
<b>Gesamt</b>	429

Abbildung 1 zeigt die regionale Verteilung der zwischen 1995 und 2009 gemeldeten Paratuberkulosefälle in Deutschland (PROBST und KUBITZA, 2010).

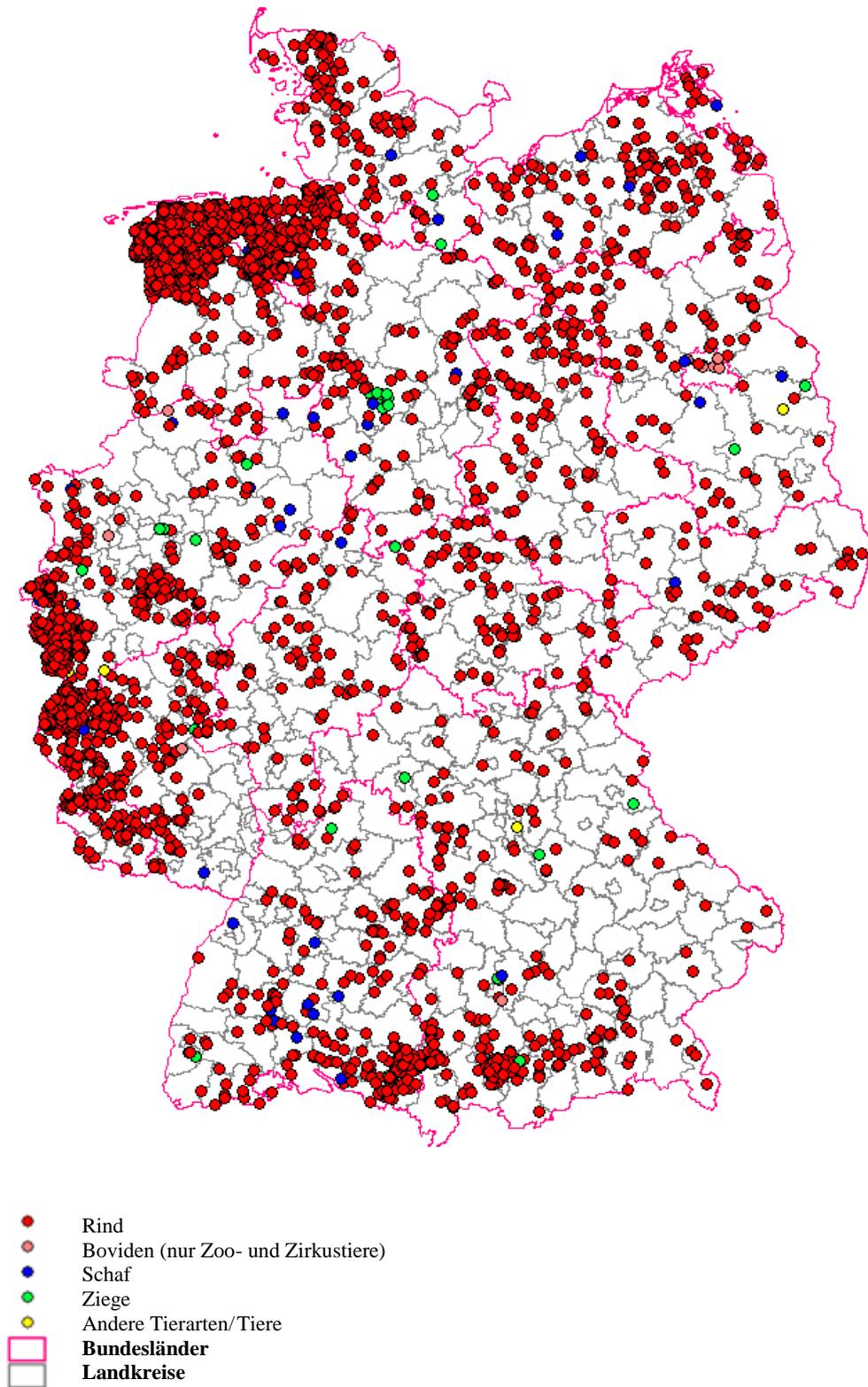


Abbildung 1: Regionale Verteilung der zwischen 1995 und 2009 gemeldeten Paratuberkulosefälle in Deutschland [Quelle: PROBST und KUBITZA, 2010]

Die offizielle Statistik spiegelt die epidemiologische Situation nicht korrekt wider, da nur die Zahlen von klinisch erkrankten Rindern erfasst werden. Es ist davon auszugehen, dass die eigentlichen Fallzahlen wesentlich höher sind. Dies trifft besonders auf Tiere zu, die sich in der Latenzphase befinden (KLEE, 2003). Die Paratuberkulose kommt zudem, wie oben ausgeführt, auch bei vielen anderen Tierarten vor.

Um das eigentliche Paratuberkulosevorkommen abschätzen zu können, wurden in vielen Ländern zahlreiche Untersuchungen bei verschiedenen Tierarten durchgeführt. In Tabelle 3 sind einige dieser Studien bei Rindern und kleinen Hauswiederkäuern mit den entsprechenden Einzeltier- und Herdenprävalenzen aufgelistet.

**Tabelle 3: Nachweis MAP positiver Rinder, Einzeltiere/Herden, in unterschiedlichen Ländern unter Berücksichtigung der Probenanzahl (Rd = Rind, Lnn. = Lymphknoten, k.A. = keine Angabe)**

Land/ Zeitraum	Tierart/ Anzahl/ Matrix	Methode	MAP positive Herden	MAP positive Einzeltiere	Autoren
Deutschland Thüringen (2000–2004)	Rd, ca. 20.000 Milchproben	ELISA	80 %	13,0 %	ELSCHNER, 2005
Deutschland Thüringen (2000–2004)	Rd, 43.000 Blutproben	ELISA	k.A.	8,8 %	ELSCHNER, 2005
Deutschland Thüringen (2010)	Rd, 29.318 Faecesproben	Kultur	k.A.	3,9 %	SCHAU, 2011
Deutschland Brandenburg (2004)	Rd, 269 Blutproben	ELISA	k.A.	14,1 %	ORTMANN et al., 2005
Deutschland Brandenburg (2004)	Rd, 238 Milchproben	ELISA	k.A.	1,7 %	ORTMANN et al., 2005
Deutschland Sachsen (2002–2004)	Rd, 55.394 Blutproben	ELISA	k.A.	3,9 %	DONAT, 2005
Deutschland Sachsen- Anhalt (2003–2004)	2003: Rd, 261 Faecesproben 2004: Rd, 141 Faeces	PCR	k.A.	2003: 17 % 2004: 10 %	SCHLIEP- HAKE et al., 2005
Deutschland Bayern 2004	Rd, 2748 Serumproben	ELISA	20 % <sup>1</sup> 12 % <sup>2</sup>	1,5 % <sup>1</sup> 0,9 % <sup>2</sup>	BÖTTCHER et al., 2005

Tabelle 3, Fortsetzung

Land/ Zeitraum	Tierart/ Anzahl/ Matrix	Methode	MAP positive Herden	MAP positive Einzeltiere	Autoren
Deutschland Nordrhein- Westfalen (2002–2003)	Wanderschafe, 28 Herden Stichproben Blutproben	ELISA	50 %	k.A.	VOGEL et al., 2005
Belgien (1997–1998)	Rd, 13317 Serumproben	ELISA	18 %	2,9%	BOELAERT et al., 2000
Dänemark (1999)	Rd, Tankmilch 900 Herden	ELISA	70 %	k.A.	NIELSEN et al., 2000
Österreich (2006)	Rd, 756 Blutproben	ELISA	k.A.	19%	DREIER et al., 2006
Portugal (2009)	Schafe, 3900 Blutproben	ELISA	k.A.	3,7%	COELHO et al., 2010
Niederlande	Rd, 90 Herden Serumproben	ELISA	54,3 %	5,8%	VAN SCHAİK et al., 2003
USA (2010–2011)	Färsen, 1842 Faecesproben	Kultur	k.A.	2,0%	BOLTON et al., 2011

<sup>1</sup> = ELISA der Firma Idexx (Fr.- Montpellier); <sup>2</sup> = ELISA der Firma Pourquier (Fr.- Montpellier)

In einer Studie von HOFFMANN und BÖTTCHER (2005) wurde die Verbreitung der Paratuberkulose bei Rindern in Bayern untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass in einer Region nördlich von Passau (Bayerischer Wald, Oberpfalz bis nach Oberfranken) signifikant weniger Seroreagenten gefunden wurden, als südlich der Donau (bis in die Voralpen). Als mögliche Gründe wurden das Verkaufs- und Zukaufverhalten der Landwirte und die vermehrte Weidehaltung südlich der Donau diskutiert.

Zur Prävalenzabschätzung der Paratuberkulose bei Wildtieren wurden v.a. bei Wildwiederkäuern in verschiedenen Ländern ebenfalls Studien durchgeführt. Tabelle 4 zeigt einige diese Studien unter Berücksichtigung der Tierart, der verwendeten Methode und der Herden- bzw. Einzeltierprävalenz.

**Tabelle 4: Nachweis von MAP bei Wildtieren in unterschiedlichen Ländern unter Berücksichtigung der Probenanzahl (RehW = Rehwild, RW = Rotwild, Lnn. = Lymphknoten, k.A.= keine Angabe, Z-N = ZIEL-NEELSEN-Färbung)**

<b>Land/ Zeitraum</b>	<b>Tierart/ Anzahl/ Matrix</b>	<b>Methode</b>	<b>MAP positive Herden</b>	<b>MAP positive Einzeltiere</b>	<b>Autoren</b>
Deutschland Hessen 1980	RW, 96 Serumproben	KBR	k.A.	7,3%	WEBER und CHRISTOPH, 1980
Deutschland Hessen 1980	RehW, 169	KBR	k.A.	3,6%	WEBER und CHRISTOPH, 1980
Tschechische Republik (1997–1998)	RW, 132 Faeces, Gewebeproben	Kultur	k.A.	7,1%	PAVLIK et al., 2000
Tschechische Republik (1997–1998)	RehW, 336 Faeces, Gewebeproben	Kultur	k.A.	1,5%	PAVLIK et al., 2000
Tschechische Republik (2004–2006)	RW, 2212 Faecesproben	Kultur	k.A.	1 Tier	PRIBYLOVA et al., 2011
Schottland (2002–2003)	Wildkaninchen 252 Darmteile	Kultur	k.A.	39,7%	JUGDE et al., 2005
Irland (1993)	RW, 70 Faecesproben	Z-N	k.A.	3 Tiere	POWER et al., 1993
Österreich (2002–2008)	RW, 127 Mesenterial-/ Portallnn.	PCR	k.A.	26,7%	DEUTZ UND SPERSGER, 2009
Österreich (2002–2008)	RehW, 357 Mesenterial-/ Portallnn.	PCR	k.A.	27,8%	DEUTZ UND SPERSGER, 2009
Spanien	RW, 852 Serumproben	ELISA	k.A.	30,2%	REYES- GARCÍA et al., 2008
Niederlande	Gatter-RW, 8 Herden, Serum	ELISA	50%	k.A.	PIETERSE et al., 2010
USA (1998)	Elche, 45 Blutserum, Faeces	ELISA Kultur	k.A.	ELISA: 40% Kultur: 13%	MANNING et al. , 2003
USA (1998–2002)	RehW, 313 Blutserum, Faeces und Lnn.	ELISA Kultur	k.A.	ELISA: 2,0% Kultur: 0,3%	DAVIDSON et al., 2004
USA (2000)	Elche, 37 Faecesproben	Kultur	k.A.	1 Tier	CRAWFORD et al., 2006

In einigen weiteren Untersuchungen konnte MAP bei Rothirschen aus Gatterhaltung oder der freien Wildbahn nachgewiesen werden. In Neuseeland beispielsweise konnte in den Jahren 1986-2000 MAP kulturell und/oder molekularbiologisch bei 619 Gatterhirschen nachgewiesen werden. Lediglich 5,8 % der Hirsche wiesen klinische Symptome der Paratuberkulose auf. Die 619 Tiere stammen aus 299 unterschiedlichen Herden, dies entspricht ca. 6 % der Rothirschherden in Neuseeland. Bei 60 % der 299 Herden konnte MAP nur bei einem Tier nachgewiesen werden, die höchste Anzahl positiver Hirsche in einer Herde waren 47 Tiere (DE LISLE et al., 2003).

In einer tschechischen Rothirschherde konnte nach Zukauf von schottischen Hirschkühen ein Anstieg der Paratuberkulose beobachtet werden. Im ersten Jahr der Untersuchung konnte bei keinem der 50-100 Tiere Antikörper gegen MAP nachgewiesen werden, im zweiten Jahr waren 7,7 % und im dritten Jahr 88,5 % der Hirsche serologisch positiv. Klinische Symptome der Paratuberkulose konnten im dritten Jahr bei vier Tieren beobachtet werden (KOPECNA et al., 2008).

Aktuelle Studien zur Prävalenzabschätzung bei Wildwiederkäuern in Deutschland, Polen, Schweden oder Russland liegen in der Literatur nicht vor. Nach persönlicher Mitteilung (LIPIEC, 2012) wurde im Norden Polens eine Rotwildherde mit 1000 Tieren auf Paratuberkulose untersucht. Serologisch, molekularbiologisch und kulturell waren davon 15 Tiere positiv. Paratuberkulose typische Symptome zeigten 3 Tiere. Die Paratuberkulose bei diesen Tieren war vermutlich auf importierte Rothirsche zurückzuführen.

Anhand der Studien wird ersichtlich, dass die Paratuberkulose weltweit verbreitet ist und überall dort gefunden werden kann, wo nach ihr gesucht wird. Bei den aufgezählten Studien wurden Einzeltierprävalenzen zwischen  $< 0,1$  % und 40 % und Herdenprävalenzen zwischen 12 % und 80 % ermittelt. Je nach Gebiet, beprobter Tierart, Probenmatrix und verwendetem Nachweisverfahren unterscheiden sich die Zahlen massiv. Aufgrund der Variabilität des Studiendesigns ist eine Vergleichbarkeit dieser Prävalenzstudien nicht gegeben (BOELAERT et al., 2000; KLEE, 2007).

### 2.3.4 Empfänglichkeit und Übertragung

Juvenile Rinder bis zu einem Alter von sechs Monaten sind am empfänglichsten für eine Infektion mit Paratuberkulose. Ab einem Alter von eineinhalb bis zwei Jahren unter natürlichen Bedingungen sind Rinder weitgehend resistent gegenüber Neuinfektionen (CLARKE, 1994; KLEE, 1987).

Die häufigste Übertragung von MAP erfolgt fäkal-oral, beispielsweise durch das Saugen der Kälber an verschmutzten Zitzen der Muttertiere oder über eine Aufnahme der Erreger durch fäkalverunreinigte Böden. Erregerhaltige Faeces stellen die größte Infektionsquelle für Paratuberkulose dar, da über Faeces infizierter Tiere sehr viele Erreger ausgeschieden werden. Die minimale Infektionsdosis pro Kalb liegt laut GERLACH (2002) bei  $10^4$  Erregern. Experimentell erkrankten 100 % der Kälber nach Gabe einer oralen Erregerdosis von  $10^6$  KbE. Rinder scheiden in der klinisch inapparenten Phase der Erkrankung ca.  $10^1$ - $10^2$  KbE/g Faeces aus. Bei klinisch erkrankten Tieren liegt die Erregerausscheidung über Faeces sogar bei ca.  $5 \times 10^{12}$  KbE pro Tag (CHIODINI et al., 1984; SWEENEY et al., 1994; HARRIS und BARLETTA, 2001; FRY und MCGAVIN, 2009).

Bei Hirschen konnte ebenfalls ein starker Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und der Empfänglichkeit für die Erkrankung beobachtet werden. In einer Langzeitstudie von MACKINTOSH et al. (2010) wurden Rothirsche mit einer oralen Erregerdosis von  $10^9$  KBE infiziert und über 50 Wochen hinweg beobachtet. Es wurden dreißig 3 Monate alte Hirschkalber, zwanzig 15 Monate alte Jährlinge und zwanzig adulte Hirsche mit MAP infiziert. Es konnten klinische Symptome bei zehn der Hirschkalber, jedoch bei keinem Jährling oder adultem Tier beobachtet werden. Antikörper konnten bei 24 der 28 untersuchten Kälber, bei 13 der 17 Jährlinge und lediglich bei drei der 20 adulten Hirsche nachgewiesen werden.

Die Übertragung von MAP kann auch über andere Wege erfolgen. In geringeren Mengen wird der Erreger über die Milch ausgeschieden. Es werden Erregerkonzentrationen von 2 bis 8 KbE pro 50 ml bzw. 20 bis 160 KbE pro kg Milch bei klinisch infizierten Rindern beschrieben (STABEL et al., 2001; HAMMER, 2011).

Relativ häufig kommt auch eine vertikale Übertragung des Erregers von Kuh zu Kalb vor. So wird von SEITZ et al. (1989) das Risiko für das Kalb einer klinisch

erkrankten Kuh intrauterin mit MAP infiziert zu werden, auf 26% geschätzt. DEUTZ et al. gelang 2003 der Erstdnachweis der intrauterinen Übertragung von Paratuberkulose bei Rot- und Gamswild.

Theoretisch ist auch eine Übertragung der Paratuberkuloseerreger durch erregerehaltige Nematoden möglich. LLOYD et al. (2001) kontaminierte nematodenhaltige Faeces von Schafen artifiziell mit MAP und konnte aus allen drei in den Faeces enthaltenen Nematodenspezies (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*) überlebensfähige Erreger isolieren. Eine Übertragung der Paratuberkulose durch erregerehaltige Zecken und Stechmücken ist laut DEUTZ und SPERGSER (2009) ebenfalls nicht ausgeschlossen.

Es kann auch zu einer Wirtsspezies übergreifender Übertragung kommen. So gelang es BEARD et al. (2001b) Kälber mit MAP-Isolaten aus Wildkaninchen zu infizieren. Die infizierten Kälber zeigten nach sechs Monaten paratuberkulose-typische Veränderungen am Darm. Diese Darmveränderungen waren nicht von solchen zu unterscheiden, die von MAP-Isolaten aus Rindern hervorgerufen werden. Auch fanden DEUTZ und SPERGSER (2009) in ihren Untersuchungen heraus, dass im Untersuchungsgebiet Steiermark die Infektionen der Wildtierbestände von wenigen, genetisch eng verwandten MAP-Stämmen des Rind-Typs ausgingen. Daher gehen die Autoren davon aus, dass eine Übertragung des Erregers von Rindern auf Wildtiere, beispielsweise durch kontaminierte Weide- bzw. Äsungsflächen, sehr wahrscheinlich ist. CORN et al. (2005) sieht zudem eine große Gefahr darin, dass infizierte Wildwiederkäuer ein Reservoir für Paratuberkulose darstellen und Rinderherden mit MAP infizieren. Auch Untersuchungen von FRITSCH et al. (2012) lassen vermuten, dass es zu einer Übertragung von MAP zwischen Rothirschen und Rindern kommt.

### **2.3.5 Pathogenese, Pathologie und klinisches Bild der Paratuberkulose**

Die Pathogenese der Erkrankung wurde von TOOKER et al. (2002) wie folgt beschrieben. Nach der oralen Aufnahme wird der Erreger von M-Zellen (engl.: microfold cells) im Gastrointestinaltrakt aufgenommen. M-Zellen besitzen ihren Namen aufgrund membranöser Mikrofalten an ihrer Oberfläche. Die M-Zellen transportieren den Erreger an das darmassoziierte lymphatische Gewebe (engl.: **gut-associated lymphoid tissue; GALT**). Nach Freisetzung aus den M-Zellen wird MAP von den Makrophagen phagozytiert. In den Makrophagen können die Erreger lange Zeit überleben und sich vermehren. Das Stadium der Paratuberkuloseinfektion eines Tieres hat keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Makrophagen das Bakterium abzutöten (GOLLNICK et al., 2007).

Bei den entstehenden histopathologischen Veränderungen am Magen-Darm-Trakt (MDT) und den regionären Lymphknoten (Ln. ileocaecalis und Lnn. mesenteriales), handelt es sich um einen diffusen Typ der granulomatösen Entzündung mit einer Ansammlung von Makrophagen, wenigen Lymphozyten und Plasmazellen. Die histologischen Läsionen beim Rind werden nach GONZÁLES et al. (2005) in fünf Formen unterteilt. Die Unterteilung der Läsionen ist abhängig von ihrem Ausprägungsgrad, der Lokalisation und Verteilung, dem vorliegendem Zelltyp und der Anwesenheit und Anzahl säurefester Stäbchen (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Unterteilung der histopathologischen Läsionen bei MAP-infizierten Rindern [Quelle: Gonzáles et al., 2005]**

<b>Typ</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>dominierender Zelltyp</b>	<b>Anzahl säurefester Stäbchen</b>
<b>fokale Läsionen</b>	Lymphknoten, ileocaecales Lymphgewebe	Epitheloidzellen Riesenzellen	keine bis wenige
<b>multifokale Läsionen</b>	Lymphknoten Lamina propria	Epitheloidzellen Riesenzellen	keine bis mäßig viele
<b>diffuse multibazilläre Läsionen</b>	diffus	Epitheloidzellen	viele
<b>diffuse lymphozytäre Läsionen</b>	diffus	Lymphozyten Riesenzellen	vereinzelt
<b>diffuse intermediäre Läsionen</b>	diffus	Lymphozyten Epitheloidzellen Riesenzellen Plasmazellen	wenige

Die histopathologischen Läsionen bei Hirschen sind in der frühen Form der Erkrankung häufiger in den mesenterialen Lymphknoten als im intestinalen Gewebe zu finden. In der fortgeschrittenen Form der Erkrankung konnte dieser Unterschied nicht mehr beobachtet werden. Daneben können in der frühen Form der Erkrankung beim Hirschen weniger Bakterien in den Läsionen nachgewiesen werden, als in der fortgeschrittenen Form (CLARK et al., 2010).

Bei kleinen Wiederkäuern tritt in den Läsionen in 50% der Fälle Verkäsung, Verkalkung und bindegewebige Demarkation auf.

Durch die granulomatöse Enteritis wird die normale Zottenarchitektur des Dünndarms zerstört. Es kommt in Folge einer Zottenverkürzung und Zottenfusion zu Maldigestion, Malabsorption und osmotischer Diarrhoe. Charakteristische, makroskopisch sichtbare, pathologische Veränderungen sind beim Rind eine hirnwindenähnliche, hochgradige Verdickung der Ileumschleimhaut, sowie eine hochgradige Verdickung der regionären Lymphknoten. Eine Mineralisation der Aorta kann für die Paratuberkulose der Rinder spezifisch sein. Es wird vermutet, dass diese Arteriosklerose als Folge der sich entwickelnden Kachexie und einer hyperkalzämischen Stoffwechsellaage entsteht (FRY und MCGAVIN, 2009; N.N., 2011a).

Es werden beim Rind **drei Phasen** des Krankheitsverlaufs unterschieden. Der Verlauf der Erkrankung ist stark abhängig von der Resistenzlage, dem Alter und der aufgenommenen Erregermenge. Die **frühe subklinische Phase**, ohne klinisches Erscheinungsbild und ohne Bakterienausscheidung, ist durch die wenigen im Organismus befindlichen Bakterien und die sehr geringen Läsionen am Magen-Darm-Trakt (MDT) sehr schwierig nachzuweisen. Dieser Krankheitsabschnitt kann beim Rind zwei bis zehn Jahre dauern. Anschließend folgt die **späte subklinische Phase**. In diesem Stadium sind noch keine klinischen Symptome erkennbar, jedoch kommt es schon zu ersten Läsionen am MDT und zu einer intermittierenden Erregerausscheidung. Dieses Stadium erstreckt sich beim Rind meist über einen Zeitraum von nur wenigen Monaten. Die anschließende **klinische Phase** ist durch deutliche klinische Symptome und eine hochgradige Erregerausscheidung von bis zu  $5 \times 10^{12}$  KbE pro Tag gekennzeichnet. Diese Phase führt in der Regel nach Wochen bis Monaten zum Tod. Bei Rindern ist sie durch unstillbare Durchfälle bei erhaltenem Appetit und gleichzeitig hochgradiger Abmagerung gekennzeichnet. Häufig kommt es nach einer Stresssituation, z. B. in Folge von Abkalbung, Transport, Ortswechsel oder Labmagenverlagerung zum Ausbruch der klinischen Phase der Erkrankung. Bei Schafen und Ziegen verläuft die Erkrankung ähnlich, jedoch kommt Diarrhoe als klinisches Symptom so gut wie nie vor (CHIODINI et al., 1984; KLEE, 1987; WHITLOCK und BUERGELT, 1996; CLARKE, 1997; KLEE, 2003; FRY und MCGAVIN, 2009).

Das Erscheinungsbild der Paratuberkulose bei Wildwiederkäuern unterscheidet sich von jenem beim Rind. Durchfall tritt bei den erkrankten Wildtieren nur in ca. 20% der Fälle auf und die beim Rind typische, hirnwindenähnliche Verdickung der Darmwand ist nicht bzw. nur sehr gering ausgeprägt. Zudem treten die klinischen Symptome der Erkrankung viel früher auf als beim Rind. So konnte schon bei vier bis sechs Monate alten Kitzen und Kälbern von Reh-, Gams- und Rotwild ein ausgeprägtes Krankheitsbild beobachtet werden. Paratuberkulose verdächtig sind abgemagerte Wildwiederkäuer, Tiere mit verzögertem Haarwechsel und solche mit chronischem Durchfall. Chronischer Durchfall ist am verschmutzten Spiegel oder Haarausfall an den Sprunggelenken erkennbar (DEUTZ, 2004; WINKELMAYER et al., 2008). Abbildung 2 zeigt einen paratuberkuloseverdächtigsten, abgemagerten Rothirsch mit Spuren von Durchfall (DEUTZ, 2004).



**Abbildung 2: Abgemagerter Rothirsch mit Durchfall [Quelle: Deutz, 2004]**

Vergrößerte Darmlymphknoten können ebenfalls, wie in Abbildung 3 zu sehen ist, einen Hinweis auf eine Infektion mit Paratuberkulose geben (DEUTZ, 2004).



**Abbildung 3: Vergrößerte Darmlymphknoten (Pfeile) bei einem Rothirsch [Quelle: Deutz, 2004]**

### 2.3.6 Diagnose der Paratuberkulose

Bei einem klinisch erkrankten Tier sind die deutlichen klinischen Symptome, wie bereits in den Abschnitten 2.3.1 und 2.3.5 beschrieben, der wichtigste Hinweis auf eine Paratuberkuloseerkrankung. Differenzialdiagnostisch kommen beim Rind Amyloidnephrosen, Fasziolose, chronischer Kupfermangel, die chronische Form der Salmonellose, die chronische Form der bovinen Virusdiarrhoe, Leberabszesse und die Leukose in Frage. Einige der Differenzialdiagnosen, wie beispielsweise die Amyloidnephrose und die Salmonellose, lassen sich leicht durch eine Palpation der linken Niere bzw. eine bakteriologische Untersuchung von Faeces ausschließen. Um andere Erkrankungen, wie beispielsweise die Leukose bzw. die chronische Form der bovinen Virusdiarrhoe abklären zu können, ist eine serologische Untersuchung bzw. ein Virusnachweis notwendig. Bei der differenzialdiagnostischen Abklärung ist zu beachten, dass sich diese Krankheiten nicht gegenseitig ausschließen und daher auch parallel bei Rindern eines Bestandes vorkommen können (KLEE, 1987; KLEE, 2003).

Bei subklinisch erkrankten Tieren ist der Nachweis der Erkrankung durch das Fehlen klinischer Symptome und die intermittierende Erregerausscheidung erschwert. Der Nachweis der Paratuberkulose ist in diesem Stadium jedoch von größerer wirtschaftlicher Bedeutung, da bei Rindern durch den Rückgang der Milchleistung große wirtschaftliche Schäden entstehen (KLEE, 2003; Büttner 2005).

Es gibt, wie nachfolgend ausgeführt, sowohl direkte, als auch indirekte Methoden des Erregernachweises. Um einen Paratuberkulosefall sicher diagnostizieren zu können, ist die Kombination verschiedener Nachweisverfahren empfehlenswert. So kann z.B. ein klinischer Verdacht, der durch den mikroskopischen Nachweis von säurefesten Stäbchen bestätigt wird, oder ein klinischer Verdacht, der durch einen Genomnachweis aus Faeces, Dünndarmschleimhaut oder Mesenteriallymphknoten bekräftigt wird, die Diagnosefindung erleichtern (PROBST und KUBITZA, 2011). PINEDO et al. (2008) empfiehlt v.a. das ELISA-Verfahren kombiniert mit einer PCR von Faeces zur Paratuberkulosedagnostik, da diese Kombination in seinen Untersuchungen die höchste Sensitivität aufwies.

