

Abschlussbericht

Verbesserung des Nachweises von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* mittels verschiedener diagnostischer Verfahren

FKZ:	314-06.01-2812HS020
Förderzeitraum:	15.01.2013 – 31.07.2014
Berichtszeitraum:	15.01.2013 – 31.07.2014
Projektpartner:	Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarb. (IBEI) Dr. Amely Campe (Projektkoordination), Prof. Dr. Lothar Kreienbrock Arbeitsbereich Bestandstiermedizin der Klinik für Rinder (RiKli) Prof. Dr. Martina Hoedemaker, Ph.D. Klinik für Rinder Prof. Dr. Jürgen Rehage Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin (Mibi) Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand, Prof. Dr. Ralph Goethe Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit (LMQS) Prof. Dr. Günter Klein, Dr. habil. Amir Abdulmawjood, Svenja Fohler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens.....	4
Kombination aus diagnostischen Testverfahren.....	4
Analyse der Risikofaktoren.....	4
Internationaler Erfahrungsaustausch.....	4
1.1. Planung und Ablauf des Vorhabens.....	4
1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	6
2. Material und Methoden.....	8
2.1. Mibi – Material & Methoden.....	8
2.2. LMQS – Material & Methoden.....	8
2.3. IBEI – Material & Methoden.....	9
2.3.1. Kombination aus diagnostischen Testverfahren.....	9
2.3.1.1. Definitionen.....	9
2.3.1.2. Analysen.....	9
2.3.2. Analyse der Risikofaktoren.....	10
2.3.3. Internationaler Erfahrungsaustausch.....	11
3. Ergebnisse.....	11
3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	11
3.1.1. Labordiagnostische Untersuchungen.....	11
3.1.1.1. Ergebnisse in der Mibi.....	11
3.1.1.2. Ergebnisse in der LMQS.....	12
3.1.2. Kombination aus diagnostischen Testverfahren.....	13
3.1.2.1. Definitionen.....	15
3.1.2.2. Analysen.....	17
3.1.2.2.1 Einzeltieruntersuchung.....	24
3.1.2.2.2 Herdenuntersuchung.....	25
3.1.2.2.3 Programm der (Milch)Wirtschaft.....	29
3.1.3. Analyse der Risikofaktoren.....	30
3.1.4. Internationaler Erfahrungsaustausch.....	31
3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	35
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	36
5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen.....	40
6. Literaturverzeichnis.....	41

7. Anhang	47
7.1. Mibi - Anhang	47
7.2. IBEL – Anhang.....	49
7.2.1. Kombination aus diagnostischen Testverfahren	49
7.2.2. Internationaler Erfahrungsaustausch.....	55

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Ziel des hier vorgestellten Projektes war es, eine Strategie zu entwickeln, mit der die Testgüte des gesamten Bekämpfungsverfahrens verbessert wird, indem verschiedene Testverfahren gleichzeitig angewendet werden (Paralleltestung). Ziel war somit eine Lösung für die Verbesserung des Nachweises von *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* (MAP) zu finden .

Kombination aus diagnostischen Testverfahren

Projektziel war es, eine (minimale) Kombination aus diagnostischen Testverfahren zu finden, die kosteneffizient ist und die diagnostische Sicherheit verbessert. Vorrangig sollten also im hier durchgeführten Projekt Aspekte der Diagnostik untersucht werden, um ein praktikables, wirksames und kosteneffizientes Überwachungssystem zu entwickeln. Dadurch sollte ein wichtiger Schritt in Richtung eines wirksamen Bekämpfungssystems gemacht werden.

Analyse der Risikofaktoren

Betriebsebene: Vorbereitend auf zukünftige Folgestudien (Module) sollte geprüft werden, ob es Hinweise darauf gibt, durch welche Risikofaktoren die Herdenprävalenz beeinflusst ist.

Einzeltierebene: Bei Krankheiten mit solch protrahiertem Verlauf ist die diagnostische Methode der Wahl von dem Infektionsstatus abhängig. Durch die Einzeltierdiagnostik sollte daher zudem ermittelt werden, ob es Hinweise darauf gibt, an welchen Faktoren man festmachen kann, welcher diagnostische Test angewendet werden sollte (Alter, Laktationsstadium, etc.).

Internationaler Erfahrungsaustausch

In Deutschland fehlen effiziente Programme zu einer Minimierung der Verluste durch die Paratuberkulose. Für die Entwicklung bzw. Verbesserung bisheriger Bekämpfungsprogramme sollten weiterhin Erfahrungen aus anderen Ländern mit bereits bestehenden Bekämpfungsprogrammen berücksichtigt werden.

1.1. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war der Paratuberkulosestatus weder für den Betrieb noch für das Einzeltier bekannt. Die Probenentnahmen erfolgten im Rahmen des laufenden Forschungsvorhabens „Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischen Krankheitsgeschehen“ (Förderkennzeichen: 2810HS005) durch die dort tätigen Studentierärzte des Partners RiKli. Es war geplant, bis Versuchsende insgesamt 90 der 139 Betriebe auch im MAP@on-Projekt zu untersuchen. Dies ist insofern gelungen als, dass insgesamt sogar 93 Betriebe (35 Kontroll-, 25 Fall-1- und 33 Fall-2-Betriebe) gemäß des Stichprobenschemas des übergeordneten Projektes untersucht worden sind.

Dabei galten für dieses Projekt die Bedingungen aus dem sog. Botulismus-Projekt für die Teilnahme eines Betriebes. So wurden nur Betriebe mit Boxenlaufställen und einer Anzahl laktierender Tiere von >30 zugelassen. Das hier dargestellte Projekt war durch die Kopplung an das übergeordnete Projekt eine sog. Fall-Kontroll-Studie, bei der ein Verdachtsbetrieb (sog. Fallbetrieb) mindestens drei von fünf Einschlusskriterien erfüllen musste (Milchrückgang > 15 % über einen Zeitraum von mind. 3 Monaten, Todesfälle/Euthanasien > 5 %, Abgangsrate (ohne Exporte) > 35 % oder Erhöhung der Abgangsrate um 10 % oder mehr (z.B. von 28 % auf 39 %), milchfieberartiges Festliegen > 10 % sowie erhöhte Krankheitsrate; vgl. Botulismus-Bericht für weitere Definitionen). Aufgrund der vermuteten Unterschiede zwischen geimpften und nicht-geimpften Fallbetrieben im Botulismus-Projekt wurden zwei Fallgruppen untersucht, so dass im Folgenden von Fall-1- (nicht geimpft), Fall-2- (geimpft mit polyvalenter Clostridienvakzine) und Kontrollbetrieben (keines der Einschlusskriterien erfüllt) gesprochen wird.

Im Anschluss an die Studienplanung und –Koordination wurde die bereits im Botulismus-Projekt erstellte Datenbank erweitert für die zusätzlich erstellten Probenergebnisse, so dass letztlich insgesamt 20 neue Spalten (resp. Variablen) ergänzt und manuelle Importe aus anderen (Labor-)Datenbanken programmiert wurden.

Von jedem Betrieb wurden vier Umweltproben (n=4; Mibi: Kultur; Vorwartebereich des Melkstands, Lauffläche im Futtertischbereich, Lauffläche im Liegebereich, Lauffläche im Tränkebereich) sowie eine Tankmilchprobe (LMQS: PCR) genommen. Zudem wurde von je fünf Verdachts- und fünf Kontrolltieren (vgl. Botulismus-Bericht für die Definitionen) je eine Einzelkotprobe (n=10; LMQS: PCR; Mibi: Kultur), eine Gesamtgemelksprobe (n=10; LMQS: PCR) sowie eine Serumprobe (n=10; Mibi: Ak-ELISA) genommen. Die Probenlogistik wurde zwischen den beiden Laborpartnern aufgeteilt (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Probenlogistik (eingesetzte Testtypen und verwendete Medien)

Testtypen	Medien			
	Kot	Serum	Milch	Umgebung
Direkt				
Kultur	x ₂	-	-	x ₂
PCR	x ₁	-	x ₁	-
Indirekt				
ELISA	-	x ₂	-	-

1 = LMQS; 2 = Mibi

Im Februar 2014 wurden die Betriebsbesuche abgeschlossen. Alle bis dann gewonnen Proben wurden bis zum 07. August 2014 in den Laboratorien der Partner Mibi und LMQS analysiert und flossen anschließend in die Auswertungen des Partners IBEL mit ein.