### **2.3.6.1 Direkter Erregernachweis**

#### **2.3.6.1.1 Mikroskopie**

Der mikroskopische Erregernachweis kann in Ausstrichen von Faeces oder in Abklatschpräparaten von veränderten Darmabschnitten oder Lymphknoten erfolgen. Die säurefesten Stäbchen lassen sich gut mit der ZIEHL-NEELSEN-Färbung anfärben. Durch die gleichzeitige Einwirkung von Beize und Hitze wird die mykobakterielle Zellwand durchlässig für den Farbstoff Karbolfuchsin, wodurch die Mykobakterien rot angefärbt werden. Die umliegende Matrix wird anschließend, nachdem sie durch ein Gemisch aus Alkohol und Salzsäure wieder entfärbt wurde, mit dem Farbstoff Methylenblau angefärbt. Die Mykobakterien stellen sich dann in typischer Weise in Form von leuchtend roten Nestern auf blauem Grund dar. Bei Organproben wird auch eine Akaridin-Orange-Färbung empfohlen (SELBITZ, 2002; PROBST und KUBITZA, 2011).

Die Mikroskopie ist kostengünstig und eignet sich v. a. bei klinisch erkrankten Tieren, da hier eine hohe Erregerausscheidung pro Tag erfolgt (s. Kapitel 2.3.5). Durch die relativ niedrige analytische Sensitivität dieser Methode gelingt laut ZIMMERER (1999) ein Erregernachweis bei subklinisch infizierten Tieren nur in 19% aller kulturell positiv getesteten Faecesproben. Bei der mikroskopischen Untersuchung von veränderten Darmabschnitten und den dazugehörigen Lymphknoten ist die Nachweisrate höher (PROBST und KUBITZA, 2010). In Biopsien der Rektumschleimhaut finden sich laut FRY und MCGAVIN (2009) säurefeste Stäbchen in 60% der paratuberkulosepositiven Fälle.

#### **2.3.6.1.2 Kultur**

Die kulturelle Anzucht des Erregers erfolgt auf mycobaktinhaltigen Nährböden z. B. dem HERROLD'S Egg Yolk-Schrägagar. Durch die langsame Wachstumsrate des Erregers sind Kolonien erst nach vier bis fünf Wochen mit einer Lupe und nach fünf bis sechs Wochen makroskopisch als kleine, weißlich-graue Kolonien erkennbar (s. Kapitel 2.2.1). Die Kolonien zeigen ein weißlich-graues, glattes, glänzendes Aussehen und wachsen halbkugelig mit einem Durchmesser von bis zu 5 mm. Bei einer geringen Erregermenge werden teilweise erst nach zwölf Wochen wenige Kolonien sichtbar. Bei kleinen Wiederkäuern und Wildtieren können auch extrem langsam wachsende, gelb-orange Kolonien auftreten. Um das

häufig auftretende Fremdwachstum durch Begleitflora und Schimmelpilze auf den Nährböden zu minimieren, ist eine Dekontamination der Faeces bzw. Organproben notwendig. Es empfiehlt sich eine Dekontamination mit 0,75%iger HPC-Lösung (Hexadecylpyridiniumchlorid-Lösung) über einen Zeitraum von 48 Stunden, um die Nachweisrate nach sechs Wochen Kulturzeit zu optimieren (PROBST und KUBITZA, 2011).

Die Kultur zählt als „Goldstandard“ unter den Nachweismethoden. Sie besitzt eine hohe diagnostische Spezifität von 98% und bei einer einmaligen Untersuchung von Faeces eine diagnostische Sensitivität von ca. 65% (NIELSEN et al., 2002). Die relativ niedrige diagnostische Sensitivität ist der intermittierenden Erregerausscheidung bei subklinisch infizierten Tieren und der schwierigen Anzucht durch die häufige Überwucherung der Kultur mit Fremdkeimen zuzuschreiben. Laut MERKAL (1973) sind für eine erfolgreiche Erregeranzucht 50–100 MAP/g Faeces erforderlich.

Um einen positiven kulturellen Befund zu bestätigen, müssen Subkulturen angefertigt werden und anschließend die dort wachsenden Kolonien mittels ZIEHL-NEELSEN-Färbung als säurefeste Stäbchen identifiziert, oder eine MAP-spezifische PCR des Koloniematerials durchgeführt werden (PROBST und KUBITZA, 2011).

#### **2.3.6.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Um Faeces oder Gewebeproben mittels PCR untersuchen zu können, ist die Extraktion der MAP-DNA notwendig. Als erster Schritt der Extraktion werden die Zellwände der Bakterienzellen thermisch, chemisch und/oder mechanisch lysiert. Anschließend findet die Entfernung von Zelldetritus und Verunreinigungen, z.B. durch Sedimentationsverfahren, statt. Anschließend wird die gewonnene DNA in Puffern resuspendiert. Häufig finden kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits Anwendung. Sie enthalten meist DNA-bindende Membranen beispielsweise auf Siliziumbasis (BOOM, 1990).

Es kommen sowohl konventionelle, als auch Real-time PCR-Verfahren für den MAP-Nachweis zum Einsatz. Die häufigste Zielsequenz beider PCR-Verfahren ist das Insertionselement IS900, welches in 14 bis 18 Kopien im MAP Genom vorkommt, nicht aber bei anderen Mykobakterien. Es wurden auch einige andere MAP-spezifische Zielsequenzen beschrieben, wie beispielsweise die

F57-Sequenz, die Insertionselemente IS1311 und ISMav2 und das HspX-Gen. Das HspX-Gen codiert ein MAP spezifisches hitzeschockproteinähnliches Protein (s. Kapitel 2.2.2). Die F57-Sequenz codiert ein 34 kDa großes Protein. Diese oben genannten Marker kommen jedoch in wesentlich weniger Kopien im MAP-Genom vor als das IS900. F57 und HspX sind jeweils nur mit einer Kopie im MAP-Genom vertreten, das ISMav2 mit drei und das IS1311 mit sieben bis zehn Kopien. IS1311 wurde jedoch ebenfalls bei *M. avium* und *M. intracellulare* nachgewiesen und ist dadurch nicht MAP-spezifisch (GREEN et al., 1989; POUPART et al., 1993; ELLINGSON et al., 1998; STROMMINGER et al., 2001; HARRIS und BARLETTA, 2001; MOTIWALA et al. 2006).

Die PCR als direkte MAP-Nachweismethode besitzt im Vergleich zum kulturellen Nachweis eine niedrigere Sensitivität. Verglichen mit anderen Nachweismethoden wie beispielsweise dem mikroskopischen Nachweis jedoch eine wesentlich höhere Sensitivität (ZIMMERER et al., 1999). So konnte in einer Studie von TADDEI et al. (2004) eine durchschnittliche Sensitivität für MAP von über 60% ermittelt werden. In dieser Studie wurden drei verschiedene PCR-Tests, basierend auf dem Nachweis des Insertionselements IS900, mit dem kulturellen Nachweis bezüglich ihrer Sensitivität und ihrer Spezifität verglichen. Es wurden 100 Proben von Rinderfaeces untersucht und davon 80 mittels kultureller Anzucht als positiv befundet. Mittels der drei PCR-Kits wurden 48, 49 bzw. 54 Proben positiv auf MAP getestet. Die Sensitivitäten lagen somit bei 60%, 61,3% und 67,5%. Die Spezifität lag bei allen drei Kits bei 100%.

VANSNICK (2007) konnte mittels PCR eine Nachweisgrenze von  $10^2$  KBE/g in artifiziell kontaminierten Faeces ermitteln. Durch die intermittierende Erregerausscheidung in der späten subklinischen Phase kommt es in dieser Phase der Erkrankung zeitweilig zu einer geringen MAP-Anzahl in den Faeces. Daher ist eine niedrige Nachweisgrenze entscheidend, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden (WHITLOCK und BUERGELT, 1996).

Nachteilig an der PCR als Nachweismethode für MAP ist, dass meist keine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit des Erregers getroffen werden kann. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Probenmenge, die in die Extraktion eingesetzt werden kann, wie z. B. 25 mg Gewebe beim QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup>. MAP besitzt die Fähigkeit Zellaggregate zu bilden. Diese Tatsache wurde von GRANT et al. (2005) in Milch nachgewiesen. Die Zellaggregate bestehen aus bis zu 10.000

Bakterienzellen. Durch die Ausbildung interzellulärer Filamente wird der Zusammenhalt der Zellen untereinander gewährleistet. Durch die Bildung von Zellaggregaten sind die Erreger nicht homogen in der Milch verteilt, was zu einem erschwerten Nachweis von MAP mittels PCR führen kann (GRANT et al., 2005).

Um eine erfolgreiche DNA-Extraktion überprüfen zu können, kann zusätzlich zu der Positiv-, Negativ- und Amplifikationskontrolle eine Extraktionskontrolle mitgeführt werden. Als Extraktionskontrolle werden häufig Primer für ein in fast allen Zellen enthaltenes Gen verwendet, beispielsweise das  $\beta$ -Actin Gen (HARRIS und BARLETTA, 2001).

### **2.3.6.2 Indirekter Erregernachweis**

#### **2.3.6.2.1 Serologische Tests zum Nachweis zellvermittelter Immunantwort**

##### **2.3.6.2.1.1 JOHNIN-Hauttest**

Der JOHNIN-Hauttest ist ein in vivo Nachweis einer zellulären spezifischen Immunantwort gegen MAP. Bei diesem Intrakutantest wird 0,1 ml eines proteinhaltigen MAP-Antigen-Gemisches intradermal an der Schulter des Rindes injiziert und die Hautdickenzunahme beurteilt. Die Hautdickenzunahme wird ausgelöst durch eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Typ IV-Reaktion). Bei Rindern wird eine Hautdickenzunahme von mehr als 3 mm, innerhalb von 24–72 h als positive Reaktion gewertet. Dieser Test wird in Deutschland nicht mehr angewendet, da es zu Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien wie z.B. *Mycobacterium bovis* kommen kann und folglich zu Interaktionen mit eventuell späteren Tuberkulinproben. Zudem ist die Methode sehr aufwändig, da die Tiere zweimal konsultiert werden müssen (DE LISLE et al., 1980; SELBITZ, 2002; HOMUTH, 2002).

##### **2.3.6.2.1.2 Interferon Test**

Beim Interferon Test wird die zellvermittelte Immunantwort infizierter Tiere nachgewiesen. Dadurch bietet der Test die Möglichkeit, Paratuberkuloseinfektionen bei Jungrindern bzw. Rindern mit einer geringen humoralen Immunantwort zu erkennen. Vollblut wird mit mycobakteriellem Antigen stimuliert und die Produktion des Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch einen Capture-ELISA gemessen.

Es kann jedoch, häufig bei jungen, nicht infizierten Tieren zu einem natürlichen Anstieg des IFN- $\gamma$  und dadurch zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Daher sollte diese Nachweismethode lediglich unterstützend bei der Diagnose der Paratuberkulose bei Jungtieren eingesetzt werden (COLLINS, 1996; STABEL, 1996; MCDONALD et al., 1999).

#### **2.3.6.2.2 Serologische Tests zum Nachweis humoraler Immunantwort**

Die folgenden drei Tests, die Komplementbindungsreaktion (KBR), die Agargel-Immundiffusion (AGID) und der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), weisen alle Antikörper gegen MAP nach. Diese drei Methoden besitzen eine relativ hohe Spezifität, daher kommt es auch zu wenig falsch positiven Ergebnissen. Die Sensitivität der Antikörpernachweismethoden ist jedoch insgesamt relativ niedrig, aufgrund der langen Phase der Erkrankung bis zur Serokonversion. Der ELISA besitzt verglichen mit den beiden anderen Tests die höchste Sensitivität (HARRIS und BARLETTA, 2001).

##### **2.3.6.2.2.1 Komplementbindungsreaktion (KBR)**

Die Komplementbindungsreaktion wurde als erster serologischer Test 1906 zur Diagnose der Syphilis beschrieben (VON WASSERMANN et al., 1906).

Die Reaktion verläuft in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wird die Serumprobe mit dem spezifischen Antigen und einer definierten Fremdkomplementmenge, beispielsweise Meerschweinchenserum, gemischt und inkubiert. Im zweiten Schritt werden Schaferythrozyten und komplementbindende Antikörper gegen diese zugegeben. Eine Hämolyse tritt nur dann ein, wenn noch freies Komplement vorhanden ist, in der Serumprobe also keine Antikörper gegen das betreffende Antigen vorhanden waren. Bei einer positiven Reaktion bleiben die Erythrozyten erhalten, da das Komplement bereits im ersten Schritt verbraucht wurde. Es kommt daher zu einer sichtbaren Knöpfchenbildung am Gefäßboden durch Sedimentation der Erythrozyten.

Dieses Verfahren gilt aufgrund seiner geringen Sensitivität und Spezifität als obsolet. In einer Untersuchung von REICHEL et al. (1999) besaß die KBR im Vergleich zur kulturellen Anzucht lediglich eine Sensitivität von 17,9%, zudem kommt es häufig zu Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien (TOWARD und INGRAM, 1912; SELBITZ, 2002; WILKS et al., 1981).

### **2.3.6.2.2.2 Agargel-Immundiffusion (AGID)**

Bei der AGID wird zu einem in einem Gel befindlichen MAP-Antigenen Serum hinzugegeben. Falls Antikörper vorhanden sind, diffundieren diese, bis sich eine Präzipitationslinie aus Antigen-Antikörper-Komplexen ausbildet. Dieser Test wird, da er schnell und kostengünstig ist, in Australien zur Diagnostik bei Schaf- und Ziegenherden eingesetzt (GUMBER et al., 2006). Der Test ist aufgrund seiner niedrigen diagnostischen Sensitivität und der langen Latenzphase der Erkrankung nicht zum Screening subklinisch infizierter Herden geeignet (WITHLOCK und BUERGELT, 1996). Als Beispiel sei eine Studie von GUMBER et al. (2006) angeführt, die eine Sensitivität von 13,8% bei Schafen und 39,5% bei Ziegen zeigte.

### **2.3.6.2.2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

ELISA ist der am häufigsten verwendete serologische Test zum Antikörpernachweis bei MAP infizierten Rinderbeständen. Für die Einzeltierdiagnostik der Paratuberkulose ist der Antikörpernachweis jedoch nur eingeschränkt geeignet. Subklinisch infizierte Tiere, bei denen trotz einer Infektion mit MAP noch keine Serokonversion stattgefunden hat, können mit diesem Test nicht MAP-positiv nachgewiesen werden. Die subklinische Phase kann beim Rind zwischen zwei und zehn Jahren dauern. So konnte in einer Verlaufsuntersuchung von 500 Rindern bei 50% der MAP-infizierten Tiere der Erreger kulturell nachgewiesen werden, bevor die Rinder im serologischen Test eindeutig positive Ergebnisse zeigten (WITHLOCK und BUERGELT, 1996; SWEENEY et al., 2005).

Bei kleinen Wiederkäuern scheint die Phase bis zur Ausbildung einer Serokonversion wesentlich kürzer zu sein. So konnte STORSET et al. (2001) nach einer experimentellen oralen Infektion von sieben Ziegen im Alter von vier bis acht Wochen bei vier der infizierten Tiere bereits nach 15-20 Wochen Antikörper gegen MAP nachweisen. Ebenso beobachtete DEUTZ (2004) bereits Erkrankungsfälle bei vier bis sechs Monate alten Kitzen und Kälbern von Reh-, Gamswild und Rothirsch (s. Kapitel 2.3.5).

Tabelle 6 zeigt die fünf in Deutschland nach § 17c Tierseuchengesetz zugelassenen, kommerziell erhältlichen ELISA-Tests zur Paratuberkulosedagnostik (N.N., 2012d). Diese Tests müssen in einer Prüfung

mit definierten Proben im nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose nach derzeitigem Stand eine Sensitivität von 53,6% und eine Spezifität von 98,5% erreichen (PROBST und KUBITZA, 2011). Die Testkits sind für den Nachweis von Antikörpern in unterschiedlicher Probenmatrix (Serum, Plasma, Milch) entwickelt worden.

**Tabelle 6: Die fünf nach § 17c Tierseuchengesetz in Deutschland zugelassenen ELISA Testverfahren zum MAP-Antikörper Nachweis (Quelle: N.N., 2012d)**

Bezeichnung des Produkts	Probenmatrix	Firma
<b>ID Screen<sup>®</sup> Paratuberculosis Indirect (PARAS)</b>	Serum, Milch	ID Vet (Fr.- Montpellier)
<b>ID Screen<sup>®</sup> Paratuberculosis Indirect – Bestätigung (PARAB)</b>	Serum, Milch	ID Vet (Fr.- Montpellier)
<b>1. IDEXX Paratuberculosis Verification 2. IDEXX Paratuberculosis Screening</b>	Serum, Plasma, Milch	IDEXX (Fr.- Montpellier)
<b>CATTLETYP MAP<sup>®</sup> Ab</b>	Serum, Plasma, Milch	Labor Diagnostik GmbH Leipzig
<b>PARACHEK<sup>®</sup> 2</b>	Serum, Milch	Prionics Deutschland GmbH (D.- Wolfratshausen)

Nach eigenen Angaben der Labor Diagnostik Leipzig GmbH (LDL) (2010) konnten mit dem Cattletype<sup>®</sup> MAP Ab-Kit bei einer Untersuchung von 102 nachweislich MAP-Antikörper-positiven Rindern 92 durch den ELISA ebenfalls als positiv detektiert werden. Die ermittelte diagnostische Spezifität lag in diesem Fall bei 99,3%. In einem weiteren Versuch wurde die Anzuchtung der Erreger mit dem serologischen Antikörpernachweis durch den ELISA Cattletype<sup>®</sup> MAP Ab verglichen. Hierbei konnte nur eine geringe Übereinstimmung der

Untersuchungsergebnisse festgestellt werden. Kulturell wurden vier von 25 Rindern als positiv detektiert. Serologisch wurden elf Tiere als Antikörper-positiv detektiert, darunter waren jedoch nur zwei der vier kulturell positiven Tiere. Gründe für diese geringe Übereinstimmung sind beispielsweise wie unter Kapitel 2.3.6.1.2 und 2.3.5 beschrieben, die intermittierende Erregerausscheidung über Faeces und die lange Phase der Erkrankung, bis es zur Serokonversion kommt.

Bei einem Versuch mit Kontrollseren des Referenzlabors für Paratuberkulose konnten mittels Cattletype<sup>®</sup> MAP Ab sechs der zehn positiven Proben als richtig positiv detektiert werden. Mittels des ELISAs des Institut Pourquier (Fr.-Montpellier) konnten drei der zehn positiven Serumproben als positiv erkannt werden, eine Probe war fraglich. Bei beiden ELISA-Methoden konnten die fünf negativen Kontrollseren auch als negativ nachgewiesen werden (LDL, 2010).

Bei einer Untersuchung von BÖTTCHER und GANGL (2004) wurde ein ELISA der Firma Svanova (A.-Wien) mit den ELISA-Testkits der Firma Pourquier (Fr.-Montpellier) und der Firma Idexx (Fr.-Montpellier) verglichen. Es wurden 2748 Serumproben aus 119 Rinderherden untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Vorabsorption des Probenmaterials mit *Mycobacterium phlei* die Anzahl falsch positiver Proben deutlich verringert, da so Kreuzreaktionen mit andern Mykobakterien deutlich minimiert werden. So wurden 24,1 % der Seren durch den ELISA der Firma Svanova positiv getestet. Dieser Test besitzt keine Vorabsorption des Probenmaterials mit *Mycobacterium phlei*. Im Gegensatz dazu wurden lediglich 0,9% bzw. 1,5% der Seren mit den anderen ELISA-Testkits als positiv getestet. Der Cattletype<sup>®</sup> MAP Ab besitzt ebenfalls eine Vorabsorption des Probenmaterials mit *Mycobacterium phlei* (LDL, 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Spezifität der aufgezählten ELISA-Methoden mit über 98,5% hoch ist. Zudem verringert eine Vorabsorption des Probenmaterials mit *Mycobacterium phlei* die Anzahl falsch positiver Ergebnisse durch Minderung der Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien. Die Sensitivität des ELISAs ist relativ gering, ein Grund dafür liegt in der langen Latenzphase der Erkrankung. Daher lassen sich die Ergebnisse der Kultivierung von Faeces auch schwer mit den serologischen Ergebnissen vergleichen. Die intermittierende Erregerausscheidung über Faeces erschwert diesen Vergleich zusätzlich.

### 2.3.7 Bekämpfung in Deutschland und Europa

Grundsätzlich sollte die Paratuberkulose bei Wildtieren gezielt bekämpft werden (DEUTZ, 2004). Jedoch wird diese Bekämpfung erst nach einer Eindämmung der Paratuberkulose bei Rindern Wirkung zeigen, da wie unter Punkt 2.3.4 beschrieben, eine Übertragung der Paratuberkulose von Rindern auf Wildtiere angenommen wird. Daher ist eine enge Verzahnung der Bekämpfungsprogramme von Rindern und Wildtieren zwingend erforderlich, zumal CORN et al. (2005) auch die Gefahr sieht, dass infizierte Wildwiederkäuer Paratuberkulose freie Rinderherden mit MAP infizieren.

DEUTZ (2004) schlägt verschiedene Bekämpfungsmaßnahmen für die Paratuberkulose bei Wildwiederkäuern vor. Eine Bodenvorlage von Futtermitteln sollte im Rahmen von fütterungshygienischen Maßnahmen nicht erfolgen, um eine Kontamination des Futters mit Mykobakterien zu vermeiden. Die Faeces sollten regelmäßig aus dem Fütterungsbereich entfernt und der Fütterungsbereich nach Ende des Fütterungszeitraums gekalkt werden. Zusätzlich wäre eine Schulung der Jäger erforderlich, da nur mit Hilfe ihrer Kooperation ein längerfristiger Erfolg erzielt werden kann. Als jagdliche Maßnahmen sollten krankheitsverdächtige Tiere und auch die Kitze und Kälber von erkrankten Muttertieren zu jeder Jahreszeit abgeschossen werden. Ein erhöhter Jagddruck im Bereich von kontaminierten Weidegebieten wird als Lenkungseffekt empfohlen. Kranke und krankheitsverdächtige Tiere und deren Eingeweide sollten seuchensicher entsorgt werden. Um Informationen über die regionale Verbreitung von Paratuberkulose bei Wildtieren zu erhalten, ist es wichtig, dass alle Verdachtsfälle abgeklärt werden, ein Monitoring auch bei unverdächtigen Tieren erfolgt und Erregerreservoirs wie z.B. Nagetiere, Vögel etc. erfasst werden.

Da eine Heilung von klinisch erkrankten Tieren nicht möglich ist zielen die in Deutschland freiwilligen Bekämpfungsmaßnahmen bei Rindern vor allem auf eine Reduktion der Paratuberkuloseinfektionen ab.

Die Paratuberkulose des Rindes ist, wie unter Punkt 2.3.3 ausgeführt, in Deutschland meldepflichtig, wird aber nicht staatlich bekämpft. Jedoch wurden 2005 zur Vereinheitlichung der freiwilligen Bekämpfungsmaßnahmen vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen

erstellt. In den Paratuberkuloseleitlinien werden v.a. Hinweise zu allgemeinen Hygienemaßnahmen, aber auch zur Bestandsüberwachung gegeben. Das Ziel dieser Hygienemaßnahmen ist vordringlich die Gefahr einer Infektion junger Tiere durch ältere zu reduzieren. Daher sollten Kälber bis zu einem Lebensalter von einem Jahr streng räumlich getrennt von älteren Tieren gehalten werden. KLEE (2007) empfiehlt zusätzlich, Gülle oder Mist nur auf Äcker oder Mähweiden, nicht aber auf Weiden auszubringen und Jungtiere nicht auf Weiden zu treiben, auf welchen im Jahr zuvor Kühe oder andere Wiederkäuer standen. Und es sollte, wie in den Leitlinien beschrieben, Silage nur aus dem eigenen Betrieb oder einem Betrieb mit gleichem Paratuberkulosestatus verfüttert werden. Prinzipiell ist, neben einer guten Betriebshygiene wie z.B. mittels angemessener Schadnagerbekämpfung und hofeigener Kleidung, eine Eigenremontierung des Betriebes anzustreben. Bei notwendigen Zukäufen ist darauf zu achten, dass Tiere nur aus Beständen mit bekanntem Paratuberkulosestatus zugekauft werden. Ein Impfstoff ist in Deutschland aktuell nicht zugelassen. Zwar könnte die Ausscheidung der Erregermenge durch eine Impfung verringert werden, sie bietet jedoch keinen Schutz vor einer Infektion und Erkrankung. Hinzu kommt, dass auf Grund von impfstoffbedingter Antikörperbildung serologische Tests ihre Aussagekraft bei der Bestandsüberwachung verlieren würden.

Für eine geeignete Bestandsüberwachung, ebenso um eine Bestandssanierung zu erreichen, sollte einmal jährlich eine serologische Untersuchung aller Tiere ab einem Alter von zwei Jahren mit einem Testverfahren, das eine Spezifität von über 99% aufweist, durchgeführt werden. Bei allen serologisch positiven Tieren und deren Nachkommen wird eine Nachuntersuchung dreimal im Abstand von sechs Monaten mittels bakteriologischer Untersuchung von Faeces oder mittels PCR von Faeces empfohlen. Alle bakteriologisch bzw. molekularbiologisch positiven Tiere sollten unverzüglich der Schlachtung zugeführt werden.

Ein Rinderbestand gilt dann als Paratuberkulose unverdächtig, wenn er mindestens fünf Jahre mit einem serologischen Test (Spezifität über 99%) und klinisch bzw. bakteriologisch (einschließlich PCR) mit negativem Befund untersucht worden ist und zur Aufrechterhaltung dieses Status die Untersuchungen fort dauern (N.N., 2005). In Thüringen wurde 2010 die erste Paratuberkulose unverdächtige Herde anerkannt (DONAT, 2011).

Die aktuell staatlich nicht finanzierten Bekämpfungsmaßnahmen in Deutschland werden kontrovers diskutiert. So sehen WITTKOWSKI et al. (2011) Änderungsbedarf bei den Paratuberkulosebekämpfungsmaßnahmen. Diese sollten für den Bauern mit einer Wertschöpfung einhergehen. Ein vom Tiergesundheitsdienst in Bayern (TGD) durchgeführtes, freiwilliges Programm bestätigt diese Annahme. In diesem Programm untersucht der TGD die jeweils 30 ältesten Tiere eines Bestandes auf MAP und stellt entsprechende Zertifikate über den Infektionsstatus aus. Von den ursprünglich 160 Betrieben sind derzeit nur noch 40 Betriebe weiterhin in diesem Programm. Als Gründe müssen angenommen werden, dass für die Landwirte einerseits kein finanzieller Anreiz besteht, an diesem Programm teilzunehmen und andererseits die Befürchtung, dass die Meldepflicht mit Namensnennung eine Rufgefährdung ihres Betriebs nach sich ziehen könnte (WITTKOWSKI et al., 2011). Daher fordern WITTKOWSKI et al. (2011) die Meldepflicht zu anonymisieren.

Andere europäische Länder verfolgen unterschiedliche Konzepte zur Paratuberkulosebekämpfung, jedoch ist das Ziel aller angeführten Programme eine Reduktion der Paratuberkulose in Rinderbeständen. Eine gezielte Bekämpfung der Paratuberkulose bei Wildwiederkäuern wird aktuell nicht durchgeführt.

In Österreich beispielsweise ist die Paratuberkulose bei Rindern, Schafen, Ziegen und Wildwiederkäuern in Gatterhaltung seit 2006 anzeigepflichtig. Gehäuft werden Fälle bei Rinderbeständen mit Stieren aus Westeuropa oder mit Mutterkuhhaltung gemeldet. Im Zeitraum von 2006-2008 wurden 106 positive Tiere aus 57 verschiedenen Beständen nachgewiesen. Erkrankte Tiere werden getötet und der Landwirt entschädigt (DÜNSER und GEISBAUER, 2008; DEUTZ, 2011).

Schweden galt bis 1993 als paratuberkulosefrei, jedoch wurde 1993 bei einer importierten Kuh Paratuberkulose festgestellt. Zwischen 1993 und 2007 wurde dann bei 53 Herden Paratuberkulose nachgewiesen. Seit dem Jahr 1998 existiert daher in Schweden ein staatlich finanziertes, freiwilliges Bekämpfungsprogramm bei Rinderbetrieben. Im Jahr 2000 waren ca. 820 Herden in diesem Programm. Bei den teilnehmenden Betrieben werden alle Rinder, die älter als 24 Monate sind (zugekaufte Rinder schon über 12 Monate), mittels kultureller Anzüchtung von

Faeces getestet. Die Herden werden in drei Kategorien, abhängig von der Anzahl negativer Untersuchungen, unterteilt. Die Kategorie C beinhaltet ein- bis zweimal negativ getestete Herden, Kategorie B drei- bis viermal negativ getestete Herden und Herden der Kategorie A wurden fünfmal negativ getestet. Alle Herden mit paratuberkulosepositiven Tieren werden gekeult und die Stallungen gereinigt und desinfiziert (STERNBERG et al., 2002; STERNBERG et al., 2007).

In den Niederlanden und in Dänemark erfolgt eine flächendeckende Untersuchung der Rinderbetriebe auf Paratuberkulose. So werden in den Niederlanden verpflichtend alle Milchviehherden mittels ELISA (Milch oder Serum) in drei Kategorien A, B und C unterteilt. Den Status A bekommen serologisch negative Herden, den Status B Herden mit positiven Tieren die gemerzt werden und den Status C erhalten Herden, bei denen die positiven Reagenten im Betrieb verbleiben (BIERMAYER et al., 2011).

Das in Dänemark seit 2006 laufende Bekämpfungsprogramm ist auf freiwilliger Basis. Es nehmen ca. 28% der Milchviehbetriebe daran teil. Diese Milchviehbetriebe besitzen zusammen 40% der Kühe in Dänemark. Bei einer freiwilligen Befragung stellte sich heraus, dass die Gründe der Landwirte, an diesem Bekämpfungsprogramm teilzunehmen, sehr unterschiedlich waren. So wollten 91% der 1013 Befragten Landwirte zur Erhöhung der Tiergesundheit beitragen. Bei 87% war eine zusätzliche Motivation einen „zertifiziert paratuberkulosefreien Bestand“ innerhalb der nächsten vier bis zehn Jahre zu erhalten. Dies zeigt, dass die Durchführung eines zertifizierten Bekämpfungsprogramms durchaus von den Landwirten erwünscht ist (NIELSEN, 2011).

### 2.3.8 MAP als potentieller Zoonoseerreger

Ein Zusammenhang zwischen der Paratuberkulose des Tieres und dem Morbus CROHN des Menschen wird seit langem diskutiert. Morbus CROHN gehört beim Menschen zur Gruppe der chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (Inflammatory Bowel Diseases, IBD). Die Erkrankung verläuft in Schüben und kann den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen. Sie beruht „auf einer inadäquaten Immunantwort bei genetisch suszeptilen Personen auf mikrobielle Antigene kommensaler Mikrobiota“ (BAUMGART, 2009). CROHN, ein amerikanischer Gastroenterologe, beschrieb 1932 erstmals dieses Krankheitsbild. Von ihm leitet sich auch der Name der Erkrankung ab. Das klinische Bild ist durch Diarrhoen, häufig auch blutig-schleimig, abdominale Schmerzen, Fieber und klinische Zeichen eines Ileus gekennzeichnet (BAUMGART, 2009).

Die Pathogenese des Morbus CROHN ist noch nicht hinreichend geklärt. Sowohl die Genetik, Bakterien oder Viren als Krankheitsauslöser, Umweltfaktoren und Rauchen werden als Gründe für Morbus CROHN diskutiert. So kommt die Erkrankung beispielsweise in industrialisierten Ländern wesentlich häufiger vor, als in entwicklungsschwachen Ländern. Das höchste Vorkommen mit 27-48 Fällen auf 100.000 Einwohner wird in Nordamerika und Europa verzeichnet (NASER et al., 2012).

Ob MAP eine ätiologische Bedeutung in der Pathogenese von Morbus CROHN besitzt, wird seit langem kontrovers diskutiert. Tabelle 7 und 8 zeigen stichpunktartig auf, welche Gründe für bzw. gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus CROHN sprechen (ROSENFELD und BRESSLER, 2010).

**Tabelle 7: Gründe, die für einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus CROHN sprechen, MC = Morbus CROHN [Quelle: ROSENFELD und BRESSLER, 2010]**

1	Makroskopische und mikroskopische Ähnlichkeiten der beiden Erkrankungen
2	MAP konnte in Milch und im Wasser nachgewiesen werden und kann konventionelle Pasteurisierungsverfahren überleben
3	MAP konnte in Gewebe und Blut von Patienten mit MC häufiger nachgewiesen werden, als bei Personen ohne MC
4	MAP-Antikörper konnten im Blut von MC-Patienten häufiger als bei Kontrollgruppen nachgewiesen werden
5	MAP konnte im Kolostrum von Patientinnen mit MC nachgewiesen werden
6	Die Genmutationen NOD2/CARD15 sind nachgewiesen prädispositionierend für MC. Durch diese Mutationen kommt es zu einer angeborenen defekten Immunantwort auf bakterielle Infektionen und dadurch möglicherweise auch zu einer ineffektiven Bekämpfung des intrazellulären MAP

**Tabelle 8: Gründe, die gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus CROHN sprechen, MC = Morbus CROHN [Quelle: ROSENFELD und BRESSLER, 2010]**

1	Menschen mit Kontakt zu MAP infizieren Tieren besitzen keine erhöhte Prävalenz für MAP
2	MAP konnte ebenfalls bei Personen ohne MC nachgewiesen werden, wenn auch weniger häufig
3	Es gibt keinen Beweis dafür, dass MAP-haltige Nahrung MC hervorruft
4	Es gibt keinen Beweis für eine erhöhte Übertragung von MAP bzw. MC auf die Nachkommen außer das Vorkommen von MAP in Kolostralmilch
5	MC spricht auf eine immunsupprimierende Therapie an, welche mit einem verminderten MAP-DNA Level einhergeht
6	Eine Antibiotikatherapie bei MC zeigt keine langfristigen Erfolge

Seit langem wird mit Hilfe vieler Studien versucht, den kausalen Zusammenhang zwischen MAP und der Pathogenese von Morbus CROHN nachzuweisen bzw. auszuschließen. Die makroskopischen und mikroskopischen Ähnlichkeiten zwischen der Paratuberkulose und Morbus CROHN beschrieb als erster DALZIEL 1913 in einem Artikel im „British Medical Journal“. CHIODINI wies 1984 MAP-ähnliche Organismen bei zwei von elf Patienten mit Morbus CROHN, jedoch bei keinem der weiteren sechs untersuchten Patienten mit anderen IBD nach. Bis 1989 gab es vereinzelt Nachweise von MAP bei Morbus CROHN Patienten, jedoch waren die Studien wegen ihres unterschiedlichen Studiendesigns nicht vergleichbar (CHODINI und RODRICK 1989). FRANCOIS et al. (1997) konnte Homologien in der Gensequenz von vier MAP-Isolaten aus Probenmaterial von Morbus CROHN Patienten und acht von elf MAP-Isolaten aus Probenmaterial von Kühen feststellen. In neueren Studien von SALEH et al. (2004) wurden Blutproben von 28 Morbus CROHN Patienten untersucht. Bei 16 dieser Patienten gelang ein PCR- und/oder kulturell positiver Nachweis von MAP. In einer anderen, ebenfalls 2004 geführten Studie von BERNSTEIN et al., wurden 283 Patienten mit MC, 144 Patienten mit anderen IBD und 540 gesunde Kontrollpersonen serologisch auf Antikörper gegen MAP untersucht. Es zeigte sich in dieser Studie kein signifikanter Unterschied in der Antikörperprävalenz bei den drei Gruppen.

In einer Studie in den USA wurden die Antikörpertiter gegen MAP von Tierärzten und Landwirten mit denen von durchschnittlichen Blutspendern verglichen und insgesamt ein wesentlich höherer Titer bei den Tierärzten und Landwirten festgestellt. Es wurden 11–12% der Tierärzte und Landwirte, jedoch lediglich 3,3% der Blutspender als serologisch positiv getestet (KLEE, 2003).

Bislang konnte in keiner Studie ein kausaler Zusammenhang von MAP in der Ätiologie von Morbus CROHN bewiesen werden, daher ist eher von einer sekundären Darmbesiedlung durch Bakterien wie beispielsweise MAP auszugehen (BÜTTNER et al., 2005).

Eine mögliche Infektionsquelle von MAP für den Menschen stellen Milch- und Käseprodukte dar. So können bei einer klinisch erkrankten Kuh ca. 20 bis 160KbE/kg Milch sekretorisch ausgeschieden werden. Zusätzlich können durch fäkale Kontamination ca. 3200KbE/kg in die Milch eingetragen werden (HAMMER, 2011). Jedoch konnte bei artifiziell kontaminierter Milch eine Reduktion von  $4\log_{10}$  Stufen der Paratuberkuloseerreger durch die üblichen

Erhitzungsverfahren erzielt werden. Durch diese und andere Be- und Verarbeitung von Milch- und Käseprodukten, wird die Exposition für den Menschen als gering eingeschätzt (HAMMER, 2011).

## 2.4 Der Rothirsch (*Cervus elaphus*) im Nationalpark Bayerischer Wald

Rothirsche gehören zu den größten Hirscharten. Männliche Tiere (Abbildung 4) können ein Gewicht von bis zu 250 kg erreichen. Natürlicherweise halten sich Rothirsche gebirgiger Regionen im Sommer in höheren Lagen auf, da dort in der Regel mehr Nahrung zu finden ist. Im Winter wandern sie in die weniger schneereichen Talregionen. Die Länge der zurückgelegten Wanderstrecke zwischen Winter- und Sommeraufenthalt der Hirsche ist abhängig vom Nahrungsangebot. Hirsche im bayerischen Voralpenland beispielsweise sind vor Festlegung von ausgewiesenen Rothirschgebieten im Winter entlang der Isar bis nach Freising gewandert. Hirsche leben in Rudeln und v. a. weibliche Hirsche und ihre Jungtiere schließen sich zu Verbänden zusammen und wandern auch gemeinsam. Diesen Verbänden schließen sich jüngere Hirsche zuweilen lose an. Ältere männliche Hirsche sind oft Einzelgänger. In einer Telemetriestudie im Thüringer Wald konnte nachgewiesen werden, dass besonders 2- bis 7-jährige männliche Hirsche oft weite Wanderungen unternehmen. Das durchschnittliche Durchstreifungsgebiet der männlichen Hirsche lag bei 3.900 ha, das der weiblichen Hirsche und Jungtiere lediglich bei 510 ha (LINN UND WANDEL, 2004; NEUMANN et al., 2012; HEURICH, 2012).



**Abbildung 4: Männlicher Rothirsch (Foto: NORBERT WIMMER)**

Der Rothirsch hat das physiologische Optimum seines Verbreitungsgebietes in halboffenen Landschaften. Durch die zunehmende Besiedlung des Menschen wurde der Rothirsch jedoch immer mehr in die Wälder zurückgedrängt. Der

Rothirsch gehört zu den euryöken (anpassungsfähigen) Tierarten, er besitzt dadurch mittlerweile in Mitteleuropa sein ökologisch optimales Verbreitungsgebiet im geschlossenen Wald. Unter dem ökologischen Optimum eines Verbreitungsgebietes versteht man den für die Art günstigsten Siedlungsbereich bei Konkurrenz oder Störung (REIMOSER, 2008).

Durch die Abdrängung des Rothirschs in den Wald kommt es vermehrt zu Waldschäden, da beim Rothirsch im Gegensatz zum Rehwild die Baumrinde als faserreiche Nahrung zum Äsungsspektrum gehört. Durch das Schälen der Baumrinde wird der Holzkörper freigelegt, wodurch es am Stamm zur Infektion mit holzzersetzenden Pilzen kommen kann. Beispielsweise wiesen 2002 im Nationalpark Bayerischer Wald 10,4% der Bäume alte Schälsschäden auf. In diesem Fall bedeutet "Alt" alles Schälen, das vor Beginn der letzten Vegetationsperiode entstanden ist. Um diese Waldschäden möglichst gering zu halten und um „*die natürliche Verjüngung der standortgemäßen Baumarten im Wesentlichen ohne Schutzmaßnahmen*“ wie im bayerischen Jagdgesetz (BayJG) in Art. 1 3. gesetzlich geregelt zu ermöglichen, wurden in Bayern, aber auch in anderen Bundesländern Rothirschbezirke festgelegt. In diesen Rothirschbezirken dürfen Rothirsche frei wandern, die Bestandszahlen werden jedoch durch Bejagung reguliert. Die Jagdstrecke, d.h. die Stückzahl des erlegten Wildes je Jahr und Raum, lag in Bayern nach Angaben des Bayerischen Jagdverbands e.V. (2012b) 2009/2010 bei 10.518 und 2010/2011 bei 11.092 Rothirschen.

Außerhalb dieser festgelegten Rothirschbezirke gilt ein Totalabschuss der Rothirsche. Der Spessart, der Voralpenraum und der Nationalpark Bayerischer Wald sind die größten Rothirschbezirke in Bayern.

Durch die Errichtung von Rothirschbezirken in den meisten Bundesländern ist das Vorkommen des Rothirschs auf ca. 23% der Bundesfläche begrenzt. Der gesamte Rothirschbestand wird in Deutschland auf rund 180.000 Tiere geschätzt. In Bayern leben etwa 30.000 Rothirsche. Abbildung 5 zeigt den Rothirschbestand in Deutschland 2011, bezogen auf 1.000 ha Waldlebensraum. Diese Abbildung zeigt ebenso, dass nur noch in wenigen Gebieten Deutschlands, wie in Mecklenburg-Vorpommern, in Teilen Niedersachsens und in Teilen Brandenburgs der Rothirsch auch außerhalb großer Wälder vorkommt, da in diesen Regionen Deutschlands auf eine Errichtung von Rothirschbezirken verzichtet wurde (KUTZER, 2000; KINSER et al., 2010; N.N., 2012a; HEURICH et al., 2011).

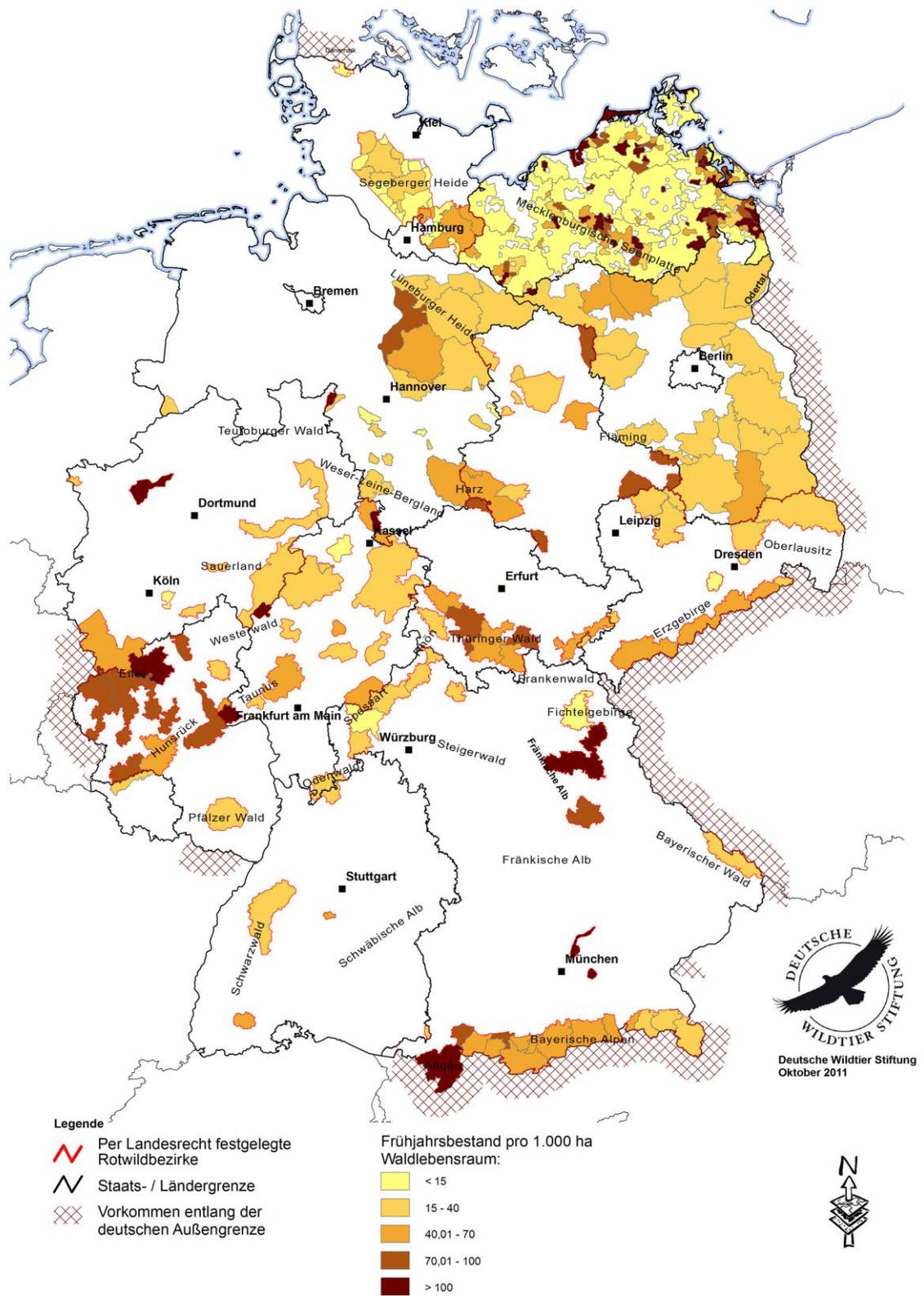
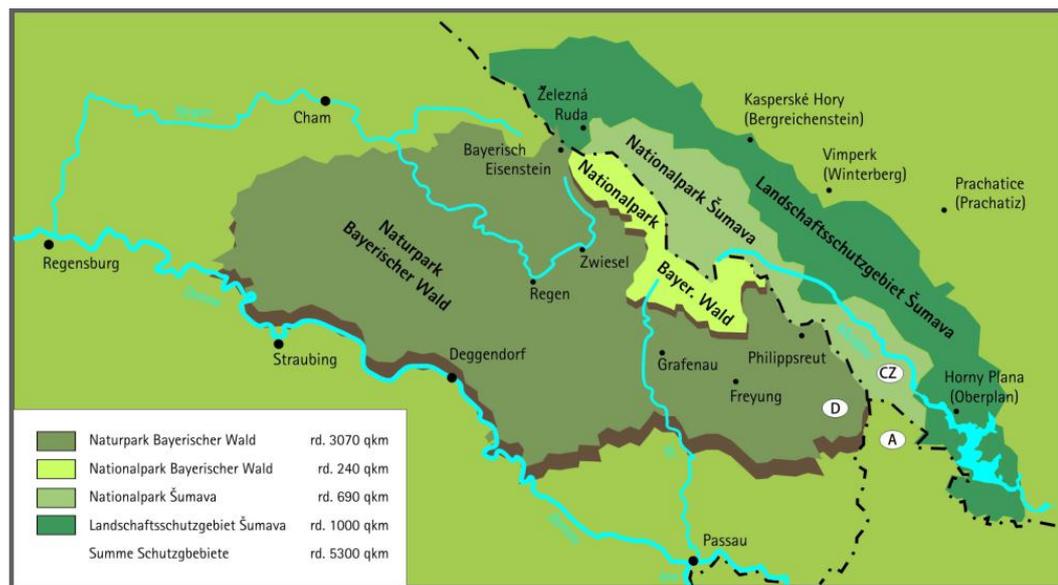


Abbildung 5: Rothirschbestand in Deutschland 2011 bezogen auf 1.000 ha Waldlebensraum (Quelle: N.N., 2012a)

Der Nationalpark Bayerischer Wald (Abbildung 6) liegt im Südosten Bayerns, im Landkreis Regen, entlang der deutsch-tschechischen Grenze. Der Nationalpark wurde 1970 als erster deutscher Nationalpark eröffnet und 1997 erweitert. Mittlerweile umfasst er eine Fläche von 24.369 ha. Er erstreckt sich von 600 m ü. NN in den Tallagen (Kolbersbach), bis hin zu den Kammlagen mit den höchsten Erhebungen Großer Rachel (1453 m ü. NN), Lusen (1.373 m ü. NN) und Falkenstein (1.312 m ü. NN).

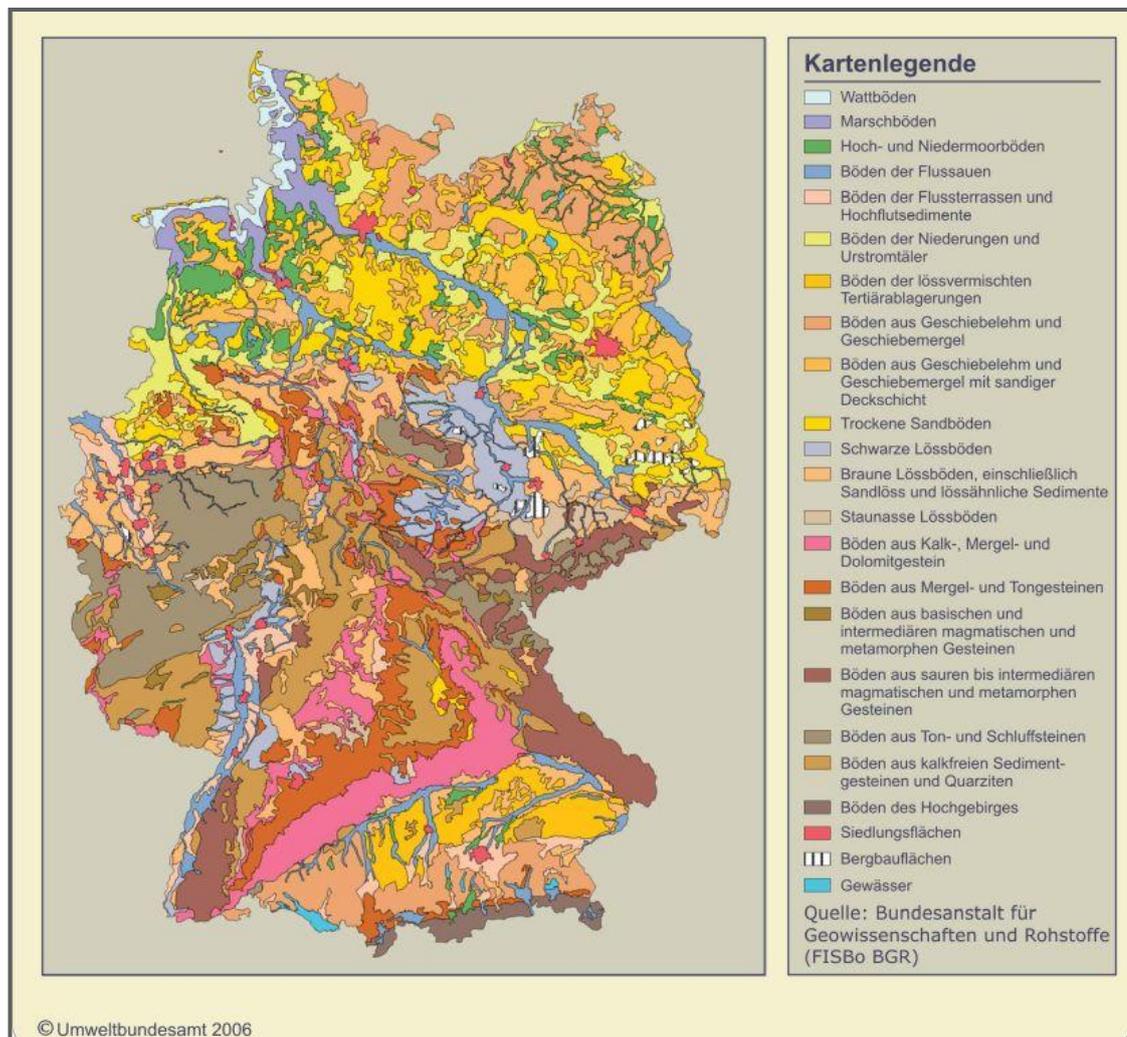


**Abbildung 6: Übersichtskarte Nationalpark Bayerischer Wald und Umgebung**  
[Quelle: Heurich, 2012]

Eine Möglichkeit der gegenseitigen Übertragung von MAP zwischen Rindern und Rothirschen stellen mit Faeces kontaminierte Weideflächen dar (s. Kapitel 2.3.4) (CORN et al., 2005; DEUTZ UND SPERGSE, 2009). Im Landkreis Regen wurden 2007 insgesamt 24.206 ha der Bodenfläche landwirtschaftlich genutzt, davon waren 16.737 ha Wiesen zur Schnittnutzung, 2.863 ha Mähweiden und 845 ha Weiden ohne Hutungen. Im Einzugsgebiet des Nationalparks Bayerischer Wald wird keine Weidehaltung betrieben. Weideflächen, die direkt an den Nationalpark grenzen, befinden sich lediglich im östlichen Teil des Nationalparks in der Gegend von Neuschönau. Auf diesen Weideflächen werden die Hirsche von den Jägern jedoch so gut wie nie gesichtet (HEURICH, 2012; N.N., 2012c).

MAP besitzt, wie unter Punkt 2.2.3 erwähnt, eine hohe Tenazität gegenüber Säure und kommt bei sauren Böden mit hohem Eisengehalt häufiger vor. Der Boden-pH im Nationalpark ist in der Auflageschicht relativ niedrig, verglichen mit andern

Gebieten Deutschlands (Abbildung 7). Dies ist bedingt durch die geologischen Voraussetzungen mit Kristallingestein ohne Pufferwirkung, Huminsäuren, welche durch die Nadelwaldaufstreu gebildet werden und die anthropogene Versauerung. Nahe des Wintergatters Neuhüttenwiese lag 1994 der Boden-pH bei 3,5 in der Auflageschicht. Die aktuellen Werte müssten jedoch aufgrund des massiven Rückgangs der anthropogenen Versauerung in den letzten Jahren um einen pH von 0,5 bis 0,7 höher sein. Die Austauschkapazität des Bodens (meq/kg) für austauschbare Eisenwerte ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ist abhängig vom Boden-pH, da diese nur bei tiefen pH-Werten mobilisiert und am Austauscher gebunden werden können. Durch den pH-Wert Anstieg in den letzten Jahren ist somit auch die Austauschkapazität (meq/kg) des Bodens für austauschbare Eisenwerte ( $\text{Fe}^{2+}$ ) gesunken (UMWELTBUNDESAMT, 2006; BEUDERT, 2012).

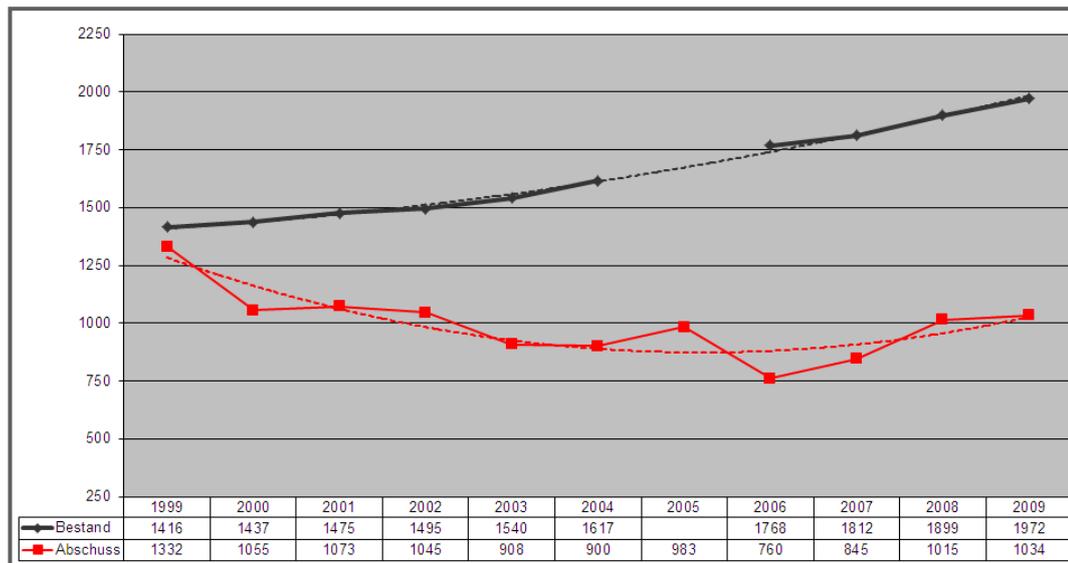


**Abbildung 7: Bodenübersichtskarte, Deutschland; Maßstab 1 : 5.000.000**  
[Quelle: UMWELTBUNDESAMT, 2006]

Unmittelbar im Norden bzw. Nordosten des Nationalparks Bayerischer Wald schließt sich der tschechische Nationalpark Šumava mit einer Fläche von 69.030ha an.