1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Paratuberkulose der Rinder, hervorgerufen durch *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP), kommt weltweit vor. Sie führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten, da die (Herden-) Milchleistung sinkt, Tiere abmagern und die Remontierungsrate steigt (Lombard, 2011). Die Erkrankung ist besonders in Ländern mit industrialisierter Milchviehhaltung von zunehmender Bedeutung, nicht nur in Deutschland, sondern auch in Europa und anderen Regionen der Welt. In einigen Ländern existieren daher bereits staatliche Bekämpfungsprogramme, wie z. B. in den Niederlanden, Schweden oder, seit Kurzem, in Irland (Kennedy, 2011) oder Studien zur Prävalenzschätzung von MAP (z.B. Hanifian et al., 2013; Raizman et al., 2011; Wilson et al., 2010). Neben Hauswiederkäuern geraten zunehmend auch Zoo- und Wildtiere als Reservoir in den Fokus (Munster et al., 2012; Pruvot et al., 2013). Zudem müssen bei dieser unheilbaren Erkrankung auch Tierschutzaspekte berücksichtigt werden, da infizierte Tiere unter einem protrahierten Krankheitsverlauf mit fatalem Ausgang leiden. Neben der wichtigen tiergesundheitlichen und ökonomischen Bedeutung von MAP ist auch dessen potenzielle Bedeutung als zoonotischer Erreger beim Menschen, besonders hinsichtlich einer möglichen Beteiligung am Morbus Crohn zu berücksichtigen. Die ursächliche Bedeutung des Erregers ist bisher aber noch nicht geklärt. Daher ist die Diskussion des Themas immer noch sehr kontrovers (Collins, 2011b). Als Diagnostika, die kostengünstig genug sind, um in Bekämpfungsverfahren verwendet zu werden, stehen im Wesentlichen der kulturelle Nachweis sowie die PCR und der ELISA zur Verfügung. Der kulturelle Nachweis des Erregers ist nach wie vor (kosten-) aufwändig und teilweise langwierig. Daher hat es insbesondere in der letzten Zeit verschiedene Vergleiche zwischen diesen Verfahren unter anderem auch im Hinblick auf ihre Testgüte gegeben (Costanzo et al., 2012; Donat et al., 2012; Khol et al., 2012; Kralik et al., 2011; Sidoti et al., 2011). Einige davon haben dabei auch ökonomische Aspekte berücksichtigt (Aly et al., 2012; Donat et al., 2012). Weitere Studien haben sich mit Evaluation von DNA-Extraktionskits (Leite et al., 2013; Logar et al., 2012), Vergleichen zwischen verschiedenen MAP-Antigenen (Mon et al., 2012) oder der Auszählung von MAP in verschiedenen Testsystemen (Kralik et al., 2012) beschäftigt. Aufgrund der Vielfältigkeit von Testverfahren aber vor allem der Teststrategien gibt es seit 2006 in den USA einen Konsensus über die Anforderungen an das diagnostische Testen auf MAP in Rindern (Collins et al., 2006; Sweeney et al., 2012). Zudem wurden in 2011 Regeln für den Bericht über diagnostische Testgüte-Studien niedergelegt (Gardner et al., 2011). Bis heute leiden die diagnostischen Verfahren darunter, dass der Erreger sehr lang intermittierend und in besonderen Stresssituationen ausgeschieden wird und somit

nur ein positiver Nachweis aussagekräftig ist. Der serologische Nachweis von Antikörpern ist abhängig vom Testantigen und auf das späte Infektionsstadium beschränkt, was zu einer stark eingeschränkten Sensitivität und Spezifität führt. Diese diagnostischen Mängel tragen erheblich dazu bei, dass diese meldepflichtige Erkrankung bisher nicht erfolgreich bekämpft werden konnte. Da die Sensitivität und Spezifität der Verfahren klar vom Infektionsstatus abhängt (Gilardoni et al., 2012), ist eine korrekte Wahl und Anwendung der jeweiligen diagnostischen Tests unerlässlich (O'Shea, 2011). Darüber hinaus muss vor Beginn der Untersuchungen das Testziel definiert werden, da nicht alle Tests für sämtliche Ziele gleichermaßen nutzbar sind (Collins, 2011a; Nielsen et al., 2011a). Verschiedene Effektoren stehen im Verdacht, zusammen mit dem Infektionsstatus Einfluss auf die Auffindungswahrscheinlichkeit von MAP zu nehmen (z.B. Alter, Laktationsstadium; Bolton et al., 2011; Mitchell et al., 2012; Nielsen et al., 2012). Die derzeit zugelassenen Verfahren können auf verschiedene Medien vom lebenden Tier angewendet werden (OIE, 2012; Kot, Serum, Milch; Probst et al., 2011). Insbesondere die Milch (Einzelmilch, Tankmilch, prozessierte Milch und Milchprodukte) ist nach wie vor Ziel verschiedener Untersuchungen (Boulais et al., 2011; Donaghy et al., 2011; Messelhauser et al., 2012; Mundo et al., 2012; Okura et al., 2012; Slana et al., 2012; Wadhwa et al., 2012). Darüber hinaus rückt seit einiger Zeit die Untersuchung von Umgebungsproben ins Zentrum wissenschaftlicher Untersuchungen (Donat et al., 2011; Eisenberg et al., 2012; Moravkova et al., 2012; Smith et al., 2011), wobei hier bedacht werden muss, dass das Auffinden von Gensequenzen in Umweltproben nicht als Auffinden infektiösen Agens interpretiert werden sollte (Chiodini et al., 2011). Andere Verfahren an lebenden Tieren sind aufgrund der Invasivität am Tier nicht massentauglich oder können aufgrund der sehr geringen Testgüte nicht auf Poolproben angewendet werden (Tankmilch).

In Deutschland fehlen bisher verschiedene Schritte hin zu einer Minimierung der Verluste durch diese Erkrankung. Vorrangig sind Aspekte der Diagnostik, der Stichprobenziehung sowie der Motivation der betroffenen Landwirte wichtig, um ein praktikables, wirksames und kosteneffizientes Überwachungssystem zu entwickeln („fitness for purpose“, 2009; Banoo et al., 2010; Greiner et al., 2000; Nielsen et al., 2011b; Sergeant, 2011). Ein effektives Bekämpfungsverfahren muss jedoch von drei wichtigen Säulen getragen werden: (1) Vermeidung der Exposition, (2) Auffinden und Eradikieren von infizierten Tieren sowie (3) Vermeidung der Einschleppung (Garry, 2011).

2. Material und Methoden

2.1. Mibi – Material & Methoden

Die Untersuchung in der Mikrobiologie umfasste die Untersuchung auf *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) durch Kultur, PCR, und serologische Analyse. Zur kulturellen Untersuchung und PCR-Analyse wurden Kotproben von jeweils 10 Einzeltieren und 4 Umweltproben (Wartebereich, Fressbereich, Tränke, Liegebereich) untersucht. Zur kulturellen Untersuchung wurden je 3 g Kot in 30 ml einer 0,75%igen Hexadecylpyridinium chloride (HPC) suspendiert und 20 ml des Überstandes über Nacht inaktiviert. Es wurden je ein HEYM Schrägagarröhrchen mit Mycobactin (CATTLETYPE® MAP HEYM, #03-900/100; Qiagen) mit je 150 µl der in HPC gelösten Kotsuspension und dem Material einer Impföse beimpft. Es erfolgte die wöchentliche visuelle Kontrolle des Wachstums über 16 Wochen. Kolonien wurden mikroskopisch durch Ziehl-Neelsen-Färbung (ZN) untersucht. ZN-positive Kolonien wurden ebenfalls durch PCR auf das Vorhandensein des IS-Elements IS900 untersucht. Serum wurde mit dem ELISA-Kit „IDEXX Mycobacterium paratuberculosis Antibody Test Kit“ auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP analysiert.

2.2. LMQS – Material & Methoden

Die durch die Mitarbeiter der Klinik für Rinder auf den Betrieben genommenen Proben wurden gekühlt an das Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit weitergeleitet. Diese Proben setzten sich zusammen aus von 10 Tieren stammenden Kot- und Milchproben sowie einer Tankmilchprobe pro Betrieb. Jede Milchprobe stammte von allen vier Eutervierteln.

Die Proben wurden im Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit zunächst vorbereitet und mit Hilfe des PRECELLYS® LYSIS KIT (Glas Kit 0,1mm, Peqlab, Erlangen) homogenisiert. Danach wurde die DNA unter Verwendung des Kingfisher mL (Life Technologies, Darmstadt) und des MagVET™ Mycobacterium paratuberculosis Isolation Kit (Life Technologies) isoliert. Für die anschließende Real Time-PCR wurde dann das VetMAX® MAP Real Time-PCR Screening Kit (Life Technologies) und zur Analyse der Lightcycler®480 (Roche, Mannheim) genutzt. Durch die Nutzung des VetMAX® MAP Real Time-PCR Screening Kit kann die MAP-DNA direkt aus Rinderkot gewonnen werden, so dass keine kulturelle Anzucht oder ein Anreicherungs-schritt nötig sind. Jede Probe wurde in der Real-Time-PCR im Doppelansatz getestet.

Für einen gültigen PCR-Lauf mussten verschiedene Parameter erfüllt sein. Die Negativkontrolle durfte kein positives Ergebnis liefern. Die Ct-Werte für die Positivkontrolle sollten zwischen 28 und 34 für die MAP-DNA und zwischen 27 und 34 für die Xeno™ DNA-Kontrolle liegen. Ein Ct-Wert von unter 37 für die MAP-DNA bei einem gleichzeitig zwischen 29 und 35 liegendem Xeno™ DNA-Kontrollwert wurde als positives Ergebnis gewertet. Gab es kein MAP-DNA-Signal bei einem zwischen 29 und 35

liegendem Xeno™ DNA-Kontrollwert wurde die Probe als negativ gewertet. Unschlüssige Ergebnisse (nicht eindeutig results, icr) ergaben sich für MAP-DNA-Signale zwischen 37 und 40. Alle unschlüssigen Ergebnisse wurden wiederholt und nach einem einheitlichen Schema bewertet. Ergab sich ein positives Resultat so wurden die Proben weiterhin als unschlüssig (icr) gewertet. Zeigten die Proben in der Wiederholung ein negatives Ergebnis, wurden sie als negativ gewertet. In den Fällen, in denen sich auch der Wiederholungs-Ct-Wert zwischen 37 und 40 befand, wurden die Proben ein weiteres Mal getestet. Die positiven Resultate wurden untergliedert. Ct-Werte für den MAP-DNA-Nachweis, die kleiner 30 waren, wurden als „+++“ gewertet, Werte die sich zwischen 30 und 34 befanden als „+“ und Werte von 34 bis 37 als „+“. Werte über 40 wurden als negativ bewertet.

2.3. IBEI – Material & Methoden

2.3.1. Kombination aus diagnostischen Testverfahren

2.3.1.1. Definitionen

Bevor statistische Analysen durchgeführt wurden, mussten zunächst verschiedene Definitionen vorgenommen werden, um eine systematische Auswertung zu ermöglichen. Um die minimale, optimale Testkombination für ein Bekämpfungsprogramm zu identifizieren, muss zunächst festgelegt werden, welches Ziel das Bekämpfungsprogramm verfolgen soll. Daher wurden alle (realistisch) denkbaren Bekämpfungsziele ermittelt. Weiterhin muss definiert werden, auf welche Zielpopulationen diese Bekämpfungsprogramme angewendet werden sollten. Diese wurden zusammengestellt und Bezug zu den in dieser Studie untersuchten Tier- und Betriebsgruppen hergestellt. Schließlich musste das Ziel der labordiagnostischen Untersuchung definiert werden. Dies erfolgte sowohl auf Einzeltier- wie auch auf Betriebsebene. Für die einzelnen Kombinationen aus Bekämpfungsziel, Zielpopulation und Untersuchungsziel wurden dann die Ergebnisse der statistischen Analysen auf Hinweise für eine minimale, optimale Testkombination hin interpretiert.

2.3.1.2. Analysen

Die Prüfung der Plausibilität erfolgte bei der Eingabe der Daten bzw. während des Einlesevorgangs der Daten in die Datenbank. Die Daten können durch Exporte aus der Datenbank ausgelesen werden.

Eine deskriptive Auswertung der Probenergebnisse erfolgte im Hinblick auf die gemeinsame Auswertung aller Probenergebnisse eines Betriebes. So wurde ein sog. Response Pattern erstellt, das eine Übersicht über das Muster der MAP-Ergebnisse und die Anzahl der Betriebe mit einem solchen Muster gibt.

Im Anschluss an die deskriptiven Auswertungen wurden induktive Methoden angewendet, um weitere Analysen bezüglich der realisierten Testgüte und der vorliegenden Prävalenz durchzuführen,

ohne dabei von Evaluationsstudien abhängig zu sein, die gegebenenfalls in Populationen anderer Zusammensetzung oder mit anderer Prävalenz durchgeführt worden sind.

In der weiteren Auswertung wurde das Antwortmuster der induktiven Analyse zugeführt. Hierzu wurden verschiedene Modelle der latenten Klassenanalyse in der Statistiksoftware SAS[®] 9.3 (Prozedur LCA; ebenso wie sämtliche anderen hier dargestellten Analysen; Collins and Lanza, 2010) angepasst. Ziel war es, die realisierte Testgüte der eingesetzten Testverfahren (und die wahre Prävalenz) zu ermitteln, sowie Faktoren zu analysieren, die auf die Zusammensetzung des Testergebnismusters (resp. Response Pattern) Einfluss nehmen. Dies musste unter Berücksichtigung des Fall-Kontroll-Status der Betriebe und Tiere erfolgen. Um verlässliche Aussagen über die Schätzungen machen zu können, musste jedoch zuvor ermittelt werden, wie gut die Modelle die Daten widerspiegeln (Modellgüte), ob in den Daten Confounder verzerrend auf die Schätzungen wirken (measurement invariance) oder ob die Daten überhaupt für eine Klassifizierung in „infiziert“ und nicht infiziert“ wie sie hier benötigt wurde geeignet sind. Obwohl basierend auf biologischen Prinzipien und den Eingangsinformationen, ein 2-Klassen-Modell das optimalste sein müsste, war die Analyse der optimalen Anzahl latenter Klassen notwendig: Dabei wurde ermittelt, ob eventuelle Störgrößen auf die Einteilung der Betriebe als MAP-positiv und -negativ Einfluss genommen hatten. Eine besonders zu berücksichtigende Störgröße war der Fall-Kontroll-Status des Betriebes sein. Daher wurde nach der Ermittlung der optimalen Anzahl latenter Klassen ein nicht-stratifiziertes 2-Klassen-Modell mit einem stratifizierten Modell (für den Fall-Kontroll-Status des Betriebes. bzw. den sogenannten Kombistatus des Tieres [Betriebsstatus sowie Verdachts- oder Kontrolltier]) verglichen.

Abschließend wurde vor der inhaltlichen Interpretation (für jedes Modell) die Zuordnung der Testergebniskombinationen zu den latenten Klassen überprüft, um sicherzustellen, dass in allen Modellen tatsächlich eine Klassifizierung in „infiziert“ und „nicht infiziert“ stattgefunden hat und keine andere Klassifizierung unbemerkt blieb.

2.3.2. Analyse der Risikofaktoren

Für die Analyse der Analyse der Risikofaktoren wurden Informationen aus der Botulismus-Datenbank herangezogen. Dadurch konnte ein deutlicher Mehrwert aus der Kooperation zwischen den beiden Projekten erreicht werden. Es wurden mögliche Risikofaktoren bzw. Confounder für das Auftreten von Paratuberkulose in Betrieben und bei Tieren, die im Botulismus-Verbundprojekt gesammelt worden waren, zusammengestellt und deskriptiv ausgewertet. Aufgrund der bereits dargestellten Effekte durch das Studiendesign sollten die Auswertungen getrennt für die drei Betriebstypen (Kontrolle, Fall-1- und Fall-2-Betriebe) durchgeführt werden. Aufgrund der unerwartet erschwerten induktiven Analyse einer optimalen, minimalen Testkombination und dem zeitlich verzögerten Vorliegen sämtlicher Testergebnisse konnte den nachfolgenden Risikofaktorenanalysen (bisher)

keine Einteilung in „Paratuberkulose positiv“ und „- negativ“ beigefügt werden, die auf eine nachvollziehbare und sichere Schätzung eines induktiven Testverfahrens zurückzuführen ist.

2.3.3. Internationaler Erfahrungsaustausch

Um am internationalen Erfahrungsaustausch zum Thema Diagnostika und Bekämpfungsprogramme teilhaben zu können, nutzte die Projektleitung neben eigenen regelmäßigen Literaturrecherchen auch die Mitgliedschaft in der Internationalen Gesellschaft für Paratuberkulose (IAP) und die dort versendeten Newsletter. Weiterhin nahmen verschiedene Projektpartner an dem in 2014 in Parma, Italien veranstalteten Internationalen Kongress für Paratuberkulose (ICP) und dem vorher durchgeführten sog. MAP-Forum teil. Beim MAP-Forum konnte gemeinsam mit Dr. Karsten Donat (Tierseuchenkasse Thüringen) ein Vortrag zur Prävalenz von Paratuberkulose in Deutschland und einem praktischen Beispiel der derzeit in Anwendung befindlichen Überwachungsprogramme gehalten werden (vgl. Anhang Proceedingsband). Weitere persönliche Kommunikationen mit international anerkannten Kollegen auf dem Gebiet der Paratuberkuloseüberwachung, die im Studienzeitraum stattfanden, sind im Ergebnisteil zusammengefasst.

3. Ergebnisse

3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1. Labordiagnostische Untersuchungen

3.1.1.1. Ergebnisse in der Mibi

Es wurden von 96 Betrieben je 10 Tiere und 4 Umgebungsproben untersucht. Als Untersuchungsverfahren wurde die kulturelle Untersuchung von Kotproben durchgeführt. Kulturell positive Proben wurden durch Ziehl-Neelsen-Färbung gefärbt und durch MAP-spezifische PCR getestet. Weiterhin wurden Serumproben aller Tiere durch ELISA auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen MAP untersucht. Von den 96 analysierten Betrieben wurden 12 Betriebe als kulturell und PCR positiv identifiziert (12,5 %).

In 5 Betrieben konnten nur Einzeltiere als kulturell positiv identifiziert werden. In 6 Betrieben wurden Einzeltier –und Umweltproben als kulturell positiv identifiziert. In 6 Betrieben konnten nur Umweltproben als kulturell positiv identifiziert werden.

Insgesamt wurden aus 12 Betrieben 22 Umweltproben als kulturell positiv identifiziert. Es wurden pro Betrieb maximal 3 von 4 Umweltproben als kulturell positiv nachgewiesen (5 Betriebe). In einem Betrieb wurden 2 von 4 Umweltproben als kulturell positiv, und in 6 Betrieben wurde nur eine von 4 Umweltproben als kulturell positiv identifiziert.

Beim Nachweis aus den Umweltproben gab es eine gleichmäßige Verteilung bezüglich der Entnahmeorte. Die Verteilung der 22 als kulturell positiv getesteten Umweltproben ergab sich wie folgt: 4 Proben aus dem Bereich der Tränke, 5 Proben aus dem Wartebereich, 6 Proben aus dem Liegebereich und 7 Proben aus dem Fressbereich.

Bei 96 untersuchten Betrieben wurden im ELISA Seren von 16 Einzeltieren aus insgesamt 16 Betrieben positiv getestet. Pro Betrieb wurde immer nur 1 Tier als positiv identifiziert. Es gab eine hohe Zahl von Tieren, die im ELISA-positiv waren, jedoch in der Kultur negativ waren. Insgesamt wurden von 10 Höfen 10 Tiere ELISA-positiv bei negativer Kultur gemessen.

Es kann zusammengefasst werden, dass die Anzahl der zu untersuchenden Tiere pro Betrieb (10) wahrscheinlich zu gering war. Etwa bei 35% der Höfe wurde lediglich aus den Umweltproben kulturell MAP nachgewiesen, ohne ein Einzeltier als MAP positiv identifiziert zu haben. Bei zu geringer Prävalenz ist die Anzahl von 10 getesteten Tieren pro Betrieb zu gering.