Während der Zeit des kalten Krieges (1948-1989) waren die beiden Nationalparks durch eine 45km lange, feste Grenze voneinander getrennt. In dieser Zeit verhinderte die Grenze Wanderungen großer Wildtiere zwischen den Ländern. Seit der Öffnung der Grenze Ende der 90er Jahre ist ein Tierwechsel über die Grenze wieder möglich. Es konnte beobachtet werden, dass sich das Wanderverhalten der Rothirsche durch die jahrzehntelang bestehende Grenze so verändert hat, dass es auch nach 20 Jahren ohne gesicherte Grenzbefestigungsanlagen nur zu wenig grenzüberschreitender Wanderung durch Rothirsche kommt. Zusätzlich haben einige Tiere auch gelernt, im Winter freiwillig die Wintergatter im Nationalpark Bayerischer Wald aufzusuchen und die sonst natürlicherweise durchgeführten, größeren Wanderungen zu unterlassen. Durch dieses Verhalten kommt es nur zu einer geringen Durchmischung der Rothirschbestände im Nationalpark Šumava und im Nationalpark Bayerischer Wald. Dies wurde in einer genetischen Untersuchung der Rothirschbestände der beiden Nationalparks von FICKEL et al. (2011) bestätigt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass sich die beiden Populationen genetisch deutlich unterscheiden und die genetische Vielfalt im Rothirschbestand des Nationalparks Bayerischer Wald relativ gering ist.

Im Nationalpark Bayerischer Wald liegt der Rothirschbestand insgesamt bei rund 400 Tieren. Bei einer Rothirschzählung im Februar 2011 wurden 394 Rothirsche gezählt, darunter 189 Hirsche, 145 weibliche Tiere und 60 Kälber. Dies entspricht ca. 1,7 Rothirschen auf 100ha. Im Nationalparkgebiet Bayerischer Wald und Šumava zusammen konnte in den letzten Jahren ein Wachstum der Rothirschpopulation von 1416 im Jahr 1999 auf 1972 Stück im Jahr 2009 beobachtet werden (Abbildung 8). Dies liegt zum einen an verminderten Abschüssen, aber auch an der Entstehung von Totholz- und Kahlflächen. Diese Totholz- und Kahlflächen sind v. a. die Folge des massiven Befalls der Bäume mit Borkenkäfern. In diesen Gebieten finden Rothirsche mehr Nahrung, als im dicht bewachsenen Wald, wodurch es zu einer Verbesserung der Lebensraumkapazität für Rothirsche kommt.



**Abbildung 8: Der Rothirsch im Nationalpark Šumava und Bayerischer Wald; Entwicklung von Bestand und Abschuss 1999-2009 [Quelle: Heurich, 2009]**

Natürlicherweise würden sich die Rothirsche im Wesentlichen nur im Sommer im Nationalparkgebiet Bayerischer Wald aufhalten. Im Winter würden die Tiere aufgrund der hohen Schneelagen Überwinterungsgebiete außerhalb des Parkgebietes aufsuchen. Diese Wanderungen werden jedoch nicht mehr zugelassen, da sich die sonst aufgesuchten Wintergebiete fast alle in festgelegten "Rotwildfreien Gebieten" befinden.

In Buchenau, Ahornschachten, Neuhüttenwiesen und Riedlhäng wurden daher in den 70er Jahren Wintergatter innerhalb des Nationalparks angelegt. Es handelt sich hierbei um 50 bis 60ha große, umzäunte Bereiche, in denen die Tiere gefüttert werden.

Die Fütterung in den Wintergattern erfolgt von November bis Mai und besteht aus 75% Grassilage, 15% Heu, 5% Apfeltrester und 5% Zuckerrüben. Diese Futtermittel werden von Landwirten aus der Umgebung zugekauft. Bei nicht zugefütterten Hirschen machen Gräser ca. 60% und Kräuter ca. 25% der Nahrungsbestandteile aus. Durch die Fütterung im Winter ist die natürliche winterliche Mortalität deutlich verringert. Um den Bestand nicht zu groß werden zu lassen, ist folglich eine Regulierung durch einen organisierten Abschuss von Tieren in den Gattern notwendig. Vor Beginn der Jagdsaison werden daher Abschusspläne für die jeweilige Tierart festgelegt. Ziel ist es, diese Abschusspläne zu 100% zu erfüllen. In den Gebieten Rachel/Lusen und

Falkenstein/Rachel des Nationalparks Bayerischer Wald wurden in der Jagdsaison 2009/2010 insgesamt 134 von 175 vorher im Abschussplan als Abgang festgelegten Rothirsche und in der darauffolgenden Jagdsaison insgesamt 204 statt der geplanten 175 Rothirsche erlegt. In den beiden Jahren wurden somit im Mittel 97% der geplanten Abgänge erzielt (HEURICH und NEUFANGER, 2005; FIELITZ, 2005; FICKEL et al., 2011; GERNERA et al., 2011; HEURICH et al., 2011b; HEURICH, 2012).

Diese Regulierung der Winterwanderungen und der Bestandszahlen der Rothirsche durch Menschen mit Hilfe der Wintergatter widersprechen jedoch dem Ziel des Nationalparks einer natürlichen Regulierung des Rothirschbestandes ohne Eingriff des Menschen.

Daher wird mittelfristig vom Nationalpark angestrebt, den Zeitraum, den die Tiere im Gatter verbringen, auf das unbedingt notwendige Ausmaß zu reduzieren. Um dies möglich zu machen, wird derzeit das Raumnutzungsverhalten der Rothirsche mittels Telemetrie verfolgt.

Langfristiges Ziel ist, wie oben erwähnt, die natürliche Regulation der Rothirsche, ohne Wintergatter und Bejagung. Bei der Umsetzung dieser Pläne treten einige Probleme auf, da Wolf und Bär als natürliche Sterblichkeitsfaktoren fehlen. Ebenso gibt es keine großen Nahrungskonkurrenten, wie beispielsweise Elch und Wisent, wodurch der notwendige Verdrängungseffekt zwischen den Pflanzenfressern ebenfalls fehlt. Zudem sind die anliegenden Forstbesitzer und Jäger gegen eine natürliche Wanderung der Rothirsche, da die natürlichen Überwinterungsgebiete der Rothirsche in ihren Wäldern außerhalb des Rothirschgebietes Nationalpark liegen und sie große Waldschäden befürchten. Aufgrund dieser Faktoren sind die Wintergatter zum jetzigen Zeitpunkt die einzige praktikable Lösung für die Unterbringung der Hirsche im Winter (HEURICH und NEUFANGER, 2005; GERNER et al., 2011; HEURICH et al., 2011; HEURICH, 2012).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 68 Faecesproben, 68 Ileocaecallymphknoten und 87 Blutproben von insgesamt 87 verschiedenen Rothirschen (*Cervus elaphus*) als Probenmaterial getestet. Insgesamt wurden somit 223 Proben auf MAP untersucht.

Die Proben wurden im Zeitraum von Oktober 2010 bis Januar 2011 im Nationalpark Bayerischer Wald unmittelbar nach der Jagd bei den Wildgattern oder im Kühlhaus unter Vermeidung von Kontaminationsmöglichkeiten entnommen (Abbildung 9) und nach dem Transport bei  $-20\text{ °C}$  tiefgefroren. Es wurden jeweils Faecesproben, Ileocaecallymphknoten, Jejunallymphknoten und Blutproben von 68 Rothirschen genommen.

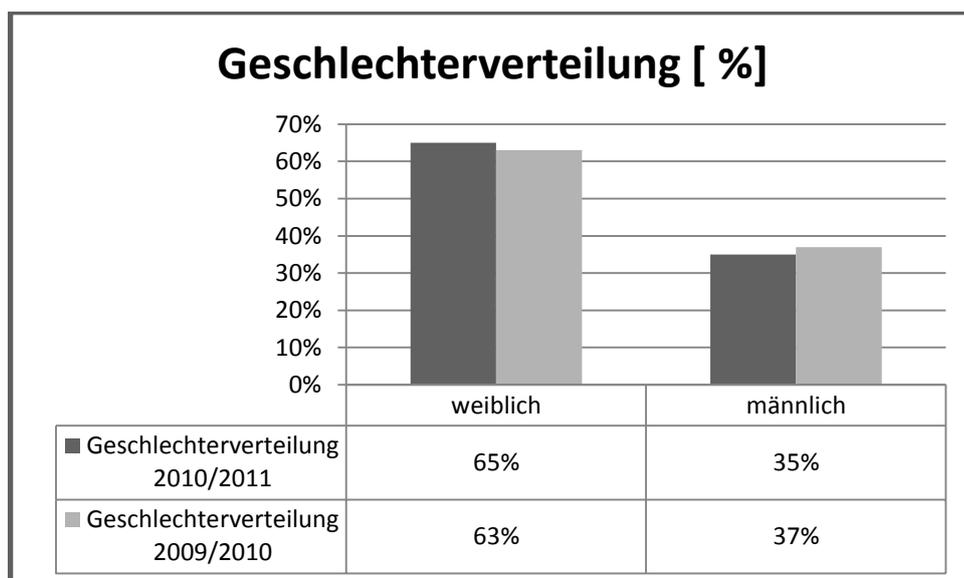
Wie aus Abbildung 10 ersichtlich ist, lag die Geschlechterverteilung der untersuchten Tiere bei 65% (44) weiblichen und 35% (24) männlichen Tieren. Der Altersdurchschnitt der weiblichen Tiere lag bei 3,5 Jahren, derjenige der männlichen Tiere bei 2,3 Jahren. Der Altersdurchschnitt aller Tiere lag bei 2,9 Jahren (Abbildung 11). Insgesamt waren 16 der 68 Tiere älter als drei Jahre (23,5%). Diese 16 Tiere waren ausnahmslos weiblich. Von den weiblichen Tieren waren 45,5% trächtig.

Zusätzlich zu den oben genannten Proben aus der Jagdsaison 2010/2011 lagen noch 19 Serumproben aus der Jagdsaison 2009/2010 (Oktober 2009 bis Januar 2010) vor. Die Blutproben wurden ebenfalls direkt nach der Jagd entnommen und das gewonnene Serum dann bei  $-20\text{ °C}$  tiefgefroren. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich ist, waren sieben (37,0%) der Tiere männlich und zwölf (63,0%) weiblich. Der Altersdurchschnitt dieser Tiere lag insgesamt bei 4,8 Jahren. Hier war das durchschnittliche Lebensalter der männlichen Tiere 4,8 Jahre, das der weiblichen bei 4,7 Jahren (Abbildung 11). 8 (42,1%) der 19 Tiere waren älter als drei Jahre, davon waren zwei Tiere männlich und acht weiblich. Neun (75,0%) der zwölf weiblichen Tiere waren trächtig.

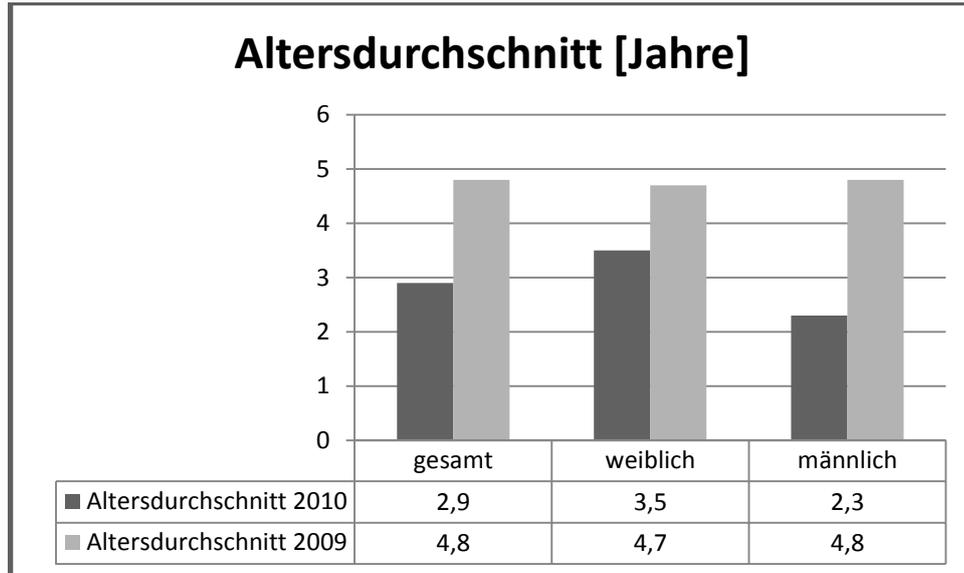
Die Tierdaten aller beprobten Rothirsche sind in Tabelle 13 (Anhang) aufgeführt.



**Abbildung 9: Probenentnahme von Jejunallymphknoten am MDT eines Rothirsches**



**Abbildung 10: Geschlechterverteilung der beprobten Rothirsche in den Jahren 2009/2010 und 2010/2011**



**Abbildung 11: Altersverteilung der beprobten Rothirsche in den Jahren 2009/2010 und 2010/2011**

## 3.2 PCR

Die Aufstellung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien ist Anhang 8.1 (Tabelle 14 und Tabelle 15) zu entnehmen. Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Testkits sind in Tabelle 16 (Anhang 8.1) aufgelistet.

### 3.2.1 Vorversuch: Artificielle Kontamination

Die Faeces und die Jejunallymphknoten von zwei Tieren wurden artifiziell mit Mykobakterien beimpft, um die Qualität der Extraktionsverfahren und der eingesetzten konventionellen PCR zu überprüfen.

Die zur artifiziellen Kontamination verwendeten MAP-Reinkulturen stammen von Isolaten von Faeces paratuberkulosepositiver Rinder und wurden am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit auf BBL™ HEROLD´s Egg Schrägagar (Becton, Dickson and Company) kultiviert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Mittels steriler Impföse wurde Kulturmaterial in 9 ml 0,9%ige NaCl-Lösung eingebracht und durchgerüttelt. Die Suspension wurde auf einen MAC FARLAND-Wert von 0,5 eingestellt und anschließend eine dekadische Verdünnungsreihe mit sieben Verdünnungsstufen erstellt.

Danach wurde aus den 7 Verdünnungsstufen DNA extrahiert. Hierzu wurden je 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe in ein 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß pipettiert und 15 Minuten lang bei +99 °C im Thermomixer erhitzt und anschließend zwei Minuten lang bei 13.400 g zentrifugiert. Je 2,5 µl des Überstandes wurden in die konventionelle PCR (s. Kapitel 3.2.3) als Template eingesetzt. Die Erregersuspension mit dem MAC FARLAND-Wert von 0,5 wurde zur artifiziellen Kontamination von Probenmaterial verwendet. Zusätzlich wurde, nach Auswertung der Ergebnisse, die letzte in der PCR noch positive MAP-Verdünnung, zur Kontamination verwendet. Je 1 ml dieser Verdünnung und der Erregersuspension wurden zu je 5 g der Faeces bzw. den zerkleinerten Lymphknoten zugegeben, gut manuell gemischt und zwei Minuten mit Hilfe des Stomachers<sup>®</sup> (VWR International GmbH, D-Darmstadt) homogenisiert.

Die so artifiziell kontaminierten Proben wurden bei -20 °C eingefroren und wiederholt nach einem Tag, einer Woche und nach über einem Monat untersucht.

### **3.2.2 Aufbereitung der Proben**

Die tiefgefrorenen Faeces- und Lymphknotenproben wurden vor der Extraktion bei Raumtemperatur aufgetaut.

#### **3.2.2.1 Grundlagen der DNA-Extraktion**

Die beiden angewendeten DNA-Extraktionsverfahren basieren auf Standard-Kitsystemen der Firma Qiagen, dem QIAamp Stool Kit<sup>®</sup> und dem QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup>. Bei beiden angewendeten Kits handelt es sich um ein chemisch-thermisches Extraktionsverfahren. Die thermischen Einflüsse durch Inkubation der Proben bei hohen Temperaturen begünstigen das Freisetzen der DNA aus den Erregerzellen. Das Kotextraktionskit wurde nach BULANDER (2009) modifiziert und dadurch um einen mechanischen Aufbereitungsschritt mittels TissueLyser, erweitert. Die Aufbereitung der Proben erfolgt mit enzym- und detergenzienhaltigen Puffern, verschiedenen Waschpuffern, Proteinase K, Ethanol und im Fall des QIAamp Stool Kits<sup>®</sup> durch Zugabe einer InhibitEX-Tablette. Die enzymatischen Puffer bewirken zu Beginn der Probenaufbereitung die Lyse enthaltener Bakterienzellen sowie den Abbau vorhandener Proteinmoleküle. Die InhibitEX-Tablette des Kotextraktionskits dient der Neutralisation von PCR-Inhibitoren wie z.B. Häm-Abbauprodukten und Phenolen. Das anschließend

zugesezte Enzym, die Proteinase K, bewirkt einen Abbau der restlichen Proteinmoleküle und trägt zur Freisetzung von Nukleinsäuren bei. Die Bindung der DNA-Moleküle erfolgt an einer Silikagel-Membran. Durch chaotrope Salze und ethanolhaltige Puffer werden die entsprechenden Bindebedingungen für die DNA gewährleistet (BOOM et al., 1990). Die Elution der gebundenen DNA-Moleküle erfolgt letztlich durch das Senken der Konzentration der chaotropen Agenzien, z. B. mit nahezu salzfreien Puffern.

### **3.2.2.2 Extraktion genomischer DNA aus Lymphknoten**

Die Ileocaecallymphknoten wurden mit einem Dispergierer, dem Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25, homogenisiert und 25 mg des Homogenisats in ein 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß eingewogen. Die Ultra-Turrax<sup>®</sup>-Stäbe wurden nach der Erstellung des Homogenisats zerlegt, gut manuell gereinigt und vor einer weiteren Verwendung bei +180 °C eineinhalb Stunden sterilisiert, um Kreuzkontaminationen der Homogenisate untereinander zu vermeiden.

Die Extraktion der Lymphknoten basiert auf dem Protokoll des QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen). Zu den 25 mg des jeweiligen Lymphknotenhomogenisats wurden 180 µl Lysepuffer (ATL-Buffer) und 20 µl Proteinase K zugegeben. Nach gründlichem durchmischen der Proben mittels Vortexer (IKA<sup>®</sup> Labortechnik, D-Staufen) wurden diese über Nacht, auf dem Thermomixer schüttelnd bei 300 rpm und 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer (AL-Buffer) zur Probe wurde diese gründlich mittels Vortexer durchgemischt und anschließend 10 Minuten bei +70 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Schließlich wurden 200 µl 96%iges Ethanol (Sigma-Aldrich) zur Probe zugefügt und danach erneut gründlich mittels Vortexer durchgemischt. Anschließend wurde die gesamte Probe auf die QIAamp Spin-Säule überführt und 1 Minute bei 5.900 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die QIAamp Spin-Säule in ein neues Mikrozentrifugengefäß (2 ml) gegeben. Darauf folgend wurden 500 µl Waschpuffer (AW1-Buffer) zugefügt und die Probe eine Minute bei 5.900 g zentrifugiert. Die QIAamp Spin-Säule wurde anschließend in ein neues Mikrozentrifugengefäß (2 ml) überführt und das alte Sammelgefäß inklusive Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 500 µl Waschpuffer (AW2-Buffer) auf die Säule aufgebracht ohne den Rand zu befeuchten und das Probengefäß drei Minuten lang bei 16.200 g zentrifugiert. Die QIAamp Spin-Säule wurde in ein neues Mikrozentrifugengefäß (1,5 ml) überführt

und der Durchfluss, sowie das alte Gefäß verworfen. Zuletzt wurden 100 µl Elutionspuffer (AE-Buffer) direkt auf die Säule pipettiert, eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute bei 5.900 g zentrifugiert. Das Eluat mit der isolierten DNA wurde bei -20 °C eingelagert.

### 3.2.2.3 Extraktion genomischer DNA aus Faeces

Die Extraktion der Faeces basiert auf dem Protokoll des QIAamp Stool Kits® (Qiagen), es wurde nach BULANDER (2009) modifiziert, da bei den Untersuchungen durch BULANDER mit Hilfe dieses modifizierten Extraktionsverfahrens eine deutlich höhere Nachweisrate von MAP in artifiziell kontaminierten Rinderfaeces erzielt werden konnte. Bei einer durchschnittlichen Paratuberkulose-Erregerkonzentration von  $3,7 \times 10^2$  KbE/g Rinderfaeces wurde eine Nachweisrate von 100% erzielt, wohingegen bei dem unveränderten Protokoll des QIAamp Stool Kits® erst bei einer Erregerkonzentration von  $3,7 \times 10^3$  KbE/g Rinderfaeces diese Nachweisrate erzielt werden konnte. Die Modifikationen bestehen aus einer höheren Einwaage von Faeces, zwei verlängerten Erhitzungsschritten und einer weiteren mechanischen Aufbereitung der Proben mittels Ribolyser. Diese Abänderungen wurden nahezu uneingeschränkt übernommen, jedoch wurde statt dem Ribolyser der Firma Savant Instruments, der Tissuelyser der Firma Qiagen zum mechanischen Aufschluss der Proben verwendet.

In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen wurde 1 g Faeces eingewogen und 5 ml Lysepuffer (ASL-Buffer) hinzugegeben. Danach folgte ein Erhitzungsschritt bei +95 °C für 10 Minuten im Wasserbad. Anschließend wurden 1,4 ml des Überstands in ein Mikrozentrifugationsgefäß (2 ml) überführt und eine sterile Stahlkugel mit 5 mm Durchmesser (Steel-Beads, Qiagen) hinzugegeben. Der mechanische Aufschluss der Probe erfolgte mit Hilfe des Tissuelysers für 4 x 20 Sekunden bei einer Frequenz von 3000 Bewegungen pro Sekunde. Nach gründlichem Durchmischen der Proben mittels Vortexer wurde die gesamte Flüssigkeit in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß umpipettiert und für 5 Minuten bei 5900 g zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde anschließend in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß überführt und eine InhibitEX-Tablette hinzugefügt. Die Lösung der Tablette erfolgte durch manuelles Schütteln. Anschließend wurde eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und danach

gründlich durchgemischt mittels Vortexer. Die Proben wurden bei 16.200 g drei Minuten zentrifugiert und hierauf der gesamte Überstand in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß (1,5 ml) überführt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt von drei Minuten bei 16.200 g. In ein neues Mikrozentrifugationsgefäß (1,5 ml) wurden 20 µl Proteinase K, 300 µl des Überstands und 300 µl Lysepuffer (AL-Buffer) zugegeben und gründlich durchmischt. Die Proben wurden fünf Minuten lang bei +70 °C und im Anschluss zehn Minuten lang bei +95 °C schüttelnd (300 rpm) auf dem Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 96 %igem Ethanol wurde die Probe durchgerüttelt und zwei Mal je ca. 400 µl mit zwischenzeitlich einminütigem Zentrifugieren bei 16.200 g auf die Säule gegeben, da das maximale Fassungsvermögen der QIAamp Spin-Säule bei 500 µl liegt. Nach weiterem einminütigem Zentrifugieren bei 16.200 g wurde die QIAamp Spin-Säule in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß überführt und das Filtrat verworfen. Anschließend wurden 500 µl Waschpuffer (AW1-Buffer) auf die Säule aufgebracht und die Probe eine Minute lang bei 16168 g zentrifugiert. Die Spin-Säule wurde in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß gesetzt. Darauffolgend wurden 500 µl Waschpuffer (AW2-Buffer) auf die Säule aufgebracht und die Probe drei Minuten lang bei 16168 g zentrifugiert. Die QIAamp Spin-Säule wurde zuletzt in ein beschriftetes 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß überführt und 100 µl des Elutionspuffers (AE-Buffer) direkt auf die Membran aufgebracht und nach einer Minute Inkubationszeit eine weitere Minute lang bei 5.900 g zentrifugiert. Das Eluat mit der isolierten DNA wurde bei -20 °C eingelagert.

### **3.2.3 Konventionelle PCR**

Für den konventionellen PCR-Nachweis wurde der BACTOTYPE® PCR Amplification Kit der Labordiagnostik GmbH Leipzig verwendet.

Die Zielsequenz der MAP-DNA ist bei diesem Test-Kit das Insertionselement ISMav2 (KADNER, 2012).

Der im Kit enthaltene PCR Mix beinhaltet DNA und Primer für eine interne Amplifikationskontrolle. Die mitgelieferte Positivkontrolle enthält DNA-Material mit erregerspezifischen DNA-Sequenzen. Bei dem im Kit enthaltenen Magnesiumchlorid ist zusätzlich der Gel-Beladungspuffer für die anschließende Gelelektrophorese enthalten. Die Reagenzien wurden vor der Verwendung

von -20 °C (bzw. ab der zweiten Verwendung um mehrfaches Einfrieren und Auftauen zu verhindern von +5 °C) auf Raumtemperatur gebracht und gemischt.

### 3.2.3.1 Protokoll

Der Mastermix wurde nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 9) erstellt, wobei zu der Anzahl der Proben und der Positiv- und Negativkontrolle noch 10 % Pipettierverlust dazugerechnet wurde. Die Taq DNA Polymerase wurde nach Angaben der Labordiagnostik GmbH Leipzig mit 1 U pro Einzelansatz (0,04 U/ $\mu$ l Endkonzentration) in die PCR eingesetzt.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Mastermix für die konventionelle PCR**

<b>Reagenz</b>	<b>Einzelansatz [<math>\mu</math>l]</b>
<b>PCR-Mix</b>	17,0
<b>Magnesiumchlorid</b>	4,5
<b>Nukleasefreies Wasser</b>	0,6
<b>Taq DNA Polymerase 2,5 U/<math>\mu</math>l</b>	0,4
<b>Gesamt</b>	22,5

Von dem erstellten Mastermix wurden je 22,5  $\mu$ l in eine Kavität eines PCR-Streifen pipettiert und 2,5  $\mu$ l Template (Proben- bzw. Kontroll-DNA), hinzugegeben. Diese Arbeitsschritte wurden räumlich getrennt unter zwei separaten sterilen Werkbänken durchgeführt. Die Proben wurden 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt in die PCR eingesetzt. Je Reaktion entstand ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l. Als Kontrollen wurden die mitgelieferte Positivkontrolle und nukleasefreies Wasser als „no template control“ verwendet. Es wurde der Thermocycler „iCycler“ (Bio-Rad, D-München) verwendet. Das verwendete Protokoll ist Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10: Thermocyclerprotokoll der konventionellen PCR**

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklusanzahl
<b>Initiale Denaturierung</b>	94	3,0	1x
<b>Denaturierung</b>	94	0,5	} 35x
<b>Annealing</b>	60	0,5	
<b>Elongation</b>	72	0,5	
<b>Finale Elongation</b>	72	5,0	1x
<b>Endphase</b>	10	∞	1x

### 3.2.3.2 Gelelektrophorese

Die Längen der amplifizierten DNA Fragmente wurden durch Gelelektrophorese mit 2 %igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) bestimmt.

Bei 600 Watt in der Mikrowelle wurden 0,6 g der Agarose in 30 ml 0,5 TBE-Buffer in Lösung gebracht. Das Gel wurde anschließend leicht schwenkend auf ca. +55 °C abgekühlt, bevor es in den Gelträger gegossen wurde. Anschließend wurde ein Gelkamm mit zwölf Zinken in das Gel eingebracht. Nach einer 20 bis 30 minütigen Aushärtungszeit wurde der Kamm vorsichtig gezogen und das erstarrte Gel in die mit 260 ml 0,5 Laufpuffer gefüllten Gelkammern gelegt. Je 5 µl der Proben, der Positivkontrolle, der Negativkontrolle und 3 µl des DNA-Leiters wurden in die Kavitäten des Gels pipettiert. Nach 50 Minuten bei 120 Volt, wurde das Gel 20 bis 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) schwenkend gefärbt und danach für 8 Minuten in Aqua bidest. entfärbt.

Die DNA-Fragmente wurden mittels UV-Kamera (BioRad) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht. Die Software Quantity One 4.5.0 (BioRad) wurde zur Speicherung und Auswertung der Abbildung des Gels genutzt.

### 3.2.3.3 Auswertung der Ergebnisse

Als positives Ergebnis wurde das Vorhandensein einer erregerspezifischen Bande mit einer Fragmentlänge von 209 bp gewertet. Zusätzlich zu der erregerspezifischen Bande, konnte die Bande der Amplifikationkontrolle bei 838 bp vorhanden sein.

Als negativ wurde ein Ergebnis gewertet, wenn ausschließlich die Bande der Amplifikationskontrolle bei 823 bp sichtbar war.

Die PCR wurde als inhibiert beurteilt, wenn weder die erregerspezifische Bande noch die Bande der Amplifikationskontrolle vorhanden war. In diesem Fall wurde der Test mit der jeweiligen Probe wiederholt.

### **3.2.4 Real-time PCR**

Für die Real-time PCR wurde ein, sich noch in der Entwicklung befindliches Test-Kit, der „BACTOTYPE<sup>®</sup> MAP“, der Labordiagnostik GmbH Leipzig verwendet. Dieses Test-Kit ist noch nicht kommerziell zu erwerben. Das Test-Kit enthält den „MAP-Mix“ inklusive Primer, Sonden und Enzyme, sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Die Zielsequenz der MAP-DNA ist bei diesem Test-Kit das Insertionselement IS900 (KADNER, 2012).

Der „MAP-Mix“ enthält eine MAP-DNA spezifische Primer-Sonden-Kombination (FAM-Fluoreszenz, Anregung bei 492 nm, Emission bei 518 nm). Um falsch negative Ergebnisse auszuschließen, sind in dem Kit zusätzlich zwei Primer-Sonden-Kombinationen für interne Kontrollen enthalten, eine Primer-Sonden-Kombination für die DNA der Amplifikationskontrolle (HEX-Fluoreszenz, Anregung bei 534 nm, Emission bei 559nm) sowie eine Primer-Sonden-Kombination für die DNA der Extraktionskontrolle (Cy5-Fluoreszenz, Anregung bei 646 nm, Emission bei 664 nm) (N.N, 2011b). Als Extraktionskontrolle wird in diesem Kit  $\beta$ -Aktin-DNA aus der Probe amplifiziert (KADNER, 2012).

#### **3.2.4.1 Protokoll**

Die Reagenzien des Testkits wurden lichtgeschützt aufbewahrt, vor der Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut und gemischt.

Die Proben wurden 1:2 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt in die PCR eingesetzt. Je durchgeführter Reaktion wurden 20  $\mu$ l des MAP-Mix und 5  $\mu$ l der verdünnten Probe bzw. der Kontrollen in einen PCR-Streifen pipettiert. Diese Arbeitsschritte wurden räumlich getrennt unter zwei separaten sterilen Werkbänken durchgeführt. Je Reaktion entstand dadurch ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l. Die PCR-Streifen wurden vor dem Einsatz in den Thermocycler kurz zentrifugiert.

Für die Real-time PCR wurde der Thermocycler „IQ5“ (Bio-Rad, D-München) verwendet. Das verwendete two-step Protokoll ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Entsprechend der verwendeten Primer-Sonden-Kombinationen wurden die Werte für FAM, HEX und Cy5 aufgezeichnet, gemessen und detektiert.

**Tabelle 11: Thermocyclerprotokoll der Real-time PCR**

Schritte	Temperatur [ °C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
<b>Initiale Denaturierung</b>	95	10,0	1x
<b>Denaturierung</b>	95	0,25	} 40x <sup>1</sup>
<b>Annealing + Elongation</b>	60	0.50	
<b>Finale Elongation</b>	72	0,51	1x

<sup>1</sup> = Fluoreszenzmessung jeweils am Ende dieses Schrittes

### 3.2.4.2 Auswertung der Ergebnisse

Damit eine PCR gewertet wurde, musste das Fluoreszenzsignal aller Primer-Sonden-Kombinationen (FAM, Cy5 und HEX) der Positivkontrolle einen Ct-Wert unter 36 besitzen. Dadurch ist davon auszugehen, dass die Positivkontrolle Amplifikate der MAP-DNA, der Ampifikationskontrolle und der Extraktionskontrolle enthält. Die Negativkontrolle durfte für ein auswertbares Testergebnis weder ein FAM- noch ein Cy5-Signal aufweisen, jedoch das HEX-Fluoreszenzsignal der Amplifikationskontrolle.

Beim Vorliegen eines positiven FAM-Fluoreszenzsignals und einer exponentiell verlaufenden Kurve wurde das Ergebnis als positiv gewertet. Ein Nachweis der internen Kontrollen an Hand eines HEX-Fluoreszenzsignals bzw. eines Cy5-Fluoreszenzsignals war in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Bakterien-DNA-Konzentrationen zu einem reduzierten bzw. ausbleibenden Signal für die internen Kontrollen führen können.

Als negativ wurde eine Probe dann gewertet, wenn kein FAM-Fluoreszenzsignal, jedoch ein HEX- und ein Cy5-Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden konnten. In diesem Fall ist die Wahrscheinlichkeit einer PCR-Inhibition bzw. einer fehlerhaften Extraktion sehr gering.

Der Test wurde wiederholt, wenn weder ein FAM-, ein Cy5-, noch ein HEX-Fluoreszenzsignal detektiert wurde, da in diesem Fall davon ausgegangen werden musste, dass die PCR inhibiert war. Die jeweilige Probe wurde dann zusätzlich mit nukleasefreiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt in die PCR eingesetzt.

### **3.3 ELISA**

Die Aufstellung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien ist Anhang 8.1 (Tabelle 14 und Tabelle 15) zu entnehmen. Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Testkits sind in Tabelle 16 aufgelistet.

#### **3.3.1 Aufbereitung der Proben**

Das Blut wurde den frisch ausgeweideten Hirschen aus der Bauchhöhle entnommen und in einem 15 ml Serumröhrchen aufgefangen. Es wurde während des Transports stehend gelagert und anschließend im Labor nach der Gerinnung zehn Minuten lang bei 720 g zentrifugiert. Anschließend wurden 1,5 ml des Überstandes in ein beschriftetes 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß überführt. Die Serumprobe wurde anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

#### **3.3.2 Bestimmung der Antikörperkonzentration**

Für die Bestimmung der Antikörperkonzentration im Serum fand der „CATTLETYPE<sup>®</sup> MAP Ab I Paratuberculosis“ der Labordiagnostik GmbH Leipzig Verwendung (vergleiche Tabelle 6). Er wird als komplettes Test-Kit (Kontrollseren, Waschpufferkonzentrat, Probenverdünnungspuffer, Substratlösung, Stopplösung, MAP – Antigen und eine beschichtete Testplatte) angeboten. Bei diesem Testtyp handelt es sich um einen indirekten ELISA zur Antikörperbestimmung mit einer Vorabsorption des Probenmaterials mit *Mycobacterium phlei*.

##### **3.3.2.1 Vorbereitung**

Der Waschpuffer wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Für eine Testplatte wurden daher 25 ml des konzentrierten Waschpuffers mit 225 ml destilliertem Wasser verdünnt. Alle Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

##### **3.3.2.2 Testdurchführung**

Auf einer Vorverdünnungsplatte wurden 10  $\mu\text{l}$  der Serumproben mit 190  $\mu\text{l}$  Verdünnungspuffer vermischt und somit 1:20 verdünnt. Danach erfolgte die Vorinkubation. Hierbei wurden die verdünnten Proben 90 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Testplatte befüllt. In die

Kavitäten wurden je 100 µl der Negativ- und Positivkontrollen im Doppelansatz pipettiert. Die vorinkubierten Serumproben der Hirsche wurden im Einfachansatz pipettiert. Im Anschluss daran wurde die Testplatte abgedeckt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen auf Zellstoff ausgeklopft, drei Mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und zwischendurch wiederholt durch Ausschlagen entleert. In die entleerten Vertiefungen wurden nach dem dritten Waschschrift je 100 µl des Anti-IgG-HRP Konjugats zugegeben. Nach weiterer 30-minütiger Inkubation wurden die Vertiefungen ebenfalls durch Ausschlagen entleert. Erneut wurde je drei Mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen, zwischen den Waschsritten jeweils ausgeschlagen. Nach dem letzten Ausschlagen wurden 100 µl TMB-Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert. Danach wurde die Testplatte abgedeckt und es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Mit der Zeitmessung wurde nach dem Füllen der ersten Vertiefung begonnen. Nach Ablauf der 10 Minuten wurden je 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen gefüllt. Die Zugabe der Stopplösung erfolgte in der gleichen Reihenfolge, in der auch die Substratlösung zugegeben wurde. Innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung erfolgte die Messung der optischen Dichte. Die Messung erfolgte mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

### 3.3.2.3 Auswertung der Messwerte

Der Test wurde als gültig bewertet, wenn der Mittelwert (MW) der OD-Werte bei der Positivkontrolle einen Wert  $\geq 0,7$  ergab und der MW der OD-Werte der Negativkontrolle  $\leq 0,2$  war.

Es wurden jeweils die Mittelwerte aus den OD-Werten der Negativ- und Positivkontrollen berechnet. Folgende Formel wurde für die Auswertung verwendet:

$$\frac{S}{P} = \frac{(OD_{probe} - MW_{ODnk})}{(MW_{ODpk} - MW_{ODnk})}$$

S = OD der Probe

P = OD-Mittelwert der Positivkontrolle

OD = Optische Dichte

MW = Mittelwert

nk = Negativkontrolle

pk = Positivkontrolle

Der S/P-Quotient beschreibt das Verhältnis der Probe (S) zum OD-Mittelwert der Positivkontrolle (P), jeweils nach Abzug des OD-Mittelwerts der Negativkontrolle.

Proben mit einem S/P-Quotienten  $< 0,4$  wurden als negativ befunden. Spezifische Antikörper gegen *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* wurden somit nicht nachgewiesen.

Proben mit einem S/P-Quotienten  $\geq 0,4$  werden als positiv bewertet. Hier wurden spezifische Antikörper gegen *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* nachgewiesen.

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 12: Übersichtstabelle der Untersuchungsergebnisse der makroskopischen, serologischen und molekularbiologischen Untersuchung des Probenmaterials (n.d. = nicht durchgeführt, Lnn.=Lymphknoten)**

	Anzahl	Anzahl positiver Ergebnisse			
		Makroskopisch <sup>1</sup>	ELISA (Serumproben)	konv. PCR (Faeces, Ileocaecalln.)	Real-Time PCR (Ileocaecalln.)
2009/2010	Tiere < 3 Jahre	0	0	n.d.	n.d.
	Tiere ≥ 3 Jahre	1	0	n.d.	n.d.
	Gesamt	1	0	n.d.	n.d.
2010/2011	Tiere < 3 Jahre	0	0	0	0
	Tiere ≥ 3 Jahre	0	0	0	0
	Gesamt	0	0	0	0

<sup>1</sup>: Makroskopische Untersuchung auf paratuberkuloseartige Symptome: Durchfall, vergrößerte Lymphknoten, Abmagerung

#### 4.1 Makroskopische Befunde

Um einem Überblick über den Gesundheitsstatus der untersuchten Tiere zu erhalten und um paratuberkuloseverdächtige Rothirsche mit klinischen Symptomen zu erkennen, wurden die erjagten Tiere während der Probennahme adspektorisch auf Veränderungen hin untersucht und diese schriftlich festgehalten.

Bei acht der 68 (11,8%) untersuchten Rothirsche aus der Jagdsaison 2010/2011 wurden eine oder mehrere pathologische Veränderungen festgestellt. Ein Tier besaß eine verheilte Tarsusfraktur hinten links. Die übrigen Veränderungen waren deutliche, makroskopische Organveränderungen am Geschlinge bzw. am Magen-Darm-Trakt der Tiere. Drei Tiere wiesen multifokal petechiale Blutungen am Dünndarm, zwei an der Lunge auf. Bei einem Hirsch zeigte die Leber einzelne, bindegewebige, weiße Herde mit einem Durchmesser von ca. 7mm. Bei zwei Tieren zeigten sich Organverklebungen. In einem Fall war die Leber mit dem Zwerchfell, im anderen Fall das Netz mit dem Dünndarm verklebt. Bei einem weiteren Tier wies die Lunge knotige Veränderungen auf. Typische Veränderungen, die in der klinischen Phase der Paratuberkulose bei erkrankten Wildwiederkäuern häufig auftreten (DEUTZ und SPERGSER, 2009), wie Abmagerung, Durchfall und vergrößerte Darmlymphknoten, konnten bei den untersuchten Tieren der Jagdsaison 2010/2011 nicht beobachtet werden.

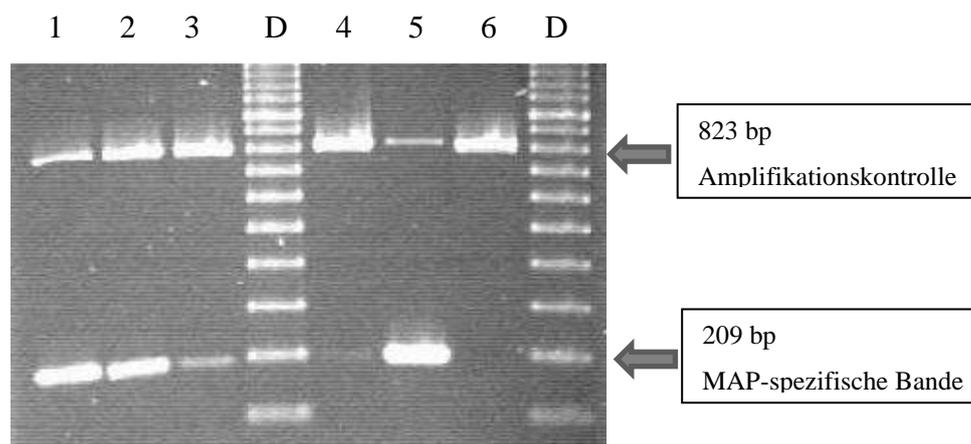
Bei drei von 19 (15,0%) serologisch untersuchten Tieren der Jagdsaison 2009/2010 wurden makroskopische Organveränderungen am Geschlinge bzw. am Magen-Darm-Trakt vermerkt. Bei einem Tier wies die Lunge schwärzliche, knotige Veränderungen auf, bei einem anderen war die Leber mit dem Zwerchfell verwachsen. Bei einem ca. 20 Jahre alten männlichen Hirsch wurden mehrere Auffälligkeiten beobachtet. Er war kachektisch, besaß multiple bis zu 20 mm große Herde in der Leber, vergrößerte Darmlymphknoten mit einem Durchmesser von bis zu 8 cm, zahlreiche Verklebungen und multiple Abszesse am Darm. Die übrigen Tiere wiesen adspektorisch keine krankhaften Veränderungen auf.

## 4.2 PCR

### 4.2.1 Vorversuche

Um sicher zu stellen, dass mittels des angewendeten Extraktionsverfahrens und der verwendeten konventionellen PCR die DNA von MAP aus Faeces von Rothirschen und Dünndarmlymphknoten extrahiert und nachgewiesen werden kann, wurde die Faecesproben und Dünndarmlymphknoten artifiziell mit MAP beimpft (s. Kapitel 3.2.1). Die Extrakte aller Verdünnungsstufen der MAP-Suspensionen wurden in die PCR eingesetzt.

Der Gelausschnitt in Abbildung 12 zeigt, die PCR-Amplifikate der DNA-Extrakte der MAP-Suspension mit dem MAC FARLAND-Wert von 0,5, der  $10^{-1}$ , der  $10^{-2}$  und der  $10^{-3}$  Verdünnungen sowie die DNA-Leiter, die Positivkontrolle und die Negativkontrolle.



**Abbildung 12: Gelausschnitt mit PCR-Amplifikaten der MAP-Verdünnungen**

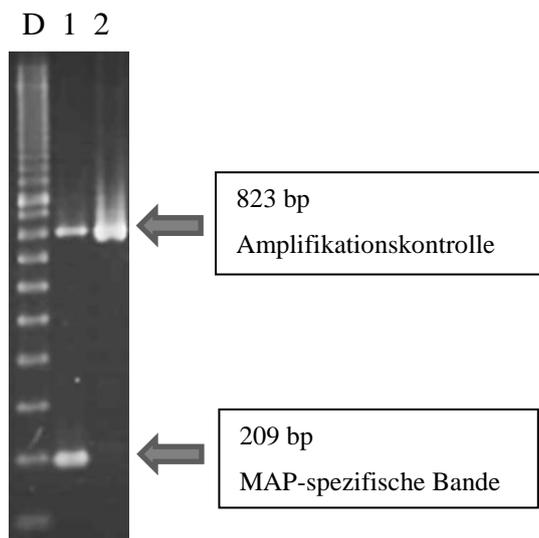
- 1: MAP-Suspension mit MAC FARLAND-Wert von 0,5
- 2:  $10^{-1}$ -Verdünnung
- 3:  $10^{-2}$ -Verdünnung
- 4:  $10^{-3}$ -Verdünnung
- 5: Positivkontrolle
- 6: Negativkontrolle
- D: DNA-Leiter

Bei den in die PCR eingesetzten Extrakten der MAP-Suspension mit MAC FARLAND-Wert von 0,5 und den Verdünnungstufen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  konnten die erregerspezifischen MAP-Amplifikate nachgewiesen werden. Die MAP-spezifische Bande bei 209 bp wurde mit zunehmender Verdünnung schwächer. Bei den MAP-Verdünnungen ab  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  (keine Abb.) konnte keine MAP-

spezifische Bande mehr nachgewiesen werden, sondern lediglich die Bande der Amplifikationskontrolle.

Je 5 g Faeces und Dünndarmlymphknoten wurden mit 1 ml der MAP-Suspension mit dem MAC FARLAND-Wert von 0,5 (stark PCR positiv) bzw. mit 1 ml der  $10^{-3}$ -Verdünnung (schwach PCR positiv) beimpft.

Der Gelausschnitt in Abbildung 13 zeigt die DNA-Amplifikate der nach einem Tag gewonnenen Extrakte aus den beimpften Faecesproben. Beim Extrakt der Faeces die mit der MAP-Suspension mit dem MAC FARLAND-Wert von 0,5 beimpft wurde, ist eine deutlich positive MAP-spezifische Bande sichtbar, bei den Faeces mit der größeren Verdünnung konnte die DNA des Erregers hingegen nicht nachgewiesen werden.

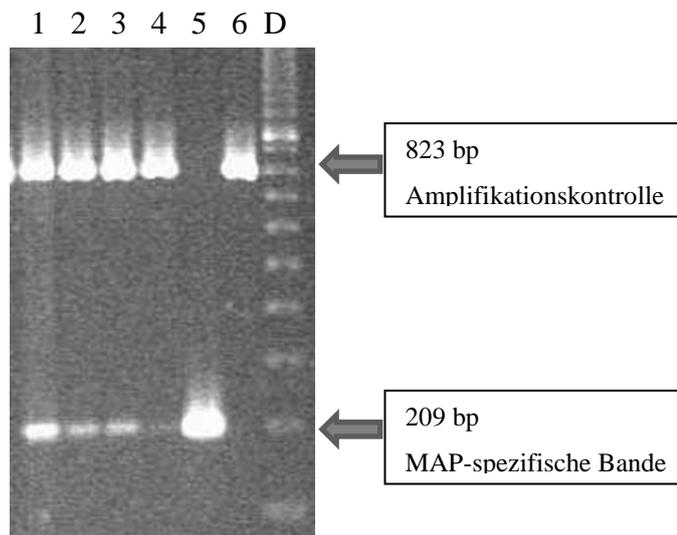


**Abbildung 13: Gelausschnitt der PCR-Amplifikate der Tag-1-Extrakte aus MAP beimpften Faeces**

- 1: Faeces beimpft mit MAP-Suspension mit dem MAC FARLAND-Wert von 0,5
- 2: Faeces versetzt mit  $10^{-3}$ -Verdünnung.
- D: DNA-Leiter

Um sicherzustellen, dass die DNA der Mykobakterien auch nach mehreren Monaten zuverlässig aus tiefgefrorenem Gewebe bzw. Faeces extrahiert werden kann, wurden die Faeces bzw. der Jejunallymphknoten, welche mit der MAP-Suspension mit dem MAC FARLAND-Wert von 0,5 beimpft wurden, nach einem

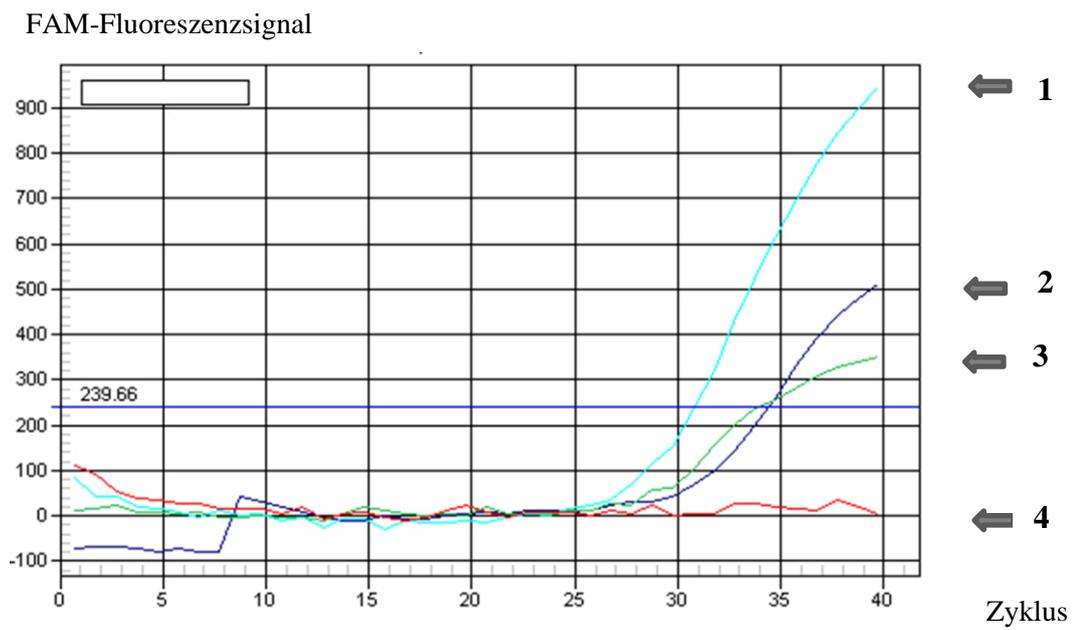
Zeitraum von vier Monaten erneut extrahiert. Die Extrakte wurden unverdünnt und 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt in die PCR eingesetzt (Abbildung 14). Die Extrakte von Faeces und die Lymphknotenextrakte zeigten sowohl unverdünnt, als auch 1:10 verdünnt, eine MAP-spezifische Bande. Allerdings war die MAP-spezifische Bande bei 209 bp bei den beimpften Faeces in der 1:10 Verdünnung nur relativ schwach zu sehen.



**Abbildung 14: Gelausschnitt der PCR-Amplifikate der beimpften Faeces bzw. Dünndarmlymphknoten, nach 4-monatiger Gefrierlagerung**

- 1: Mit MAP beimpfter Jejunallymphknoten
- 2: Mit MAP beimpfter Jejunallymphknoten 1:10 verdünnt
- 3: Mit MAP beimpfte Faeces
- 4: Mit MAP beimpfte Faeces 1:10 verdünnt
- 5: Positivkontrolle
- 6: Negativkontrolle
- D: DNA-Leiter

Die Extrakte der Lymphknoten, die mit der MAP-Suspension mit dem MAC FARLAND-Wert von 0,5 beimpft waren, wurden 1:2 ebenfalls in die Real-Time PCR eingesetzt. Wie Abbildung 15 zeigt, ist sowohl der Extrakt des beimpften Lymphknotens, der nach einem Tag gewonnen wurde in der Real-Time PCR positiv, als auch der Extrakt, der nach einer Wartezeit von vier Monaten extrahiert wurde.

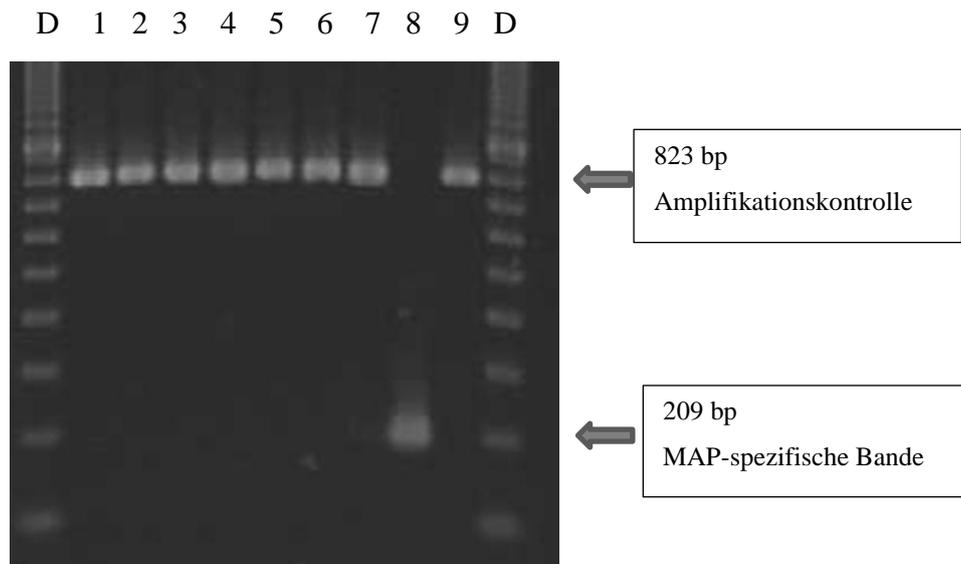


**Abbildung 15: Ergebnisse der Real-Time PCR der beimpften Lymphknoten**

- 1: Positivkontrolle
- 2: Extrakt des beimpften Lymphknotens nach einem Tag Gefrierlagerung  
1:2 verdünnt
- 3: Extrakt des beimpften Lymphknotens nach 4 Monaten eingefroren 1:2  
verdünnt
- 4: Negativkontrolle

#### 4.2.2 Ergebnisse der Untersuchung von Probenmaterial mittels konventioneller PCR

Wie Abbildung 16 exemplarisch zeigt, konnte bei keiner der Proben von Faeces eine MAP-spezifische Bande festgestellt werden. Ebenso konnte bei keinem Ileocaecallymphknoten eine MAP-spezifische Bande nachgewiesen werden.



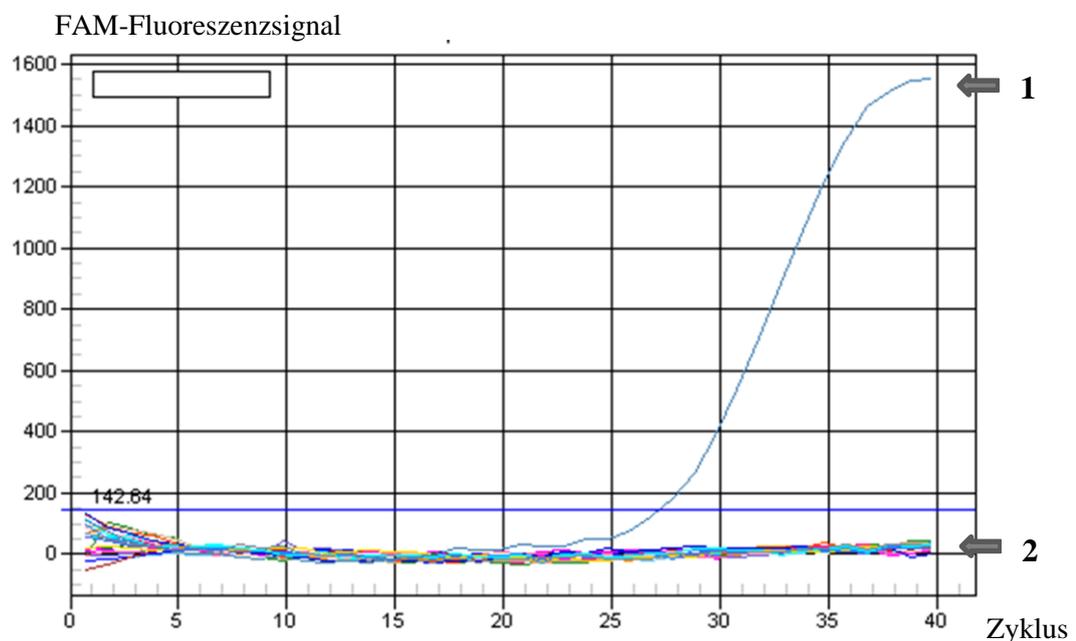
**Abbildung 16: Gel der DNA-Amplifikate von 7 Faecesproben**

- 1–7: Faecesproben Nr: 63, 65, 66, 71, 72, 73, 81
- 8: Positivkontrolle
- 9: Negativkontrolle
- D: DNA-Leiter

Die Faecesproben und die Ileocaecallymphknoten der 68 Tiere wurden somit alle mittels konventioneller PCR negativ auf MAP getestet. Die Jejunallymphknoten der 68 Tiere wurden gesammelt, um im Fall eines positiven Ergebnisses genügend Material für weitergehende Untersuchungen bzw. eine kulturelle Anzucht zu besitzen, da die gesammelten Ileocaecallymphknoten oft nur wenige Gramm schwer waren. Da alle untersuchten Proben in der PCR negativ waren, wurden die Jejunallymphknoten nicht weiter untersucht.