Bei der Anzucht von MAP auf HEYM Schrägagarrröhrchen konnten in den meisten Fällen sehr deutlich die Kolonien identifiziert werden. Probleme, wie Kontamination durch Schimmelpilze oder andere Bakterien, wie sie aus anderen Laboren berichtet wurden, traten bei unseren Untersuchungen nicht auf. Die MAP Analyse durch die gewählte PCR Methode (Nachweis von IS900) hat sich als stabil erwiesen. Die Ergebnisse Kultur/PCR korrelieren jedoch nicht zu 100%. Von den erhaltenen 49 Isolaten wurden 39 in der PCR bestätigt. 6 PCR Reaktionen zeigten bei positiver Kultur keine IS900 Bande. Bei 4 Kulturen konnte trotz interner Kontrolle das IS900 Fragment nicht amplifiziert werden. Somit korrelieren positive PCR Ergebnisse (IS900) zu 79,6 % mit den Ergebnissen der Kultur. Eine positive Kultur korrelierte zu 75% mit dem positiven Befund im ELISA. Bei der Untersuchung von etwa 960 Tieren wurden 10 Proben im ELISA falsch positiv gemessen.

3.1.1.2. Ergebnisse in der LMQS

Im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit wurden 1.942 Proben von 929 Tieren aus 93 Betrieben untersucht. Diese Betriebe unterteilen sich in 25 Fall-1, 33 Fall-2 und 35 Kontrollbetriebe. Die 1.942 Proben bestanden aus 928 Kotproben, 922 Milchproben und 92 Tankmilchproben. Es wurde DNA von 1942 Proben isoliert und diese mit insgesamt 2128 PCR Läufen (ohne Wiederholung von nicht eindeutigen Ergebnissen) untersucht. Das Real Time-PCR Verfahren konnte mit allen erhaltenen Proben erfolgreich durchgeführt werden, so dass für insgesamt 99,89% der untersuchten Tiere mindestens ein PCR Ergebnis sowie für 99,25% der Tiere ein Befund beider Proben vorlag.

Insgesamt war in Proben von 17 Betrieben (18,28%) MAP-DNA mittels Real-time-PCR nachweisbar. Innerhalb der positiven Betriebe gab es eine Streuung von einer bis hin zu 13 positiven Proben. Insgesamt waren 22 Tiere auf den Fall-1- (8,80%), 21 der Tiere der Fall-2- (6,36%) und 9 Tiere der

Kontrollbetriebe (2,57%) positiv für MAP-DNA (Kot- und/oder Milchprobe). Positive Resultate ergaben sich sowohl für die Kot- als auch für die Milchproben. In 8,84 Prozent der Kotproben der Fall-1 und 4,24 Prozent dieser Proben der Fall-2 Betriebe, jedoch nur in 1,15 Prozent der Kotproben der Kontrollbetriebe, konnte MAP-DNA nachgewiesen werden. Für die Milchproben ergaben sich Anteile von 2,4 Prozent für Fall-1-, 3,07 Prozent für Fall-2- und 1,45 Prozent für Kontrollbetriebe. Es war keine MAP-DNA in einer der Tankmilchproben nachweisbar.

3.1.2. Kombination aus diagnostischen Testverfahren

Wie bereits von Nielsen et al. (2014) erläutert, ist es vor der Untersuchung geeigneter Testsysteme zunächst notwendig, das Ziel der Bekämpfung, für das die Tests eingesetzt werden sollen, genau zu definieren. Daher wurden auch vor der Untersuchung einer optimalen, minimalen Testkombination verschiedene Szenarien definiert, an denen die Testkombinationen beurteilt werden konnten (vgl. Kap. 3.1.2.1 „Definitionen“ und Tab. 2). Aufgrund des Studiendesigns (Fall-Kontrollstatus des Betriebes und Verdachts- bzw. Kontrollstatus des Tieres) waren passende Studiengruppen vorhanden, um ein Einzeltierszenario (Kap. 3.1.2.2.1; unverdächtiges Tier aus unverdächtigem Betrieb) sowie drei verschiedene Betriebsszenarien (Kap. 3.1.2.2.2 mit unverdächtigen sowie verdächtigen Betriebe und Kap. 3.1.2.2.3 mit dem Programm der Milchwirtschaft) zu untersuchen. Um jedoch vor den Szenario-basierten Analysen einen Einblick in sämtliche Testergebnisse und Testvergleiche zu geben, beginnt das Kapitel 3.1.2.2 „Analysen“ mit einer deskriptiven Übersicht über Einzeltier- und Herdenergebnisse.

Wie bereits anzunehmen war, waren (abhängig von der gerade untersuchten Testkombination) teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Studiengruppen hinsichtlich der realisierten Testgüten feststellbar. Dies bestätigt die Annahme, dass die Güte eines Testverfahrens sehr stark von der Zielpopulation abhängt, in der er eingesetzt wird. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, dass es zusätzlich zu den weiterhin benötigten Evaluationsstudien von Testverfahren auch wichtig ist, in Studien und Bekämpfungsprogrammen eine Verifikation der Testgüte der eingesetzten Verfahren durchzuführen, um die Qualität der Studie bzw. des Programmes zu sichern. Für die hier dargestellten Ergebnisse bedeutet dieser starke Einfluss des Studiendesigns jedoch, dass die Analysen innerhalb der Subgruppen gemacht werden mussten, wodurch die jeweiligen Stichprobenumfänge innerhalb dieser Subgruppen teilweise sehr klein waren und somit nicht mehr als explorative Schlussfolgerungen zuließen. Diese Modelle sind erkennbar an den nicht vorhandenen Standardfehlern zu den Prävalenz- und Testgüteschätzern.

Von den sechs hier eingesetzten Testverfahren fokussierten fünf Verfahren auf den direkten Erregernachweis (im Folgenden mit „DEN“ abgekürzt). Diese Verfahren weisen den Erreger kulturell oder seine DNA nach. Bei diesen Verfahren ist ein positives Ergebnis als „wahr positiv“ zu beurteilen. Das hier für die induktiven, statistischen Analysen eingesetzte Modell geht jedoch bei jeder eingehenden Information von einem gewissen Grad an Unsicherheit in deren Wahrheitsgehalt aus und weist demnach auch diesen wahr positiven Ergebnissen einen Unsicherheitsfaktor zu. Dadurch wurden in manchen Modellen die Klassifizierungen in „infiziert“ und „nicht infiziert“ nicht korrekt vorgenommen.

Auch wenn die latente Klassenanalyse als Verfahren ohne Gold Standard Test mittlerweile ein hilfreiches Mittel ist, um in Studien dieser Art die realisierte Testgüte der Diagnostika zu prüfen, darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass die Testverfahren grundsätzlich eine hohe Testgüte einbringen müssen, um die Schätzung der latenten Klassen reliabel zu machen. Denn die latente Klassenanalyse kann diejenigen Informationen verarbeiten, die die labordiagnostischen Tests ihr liefern.

Für die induktiven, statistischen Analysen wurden auf Einzeltierebene insgesamt 132 (72+48+12) und auf Herdenebene 125 (50+50+25) latente Klassenanalysemodelle angepasst. Aufgrund der Modellselektion, des Einflusses durch das Studiendesign und die Klassifikationsschwierigkeiten durch die wahr positiven Ergebnisse aus den DEN-basierten Testverfahren konnten letztlich sechs (6+0+0) Modelle auf Einzeltierebene und 19 (17+2+0) Modelle auf Herdenebene inhaltlich interpretiert werden.

Die nachfolgend detailliert dargestellten Ergebnisse aus den deskriptiven und induktiven Analysen deuten an, dass es in der hier vorgestellten Studie keine optimale, minimale Testkombination gegeben hat, die – unabhängig von einem Bekämpfungsziel – zu einer konsistent guten Prävalenzschätzung geführt hat und bei der zudem eine akzeptable Testgüte der einzelnen Verfahren realisiert werden konnte. Vielmehr zeigte sich, dass die optimalen Testkombinationen davon abhängen, welche Zielpopulation untersucht wird und welches Bekämpfungsziel verfolgt werden soll. Während Tankmilchuntersuchungen in dieser Studie in keinem untersuchten Szenario einen hilfreichen Beitrag leisteten, scheinen DEN-basierte Verfahren unabhängig vom Bekämpfungsziel ein wichtiger Bestandteil von Untersuchungsprogrammen zu sein.

Für die Untersuchung von unverdächtigen Einzeltieren zeigte sich, dass zukünftig der Fokus auf den DEN-basierten Verfahren liegen sollte, wobei insbesondere nicht auf eine Einzelkot-Kultur und eine Einzelkot-PCR verzichtet werden kann. Jedoch gibt es nach wie vor keine Testverfahren, die allein

oder in einer minimalen Kombination mit anderen Verfahren eine kostengünstige und verlässliche Aussage darüber zulassen, ob ein Einzeltier mit dem Erreger der Paratuberkulose infiziert ist oder nicht.

Für die Untersuchung von unverdächtigen Betrieben mit dem Ziel eines groben Einblicks in den Herdenstatus erscheinen basierend auf den hier analysierten Daten, auch in der induktiven Analyse die Einzelkot-basierten Verfahren als wichtiger Bestandteil eines Gesamtverfahren besonders gut geeignet zu sein.

Für die Untersuchung von verdächtigen Betrieben mit dem Ziel eines groben Einblicks in den Herdenstatus kommt basierend auf dem explorativen Charakter der hier dargestellten Ergebnisse nur die 2er-Testkombination aus Kot-Kultur und Umgebungskultur in Frage, da sie den Herdenstatus etwas genauer zu erfassen scheint als bei Einsatz nur eines einzelnen Testverfahrens. Ob darüber hinaus die Kombination aus ELISA und Umgebungskot-Kultur ebenfalls denkbar wäre, muss in nachfolgenden Studien größeren Umfangs untersucht werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass dann weiterhin die Sensitivität des ELISAs gering bliebe.

Für ein Programm der Milchwirtschaft können grundsätzlich die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Analysen für die Herdenuntersuchung unverdächtiger Herden übernommen werden. Jedoch ist zu beachten, dass ein (falsch) positiv getesteter Betrieb wirtschaftliche Nachteile bei der Vermarktung seiner Produkte hätte. Ein falsch negativ getesteter Betrieb würde den Ansprüchen des Systems an eine optimale Qualitätssicherung widersprechen.

3.1.2.1. Definitionen

Ähnlich der Anforderung für jedes Testziel andere, explizite Testverfahren bzw. Testkombinationen anzuwenden (Nielsen, 2011; Nielsen, 2014; OIE, 2009 - „Fit for purpose“) müssen auch die Ziele von Bekämpfungsprogrammen explizit beschrieben und differenziert werden, um im Folgenden Tests zu identifizieren, die möglichst optimal zum Bekämpfungsziel passen (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2: Differenzierung von Zielen von Bekämpfungsprogrammen

Bekämpfungsprogramm - Ziele	Zielpopulation	Untersuchungsziel
Einzeltierebene		
Einzeltieruntersuchung (z.B. zum Export „Freiheit von einer Krankheit“)	Zuchtrinder / Jungrinder → <i>Unverdächtige Einzeltiere</i>	Sichere Aussage über den Infektionsstatus des Einzeltieres → <i>Diagn. Test muss eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen</i>
Individuelles Programm für eine Herde (z.B. zur Eindämmung der wirtschaftlichen Schäden durch Paratuberkulose, Senkung der Innerherdenprävalenz, der Eradikation, Verbesserung des Tierschutzes)	Risiko-basiert selektierte Rinder eines bekannt betroffenen Betriebes → <i>Einzelne (verdächtige) Rinder in betroffenen Herden</i>	Möglichst sicheres Auffinden der Ausscheidertiere (mit dem größten Risiko für andere Tiere)
Herdenebene		
Herdenuntersuchung (z.B. zum Benchmarken, als Kick-off für nachfolgende Bekämpfung oder zur Qualitätssicherung)	Rinder des jeweiligen Betriebes (alle / Stichprobe) → <i>Unverdächtige / Verdächtige Herden</i>	Relativ grober Einblick in den Herdenstatus → <i>Diagn. Test muss eine hohe Spezifität aufweisen</i>
Prävalenzuntersuchung in Herden (z.B. zum Ermitteln des Status Quo in einer Region)	Adulte Rinder in der jeweiligen Region (alle / Stichprobe) → <i>Alle Herden</i>	Möglichst verlässliche Aussage über den Anteil infizierter Herden in der Region
Staatliches Programm (z.B. zur Senkung der (Herden-)Prävalenz in einer Region)	Bekannt betroffene Betriebe: Risiko-basiert selektierte Rinder in der jeweiligen Region (alle / Stichprobe) → <i>Betroffene Herden</i>	Möglichst sicheres Auffinden der Ausscheidertiere (mit dem größten Risiko für andere Tiere; „high shedders“)
Programm der (Milch-)Wirtschaft (z.B. zum Benchmarken und zur Qualitätssicherung; Wettbewerbsvorteil am LM-Markt)	Rinder von teilnehmenden Betrieben (alle / Stichprobe) → <i>Unverdächtige Herden</i>	Auffinden von nicht infizierten Herden → <i>Diagn. Test muss eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen</i>

Grau=Bekämpfungsziele können nicht im Rahmen dieser (Fall-Kontroll-)Studie betrachtet werden

In der hier dargestellten Studie wurden ausschließlich Betriebe untersucht, von denen kein vorheriger Paratuberkulosestatus vorlag. Die sog. Kontrolltiere und Kontrollbetriebe werden daher im Folgenden als Repräsentanten für unverdächtige Tiere bzw. Herden betrachtet. Die Verdachtstiere und Fall-1- (und Fall-2-)Betriebe des übergeordneten Botulismus-Projektes werden als Verdachtstiere und Verdachtsbetriebe im Sinne des Paratuberkuloseverdachts betrachtet. In

Tabelle 2 grau markierte Bekämpfungsziele können nicht im Rahmen dieser (Fall-Kontroll-)Studie betrachtet werden, da die Stichprobe aufgrund des Studiendesign nicht repräsentativ für eine Zielpopulation ist und keine bekannt von Paratuberkulose betroffenen Tiere oder Betriebe teilgenommen haben.

Ein Betrieb galt als positiv in einem der Einzeltiertestverfahren, sofern mindestens ein Tier in diesem Verfahren positiv getestet worden war. Ein Unterschied zwischen Verdachts- und Kontrolltieren machte hier keinen inhaltlichen Sinn, so dass jedes der Zehn getesteten Tiere dasselbe Gewicht bei der Definition eines positiven Betriebes hatte. Auch für die vier Umgebungsproben je Betrieb gilt, dass ein Betrieb als positiv gilt, sobald mindestens eine dieser Proben positiv ist.

3.1.2.2. Analysen

Zur Analyse durch das IBEI lagen Daten zu 465 Kontroll- und 465 Verdachtstieren aus 93 Betrieben vor. Die Verteilung der Betriebe auf den Fall 1- (ungeimpft; n=25), Fall 2- (geimpft; n=33) und Kontrollstatus (n=35) war relativ homogen. Die Daten zu den einzelnen Untersuchungsergebnissen wiesen ein hohes Maß an Vollständigkeit auf. Nur in acht von über 4.000 genommenen Proben lag kein Probenmaterial zur Untersuchung vor und neun weitere Proben waren im Verlauf der diagnostischen Untersuchungen nicht auswertbar.

Einzeltierebene: Unter der Voraussetzung, dass mindestens ein positives Testergebnis ein Tier als infiziert beschreibt, würden insgesamt 64 von 930 (6,88%) aller untersuchten Tiere als infiziert identifiziert. Es konnten relevante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit auf diese Weise als positiv identifizierter Tiere sowohl zwischen Kontroll- und Verdachtstieren als auch zwischen Fall- und Kontrollbetrieben festgestellt werden (vgl. Tab. 3). Insbesondere das häufigere Auffinden von positiven Tieren (bei mindestens einem positiven Test) bei den ungeimpften Fall-1-Betrieben ist hier herauszustellen.

Tabelle 3: Vorkommen positiv getesteter **Tiere** bei **mindestens einem positiven von vier** angewendeten Tests

	Verdachtstiere	Kontrolltiere	Gesamt
Kontrollbetriebe	11 (6,29%)	5 (2,86%)	16 (4,57%)
Ungeimpfte Fall-1-Betriebe	15 (12%)	10 (8%)	25 (10%)
Geimpfte Fall-2-Betriebe	12 (7,27%)	11 (6,67%)	23 (6,97%)
Gesamt			64 (6,88%)

Unter der Annahme, dass nicht alle hier verwendeten Einzeltiertests die gleiche hohe Effizienz bei der Vorhersage einer Infektion bei einem Einzeltier haben (Stabel et al., 2002), kann die Betrachtung auch nur für drei Tests (Faeces-Kultur, Faeces-PCR und Milch-PCR) gemacht werden (vgl. Tab. 4). Dies senkt das unter der gegebenen Definition vorgefundene Vorkommen von positiven Tieren in jeder Tiergruppe leicht, führt jedoch nicht zu einer Veränderungen zwischen den Tiergruppen.

Tabelle 4: Vorkommen positiv getesteter **Tiere** bei **mindestens einem positiven von drei** angewendeten Tests (ohne Serum-ELISA)

	Verdachtstiere	Kontrolltiere	Gesamt
Kontrollbetriebe	8 (4,57%)	3 (1,71%)	11 (3,14%)
Ungeimpfte Fall-1-Betriebe	14 (11,2%)	9 (7,2%)	23 (9,2%)
Geimpfte Fall-2-Betriebe	10 (6,06%)	11 (6,67%)	21 (6,36%)
Gesamt			55 (5,91%)

In allen drei Betriebstypen waren die Verdachtstiere etwas häufiger positiv getestet als die Kontrolltiere. Dies ist darauf zurückzuführen, dass als Verdachtstiere auch diejenigen Tiere mit einem Habitus chronisch krank und aufgrund einer auffällig schlechten Körperkondition ausgewählt wurden (vgl. Abschlussbericht Botulismus-Projekt). In einem seit längerem infizierten Bestand kann erwartet werden, dass klinisch erkrankte Tiere (wie hier die Verdachtstiere) gefunden werden. Für die Planung eines Bekämpfungsprogramms kann hieraus geschlossen werden, dass eine Risiko-basierte Auswahl der zu beprobenden Tiere die Auffindungswahrscheinlichkeit infizierter Tiere erhöht.