### 4.2.3 Ergebnisse der Untersuchung von Probenmaterial mittels Real-Time PCR

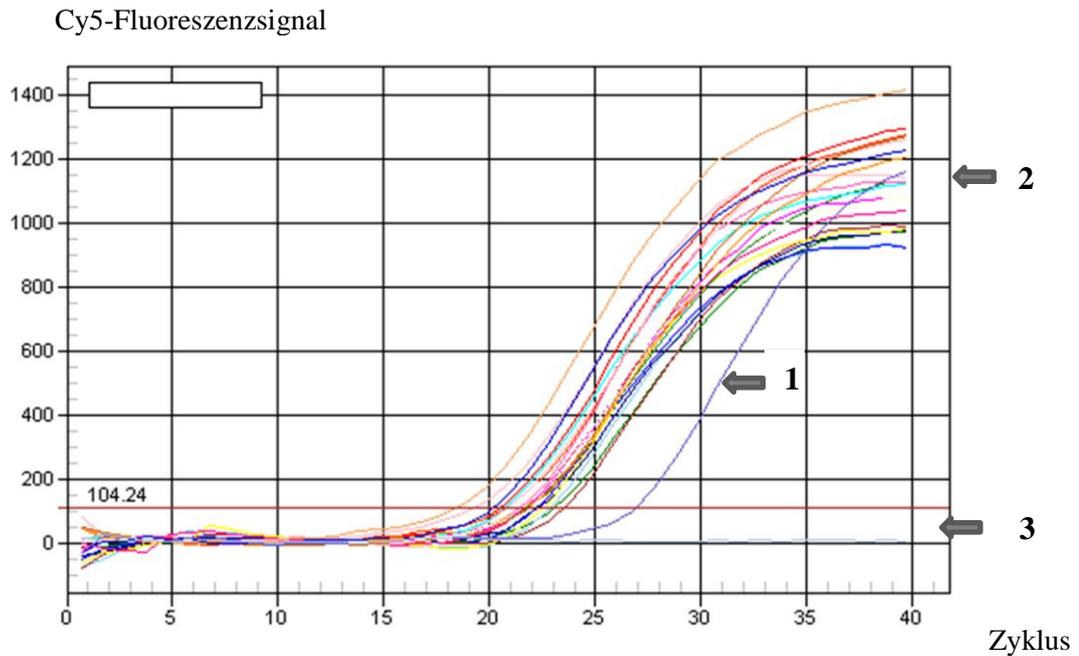
Alle Proben wurden in einer 1:2 Verdünnung in die PCR eingesetzt, sieben Proben waren bei dieser Konzentration inhibiert, d.h. eine HEX-Fluoreszenz war nicht detektierbar. Die Real-Time PCR wurde bei diesen sieben Proben in einer 1:10 Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser wiederholt. Wie Abbildung 17 exemplarisch an Hand von 20 Proben zeigt, konnte bei allen Proben ein negatives FAM-Signal ermittelt werden. Bei allen Proben konnten zudem positive HEX- und positive Cy5-Signale (Abbildung 18) nachgewiesen werden. Die untersuchten Ileocaecallymphknotenextrakte wurden bei der 1:2 bzw. 1:10 Verdünnung nicht inhibiert und waren MAP negativ.



**Abbildung 17: FAM-Fluoreszenzsignale von 20 Ileocaecallymphknotenextrakten:**

1: Positivkontrolle

2: 20 Lymphknotenextrakte + Negativkontrolle



**Abbildung 18: Cy5-Fluoreszenzsignale von 20 Ileocaecallymphknotenextrakten**  
 1: Positivkontrolle  
 2: 20 Lymphknotenextrakte  
 3: Negativkontrolle

### 4.3 ELISA

Die untersuchten 87 Serumproben besaßen alle einen S/P-Quotienten zwischen -0,072 und -0,003 und waren daher deutlich negativ, da bei diesem Testkit Proben erst mit einem S/P-Quotienten von über 0,4 als positiv bewertet werden. Die Auflistung der S/P-Quotienten der einzelnen Tiere sind im Anhang 8.2 in Tabelle 17 ersichtlich. Es konnte in dieser Untersuchung somit kein MAP-Antikörper fragliches bzw. verdächtiges oder positives Tier ermittelt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Vorversuche

Die Vorversuche dienten vornehmlich dem Ziel, Sicherheit im Umgang mit den eingesetzten Extraktionsverfahren und PCR-Testkits zu erhalten. Zudem wurde die Eignung der eingesetzten Extraktionsverfahren zur Extraktion der MAP-DNA aus Faeces und Lymphknoten von Hirschen überprüft. Die während der Jagdsaison 2010/2011 gewonnenen Proben von 68 Rothirschen wurden bis zu drei Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefriergelagert. Nach Abschluss der Jagdsaison wurden die Proben weiter bearbeitet. Daher wurde im Rahmen der Vorversuche auch überprüft, ob sich die MAP-DNA aus dem vorliegenden Probenmaterial nach 4 Monaten noch extrahieren und nachweisen lässt.

LARSEN et al. (1956) beschrieben die kulturelle Anzucht von MAP aus Faeces von Rindern bei einer Lagertemperatur der Proben von  $-14^{\circ}\text{C}$  noch nach 12 Monaten. In einer Studie von RAIZMAN et al. (2011) lag die mittlere Überlebenszeit von MAP in gefrorenen Faeces sowohl bei  $-18^{\circ}\text{C}$  als auch bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bei 24 Monaten. Die Temperaturdifferenz machte keinen signifikanten Unterschied.

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse konnten in den Vorversuchen nachvollzogen werden. So konnte sowohl mittels konventioneller PCR, als auch mittels Real-Time PCR (Abbildung 14, Abbildung 15), MAP-DNA aus beimpften Faeces bzw. Lymphknoten, die vier Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren waren, extrahiert und nachgewiesen werden.

Es bleibt zu diskutieren, wieso der MAP-Nachweis nicht bei den mit der  $10^{-3}$ -Verdünnung beimpften Proben aus Faeces von Hirschen oder Jejunallymphknoten gelang. Untersuchungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze von MAP-DNA aus beimpften Hirschfaeces liegen in der Literatur nicht vor. In einigen Studien wurde Rinderfaeces mit MAP beimpft und so die Nachweisgrenze der eingesetzten PCR errechnet. In einer Studie von BÖGLI-STUBER et al. (2005) wurden beimpfte und native Proben von Rinderfaeces mit einer IS900-basierten Real-Time PCR auf MAP untersucht. Der MAP-Nachweis konnte bei einer Erregerkonzentration von 500 Kbe/g Faeces bei 100% der untersuchten Proben erzielt werden. In einer Studie von VANSNICK et al.

(2007) lag die Nachweisgrenze in beimpften Faeces bei  $10^2$  KBE/g. BULANDER (2009) konnte mit Hilfe des QIAamp Stool Kits<sup>®</sup> in modifizierter Form als Extraktionsverfahren und einer Real-time PCR basierend auf den MAP-Markern F57 und ISMav2 bei  $3,7 \times 10^2$  KBE/g Rinderfaeces eine Nachweisrate von 100 % erzielen.

Die Ergebnisse der Vorversuche in der vorliegenden Arbeit können nicht mit den oben aufgeführten Studien verglichen werden, da keine Keimzahlbestimmung erfolgte, sondern lediglich eine dekadische Verdünnungsreihe, ausgehend von einem MAC FARLAND-Wert von 0,5 erstellt wurde. MAP konnte aus den Lymphknoten und den Faecesproben der 68 Rothirsche, die mit der Erregersuspension von einem MAC FARLAND-Wert von 0,5 versetzt wurden, sowohl nach einem Tag, als auch nach vier Monaten bei  $-20\text{ °C}$ , extrahiert und nachgewiesen werden. Der MAP-Nachweis gelang hingegen nicht bei den mit der  $10^{-3}$ -Verdünnung beimpften Proben aus Faeces bzw. Jejunallymphknoten von Hirschen. Es ist anzunehmen, dass in diesem Fall die Anzahl der Paratuberkuloseerreger unter die Nachweisgrenze gefallen ist, da durch die Verwendung von 1 ml MAP-Suspension auf 5 g Faeces bzw. Gewebe eine weitere Verdünnung erfolgte. Ein weiterer Erklärungsansatz für den fehlenden Erregernachweis bei der höheren Verdünnung können unspezifische Bindungen an der Silikagel-Membran der QIAamp Spin-Säule sein. Dadurch kam es möglicherweise zu einer unvollständigen Elution der DNA.

Eine andere mögliche Erklärung für den mangelnden Nachweis des Erregers bei den mit der  $10^{-3}$ -Verdünnung beimpften Proben ist eine unzureichende homogene Verteilung des Erregers in der Probe, da MAP in der Lage ist Zellaggregate zu bilden (GRANT et al., 2005). Um dieser möglicherweise inhomogenen Verteilung entgegen zu wirken, wurden die Faeces vor der artifiziellen Kontamination intensiv mittels eines Stomachers<sup>®</sup> homogenisiert und die Proben der Lymphknoten mittels eines Dispergierers homogenisiert. Anschließend erfolgte eine manuelle Vermischung der Proben mit der MAP-Verdünnung. Daher kann in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden, dass das Fehlen des Erregernachweises bei den mit der  $10^{-3}$ -Verdünnung beimpften Proben eher auf eine zu geringe Erregermenge bzw. eine unvollständige Elution zurück zu führen ist, als auf eine inhomogene Verteilung des Erregers.

## 5.2 Untersuchung des Probenmaterials

Die Paratuberkulose ist weltweit verbreitet. In Deutschland wurden im Jahr 2009 380 Paratuberkulosefälle bei Wiederkäuern gemeldet. Diese Meldungen sind jedoch aufgrund der hohen Zahl subklinisch erkrankter Tiere nicht aussagekräftig. Es wurden daher viele Prävalenzstudien durchgeführt (s. Kapitel 2.3.3), um das Paratuberkulosevorkommen in Deutschland, sowie weltweit abschätzen zu können (KLEE, 2003; PROBST und KUBITZA, 2010). Bei den nachfolgend aufgeführten Studien wurde unterschiedliches Probenmaterial von Rindern serologisch, molekularbiologisch und/oder kulturell untersucht. In Thüringen konnte eine serologische Einzeltierprävalenz von 8,8% bei 43.000 Blutproben und eine kulturelle Einzeltierprävalenz von 3,9% bei 29.318 Faecesproben ermittelt werden (ELSCHNER, 2005; SCHAU, 2011). In Sachsen wurden zwischen 2002-2004 55.394 Blutproben untersucht und eine serologische Einzeltierprävalenz von 3,9% errechnet (DONAT, 2005). In Sachsen-Anhalt wurden mittels PCR im Jahr 2003 17% der 261 Faecesproben als positiv bewertet (SCHLIEPHAKE et al., 2005). In Bayern konnten, abhängig von der ELISA-Methode, Einzeltierprävalenzen von 0,9-1,5% bei 2748 Serumproben ermittelt werden (BÖTTCHER et al., 2004). In Österreich wurden bei 756 Blutproben mittels ELISA Einzeltierprävalenzen von 19% nachgewiesen (DREIER et al., 2006). Die ermittelten Einzeltierprävalenzen für Rinder liegen an Hand dieser Studien somit zwischen 0,9% und 19%.

Bei Wildwiederkäuern wurden in Nachbarländern zum Nationalpark Bayerischer Wald vor allem drei größere Studien durchgeführt, davon zwei in der Tschechischen Republik und eine in Österreich. In der gesamten Tschechischen Republik wurden zwischen 2004 bis 2006 Faecesproben von 2212 Rothirschen kulturell untersucht und lediglich ein MAP-positives Tier nachgewiesen (PRIBYLOVA et al., 2011). Bei einer anderen Studie in der gesamten Tschechischen Republik von PAVLIK et al. (2000) wurden Faeces- und Gewebeproben zwischen 1997 und 1998 kulturell untersucht. Bei 1,5% der 336 Rehe und bei 7,1% der 132 Rothirsche konnte MAP nachgewiesen werden. In der Steiermark (Österreich) wurden zwischen 2002 und 2008 717 Wildtiere mittels PCR auf MAP hin untersucht (s. Tabelle 1) Von den 357 Rehen waren 27,8%, von den untersuchten 127 Rothirschen 26,7% MAP-positiv (DEUTZ und SPERGSER, 2009).

Diese Studien lassen auf eine weite Verbreitung der Paratuberkulose in Rinderbeständen, aber auch bei Wildwiederkäuern schließen. In den eigenen serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnten jedoch bei keinem der untersuchten Rothirsche MAP-spezifische Antikörper bzw. MAP-spezifische DNA nachgewiesen werden.

### **5.2.1 Makroskopische Untersuchung der Rothirsche**

Bei MAP-positiven Wildwiederkäuern in der Steiermark konnten paratuberkulose typische Symptome wie Abmagerung, Hinweise auf Durchfall, verzögerter Haarwechsel, verspätetes Verfegen, abnormer Geruch bei frischtoten Tieren, vergrößerte Mesenteriallymphknoten, Ödeme im Bereich des Darmtraktes sowie Aszites festgestellt werden (DEUTZ und SPERGSER, 2009). PAVLIK et al. (2000) konnten in ihrer Studie in der Tschechischen Republik bei einigen der MAP-positiven Wildwiederkäuern ebenfalls diese klinische Symptome der Paratuberkulose vermerken.

Im Nationalpark Bayerischer Wald wurden abgemagerte Rothirsche in den letzten Jahren lediglich in Verbindung mit einer Verletzung registriert (HEURICH, 2011). Diese Beobachtungen wurden durch die Ergebnisse der adspektorischen Untersuchung der beprobten Rothirsche bestätigt. Die untersuchten Tiere waren adspektorisch gesund und wiesen bis auf eine Ausnahme keine paratuberkulose typischen, pathologischen Veränderungen wie Abmagerung und vergrößerte Darmlymphknoten auf. Lediglich ein 20-jähriger Hirsch aus der Jagdsaison 2009/2010 zeigte klinische Anzeichen einer Paratuberkulose. Er war kachektisch und besaß vergrößerte Dünndarmlymphknoten mit einem Durchmesser von bis zu 8 cm. Von diesem Tier konnte jedoch nur die Serumprobe auf Antikörper hin untersucht werden, da aus der Jagdsaison 2009/2010 keine Gewebeproben bzw. Faecesproben mehr vorlagen.

In der vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Tiere makroskopisch untersucht und beprobt, die im Rahmen des normalen Abschussplans des Nationalparks erlegt wurden. Im Gegensatz zu den genannten Studien von PAVLIK et al. (2000) und DEUTZ und SPERGSER (2009) wurde kein Fallwild beprobt. Die Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen weisen auf einen gesunden Rothirschbestand hin und geben keinen Hinweis auf

Paratuberkuloseerkrankungen. Mögliche Gründe dafür werden unter Punkt 5.2.2 näher erläutert.

### 5.2.2 Molekularbiologische und serologische Ergebnisse

Die PCR und der ELISA als Nachweismethoden für die Paratuberkulose werden häufig verwendet (s. Kapitel 2.3.6), da die kulturelle Nachweismethode als Goldstandard sehr langwierig ist und die Kulturen häufig durch Fremdwachstum überwuchert werden. Die Sensitivität der PCR ist mit 60%, bezogen auf die kulturelle Anzucht, im Vergleich zu anderen Nachweismethoden relativ hoch. Die Mikroskopie besitzt beispielsweise eine Sensitivität von 19%, die AGID eine Sensitivität von 13,8% und die KBR eine Sensitivität von 17,2% (ZIMMER et al., 1999; Reichel et al., 1999; TADDEI et al., 2004; GUMBER et al., 2006; PROBST und KUBITZA, 2010; PROBST und KUBITZA, 2011). Die PCR liefert schnelle Ergebnisse. Sie besitzt gegenüber dem ELISA den Vorteil, dass positive Tiere auch in der subklinischen Phase der Erkrankung, in der sich noch keine Serokonversion vollzogen hat, nachgewiesen werden können. Ein weiterer Nachteil des ELISA besteht darin, dass auch Erregerausscheider vereinzelt als negativ detektiert werden. Andererseits besteht durch den ELISA die Möglichkeit paratuberkulosepositive Tiere zu detektieren, auch wenn diese in der PCR auf Grund der intermittierenden Erregerausscheidung über Faeces als negativ detektiert würden (WHITLOCK und BUERGELT, 1996; STABEL et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden aus der Jagdsaison 2010/2011 jeweils Ileocaecallymphknoten bzw. Faecesproben von 68 Hirschen (insgesamt 136 Proben) mittels konventioneller **PCR** auf MAP hin untersucht. Die Extrakte der Ileocaecallymphknoten wurden zusätzlich mittels Real-Time PCR untersucht und alle Proben gleichsam negativ beurteilt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie es bei der Untersuchung auf MAP zu negativen Ergebnissen aufgrund der PCR als Nachweismethode kommen kann, wie z.B. durch Inhibitoren, eine fehlerhafte Extraktion, Zellaggregatbildung der Mykobakterien, intermittierender Erregerausscheidung über Faeces oder aufgrund einer zu geringen Nachweisgrenze der PCR.

Dass verschiedene PCR-Inhibitoren zu falsch negativen Ergebnissen in der PCR führen können, ist hinreichend bekannt (HARRIS und BARLETTA, 2001; KONAINS

und REED, 2006; BESSETTI, 2007). Die PCR-Produkte der mitgeführten Amplifikationskontrolle waren in der 1:10 Verdünnung der Extrakte stets nachweisbar, daher kann eine Inhibition als Grund für die negativen Ergebnisse in diesem Fall ausgeschlossen werden.

Das Vorhandensein von DNA in den Extrakten und somit eine korrekte Extraktion wurde durch die positiven Cy5-Fluoreszenzsignale der Extraktionskontrolle,  $\beta$ -Aktin, in der Real-Time PCR bestätigt. Eine inkorrekte Extraktion kann daher als Erklärung für die negativen Ergebnisse in der PCR ebenfalls ausgeschlossen werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass MAP in der Lage ist Zellaggregate zu bilden (HAMMER et al., 2002; GRANT et al., 2005). Bei den kleinen Probenmengen, die in die Extraktion eingesetzt werden, besteht daher die Gefahr, Stellen zu beproben, die keine Mykobakterien enthalten. Dadurch sind positive Tiere möglicherweise nicht als solche zu erkennen. BULANDER (2009) verwendete das QIAamp Stool Kit<sup>®</sup> in modifizierter Form als Extraktionsverfahren und eine Real-Time PCR basierend auf den MAP-Markern F57 und ISMav2 als Nachweismethode. Um dem oben beschriebenen Problem der Zellaggregatbildung entgegenzuwirken, hat BULANDER (2009) die Faeces vor der Einwaage gut durchmischt und die Einwaage von den eigentlich maximal vorgegebenen 220 mg im QIAamp Stool Kit<sup>®</sup> auf 1 g erhöht. Diese Abänderungen wurden in dieser Arbeit übernommen. Die Lymphknoten wurden zudem vor der Einwaage mit dem Ultra-Turrax<sup>®</sup> homogenisiert. Falsch negative Ergebnisse auf Grund der Zellaggregatbildung der Mykobakterien sind daher als unwahrscheinlich einzustufen, aber nicht gänzlich ausgeschlossen.

Die intermittierende Erregerausscheidung über die Faeces während der subklinischen Phase der Erkrankung kann ein weiterer Grund für mögliche falsch negative Ergebnisse in der PCR von Faeces sein (WITHLOCK und BUERGELT, 1996). Über Faeces werden in der klinischen Phase jedoch die meisten Erreger ausgeschieden, weshalb sich die Untersuchung von Faeces sehr gut für klinisch erkrankte Tiere eignet (CHIODINI et al., 1984).

Die typische Läsionen bedingt durch Mykobakterien finden sich in den regionären Lymphknoten des Magen-Darm-Trakts schon früher im Infektionsgeschehen als beispielsweise im Jejunum selbst. Daher ist anzunehmen, dass der molekularbiologische Nachweis aus den Lymphknoten öfter auch in der

subklinischen Phase der Erkrankung möglich ist (TOOKER et al., 2002; CLARK et al., 2010). DEUTZ und SPERGSER (2009) beprobten beispielsweise in ihrer Studie Mesenterial- und Portallymphknoten, untersuchten diese mittels PCR und konnten MAP-positive Tiere nachweisen. Durch die parallele Untersuchung von Faeces und Ileocaecallymphknoten sollte in dieser Arbeit verhindert werden, dass positive Tiere nicht als solche erkannt werden.

Die Zielsequenzen der eingesetzten PCR-Kits sind die Insertionselemente IsMav2 bei der konventionellen und IS900 bei der Real-Time PCR. Diese Zielsequenzen werden in der Literatur als MAP-spezifisch und geeignet für den MAP-Nachweis beschrieben (GREEN et al., 1989; STROMMENDER et al., 2001; BÖGLI-STUBER et al., 2005; BULANDER, 2009). In einigen Studien (s. Kapitel 5.1) mit artifiziell kontaminierten Rinderfaeces wurden die Nachweisgrenzen verschiedener PCR-Methoden getestet. Die ermittelten Nachweisgrenzen lagen alle im Bereich um  $10^2$  KBE/ g Faeces (BÖGLI-STUBER et al., 2005; VANSNICK et al., 2007; BULANDER, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Ermittlung der Nachweisgrenzen der beiden PCR-Kits vorgenommen. Die angewendete 1:10 Verdünnung, welche Inhibitionen verringert, erhöht jedoch die Nachweisgrenze. Daher kann eine methodisch bedingte geringe Nachweisgrenze als Grund für negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend sprechen die sichtbare Bande der Amplifikationskontrolle, das positive Cy5-Fluoreszenzsignal der Extraktionskontrolle in der Real-Time PCR, die Modifikationen der Extraktion mit dem QIAamp Stool Kit<sup>®</sup> und die parallele Untersuchung von Faeces- und Lymphknotenproben gegen methodisch bedingte negative Ergebnisse in der PCR. Negative Ergebnisse bedingt durch die Nachweisgrenze der Methode können jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

**Serologisch** wurden in dieser Arbeit 87 Serumproben von Rothirschen auf MAP-Antikörper hin untersucht und alle negativ beurteilt. Durch die Ergebnisse der oben aufgeführten Prävalenzstudien wurde auch hier eine höhere Seroprävalenz erwartet. Negative Ergebnisse bei den ELISA als Nachweismethode können insbesondere in der langen Phase der Erkrankung bis zur Serokonversion auftreten. Beim Rind kann diese Phase zwei bis zehn Jahre andauern (WITHLOCK und BUERGELT, 1996). Von den 87 serologisch untersuchten Exemplaren waren

lediglich 24 Tiere älter als drei Jahre. DEUTZ (2004) konnte aber bereits Erkrankungsfälle bei vier bis sechs Monate alten Kitzen und Kälbern von Reh-, Gamswild und Rothirsch beobachten. Dies deutet darauf hin, dass das Krankheitsgeschehen beim Rothirsch schneller voranschreitet als bei Rindern und folglich auch die subklinische Phase kürzer ist. Diese diagnostische Lücke des ELISAs sollte zudem mit der molekularbiologischen Untersuchung der Lymphknoten soweit wie möglich kompensiert werden. Es können also negative Ergebnisse bedingt durch den ELISA als Nachweismethode nicht komplett ausgeschlossen werden. Allerdings sprechen die kürzere Phase bis zur Serokonversion bei Wildwiederkäuern und die zusätzliche molekularbiologische Untersuchung von je 68 Lymphknoten gegen ein vermehrtes Vorkommen methodisch bedingter negativer Ergebnisse im ELISA.

Nach Erörterung der serologischen und molekularbiologischen Ergebnisse soll nachfolgend diskutiert werden, ob die Tiere aufgrund der negativen Ergebnisse als MAP-frei angenommen werden können. Der gesamte Rothirschbestand im Nationalpark Bayerischer Wald umfasst ca. 400 Tieren (HEURICH, 2012). In dieser Arbeit wurden Proben von 68 Hirschen aus diesem Bestand molekularbiologisch und serologisch untersucht, was mit einem Anteil von ca. 17% des gesamten Bestandes eine repräsentative Stichprobe darstellt. Als Hauptübertragungsweg der Paratuberkulose von Rindern auf Rothirsche nehmen DEUTZ und SPERGSER (2009) die gemeinsame Nutzung von Weideflächen an. Als Lenkungseffekt empfehlen sie daher einen vermehrten Abschuss der Wildtiere in der Nähe von Weideflächen. Im Einzugsgebiet des Nationalparks Bayerischer Wald wird keine Weidehaltung betrieben. Weideflächen, die direkt an den Nationalpark grenzen, befinden sich lediglich im östlichen Teil des Nationalparks in der Gegend von Neuschönau, dort werden nach Aussagen der Jäger jedoch kaum Rothirsche gesichtet (HEURICH, 2012). Zudem wurden in einer Studie von HOFFMANN und BÖTTCHER (2005) bei Rindern in der Region nördlich von Passau über den Bayerischen Wald, die Oberpfalz bis nach Oberfranken signifikant weniger MAP-Seroreagenten gefunden als südlich der Donau bis in die Voralpen. Diese beiden Punkte sprechen dafür, dass sich die Rothirsche nur mit geringer Wahrscheinlichkeit über Faeces von paratuberkulosepositiven Rindern infizieren .

In einigen Teilen Österreichs werden Abschusspläne bewusst nicht erfüllt, um die Jagd für zahlende Jäger attraktiver zu gestalten. Der daraus resultierende enge Wildtierkontakt erhöht zwangsläufig den Infektionsdruck für Erkrankungen, z. B. hervorgerufen durch Mykobakterien (FINK, 2011). Im Nationalpark Bayerischer Wald werden die Abschusspläne sehr genau eingehalten, um die nach bayerischem Jagdgesetz (BayJG) Art. 1 3. geforderte natürliche Verjüngung des Baumbestands zu ermöglichen. Dadurch ist der Besatz mit ca. 400 Rothirschen bzw. ca. 1–2 Hirschen pro 100 Hektar im Nationalpark relativ gering, so dass hier mit keinem erhöhten Infektionsdruck für Erkrankungen wie beispielsweise Paratuberkulose zu rechnen ist.

DEUTZ und SPERGSER (2009) geben als eine der Hauptbekämpfungsmaßnahmen gegen die Paratuberkulose bei Rothirschen an, die Bodenvorlage von Futter in den Wintergattern möglichst zu vermeiden, um so einer oralen Infektion durch erregerhaltige Faeces vorzubeugen. Im Nationalpark werden durch ein gezieltes Fütterungsmanagement lediglich ca. 30% der Futtermittel direkt vom Boden aufgenommen. Das Heu wird in Raufen angeboten, die Siloballen auf den Boden gestellt, lediglich die Zuckerrüben werden auf dem Boden ausgelegt. Der Futterplatz wird einmal jährlich im Frühjahr von fäkalen Verunreinigungen befreit, so dass dadurch eine Erregeraufnahme durch mit Faeces kontaminierte Futtermittel nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

Eine Erregeraufnahme durch von Faeces kontaminierte Silage stellt, wie unter Punkt 2.3.7 beschrieben, eine weitere Infektionsmöglichkeit dar (KLEE, 2007). Die Futtermittel für die Hirsche in den Wintergattern werden von Landwirten aus der näheren Umgebung geliefert, so dass eine Kontamination der Futtermittel mit erregerhaltigen Faeces von paratuberkulosepositiven Rindern auch hier nicht völlig ausgeschlossen werden kann (HEURICH, 2011). Daher muss auch an eine Erregeraufnahme der Hirsche über die erwähnte, möglicherweise kontaminierte Silage bzw. das Heu, gedacht werden.