Wie in Tabelle 5 zu erkennen ist, gibt es kein Tier, das in allen Testverfahren als positiv erkannt worden ist, jedoch wurden teilweise bis über 90% der Tiere durch alle vier Tests als negativ erkannt. Geht man davon aus, dass die Faeces-Kultur und die Faeces-PCR die höchste Testgüte haben, so kann man auch feststellen, dass diese beiden Tests auch die meisten Tiere als positiv erkannt haben. So wurden neun Tiere durch beide Verfahren positiv identifiziert, vier ausschließlich durch die Einzelkot-Kultur und 22 ausschließlich durch die Einzelkot-PCR. Bei der Einzelmilch-PCR unterliegt die Konzentration des Agens einer starken Dilution, da es im Wesentlichen durch Kotverschmutzungen am Euter in die Milch eingetragen wird. Die Übereinstimmung mit der Faeces-PCR war sehr gut wobei es keine Übereinstimmungen mit der Faeces-Kultur gab. Da jedoch die Einzelmilch-PCR eine ebenso gute Spezifität aufweist wie die Faeces-PCR, muss ein positives Ergebnis auch hier als hinweisend auf ein infiziertes Tier gewertet werden. Somit hat die Einzelmilch-PCR 12 weitere Tiere als positiv erkannt, die in anderen Tests nicht erkannt worden waren. Hier besteht jedoch die

Möglichkeit, dass die zugrunde liegenden Kotverschmutzungen von anderen Tieren stammen könnten. Für die Planung von Bekämpfungsprogrammen lässt sich hieraus schlussfolgern, dass – sofern Einzeltier tests gewünscht sind – DEN-basierte Verfahren von den hier untersuchten Tests am besten geeignet zu sein scheinen, um Betriebe mit einem chronischen Krankheitsgeschehen auf das Vorkommen von Paratuberkulose zu untersuchen.

Tabelle 5: Muster der Testergebnisse (Response Pattern) auf Tierebene – basierend auf den vier Einzeltiertests

				Teilnehmergruppe												
				Kontrolle				Fall 1 (ungeimpft)				Fall 2 (geimpft)				
				CC-Status Tier				CC-Status Tier				CC-Status Tier				
				Verdachtstier		Kontrolltier		Verdachtstier		Kontrolltier		Verdachtstier		Kontrolltier		
Faeces Kultur	Serum ELISA	Faeces PCR	Milch PCR	Anzahl	Spalten %	Anzahl	Spalten %	Anzahl	Spalten %	Anzahl	Spalten %	Anzahl	Spalten %	Anzahl	Spalten %	
positiv	positiv	positiv	negativ	2	1,14	2	1,60	.	.	1	0,61	
		negativ	nicht eindeutig	1	0,61	.	.	
	negativ	positiv	negativ	2	1,60	.	.	1	0,61	.	.	
		negativ	negativ	.	.	1	0,57	1	0,80	1	0,80	
negativ	positiv	positiv	positiv	1	0,80	
		negativ	negativ	3	1,71	2	1,14	1	0,80	1	0,80	2	1,21	.	.	
	negativ	positiv	positiv	positiv	1	0,80	4	3,20	2	1,21	.	.
			negativ	negativ	1	0,57	1	0,57	8	6,40	2	1,60	3	1,82	5	3,03
		negativ	positiv	existiert nicht	1	0,61
			negativ	positiv	positiv	5	2,86	3	1,82	4
	nicht eindeutig	negativ	negativ	negativ	162	92,57	165	94,29	109	87,20	114	91,20	153	92,73	153	92,73
			existiert nicht	existiert nicht	.	.	1	0,57	1	0,61
		negativ	positiv	existiert nicht	.	.	1	0,57
			negativ	negativ	2	1,14	3	1,71
nicht auswertbar	negativ	positiv	negativ	1	0,80	
		negativ	negativ	1	0,80	
existiert nicht	negativ	existiert nicht	negativ	1	0,80	
All				175	100,00	175	100,00	125	100,00	125	100,00	165	100,00	165	100,00	

Herdenebene: Unter der Voraussetzung, dass mindestens ein positives Testergebnis eine Herde als infiziert beschreibt, würden insgesamt 33 von 93 (35,48%) aller untersuchten Herden als infiziert identifiziert. In der deskriptiven Auswertung konnten relevante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit auf diese Weise als positiv identifizierter Tiere zwischen ungeimpften Fall-1- und Kontrollbetrieben festgestellt werden (vgl. Tab. 6).

Tabelle 6: Vorkommen positiv getesteter **Betriebe** bei **mindestens einem positiven von sechs** angewendeten Tests

	n	%
Kontrollbetriebe	12	34,29
Ungeimpfte Fall-1-Betriebe	11	44,00
Geimpfte Fall-2-Betriebe	10	30,30
Gesamt	33	35,48

Unter der Annahme, dass nicht alle hier verwendeten Tests die gleiche hohe Spezifität haben, kann die Betrachtung auch nur für fünf Tests (Faeces-Kultur, Faeces-PCR, Milch-PCR, Umgebungs-Kultur sowie Tankmilch-PCR) gemacht werden (vgl. Tab. 7), wobei dies da facto nur vier Tests waren, da die Tankmilch-PCR kein positives Testergebnis beigesteuert hatte. Dies senkt unter der gegebenen Definition sowohl das vorgefundene Vorkommen von positiven Herden in jeder Betriebsgruppe leicht, jedoch führt es auch zu einer (leichten) Veränderungen zwischen den Betriebsgruppen, so dass nunmehr das Vorkommen von positiven Herden in den Kontrollbetrieben am seltensten ist.

Tabelle 7: Vorkommen positiv getesteter **Betriebe** bei **mindestens einem positiven von fünf** angewendeten Tests (ohne Serum-ELISA)

	n	%
Kontrollbetriebe	8	22,86
Ungeimpfte Fall-1-Betriebe	10	40,00
Geimpfte Fall-2-Betriebe	8	24,24
Gesamt	26	27,96

Unabhängig von der Anzahl zugrundeliegender Tests war der Anteil positiv getesteter Herden bei den ungeimpften Fall-1-Betriebe am höchsten. Dies legt eine intensivere Betrachtung der Unterschiede zwischen den untersuchten Betriebstypen nahe. Erste Ergebnisse hierzu sind bereits im Botulismus-Abschlussbericht zu finden und wurden auch beim Abschluss Symposium präsentiert. Dieses Ergebnis

ist konform mit der Forderung danach, dass Testverfahren nicht nur abhängig vom Bekämpfungsziel sondern auch abhängig von der Zielpopulation ausgewählt werden müssen (vgl. Tab. 2).

Unabhängig von der Anzahl zugrundeliegender Tests war der Anteil positiv getesteter Tiere bei den ungeimpften Fall-1-Betrieben am höchsten. Dies legt eine intensivere Betrachtung der Unterschiede zwischen den untersuchten Betriebstypen nahe. Erste Ergebnisse hierzu sind bereits im Botulismus-Abschlussbericht zu finden und wurden auch beim Abschluss Symposium präsentiert. Für die Planung eines Bekämpfungsprogramms lässt sich heraus schlussfolgern, dass vorbereitende Studien notwendig sind, die nicht nur ermitteln, ob und welche Risikofaktoren einen infizierten Betrieb determinieren sondern insbesondere auch, welchen Einfluss das Hygienebewusstsein und die Einstellung des Tierhalters gegenüber der Gefahr einer Infektion mit Paratuberkulose spielt.

Wie in Tabelle 8 zu erkennen ist, gibt es in der deskriptiven Auswertung keine Herde, die in allen Testverfahren als positiv erkannt worden ist, jedoch wurden abhängig vom Fall-Kontroll-Status des Betriebes 56,00% (Fall-1-) bis 72,73%(Fall-2-Betriebe) der Herden durch alle sechs Tests als negativ erkannt. Geht man davon aus, dass die Faeces-Kultur und die Faeces-PCR die höchste Testgüte haben, so kann man auch feststellen, dass diese beiden Tests zusammen auch die meisten Herden als positiv erkannt haben. Bei der Milch-PCR und die Umgebungs-Kultur haben jedoch noch einen zu berücksichtigenden zusätzlichen Anteil positiver Herden erkannt. In der Umgebungskultur –allein- konnten jedoch auch 7 (20%) bei den Kontroll-, 2 (8%) bei den ungeimpften Fall-1- und 4 (12,12%) bei den geimpften Fall-2-Betriebe nicht als positiv erkannt werden.

Tabelle 8: Muster der Testergebnisse (Response Pattern) auf Herdenebene – basierend auf den sechs Tests

Faeces Kultur	Faeces PCR	Milch PCR	Umgebungs-Kultur	Tankmilch PCR	Serum ELISA	Teilnehmergruppe						
						Kontrolle		Fall 1 (ungeimpft)		Fall 2 (geimpft)		
						Anzahl	Spalten %	Anzahl	Spalten %	Anzahl	Spalten %	
positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	.	.	2	8,00	2	6,06	
			negativ	negativ	positiv	1	2,86	
			negativ	negativ	positiv	.	.	1	4,00	.	.	
			negativ	negativ	negativ	1	3,03	
			negativ	negativ	negativ	1	2,86	
negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	.	.	1	4,00	.	.	
			negativ	negativ	positiv	1	2,86	
			negativ	negativ	negativ	1	2,86	.	.	2	6,06	
			existiert nicht	negativ	1	3,03		
			negativ	negativ	negativ	1	2,86	
	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	1	2,86
				negativ	negativ	negativ	1	2,86	.	.	1	3,03
				positiv	negativ	positiv	.	.	1	4,00	.	.
				negativ	negativ	negativ	.	.	3	12,00	.	.
				negativ	negativ	positiv	4	11,43	1	4,00	2	6,06
					negativ	23	65,71	14	56,00	24	72,73	
Gesamt						35	100,00	25	100,00	33	100,00	

Nachfolgend sind die Analyseergebnisse aus der induktiven Auswertung für die oben beschriebenen hier analysierbaren Bekämpfungsziele und Populationsgruppen dargestellt. Modelle ohne Standardfehlerkalkulation konnten inhaltlich nur explorativ interpretiert werden. Zudem gab es Modelle, die nicht wie hier benötigt in „infiziert“ und „nicht infiziert“ klassifiziert haben und daher basierend auf den hier analysierten Studiendaten im aktuellen Zustand keine Auskunft über die Prävalenz und die Testgütekriterien gaben. Beide Fälle sind in den zugehörigen Tabellen im Anhang grau bzw. dunkelgrau markiert.