MAP kommt laut Literatur zudem in Gegenden mit niedrigem Boden-pH vermehrt vor. Der Boden im Nationalpark Bayerischer Wald ist vergleichsweise sauer, daher wäre grundsätzlich ein vermehrtes Vorkommen des Erregers denkbar gewesen (KLEE, 2003; UMWELTBUNDESAMT, 2006; BEUDERT, 2012). Da keine Bodenproben untersucht wurden, kann zu dem Vorkommen von MAP im Boden des Nationalparks keine Aussage getroffen werden, jedoch lassen die durchweg

negativen Ergebnisse der untersuchten Proben nicht auf ein erhöhtes MAP-Vorkommen in den Böden des Nationalparks schließen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die weite Verbreitung der Paratuberkulose, der Erregernachweis bei Rothirschen in Österreich und Tschechien und der niedrige Boden-pH im Nationalpark Bayerischer Wald paratuberkulosepositive Tiere im Nationalpark vermuten ließ. In den eigenen serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnten jedoch bei keinem der untersuchten Rothirsche MAP-spezifische Antikörper bzw. MAP-spezifische DNA nachgewiesen werden. Negative serologische Ergebnisse durch Beprobung von Tieren in der subklinischen Phase der Erkrankung und negative Ergebnisse in der PCR durch eine methodisch bedingte Nachweisgrenze können nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Befunde der makroskopischen Untersuchung, die relativ große Stichprobe von ca. 17% des Rothirschbestands im Nationalpark, die kaum beobachtete gemeinsame Weidenutzung von Rindern und Hirschen, die geringe Bodenvorlage des Futters und die niedrige Bestandsdichte im Nationalpark sprechen allerdings für einen paratuberkulosefreien Rothirschbestand in besagtem Gebiet.

## 6 Zusammenfassung

Die Paratuberkulose ist eine tödlich verlaufende, chronische, granulomatöse Enteritis bei Haus-, Zoo- und Wildwiederkäuern, die durch das *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. In Rinderbeständen stellt sie v.a. durch den Rückgang der Milchleistung bereits in der subklinischen Phase der Erkrankung eine wirtschaftlich bedeutende Erkrankung dar. Zusätzlich wird ein zoonotisches Potential des Erregers seit langem kontrovers diskutiert. Eine gegenseitige Übertragung des Erregers zwischen Rindern und Rothirschen wird in der Literatur diskutiert und in der Steiermark (Österreich) konnte ein Anstieg der Paratuberkulose beim Rothirsch im Zeitraum zwischen 2002 bis 2008 beobachtet werden. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, einen umfassenden Einblick über die Bedeutung und das Vorkommen des Erregers bei Rothirschen im Nationalpark Bayerischer Wald, stellvertretend für die Rothirschpopulation in ganz Bayern, zu erhalten.

Untersucht wurden 87 Serumproben aus den Jagdsaisons 2009/2010 und 2010/2011 sowie Faeces und Ileocaecallymphknoten von 68 Rothirschen aus der Jagdsaison 2010/2011. Die Rothirsche der Jagdsaison 2010/2011 wurden zudem adspektorisch untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden für den Nachweis von MAP ein ELISA, die konventionelle und die Real-Time PCR verwendet.

Die Ergebnisse der adspektorischen, serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich bei den untersuchten Tieren um paratuberkulosefreie Rothirsche handelte. Dies ist vermutlich auf die seltene gemeinsame Weidenutzung von Rindern und Hirschen, die geringe Bodenvorlage des Futters und die niedrige Bestandsdichte im Nationalpark zurückzuführen.

Da es das langfristige Ziel der Nationalparkverwaltung ist, die bestehenden Wintergatter aufzulösen und die natürlicherweise durchgeführten Wanderungen der Rothirsche im Winter wieder zuzulassen, wäre eine weiterführende, stichprobenartige Untersuchung an Rothirschen im Nationalpark Bayerischer Wald von großem Interesse, um die Entwicklung hinsichtlich des Paratuberkulosestatus zu verfolgen.

## 7 Summary

### Evaluation of meaning and occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bavarian red deer.

Paratuberculosis, caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), is characterized by a chronic and incurable granulomatous enteritis mainly affecting ruminants.

In cattle livestock it marks an economically important disease due to decreasing milk yield during the subclinical phase of the disease. In humans, a zoonotic potential has been the subject for quite some time.

Cross contamination of cattle and deer is very likely and an increase of paratuberculosis of deer in "Steiermark" (Austria) has been reported from 2002 to 2008.

The objective of this study was to get an overview of the occurrence of MAP in deer from the "Nationalpark Bayerischer Wald" (Germany). Therefore, 87 serum samples of red deer, from the hunting seasons 2009/2010 and 2010/2011, and additionally 68 fecal samples and ileocaecal lympho node samples, from the hunting season 2010/2011, were analysed. As culture proof is tedious and the agar plates are often overgrowth due to other bacterial growth than MAP, an ELISA and conventional and real-time PCR were used for the diagnosis of MAP in red deer.

The results of the adspectoric, serologic and biomolecular analysis indicate that the examined red deer seemd to be free of paratuberculosis. This might be due to scare sharing of gazing area by cattle and red deer within the national park, the feeding mostly in feed troughs, and the low population density of red deer at the national park.

The administration of the national park plans to open the winter fences for natural migration of the animals in the future. Further monitoring of the MAP status in the red deer population is recommended.

## 8 Anhang

### 8.1 Material

Tabelle 13: Übersicht über beprobte und untersuchte Rothirsche (m=männlich; w=weiblich; DüDa=Dünndarm; Lnn.=Lymphonodi, o.B.= ohne Befund)

Tier-nummer	Proben-nahme	Alter [a]	Geschlecht/Trächtigkeit	Lebend-gewicht geschätzt [kg]	Makroskopische Organ-veränderungen
8	02/12/09	0,5	w	50-55	o.B.
9	15/12/09	0,5	m	55-60	schwarze. knotige Verhärtungen in der Lunge
10	15/12/09	20	m	80	abgemagert, multiple Herde in der Leber (bis 20cm), vergrößerte Lnn. am DüDa bis ca. 8cm, zahlreiche Verklebungen und Abszesse am Darm
11	15/12/09	7,0	w/trächtig	95	o.B.
12	15/12/09	10	w/trächtig	85	Zwerchfell und Leber verwachsen
14	17/12/09	1,5	w/trächtig	60-65	o.B.
15	17/12/09	1,5	w	60-65	o.B.
16	17/12/09	4,5	w/trächtig	70	o.B.
17	17/12/09	0,5	m	50	o.B.
19	17/12/09	1,5	w	55	o.B.
20	15/01/10	1,0	w/trächtig	70-75	o.B.
21	15/01/10	0,5	m	60	o.B.
22	15/01/10	1,5	m	70-75	o.B.
23	15/01/10	7,0	w/trächtig	70-75	o.B.
24	15/01/10	0,5	m	50	o.B.
26	15/01/10	1,5	w	80-85	o.B.
27	15/01/10	9,0	w/trächtig	85	o.B.
28	15/01/10	11	w/trächtig	85-90	o.B.
30	31/01/10	10	m	120	o.B.
31	18/11/10	6,0	w	70	o.B.
32	18/11/10	0,5	w	45	einzelne bindegewebige weiße Herde in der Leber, ca. 7mm Durchmesser

Tabelle 13, Fortsetzung

Tier- nummer	Proben- nahme	Alter [a]	Geschlecht/ Trächtigkeit	Lebend- gewicht geschätzt [kg]	Makroskopische Organ- veränderungen
33	30/11/10	1,5	m	75	Verklebung Leber und Zwerchfell
34	30/11/10	1,5	w/trächtig	70	o.B.
35	30/11/10	7,5	w/trächtig	85	o.B.
36	30/11/10	11	w/trächtig	90	o.B.
37	30/11/10	0,5	w	45	o.B.
38	07/12/10	1,5	m	70	o.B.
39	07/12/10	1,5	m	70	o.B.
40	07/12/10	5,5	w/trächtig	75	o.B.
41	07/12/10	0,5	m	40	o.B.
42	16/12/10	0,5	m	50	o.B.
43	16/12/10	6,5	w/trächtig	85	o.B.
44	16/12/10	0,5	m	55	o.B.
45	16/12/10	9,0	w/trächtig	85	o.B.
46	16/12/10	0,5	w	45	o.B.
47	16/12/10	0,5	m	50	o.B.
48	16/12/10	7,0	w/trächtig	80	o.B.
49	16/12/10	0,5	m	50	o.B.
50	16/12/10	2,5	w/trächtig	75	o.B.
51	16/12/10	0,5	m	40	o.B.
52	16/12/10	1,5	w/trächtig	75	o.B.
53	16/12/10	1,5	m	80	o.B.
54	16/12/10	1,5	w/trächtig	60	o.B.
55	18/12/10	2,5	m	80	o.B.
56	18/12/10	10	w/trächtig	75	o.B.
57	18/12/10	1,5	w/trächtig	65	o.B.
58	18/12/10	1,5	w	60	o.B.
59	18/12/10	0,5	w	65	o.B.
60	18/12/10	1,5	w	65	o.B.
61	18/12/10	0,5	w	55	o.B.
62	18/12/10	0,5	m	60	o.B.
63	18/12/10	1,5	m	75	o.B.
64	18/12/10	4,5	w/trächtig	70	o.B.
65	18/12/10	0,5	w	55	o.B.
66	18/12/10	7,0	w/trächtig	75	o.B.
67	18/12/10	0,5	w	45	o.B.
68	18/12/10	0,5	w	35	o.B.
69	18/12/10	2,5	m	80	Multifokale Petechien in der Lunge, Verklebungen am Netz
70	22/12/10	11	w/trächtig	70	o.B.
71	22/12/10	1,5	m	70	Petechien DüDa

Tabelle 13, Fortsetzung

Tier- nummer	Proben- nahme	Alter [a]	Geschlecht/ Trächtigkeit	Lebend- gewicht geschätzt [kg]	Makroskopische Organ- veränderungen
72	22/12/10	0,5	w	55	Petechien DüDa
73	22/12/10	0,5	w	55	o.B.
74	22/12/10	1,5	w	55	o.B.
75	22/12/10	7,0	w/trächtig	90	o.B.
76	22/12/10	17	w/trächtig	90	o.B.
77	22/12/10	0,5	m	50	o.B.
78	22/12/10	7,0	w/trächtig	85	Tarsalfraktur links
79	22/12/10	1,5	w	75	o.B.
80	22/12/10	0,5	w	55	o.B.
81	22/12/10	5,0	w/trächtig	85	o.B.
82	22/12/10	6,0	w	80	o.B.
83	22/12/10	1,5	m	80	o.B.
84	28/12/10	2,5	m	85	o.B.
85	28/12/10	2,5	m	75	o.B.
86	28/12/10	0,5	m	50	o.B.
87	28/12/10	0,5	w	45	o.B.
88	28/12/10	0,5	w	45	o.B.
89	28/12/10	0,5	w	50	o.B.
90	28/12/10	0,5	m	50	o.B.
91	28/12/10	2,5	m	90	o.B.
92	31/12/10	2,5	m	80	Petechien DüDa
93	31/12/10	0,5	w	50	o.B.
94	31/12/10	0,5	w	55	o.B.
95	31/12/10	0,5	w	45	o.B.
96	31/12/10	1,5	w/trächtig	70	o.B.
97	31/12/10	0,5	m	50	o.B.
98	31/12/10	0,5	w	35	o.B.

Tabelle 14: Liste der verwendeten Geräte

<b>Produkt/Typ</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Dispergierer „Ultra-turrax® T25“</b>	IKA® Werke GmbH & Co. Kg, D-79219 Staufen
<b>Gel-Kamm 12 Zinken</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
<b>Gelkammer „Mini-Sub® Cell GT“</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
<b>Gel-Press</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
<b>Mikrotiterplatten-Photometer “Microplate Reader” Model 680, Software: „Microplate Manager 5.2“</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
<b>Photometer „Densimat“</b>	bioMérieux Deutschland GmbH, D-72602 Nürtingen
<b>Spannungsgeber „PowerPac 200“</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
<b>Thermocycler “Biorad IQ5”</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80901 München
<b>Thermocycler “iCycler”</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80901 München
<b>Thermomixer 1,5; 2 ml „Thermomixer comfort“</b>	Eppendorf AG, D-22339 Hamburg
<b>Tissuelyser</b>	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
<b>UV-Transilluminator „Gel Doc“ Software: “Quantity One 4.5.0”</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München

Tabelle 15: Liste der Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt/Typ</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikelnummer</b>
<b>Deckelkette für PCR 8er Streifen</b>	Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen	373273
<b>Einweghandschuhe, Nitril</b>	Semperit Technische Produkte GmbH A-1031 Wien	81678163
<b>PCR 8er Streifen</b>	Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen	673273
<b>Quali-PCR-Tube-Streifen mit anhängendem Deckel</b>	G.Kisker GbR, D-48543 Steinfurt	G003-37
<b>Stainless Steel Beads 5 mm</b>	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden	69989
<b>Sterile Probenütüen "Roll Bag" in PolySilk for sampling &amp; mixing</b>	InterScience, 169 Idema Rd, Markham, ON L3R 1A9, Canada	145 040
<b>Vorverdünnungsplatten für ELISA</b>	G.Kisker GbR, D-48543 Steinfurt	G080-UB
<b>Zentrifugenröhrchen 15 ml „Cellstar“</b>	Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen	186161

Tabelle 16: Liste der Chemikalien, Reagenzien und Testkits

Produkt/Typ	Bezugsquelle	Artikelnummer
<b>100 bp DNA Leiter “EZ Load™”</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München	170-8353
<b>Agarose “Certified™ Molecular Biology Agarose”</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München	161-3104
<b>ASL-Buffer</b>	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden	19082
<b>DNA-Extraktionskit “QIAamp DNA Mini Kit”</b>	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden	51306
<b>DNA-Extraktionskit “QIAamp DNA Stool Mini Kit”</b>	QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden	51504
<b>Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80901 München	161-0433
<b>JumpStart™ Taq DNA Polymerase</b>	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO 63103, USA	D4184-250UN
<b>ELISA-KIT „CATTLETYPE® MAP Ab“</b>	LDL – Labor Diagnostik GmbH Leipzig, D-04103 Leipzig	03-501/1
<b>PCR-KIT „BACTOTYPE® Mycobacterium paratuberculosis PCR“</b>	LDL – Labor Diagnostik GmbH Leipzig, D-04103 Leipzig	04-106/10
<b>TBE-Buffer 10x</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80901 München	161-0733
<b>Real-time PCR-Kit „BACTOTYPE® MAP“</b>	LDL – Labor Diagnostik GmbH Leipzig, D-04103 Leipzig	–

## 8.2 ELISA-Ergebnisse

Tabelle 17: S/P-Quotienten der 87 Serumproben

Tiernummer	S/P-Quotient	Ergebnis
8	- 0,035	negativ
9	-0,042	negativ
10	-0,043	negativ
11	-0,042	negativ
12	-0,042	negativ
14	-0,054	negativ
15	-0,036	negativ
16	-0,072	negativ
17	-0,029	negativ
19	-0,036	negativ
20	-0,049	negativ
21	-0,049	negativ
22	-0,052	negativ
23	-0,049	negativ
24	-0,052	negativ
26	-0,031	negativ
27	-0,038	negativ
28	-0,033	negativ
30	-0,040	negativ
31	-0,047	negativ
32	-0,052	negativ
33	-0,049	negativ
34	-0,063	negativ
35	-0,015	negativ
36	-0,024	negativ
37	-0,012	negativ
38	-0,012	negativ
39	-0,033	negativ
40	-0,038	negativ
41	-0,047	negativ
42	-0,059	negativ
43	-0,024	negativ
44	-0,024	negativ
45	-0,028	negativ
46	-0,003	negativ
47	-0,043	negativ
48	-0,045	negativ
49	-0,047	negativ
50	-0,072	negativ
51	-0,045	negativ

Tabelle 17, Fortsetzung

<b>Tiernummer</b>	<b>S/P-Quotient</b>	<b>Ergebnis</b>
52	-0,024	negativ
53	-0,026	negativ
54	-0,020	negativ
55	-0,042	negativ
56	-0,047	negativ
57	-0,040	negativ
58	-0,038	negativ
59	-0,047	negativ
60	-0,020	negativ
61	-0,031	negativ
62	-0,029	negativ
63	-0,047	negativ
64	-0,054	negativ
65	-0,051	negativ
66	-0,065	negativ
67	-0,042	negativ
68	-0,028	negativ
69	-0,051	negativ
70	-0,024	negativ
71	-0,058	negativ
72	-0,049	negativ
73	-0,040	negativ
74	-0,063	negativ
75	-0,026	negativ
76	-0,033	negativ
77	-0,038	negativ
78	-0,042	negativ
79	-0,058	negativ
80	-0,045	negativ
81	-0,024	negativ
82	-0,059	negativ
83	-0,051	negativ
84	0,004	negativ
85	-0,045	negativ
86	-0,047	negativ
87	-0,051	negativ
88	-0,051	negativ
89	-0,035	negativ
90	-0,051	negativ
91	-0,049	negativ
92	-0,052	negativ
93	-0,056	negativ
94	-0,056	negativ

Tabelle 17, Fortsetzung

<b>Tiernummer</b>	<b>S/P-Quotient</b>	<b>Ergebnis</b>
95	-0,043	negativ
96	-0,024	negativ
97	-0,047	negativ
98	-0,065	negativ

## 9 Verzeichnisse

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
bp	Basenpaare
Ct	Schwellenwert-Zyklus (engl.: threshold cycle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
KbE	Koloniebildende Einheit
LAG	Landesarbeitsgemeinschaft für Fleischhygiene und Tierschutz in Bayern
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (engl.: messenger Ribonucleic acid)
n.d.	nicht durchgeführt
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
Rd	Rind
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
subsp.	subspecies
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan-Borsäure, EDTA-Puffer

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Regionale Verteilung der zwischen 1995 und 2009 gemeldeten Paratuberkulosefälle in Deutschland.....	10
Abbildung 2:	Abgemagerter Rothirsch mit Durchfall.....	20
Abbildung 3:	Vergrößerte Darmlymphknoten bei einem Rothirsch .....	20
Abbildung 4:	Männlicher Rothirsch.....	38
Abbildung 5:	Rothirschbestand in Deutschland 2011 bezogen auf 1.000 ha Waldlebensraum.....	40
Abbildung 6:	Übersichtskarte Nationalpark Bayerischer Wald und Umgebung.....	41
Abbildung 7:	Bodenübersichtskarte, Deutschland .....	42
Abbildung 8:	Der Rothirsch im Nationalpark Šumava und Bayerischer Wald; .. Entwicklung von Bestand und Abschuss 1999-2009 .....	44
Abbildung 9:	Probenentnahme von Jejunallymphknoten am MDT eines Rothirsches .....	47
Abbildung 10:	Geschlechterverteilung der beprobten Rothirsche in den Jahren 2009/2010 und 2010/2011 .....	47
Abbildung 11:	Altersverteilung der beprobten Rothirsche in den Jahren 2009/2010 und 2010/2011 .....	48
Abbildung 13:	Gelausschnitt mit PCR-Amplifikaten der MAP-Verdünnungen .....	62
Abbildung 14:	Gelausschnitt der PCR-Amplifikate der Tag-1-Extrakte aus MAP beimpften Faeces.....	63
Abbildung 15:	Gelausschnitt der PCR-Amplifikate der beimpften Faeces bzw. Dünndarmlnn., nach 4-monatiger Gefrierlagerung .....	64
Abbildung 16:	Ergebnisse der Real-Time PCR der beimpften Lymphknoten....	65
Abbildung 17:	Gel der DNA-Amplifikate von 7 Faecesproben.....	66
Abbildung 18:	FAM-Fluoreszenzsignale von 20 Ileocaecallnn.-Extrakten.....	67
Abbildung 19:	Cy5-Fluoreszenzsignale von 20 Ileocaecallnn.-Extrakten.....	68

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PCR-Ergebnisse einer Studie in der Steiermark zum Vorkommen von MAP, Juni 2002 bis August 2008.....	8
Tabelle 2:	Anzahl der gemeldeten Neuausbrüche von Paratuberkulose in Rinderbeständen in Deutschland im Jahr 2010.....	9
Tabelle 3:	Nachweis MAP positiver Rinder, Einzeltiere/Herden, in unterschiedlichen Ländern unter Berücksichtigung der Probenanzahl.....	11
Tabelle 4:	Nachweis von MAP bei Wildtieren in unterschiedlichen Ländern unter Berücksichtigung der Probenanzahl.....	13
Tabelle 5:	Unterteilung der histopathologischen Läsionen bei MAP-infizierten Rindern.....	18
Tabelle 6:	Die fünf nach § 17c Tierseuchengesetz in Deutschland zugelassenen ELISA Testverfahren zum MAP-Ak Nachweis.....	28
Tabelle 7:	Gründe, die für einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus CROHN sprechen.....	35
Tabelle 8:	Gründe, die gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus CROHN sprechen.....	35
Tabelle 9:	Zusammensetzung des Mastermix für die konventionelle PCR.....	53
Tabelle 10:	Thermocyclerprotokoll der konventionellen PCR.....	54
Tabelle 11:	Thermocyclerprotokoll der Real-time PCR.....	56
Tabelle 12:	Übersichtstabelle der Untersuchungsergebnisse der makroskopischen, serologischen und molekularbiologischen Untersuchung des Probenmaterials.....	60
Tabelle 13:	Übersicht über beprobte und untersuchte Rothirsche.....	81
Tabelle 14:	Liste der verwendeten Geräte.....	84
Tabelle 15:	Liste der Verbrauchsmaterialien.....	85
Tabelle 16:	Liste der Chemikalien, Reagenzien und Testkits.....	86
Tabelle 17:	S/P-Quotienten der 87 Serumproben.....	87

## 9.4 Literaturverzeichnis

### **Bang B. (1906)**

Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde

*Berl. Tierärztl. Wschr.* **42**, S. 759-763

### **Baumgart D. C. (2009)**

Diagnostik und Therapie von Morbus CROHN und Colitis ulcerosa

*Deutsches Ärzteblatt.* **106(8)**, S. 123-133

### **Beard P. M., Daniels M. J., Henderson D., Pirie A., Rudge K., Buxton D., Rhind S., Greig A., Hutchings M. R., Mc Kendrick I., Stevenson K. & Sharp J.M. (2001a)**

Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland

*J. Clin. Microbiol.* **39**, S. 1517-1521

### **Beard P. M., Stevenson K., Pirie A., Rudge K., Buxton D., Rhind S. M., Sinclair M. C., Wildblood L. A., Jones D. G. & Sharp J. M. (2001b)**

Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

*J. Clin. Microbiol.* **39**, S. 3080-3084

### **Bernstein C. N., Blanchard J. F., Rawsthorne P. & Collins M. T. (2004)**

Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with CROHN's Disease and ulcerative colitis

*J Clin Microbiol.* **42**, S. 1129-1135

### **Bessetti J. (2007)**

An Introduction to PCR Inhibitors

[www.promega.com/~media/Files/Resources/Profiles in DNA/An Introduction to PCR Inhibitors.ashx](http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Profiles%20in%20DNA/An%20Introduction%20to%20PCR%20Inhibitors.ashx) [Zitat vom: 31. Januar 2012]

### **Beudert B. (2012)**

Boden-pH und Eisenwerte in Nationalpark Bayerischer Wald

*persönliche Mitteilung*: 3. Januar 2012

### **Biermayer W., Goetz C. & Pearse H. J. (2011)**

Hat die Serologie noch Berechtigung in Paratuberkuloseprogrammen?

Bad Staffelstein: AVID-Tagung DVG, 5.-7. Oktober 2011

*Abstraktband*, S. 36-37

- Boelaert F., Walravens K., Biront P., Vermeersch J.P., Berkvens D., & Godfroid J. (2000)**  
Prevalence of paratuberculosis (JOHNE's disease) in the Belgian cattle population  
*Vet Microbiol.* **77**, S. 269–281
- Bögli-Stuber K., Kohler C., Seitert G., Glanemann B., Antognoli M. C., Salman M. D., Wittenbrink M. M., Wittwer M., Wassenaar T., Jemmi T., & Bissig-Choisat B. (2005)**  
Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays  
*J Appl Microbiol.* **99**, S. 587–97
- Bolton M., Pillars R., Kaneene J., Mauer W. & Grooms D. (2011)**  
Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally exposed dairy heifers and associated risk factors  
*J Dairy Sci.* **94**, S. 4669–4675
- Boom R., Sol C. J., Salimans M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M. & van der Noordaa J. (1990)**  
Rapid and simple method for purification of nucleic acids  
*J. Clin. Microbiol.* **28**, S. 495–503
- Böttcher J. & Gangl A. (2004)**  
*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* – Combined Serological Testing and Classification of Individual Animals and Herds  
*Journal of Veterinary Medicine* **10**, S. 443–448
- Böttcher J., Hoffmann D. & Gangl A. (2005)**  
Paratuberkulose – Ein serologisches Untersuchungskonzept.  
Stendal : Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung 09.-11. März 2005, *Abstraktband* S. 228–231
- Brennan P.J. & Nikaido H. (1995)**  
The envelope of mycobacteria  
*Annual Review of Biochemistry* **64**, S. 29–63
- Bulander K. (2009)**  
Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Mycobacterium* ssp. *paratuberculosis* in Milchrinderbeständen  
*Dissertation*, Gießen: VVB Laufersweiler Verlag

**Bundesjagdgesetz (BJagdG) (2011)**

Gesetz zur Regelung der Jagd (Stand: 6.12.2011)

**Büttner M., Gerbermann H., Naumann L., Neuendorf E., Rinder H., Wildner M. & Zapf A. (2005)**

Paratuberkulose beim Rind-Morbus CROHN beim Menschen: ein ursächlicher Zusammenhang?

[www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle\\_pilzinfektionen/paratuberkulose/doc/paratuberkulose\\_ag.pdf](http://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle_pilzinfektionen/paratuberkulose/doc/paratuberkulose_ag.pdf) [Zitat vom 12. September 2011]

**Chiodini R. J. & Van Kruiningen H.J. (1983)**

Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis

*J Am Vet Med Assoc.* **182**, S. 168-169

**Chiodini R. J. & Rodrick J. (1989)**

CROHN's Disease and the Mycobacterioses: a Review and Comparison of Two Disease Entities. [Hrsg.] American Society for Microbiology

*Clinical Microbiology reviews* **1**, S. 90-117

**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**, S. 218-262

**Clarke C. J. (1994)**

Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis*/*M. avium* infection.

[Hrsg] Collins M.T., Basse E.O., Chiodini R.J. *Proceedings of the 4th*

*International Colloquium on Paratuberculosis*. East Providence, R.I.:

International Association for Paratuberculosis, Inc. S. 345–354

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

The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species

*J. Comp. Pathol.* **116**, S. 217–261

**Clark R. G., Griffin J. F. & Mackintosh C. G. (2010)**

JOHNE'S disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in red deer (*Cervus elaphus*): an histopathological grading system, and comparison of paucibacillary and multibacillary disease

*N Z Vet J.* **58**, S. 90-97

**Coelho A., Pinto M., Coelho A., Aires A. & Rodrigues J. (2010)**

A seroepidemiological survey of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep from North of Portugal

*Pesq. Vet. Bras.* **30**, S. 903–908

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

Diagnosis of paratuberculosis

*Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* **12**, S. 357–371

**Corn J. L., Manning E. J. B., Sreevatsan S. & Fischer J. R. (2005)**

Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises

*Appl. Environ. Microbiol.* **71**, S. 6963–6967

**Coussens P. M., Colvin C. J., Rosa G. J., Perez L. J. & Elftman M. D. (2003)**

Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected cattle

*Infect. Immun.* **71**, S. 6487- 6498

**Crawford G. C., Ziccardi M. H., Gonzales B. J., Woods L. M., Fischer J. K., Manning E. J. & Mazet J.A. (2006)**

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infections in a tule elk (*Cervus elaphus nonnodes*) herd

*J. Wildl. Dis.* **42**, S.715-723

**Crohn B., Ginzburg L. & Oppenheimer G. D. (1932)**

Regionalis ileitis-A pathologic and clinical entity

*J. Am. Med. Assoc.* **99**, S. 1323–1329

**Dalziel T. (1913)**

Chronic intestinal enteritis

*Br. Med. J.* **2**, S. 1068-1070

**Davidson R., Manning J. B. & Nettles F. (2004)**

Culture and serologic survey for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among southeastern white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)

*J Wildl Dis.* **40**, S. 301-306

**De Lisle G. W., Seguin P., Samagh B. S., Corner A. H. & Duncan J. R. (1980)**

Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests

*Can. J. Comp. Med.* **44**, S.177-182

**De Lisle G.W., Yates G. F. & Montgomery R.H. (2003)**

The emergence of *Mycobacterium paratuberculosis* in farmed deer in New Zealand — a review of 619 cases

*New Zealand Veterinary Journal* **51**, S.58-62

**De Lisle G. W., Cannon M. C., Yates G. F. & Collins D. M. (2006)**

Use of a polymerase chain reaction to subtype *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, an increasingly important pathogen from farmed deer in New Zealand

*N.Z.Vet. J.* **54**, S.195-197

**Deutz A. & Spergser J., Rosengarten R. & Köfer J. (2003)**

Erstnachweis der intrauterinen Übertragung von Paratuberkulose bei Rot- und Gamswild

*Z. Jagdwiss.* **49**, S.314-319

**Deutz A. (2004)**

Paratuberkulose bei Wildtieren (Ernährungsbedingte) Krankheit der Zukunft.