3.1.2.2.1 Einzeltieruntersuchung

Bekämpfungsprogramm - Ziele	Zielpopulation	Untersuchungsziel
	Einzeltierebene	
Einzeltieruntersuchung (z.B. zum Export „Freiheit von einer Krankheit“)	Zuchtrinder / Jungrinder → <i>Unverdächtige Einzeltiere</i>	Sicher Aussage über den Infektionsstatus des Einzeltieres

Analysen zur Modellgüte bei den 2er-Testkombinationen deuten an, dass in der hier dargestellten Studie die Kombinationen mit Einzelmilch-PCR eine höhere Sicherheit bei der Klassenzuordnung der Tiere (Entropy) aufweisen als Kombination ohne Einzelmilch-PCR. Die erwartete Zellbesetzung (Sparseness=43,75) war groß genug, um verlässliche Schätzungen vorzunehmen. Dennoch konnten in den Modellen für die Kontrolltiere in Kontrollbetrieben, die hier als unverdächtige Tiere untersucht werden sollten, keine Standardfehler geschätzt werden, so dass die inhaltliche Interpretation nur explorativ erfolgen konnte. In den passend klassifizierenden Modellen (vgl. Kap. 3.1.2.3 „Klassenzuordnung“ und „Entropy-Index“) konnte für keinen Test eine auch nur annähernd akzeptable Sensitivität ermittelt werden. Zudem unterschätzten hier sämtliche Kombinationen die Prävalenz, die aus der Kombination aus drei DEN-basierten Verfahren ermittelt worden war – jedoch nur geringgradig. Es konnte somit basierend auf den hier analysierten Daten zum derzeitigen Stand der Analysen keine optimale 2er-Testkombination zur Untersuchung unverdächtigter Tiere ermittelt werden.

Bei den 3er-Testkombinationen genügte kein Modell den Erfordernissen, um die Klassenordnung der Tiere mit ausreichender Sicherheit vornehmen zu können. Somit kann keines der Ergebnisse hier zur explorativen Interpretation herangezogen werden. Wie bereits erwähnt scheint die sensitivste Kombination der hier untersuchten Verfahren eine Kombination aus den drei DEN-basierten Tests zu sein. Während so 2,29% (n=4) der unverdächtigten Tiere von Kontrollbetrieben sicher positiv ermittelt werden konnten, hat der Serum-ELISA von diesen Tieren keines erkannt, demgegenüber jedoch zwei andere Tiere als positiv identifiziert.

Es ist zu berücksichtigen, dass in der hier dargestellten Studie ausschließlich laktierende, erwachsene Kühe untersucht wurden, so dass sämtliche Ergebnisse nur für diese Tiergruppe interpretiert werden können. Die Ergebnisse dieser Studie deuten an, dass gerade für die unverdächtigen Kontrolltiere zukünftig der Fokus auf den DEN-basierten Verfahren liegen sollte. Hier kann nicht auf eine Einzelkot-Kultur und eine Einzelkot-PCR verzichtet werden, wenn es darum geht, diese Tiere „frei zu testen“. Die Kombination aus diesen beiden Verfahren führt zu den meisten erkennbaren Tieren. Somit lässt sich hier schlussfolgern, dass - auch wenn die Einzelkot-Kultur kostenintensiv und langwierig ist – sie doch noch nicht zu den verzichtbaren Verfahren gehört.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Studie auch klar auf, dass es für die Einzeltiertestung nach wie vor keine Testverfahren gibt, die allein oder in einer minimalen Kombination mit anderen Verfahren eine kostengünstige und verlässliche Aussage darüber zulassen, ob ein Einzeltier Paratuberkulose infiziert ist oder nicht.

Würde man demgegenüber unverdächtige Tiere von verdächtigen Betrieben untersuchen, bot sich in der hier dargestellten Studie insbesondere die Kombination aus Einzelkot-PCR und Einzelmilch-PCR als hilfreiche Kombination an.

3.1.2.2.2 Herdenuntersuchung

Bekämpfungsprogramm - Ziele	Zielpopulation	Untersuchungsziel
Herdenebene		
Herdenuntersuchung (z.B. zum Benchmarken, als Kick-off für nachfolgende Bekämpfung oder zur Qualitätssicherung)	Rinder des jeweiligen Betriebes (alle / Stichprobe) → <i>Unverdächtige / Verdächtige Herden</i>	Relativ grober Einblick in den Herdenstatus

Kalkuliert man die Herden-Sensitivität und die Herden-Spezifität und verwendet die Sensitivitäten und Spezifitäten aus Evaluationsstudien (Kot-Kultur: Collins et al., 2006; Kot-PCR: Leite et al., 2013; Milch-PCR: Grant et al., 2000; Umgeb.-Kultur: Lavers et al., 2013; Serum-ELISA: Köhler et al., 2008), so weist die Faeces-PCR die höchste hier realisierte Spezifität auf. Die Tests mit den höchsten Sensitivitäten variieren abhängig von der untersuchten Betriebsgruppe (vgl. Tab. 9).

Tabelle 9: Kalkulierte Testgüte und apparente Prävalenz basierend auf den Sensitivitäten und Spezifitäten aus Evaluationsstudien

	FKStatus _{Betrieb}	SE _{Herde}	SP _{Herde}	AP	SE _{eval}	SP _{eval}
F. kult	K	0,70	0,99	0,11	0,6	0,999
	F1	0,89	0,99	0,20	0,6	0,999
	F2	0,61	0,99	0,09	0,6	0,999
F. PCR	K	0,70	1,00	0,11	0,559	1
	F1	0,83	1,00	0,16	0,559	1
	F2	0,87	1,00	0,18	0,559	1
Milch PCR	K	0,59	0,60	0,09	1	0,95
	F1	0,57	0,60	0,08	1	0,95
	F2	0,61	0,60	0,09	1	0,95
Umg. Kult	K	0,25	0,90	0,03	0,71	0,99
	F1	0,98	0,90	0,32	0,71	0,99
	F2	0,61	0,90	0,09	0,71	0,99
Serum ELISA	K	0,89	0,59	0,20	0,555	0,948
	F1	0,89	0,59	0,20	0,555	0,948
	F2	0,73	0,59	0,12	0,555	0,948

SE_{Herde}=Sensitivität des Tests auf Herdenebene; Sp_{Herde}=Spezifität des Tests auf Herdenebene; AP=apparente Prävalenz; SE_{eval}=Sensitivität des Tests aus Evaluationsstudien; Sp_{eval}=Spezifität des Tests aus Evaluationsstudien

Für die Planung von Bekämpfungsprogrammen ließe sich basierend auf den Testgütekriterien aus vorhergehenden Evaluationsstudien schlussfolgern, dass – ergänzend zu Einzeltiertests– die Umgebungs-Kultur gut geeignet sei, um Betriebe mit einem chronischen Krankheitsgeschehen auf das Vorkommen von Paratuberkulose zu untersuchen. Allein wäre dieses Verfahren nur zum Screening und auf Betrieben mit chronischen Krankheitsgeschehen einsetzbar. In bisher unauffälligen Betrieben schiene es – zumindest als einziges Diagnostikum – eher weniger geeignet zu sein.

Die Testgüte wird bei so einem Vorgehen jedoch als Punktschätzer verwendet, wenn die beobachteten Prävalenzen hierfür korrigiert werden sollen (z.B. indem man die Rogan & Gladen-Gleichung anwendet). Die wahre Testgüte liegt jedoch (meist mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%) in einem Bereich um den Punktschätzer. Allein die Verwendung des Punktschätzers reicht daher aus, um die Kalkulation der wahren Prävalenz zu verzerren. Darüber hinaus sind die Evaluationsstudien in anders zusammengesetzten Studienpopulationen durchgeführt worden als die hier untersuchte. Daher ist davon auszugehen, dass die in Tabelle 9 dargestellten Schätzer verzerrt sind. Zudem wurde zur Berechnung der Sensitivitäten die berichtete Einzeltiersensitivität und nicht die Herdensensitivität verwendet, so dass es dadurch zu weiteren relevanten Verzerrungen gekommen ist. Um diese Probleme bei der Schätzung der realisierten Testgüte zu umgehen, wurde die latente Klassenanalyse angewendet.

Bei den allen Kombinationen aus vier (bzw. drei und zwei) Testverfahren erschwerte die Tankmilch-PCR die Modellschätzung, da durch diesen Test keine nützliche weitere Information in die Prävalenzschätzung einbezogen werden konnte . . Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Tankmilch-PCR in unverdächtigen Betrieben kein sinnvolles und hilfreiches Diagnostikum zu sein scheint.

Für eine Herdenuntersuchung (z.B. zum Benchmarken oder zur Qualitätssicherung) bei bisher *unverdächtigen* Herden mit dem Ziel eines groben Einblicks in den Herdenstatus erscheinen basierend auf den hier analysierten Daten, auch in der induktiven Analyse die Einzelkot-basierten Verfahren als wichtiger Bestandteil eines Gesamtverfahren besonders gut geeignet zu sein.

Verglichen mit einer Prävalenz von 22,86% (geschätzt aus fünf DEN-basierten Testverfahren) konnten diejenigen 2er-Testkombinationen, bei denen die Kot-Kultur beteiligt war, bereits eine gute Prävalenzschätzung machen. Jedoch konnte eine akzeptable Sensitivität von >80% für kein Testverfahren in den hier analysierten Daten ermittelt werden. Demgegenüber lagen die Spezifitäten aller Tests in zumeist >95%.