Irdning : Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, Tagung für die Jägerschaft 16.–17. Februar 2004, *Abstraktband*, S. 63-69

**Deutz A. & Spergser J. (2009)**

Paratuberkulose bei Wildtieren: Verbreitung, klinische und postmortale Befunde.

*Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung* **1**, S. 12-15

**Deutz A. & Hiesel J. (2011)**

Erfahrung mit der Bekämpfung Paratuberkulose in der Steiermark / Österreich.

Garmisch-Partenkirchen : 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes

Lebensmittelhygiene der DVG, 27.-30. September 2011, ISSN 0945-3296

*Abstraktband*, S.59

**Dohmann K., Jensen M. R., Grant I. R. & Holstad G. (2003)**

Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* type I and type II isolates

*J. Clin. Microbiol.* **41**, S.5515-5523

**Donat K. (2005)**

Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Stendal : Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung 09. bis 11. März 2005, *Abstraktband*, S.213-216

**Donat K. (2011)**

Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infizierten Milchviehbeständen mit Hilfe von Umgebungskotproben

Garmisch-Partenkirchen: 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes

Lebensmittelhygiene der DVG, 27.-30. September 2011. ISSN 0945-3296

*Abstraktband*, S.57

**Dreier S., Khol J. L., Stein B., Fuchs K., Gütler S. & Baumgartner W. (2006)**

Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (JOHNE's disease) in Austrian cattle

*J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* **53**, S.477-481

**Dünser M. & Geisbauer E. (2008)**

Bekämpfung der Klinischen Paratuberkulose in Österreich

[www.ages.at/uploads/media/09\\_Duenser.pdf](http://www.ages.at/uploads/media/09_Duenser.pdf) [Zitat vom: 05.03.2012]

**Ellingson J. L., Bolin C. A. & Stabel J. R. (1998)**

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

*Mol. Cell Probes* **12**, S.133-14.

**Elschner M. (2005)**

Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen

Thüringens

Stendal : Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung 09. bis 11. März

2005, *Abstraktband*, S. 181-184

**Fickel J, Bublilya O. A., Stache A., Noventa T., Jirsa A. & Heurich M. (2011)**

Crossing the border? Structure of the red deer (*Cervus elaphus*) population from the Bavarian-Bohemian forest ecosystem

Onlineartikel *Mammalian Biology*. Online seit Dezember 2011

**Fielitz U. (2005)**

Untersuchungen zum Verhalten von Radiocäsium in Wildschweinen und anderen Biomedien des Waldes. Duderstadt: Abschlussbericht im Auftrag des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

**Fink B. (2011)**

Abschusspläne in Voralberg

*persönliche Mitteilung* auf der LAG-Tagung 20.10.2011, Ansbach

**Fischer M., Akineden Ö., Abdulmawjood A., Schillinger S., Seeger T. &****Bülte M. (2010)**

Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Kälbern

Garmisch-Partenkirchen: 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes

Lebensmittelhygiene der DVG, 28. September-1. Oktober 2010. DVG, 2010

ISSN: 0945-3296, *Abstraktband*, S. 95

**Francois B., Krishnamoorthy R. & Elion J. (1997)**

Comparative study of *Mycobacterium paratuberculosis* strains isolated from CROHN'S disease and JOHNE'S disease using restriction fragment length polymorphism and arbitrarily primed polymerase chain reaction

*Epidemiology and Infection* **118**, S. 227-233

**Fritsch I., Luyven G., Köhler H., Lutz W. & Möbius P. (2012)**

Suspicion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transmission between cattle and wild-living red deer (*Cervus elephus*) by multitarget genotyping

*Appl. Environ. Microbiol.* **78**, S. 1132-1139

**Fry M. & McGavin M. (2009)**

Erkrankungen der Lymphknoten

[Hrsg.] Zachary J. McGavin M. *Pathologie der Haustiere*. München: Elsevier GmbH, S. 757-764

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

Paratuberkulose: Erreger und Übertragungswege

*Dtsch. tierärztl. Wschr.* **109**, S. 504-506

**Gerner J., Heurich M., Günther S. & Schraml U. (2011)**

Red deer at a crossroads-An analysis of communication strategies concerning wildlife management in the 'Bayerischer Wald' National Park, Germany

*Journal for Nature Conservation* **19**, S. 319-326

**Gollnick N., Mitchell R., Baumgart M., Janagama H., Sreevatsan S. & Schukken Y. (2007)**

Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype

*Veterinary Immunology and Immunopathology* **120**, S.93-105

**González J., Geijo M. V., García-Pariente C., Verna A., Corpa J. M., Reyes L. E., Ferreras M. C., Juste R. A., García Marín J. F. & Pérez V. (2005)**

Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle

*J Comp Pathol.* **133**, S.184-96

**Grant I. R., Ball H. J. & Rowe M. T. (1998)**

Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurisation on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*

*Lett. Appl. Microbiol.* **26**, S.166-170

**Grant I. R., Willams A. G., Rowe M. T. & Muir D. D. (2005)**

Efficacy of Various Pasteurization Time-Temperature Conditions in Combination with Homogenization on Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk

*Appl. Environ. Microbiol.* **71**, S.2853–2861

**Green E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J. & Hermon-Taylor J. (1989)**

Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human CROHN`s disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*

*Nucleic Acids Res.* **17**, S.9063-9073

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

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

*Vet. Microbiol.* **115**, S.91-101

**Hammer P. (2011)**

*Mycobacterium paratuberculosis*: Exposition über Milch und Milchprodukte – Minimierungsoptionen

Garmisch-Partenkirchen: 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, 27.-30. September 2011 ISSN 0945-3296, *Abstraktband*, S. 54

**Hammer P., Kiesner C., Walte H. G., Knappstein K. & Teufel P. (2002)**

Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer

*Kiel Milchwirtsch. Forschungsber.* **54**, S. 275–303

**Harris N. B. & Barletta R. G. (2001)**

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

*Clinical Microbiology Reviews* **14**, S. 489-512

**Heurich M. & Neufanger M. (2005)**

Die Wälder des Nationalparks Bayerischer Wald. Ergebnisse der Waldinventur 2002/2003 in geschichtlichen und waldökologischen Kontext

*Die Wälder des Nationalparks, Wissenschaftliche Reihe Heft 16*

**Heurich M. (2011)**

Bestand und Leben der Rothirsche im Nationalpark Bayerischer Wald

*persönliche Mitteilung* 12. Oktober 2011a

**Heurich M., Baierl F., Günther S. & Sinner K. F. (2011)**

Management and conservation of large mammals in the Bavarian Forest National Park

*Vimperk.* **17**, S. 1-18

**Heurich M. (2012)**

Nationalpark Allgemein und Management der Rothirsche im Besonderen: Bestand, Abschuss, Telemetrie, Fütterung usw., *persönliche Mitteilung*: 10. Februar 2012

**Hoffmann D. & Böttcher J. (2005)**

Paratuberkulose – Erhebung von Risikofaktoren in bayerischen Milchviehbeständen. Stendal : Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt  
5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung 09. bis 11. März 2005, *Abstraktband*, S. 232-234

**Homuth M. (2002)**

Diagnostik der Paratuberkulose

*Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **109**, S. 516-519

**Janning W. & Knust E. (2004)**

Bakterielle Insertionselemente

*Allgemeine Genetik – Molekulare Genetik – Entwicklungsgenetik*

[Hrsg.] Janning W. & Knust E. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S.253-257

**Jark U., Ringena I., Franz B., Gerlach G. F., Beyerbach M. & Franz B. (1997)**

Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis

*Vet. Microbiol.* **57**, S.189-198

**Johne A. & Frothingham L., (1895)**

Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind

*Dtsch. Zschr. Thiermed.* **21**, S.438-454

**Judge J., Kyriazakis I., Greig A., Allcroft D. & Hutchings M. (2005)**

Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Rabbits and the Environment: How Hot Is a Hot Spot?

*Appl. Environ. Microbiol.* **71**, S.6033-6038

**Kadner D. (2012)**

Targetsequenzen der konventionellen bzw. Real-Time PCR-Kits zur Paratuberkulosedagnostik

*Persönliche Mitteilung*: 3.Januar 2012

**Kinser A., Koop K. & Freiherr von Münchhausen H. (2010)**

Die Rotwildverbreitung in Deutschland

*Allgemeine Forstzeitschrift* **5**, S.32-34

**Klee W. (1987)**

Paratuberkulose beim Rind: Diagnose und Bekämpfung

*Der praktische Tierarzt.* **68**, S.55-57

**Klee W. (2003)**

Paratuberkulose (JOHNESCHE Krankheit)

[Hrsg.] Gründer H.D., Stöber M., Dirksen G. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Berlin: Parey Verlag, S.586-591

**Klee W. (2007)**

Ausgewählte Kapitel aus dem Gebiet der Inneren Medizin und Chirurgie der Rinder: Paratuberkulose [Zitat vom: 5. September 2011]

<http://www2.vetmed.uni-muenchen.de/med2//skripten/skriptv.html>

**Köhler H. & Möbius P. (2011)***Tiergesundheitsjahresbericht 2010*

Greifswald-Insel Riems: Friedrich-Loeffler-Institut, ISSN 1867-9374, S. 66-68

**Kontains E. J. & Reed F. A. (2006)**

Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors

*J Forensic Sci.* **51**, S. 795-804**Kuo C.-J., Bell H., Hsieh C.-L., Ptak Z. & Chang Y.-F. (2012)**

Novel Mycobacteria Antigen 85 Complex Binding Motif on fibronectin

*The Journal of Biological Chemistry* **287**, S. 1892–1902**Kutzer E. (2000)***Jagdstrecke*

Lexikon der Veterinärmedizin. Stuttgart: Enke Verlag

ISBN 3-7773-1459-5 S. 656

**Kopecna M., Parmova I., Dvorska-Bartosova L., Moravkova M.,****Babak V. & Pavlik I. (2008)**Distribution and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies*paratuberculosis* in farmed red deer (*Cervus elaphus*) studied by faecal culture, serology and IS900 RFLP examinations*Veterinarni Medicina* **53**, S. 510–523**LDL (2011a)**CATTLETYPE<sup>®</sup> MAP Ab<http://www.lab-leipzig.de/de/produkte/diagnostika-fuer/wiederkaeuer.html>

[Zitat vom: 2. Dezember 2011]

**LDL (2011b)**BACTOTYPE<sup>®</sup> *Mycobacterium paratuberculosis*<http://www.lab-leipzig.de/de/produkte/diagnostika-fuer/wiederkaeuer.html>

[Zitat vom: 2. Dezember 2011]

**Lambrecht R. S., Carriere J. F. & Collins M. T. (1988)**A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium sp.**Appl. Environ Microbiol.* **54**, S. 910-916**Larsen A. B., Merkal R. S. & Vardaman T. H. (1956)**Survival time of *M. paratuberculosis**Am. J. Vet. Res.* **17**, S. 549-551

**Li L., Bannantine J.P., Zhang Q., Amonsin A. & May B.J. (2005)**

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

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **35**, S. 12344-12349

**Lipiec M. (2012)**

Nationales Referenzlabor für Paratuberculose in Polen (Pulawy)

Vorkommen von Paratuberculose bei Wildwiederkäuern in Polen

*persönliche Mitteilung*: 06.März.2012

**Lloyd J. B., Whittington R. J., Fitzgibbon C. & Dobson R. (2001)**

Presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium

*Vet. Rec.* **148**, S. 261-263

**Mackintosh C. G., Clark R. G., Thompson B., Tolentino B., Griffin J. F. T. & de Lisle G. W. (2010)**

Age susceptibility of red deer (*Cervus elephus*) to paratuberculosis

*Vet. Microbiol.* **143**, S. 255-261

**Manning E. J., M. P. H., M. B. A. & D. V. M. (2001)**

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A review of current knowledge

*Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **32**, S. 293-304

**Manning E. J., Kucera T. E., Gates N. B. Woods L. M. & Fallon-McKnight M. (2003)**

Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd

*J. Wild. Dis.* **39**, S. 323-328

**McDonald W. L., Ridge S.E., Hope A. F. & Condron R. J. (1999)**

Evaluation of diagnostic tests for JOHNE's disease in young cattle

*Aust. Vet. J.* **77**, S. 113-119

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

Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **163**, S. 1100-1102

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

Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle

*Am. J. Vet. Res.* **29**, S. 1533-1538

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

Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic and vaccination methods

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **8**, S. 939-943

**Motiwala A. S., Li L., Kapur V. & Sreevatsan S. (2006)**

Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

*Microbes and Infection* **8**, S. 1406-1418

**Naser S. A., Arce M., Khaja A., Fernandez M., Naser N., Elwasila S. &****Thanigachalam S. (2012)**

Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in CROHN's disease pathogenesis

*World J Gastroenterol.* **18**, S. 412-424

**N.N. (2005)**

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

[Hrsg.] Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft

17. Januar 2005

**N.N. (2010b)**

Datenpaket, Cattletype® MAP Ab.

[Hrsg.] Labor Diagnostik Leipzig GmbH

**N.N. (2011a)**

Paratuberkulose; Tierpathologie München

<http://www.patho.vetmed.uni-muenchen.de/material.html>

[Zitat vom: 18. September 2011]

**N.N. (2011b)**

Übersicht über Fluoreszenzfarbstoffe

<https://www.micro-shop.zeiss.com/?s=568989278aaff&l=de&p=de&f=f>

[Zitat vom: 14. September 2011.]

**N.N. (2011c)**

MAP-Gensequenz; NCBI/Genome

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=380> [Zitat vom: 5. Januar 2011]

**N.N. (2011d)**

Mykobakterien

[www.bfr.bund.de/de/mykobakterien-54358.html](http://www.bfr.bund.de/de/mykobakterien-54358.html) [Zitat vom: 15. September 2011]

**N.N. (2012a)**

Rotwildverbreitung in Deutschland

[http://www.rothirsch.org/\\_img/projekte/Rotwildkarte/RVK\\_2011\\_Wald\\_ohWW\\_KLEIN.jpg](http://www.rothirsch.org/_img/projekte/Rotwildkarte/RVK_2011_Wald_ohWW_KLEIN.jpg) [Zitat vom: 19. Januar 2012]

**N.N. (2012b)**

Jagdstrecken in Bayern; Bayerischer Jagdverband e.v.

<http://www.jagd-bayern.de/bjv-jagdstrecken.html> [Zitat vom: 19. Januar 2012]

**N.N. (2012c)**

Agrarstrukturerhebung (Bodennutzung): Landkreis Regen

Bayerisches Landesamt für Statistik und Datenerhebung

[www.statistikdaten.bayern.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=3&levelid=13304317258&step=3](http://www.statistikdaten.bayern.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=3&levelid=13304317258&step=3) [Zitat vom: 28. Februar 2012]

**N.N. (2012d)**

Liste der nach § 17 c TierSG zugelassenen Mittel [Stand: 06.02.2012]

[www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/.../02\\_d\\_Zul\\_Mittel.pdf](http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/.../02_d_Zul_Mittel.pdf)

[Zitat vom: 3. März 2012]

**Neumann M., Tottewitz F., Sparing H. & Gleich E. (2012)**

Untersuchungen zur Lebensraumnutzung des Rotwildes (*Cervus elaphus L.*) im Thüringer Wald durch GPS-Satelliten-Telemetrie

[www.rothirsch.org/Projekte/Telemetrie/wissenschaftliche\\_projektbeschreibung.php](http://www.rothirsch.org/Projekte/Telemetrie/wissenschaftliche_projektbeschreibung.php) [Zitat vom: 20. Februar 2012]

**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**, S. 1-7

**Nielsen S. S., Gronbaek C., Agger J. F. & Houe H. (2002)**

Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis.

*Prev. Vet. Med.* **53**, S. 191-204

**Nielsen S. S. (2011)**

Dairy farmers` reasons for participation in the Danish control programm on bovine paratuberculosis

*Prev. Vet. Med.* **4**, S. 279-283

**Ortmann G., Homuth M., Ehlert F., Strutzberg-Minder K. & Huhold K. (2005)**

Serologische Untersuchungen zur Diagnostik der bovinen Paratuberkulose im Land Brandenburg

Stendal : Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung 09. bis 11. März 2005, *Abstraktband* S. 240-242

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

Herd-level economic losses associated with JOHNE`s disease on US dairy operations

*Prev Vet Med.* **40**, S. 179-192

**Pavlik I., Bartl J., Dvorska L., Svastova P., du Maine R., Machackova M., Yayo Ayele W. & Horvathova A. (2000)**

Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998

*Vet Microbiol.* **70**, S. 231-251

**Pieterse M. C., Eisenberg S.W., Folmer G.E., Liggett S., Griffin J.F., Koets A.P. & Nielen M. (2010)**

Evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Dutch farmed red deer

*Tijdschr Diergeneeskd.* **135**, S. 886-890

**Pinedo P. J., Rae D. O., Williams J. E., Donovan A., Melendez P. & Buergelt C. D. (2008)**

Association among Results of Serum ELISA, Faecal Culture and Nested PCR on Milk, Blood and Faeces for the Detection of Paratuberculosis in Dairy Cows  
*Transboundary and Emerging Diseases* **2**, S. 125-133

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

Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of JOHNE'S disease  
*J. Clin. Microbiol.* **31**, S. 1601-1605

**Power S. B., Haagsma J. & Smyth D. P. (1993)**

Paratuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Ireland  
*Veterinary Record* **132**, S. 213-216

**Pribylova R., Lamka J., Kopečna M., Trcka I., Maravkova M. & Pavlik I. (2011)**

Mycobacterial screening of Czech red deer (*Cervus elaphus*) populations in overwintering sites, 2004-2006  
*J. Wildl. Dis.* **47**, S. 780-783

**Probst C. & Kubitzka H. (2011)**

Amtliche Methodensammlung, Paratuberkulose, Greifswald-Insel Riems : FLI

**Qiagen (2010a)**

QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook

<http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnaminikit.aspx#Tabs=t2> [Zitat vom: 2.01.2012]

**Qiagen (2010b)**

QIAamp DNA Stool Handbook

<http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnastoolminikit.aspx#Tabs=t2> [Zitat vom: 2.01.2012]

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

Long-Term Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fecal Samples Obtained from Naturally Infected Cows and Stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$   
Onlineartikel *Veterinary Medicine International* PMCDI: PMC3157033

**Reichel M.P., Kittelberger R., Penrose M. E., Meynell R.M., Cousins D., Ellis T., Mutharia L. M., Johns A.H. & de Lisle G.W. (1999)**

Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved

*Vet. Microbiol.* **66**, S. 135-150

**Reimoser F., (2008)**

Lebensräume und deren Bedeutung für die Vitalität von Wildtierpopulationen.

[Hrsg.] Paulsen P. *Wildtiergesundheit, Wildtierkrankheiten, deren Bedeutung und Vermeidung*

[www.vu-wien.ac.at/uploads/media/2008\\_Wildtiergesundheit\\_ger.pdf](http://www.vu-wien.ac.at/uploads/media/2008_Wildtiergesundheit_ger.pdf)

[Zitat vom: 10. Februar 2012]

**Reyes-García R., Pérez-de-la-Lastra J. M., Vicente J., Ruiz-Fons F., Garrido J. M. & Gortázar C. (2008)**

Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis

*Vet. Immunol. Immunopathol.* **124**, S. 75-81

**Rosenberger G. (1978)**

Paratuberkulose (JOHNE'sche Krankheit).

Rosenberger G. [Hrsg.] *Krankheiten des Rindes*. Hamburg: Parey Verlag, S.756-760

**Rosenfeld G. & Bressler B. (2010)**

*Mycobacterium avium paratuberculosis* and the etiology of CROHN's disease: A review of the controversy from the clinician's perspective

*Can. J. Gastroenterol.* **24**, S. 619-624

**Saleh A. N., Ghobria G. I., Romero C. & Valentine J. F. (2004)**

Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with CROHN's disease

*The Lancet.* **364**, S. 1039-1044

**Schau U. (2011)**

Ergebnisse der Paratuberkulosedagnostik in Thüringen.

Bad Staffelstein : AVID-Tagung, DVG 5.-7. Oktober 2011

*Abstraktband*, S.38

**Schliephake A., Gaede W. & Zehle H. H. (2005)**

Erfahrungen bei der Diagnostik und Bekämpfung der Paratuberkulose in Sachsen-Anhalt

Stedal : Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung 09. bis 11. März 2005, *Abstraktband*, S. 239

**Secott T. E., Lin T. L. & Wu C. C. (2001)**

Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

*Infect. Immun.* **69**, S. 2075-2082

**Secott T.E., Lin T.L. & Wu C.C. (2002)**

Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

*Infect. Immun.* **70**, S. 2670-2675

**Seitz S. E., Heider L. E., Huesten W. D., Bech-Nielsen S., Rings D. M. & Spangler I. (1989)**

Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **194**, S. 1423-1426

**Selbitz H. J. (2002)**

*Mykobakterium*

[Hrsg.] Mayr A., Rolle M. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart: Enke Verlag, 2002, S. 555-565

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

Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis

*J. Vet. Diagn. Invest.* **8**, S. 345-350

**Sigurdsson B. (1954)**

Rida, a chronic encephalitis of sheep. With general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics

*Brit. vet. J.* **110**, S. 341-354

**Stabel J. R., Pearce L., Chandler R., Hammer P., Klijn N., Collin M. T., Heggum C. & Murphy P. (2001)**

Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products

*Bull. Intl. Dairy Fed.* **362**, S. 53-60

**Stabel J. R., Wells S. J. & Wagner B. A. (2002)**

Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for JOHNE`S disease in US dairy herds

*J. Dairy Sci.* **85**, S. 525-531

**Sternberg S., Holmström A., Viske D., Robertsson J. A., Bölske G. & Larsson B. (2002)**

Control programme for paratuberculosis in Swedish beef herds

Seventh International Colloquium on Paratuberculosis, 11-14.Juni 2002

*Abstraktband* S. 438-440

[www.pاراتuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/95](http://www.paratuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/95) [Zitat vom: 05. März 2012]

**Sternberg S., Holmström A., Viske D., Robertsson J. A., Bölske G. & Larsson B. (2007)**

Control of paratuberculosis in Sweden

Ninth International Colloquium on Paratuberculosis, 29. Oktober-2. November 2007, *Abstraktband* S. 319-323

[www.pاراتuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/274](http://www.pاراتuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/274) [Zitat vom: 05. 03. 2012]

**Storset A. K., Hasvold H. J., Valheim M., Brunhansen H., Bernsten G., Whist S. K., Djonne B., Press C. MCL., Holstad G. & Larsen H. J. S. (2001)**

Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. A immunological and microbiological study

*Veterinary Immunology and Immunopathology* **80**, S. 271-287

**Strohmeier G. R. & Fenton M. J. (1999)**

Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis

*Microbes. Infect.* **1**, S. 709-717

**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**, S. 31-37

**Sweeney R. W., Whitlock R. H., Buckley C. L., Spencer P., Rosenberger A. E. & Hutchinson L. J. (1994)**

Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk

*Am. J. Vet. Res.* **55**, S. 905-909

**Sweeney R. W., Whitlock R. H. & Mc Adams S. (2005)**

Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and uninfected herd mates. Copenhagen, Denmark : Proc. 8th Int. Coll. Paratuberculosis, 2005

**Taddei S., Robbi C., Cesena C., Rossi I., Schiano E., Arrigoni N., Vicenzoni G. & Cavirani S. (2004)**

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method

*J. Vet. Diagn. Invest.* **16**, S. 503-508

**Tierseuchengesetz (TierSG) (2010)**

Gesetz zur Regelung der Bekämpfung von Tierseuchen (Stand: 9.12.2010)

**Tooker B. C., Burton J. L. & Coussens P. M. (2002)**

Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells

*Veterinary Immunology and Immunopathology* **87**, S. 429-437

**Twort F. W. & Ingram G. L. Y. (1912)**

A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis* bovis johne and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculous enteritis of bovines

*Proc. Roy. Soc.* **84**, S. 517-543

**Umweltbundesamt (2006)**

Bodenübersichtskarte Deutschland

[http://www.umweltbundesamt.de/boden-und-altlasten/boden/bilder/300daten\\_karten\\_buek5000.pdf](http://www.umweltbundesamt.de/boden-und-altlasten/boden/bilder/300daten_karten_buek5000.pdf) [Zitat vom: 24. Februar 2012]

**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**, S. 281-295

**Vansnick E., de Rijk P., Vercammen F., Rigouts L., Portaels F. & Geysen D. (2007)**

A DNA sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples

*Vet Microbiol.* **122**, S. 166-171

**Vogel M., Gethmann J. & Luyven G. (2005)**

Paratuberkulose bei Wanderschafherden in Nordrhein-Westfalen.

Stendal : Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulosebekämpfung 09. bis 11. März 2005, *Abstraktband*, S. 226-227

**Vom Schloss A. (2000)**

Auswertung eines Sanierungsverfahrens zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen in Nordrhein-Westfalen, Dissertation, Hannover

**von Wassermann A., Neisser A. & Bruck C. (1906)**

Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis

*Deutsche Medizinische Wochenschrift* **48** S. 745-746

**Wagner H. & Bülte M. (2010)**

Prävalenzuntersuchungen über *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* bei Milchziegen in Hessen, Garmisch-Partenkirchen : 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, 28. September- 1. Oktober 2010 ISSN 0945-3296, *Abstraktband*, S. 80

**Weber A. & Christoph H. (1980)**

Nachweis von Antikörpern gegen Paratuberkulose (JOHNESCHE Krankheit) bei Schalenwild

*Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **26**, 194-197

**Whitlock R. H. & Buergelt C. (1996)**

Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology)

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

**Wilks C. R., Taylor T. K., Russell E. G. & Thomas T. R. (1981)**

Isolation of mycobacteria including cross-reactions in the complement fixation test for JOHNE`S disease

*Res. Vet. Sci.* **20**, S. 323-327

**Winkelmayer R., Paulsen P., Lebersorger P. & Zedka H.-F. (2008)**

*Wildbret-Hygiene Das Buch zur Guten Hygienepaxis bei Wild* Wien:

Zentralstelle österreichischer Landesjagdverbände, ISBN 978-3-9501873-3-5, S. 129

**Wittkowski G., Meier N., Gangl A. & Böttcher J. (2011)**

Paratuberkulose- gezielt, nachhaltig und wirtschaftlich bekämpfen!

Garmisch-Partenkirchen: 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittel-  
hygiene der DVG, 27.-30. September 2011 ISSN 0945-3296 *Abstraktband*, S. 60

**Zimmer K., Dräger K. 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, faecal culture and commercially available  
DNA-probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from  
cattle

*Zentralbl. Veterinärmed.* **46**, S. 137-140

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer für die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl und die Überlassung des Themas.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Dr. habil. M. Gareis für die konstruktive Durchsicht und Unterstützung der Arbeit.

Bei Frau Dr. U. Ullrich möchte ich mich besonders für ihre hervorragende wissenschaftliche Anleitung, die fachlichen Anregungen und die sorgfältige Durchsicht, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Frau Dr. E. Stüber danke ich besonders für ihre Bereitschaft, auftretende Fragen und Probleme zu diskutieren und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. M. Heurich und dem ganzen Nationalparkteam und hier in besonderer Weise den Herren M. Held, R. Fischer und H. Burghard, für die stets hilfsbereite Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Proben.

Dem LGL und vor allem Herrn Dr. M. Hogardt, danke ich für die Bereitstellung von MAP-Reinkulturen. Für die freundliche Überlassung von Bildmaterial danke ich Dr. A. Deutz und ebenso der Labor Diagnostik Leipzig GmbH für die Bereitstellung von „BACTOTYPE<sup>®</sup> MAP“ Test-Kits.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Frau J. Dietz, Frau M. Groß, Frau S. Holzmann und Frau I. Fitzek für die wechselnde Begleitungen bei den Jagden und ihre Hilfsbereitschaft. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit für deren Hilfe und das stets angenehme Arbeitsklima.

Mein großer Dank gilt Frau Ursula Fasold und Frau Ingrid Strauch für ihre moralische Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Meiner ganzen Familie danke ich sehr für das mir stets entgegen gebrachte Verständnis und die Unterstützung dieser Arbeit. Ganz besonders möchte ich hierbei meinen Eltern danken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und immer für mich da sind. Schließlich danke ich von ganzem Herzen meinem Lebensgefährten Christian Fasold für seine Geduld und immerwährende Unterstützung.