Bei den 3er-Testkombinationen konnte nur die Kombination aus Serum-ELISA, Einzelmilch-PCR und Umgebungskot-Kultur inhaltlich beurteilt werden. Die hier ermittelte Prävalenz war nicht vergleichbar mit der aus fünf DEN-basierten Testverfahren ermittelten Prävalenz.

In den Kombinationen aus vier Testverfahren hat keines der Modelle eine korrekte Klassifikation vorgenommen. Es sollte zudem hier berücksichtigt werden, dass die Kombination aus vier Testverfahren parallel so kostenintensiv ist, dass eine Realisierung in praxi vorsichtig überdacht werden sollte und zuerst genau kalkuliert werden müsste.

Für bisher unverdächtige Betriebe muss daher geschlussfolgert werden, dass es (in der hier durchgeführten Studie) bereits bei einer Kombination aus vier Testverfahren keine optimale Testkombination gibt, bei der die eingesetzten Verfahren Testgütekriterien erreichten, die den allgemeinen Ansprüchen für ein Diagnostikum entsprechen.

Für eine Herdenuntersuchung (z.B. als Kick-off für nachfolgende Bekämpfung) bei *verdächtigen* Herden (Fall-1- und [Fall-2-]Herden) mit dem Ziel eines groben Einblicks in den Herdenstatus kommt basierend auf dem explorativen Charakter der hier dargestellten Ergebnisse nur die 2er-Testkombination aus Kot-Kultur und Umgebungskultur in Frage, da sie den Herdenstatus etwas

genauer zu erfassen scheint als bei Einsatz nur eines einzelnen Testverfahrens. Ob darüber hinaus die Kombination aus ELISA und Umgebungskot-Kultur ebenfalls denkbar wäre, muss in nachfolgenden Studien größeren Umfangs untersucht werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass dann weiterhin die Sensitivität des ELISAs gering bliebe.

Keine der 2er-Testkombinationen ermittelte die 40% Prävalenz, die durch die Kombination aus fünf DEN-basierten Tests ermittelt worden war. Da die Umgebungskot-Kultur in der Kombination mit einem der beiden Einzelkot-basierten Verfahren ebenso wie in Kombination mit dem Serum-ELISA und der Einzelmilch-PCR zur Erkennung weiterer positiver Betriebe beitrug, scheint sie bei verdächtigen Betrieben ein hilfreiches zusätzliches Testverfahren zu sein. Die Umgebungskot-Kultur kommt in der hier dargestellten Studie dabei gerade in der Kombination mit der Kot-PCR und der Einzelmilch-PCR zu guten Sensitivitäten. Jedoch hatte die Einzelmilch-PCR (anders als die anderen Verfahren) in dieser Studiengruppe keine akzeptablen Sensitivitäten und hat auch keinen Beitrag zum Auffinden von zusätzlichen betroffenen Betrieben geleistet. Der Serum-ELISA kann einen zusätzlichen Beitrag zum Auffinden betroffener Betriebe leisten, sofern er mit den Einzelkot-basierten Verfahren, der Einzelmilch-PCR oder der Umgebungskot-Kultur verknüpft wird. Dennoch unterschätzten sämtliche Testkombinationen mit Serum-ELISA die Prävalenz in der Studiengruppe der verdächtigen Betriebe. Für die Kot-PCR konnte in den hier dargestellten Analysen keine Testkombination ermittelt werden, bei der sowohl die Prävalenz ausreichend hoch geschätzt wurde als auch die Sensitivität dieses Tests in einem akzeptablen Bereich lag. Für die Kot-Kultur konnte die Kombination mit Umgebungskot-Kultur als einzige Kombination identifiziert werden, bei der die Prävalenz derjenigen aus fünf DEN-basierten Testverfahren geschätzten Prävalenz nahe kam. Jedoch lagen die Sensitivitäten beider Tests für die hier untersuchte Studiengruppe sehr niedrig. Mit dem Ziel eines groben Einblicks in den Herdenstatus kommt basierend auf dem explorativen Charakter der hier dargestellten Ergebnisse nur die 2er-Testkombination aus Kot-Kultur und Umgebungskultur in Frage, da sie den Herdenstatus etwas genauer zu erfassen scheint als bei Einsatz nur eines einzelnen Testverfahrens. Ob darüber hinaus die Kombination aus ELISA und Umgebungskot-Kultur ebenfalls denkbar wäre, muss in nachfolgenden Studien größeren Umfangs untersucht werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass dann weiterhin die Sensitivität des ELISAs gering bliebe.

Bei den 3er-Testkombinationen konnte nur die Kombination aus Kot-Kultur, Serum-ELISA und Umgebungskot-Kultur inhaltlich beurteilt werden. Diese Testkombination konnte die Herdenprävalenz nicht in einer Größenordnung nahe derjenigen schätzen, die aus fünf DEN-basierten Testverfahren ermittelt werden konnte. Die geschätzte Sensitivität für die Umgebungskot-Kultur war relativ gut. Der Serum-ELISA zeigte in diesem Modell eine Sensitivität von >80%. Die Spezifität für diesen Test lag bei 94,78%. Aufgrund der niedrigen Sensitivitäten von Einzelmilch-PCR und der nicht

schätzbaren Standardfehler müssen diese Schätzungen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Verglichen mit der 2er-Testkombination, wo die Kombination aus Einzelkot-Kultur und Umgebungskot-Kultur bereits aufgefallen war, konnte basierend auf den Studiendaten unter den 3er-Testkombinationen kein weiterer Test identifiziert werden, der die Schätzgenauigkeit des Gesamtverfahrens noch weiter heraufsetzte.

Auch für die 4er-Testkombinationen in der Gruppe der verdächtigen Betriebe hat keines der Modelle eine korrekte Klassifikation vorgenommen. Zudem gilt auch hier die Schlussfolgerung wie für die unverdächtigen Betriebe, wonach die Ergebnisse aus den Kombinationen mit weniger Testverfahren bestätigt wurden und eine parallele 4er-Kombination zu kostenintensiv wäre, um realisierbar zu sein.

3.1.2.2.3 Programm der (Milch-)Wirtschaft

Bekämpfungsprogramm - Ziele	Zielpopulation	Untersuchungsziel
Herdenebene		
Programm der (Milch-)Wirtschaft (z.B. zum Benchmarken und zur Qualitätssicherung)	Rinder von teilnehmenden Betrieben (alle / Stichprobe) ➔ <i>Unverdächtige Herden</i>	Auffinden von nicht infizierten Herden

Innerhalb Deutschlands ist Paratuberkulose ein Faktor, der vor allem wirtschaftlichen Schaden anrichtet. Aus wirtschaftlicher Sicht ist daher im Sinne der Landwirtschaft eine Bekämpfung auf lange Sicht gesehen sicher erstrebenswert. Dies gilt insbesondere dann, wenn bedacht wird, dass viele Managementmaßnahmen gegen Paratuberkulose auch schon kurzfristig gegen eine Vielzahl von infektiösen und nicht-infektiösen Krankheiten bei Kälbern und Milchkühen wirken. Darüber hinaus gibt es in Deutschland Exporteure von Zucht- und Gebrauchsriindern, die bereits heute für verschiedene Länder ein Zertifikat der Paratuberkulose-Freiheit vorlegen müssen. Würde auf den zuliefernden Betrieben Paratuberkulose nachgewiesen werden, würde dies zu einer Handelssperre in die betreffenden Länder von mindestens drei Jahren führen. Aus Gründen der Qualitätssicherung und um sich Handlungsoptionen zu erhalten, ist daher eine Bekämpfung sicher erstrebenswert. Unabhängig vom Export kann sich das Zertifikat der Freiheit in Zukunft auch bei der Lebensmittelvermarktung positiv auswirken, wenn die Verbraucher diese Produkte verstärkt nachfragen oder hochpreisiger bezahlen. Ein Zertifikat der Freiheit kann dann einen Handelsvorteil bedeuten.

Zur Beurteilung einer geeigneten Testkombination können grundsätzlich die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Analysen für die Herdenuntersuchung unverdächtigter Herden übernommen werden. Jedoch wird der Anspruch an ein (kombiniertes) Testverfahren bei einem Programm der

Wirtschaft höher sein in Bezug auf die Güte des Gesamtverfahrens, da das Untersuchungsergebnis weitreichende Konsequenzen nach sich ziehen könnte. So hätte ein (falsch) positiv getesteter Betrieb wirtschaftliche Nachteile bei der Vermarktung seiner Produkte und ein falsch negativ getesteter Betrieb würde die Ansprüche des Systems an eine optimale Qualitätssicherung widersprechen.

3.1.3. Analyse der Risikofaktoren

Aufgrund der unerwartet erschwerten induktiven Analyse einer optimalen, minimalen Testkombination und dem zeitlich verzögerten Vorliegen sämtlicher Testergebnisse konnte den nachfolgenden Risikofaktorenanalysen (bisher) keine Einteilung in „Paratuberkulose positiv“ und „-negativ“ beigefügt werden, die auf eine nachvollziehbare und sichere Schätzung eines induktiven Testverfahrens zurückzuführen ist. Weiterführende Risikofaktorenanalysen, wie zum Beispiel unter Einsatz einer „manuellen“ Definition eines positiven Betriebes oder Tieres, konnten aufgrund des unerwartet großen zeitlichen Aufwandes bei der Modellbildung sowie aufgrund des späten Vorliegens sämtlicher Testergebnisse bisher nicht durchgeführt werden und ist daher nicht Bestandteil dieses Berichtes.

Erste deskriptive Analysen unabhängig vom Paratuberkulosestatus deuten an, dass kaum Unterschiede zwischen verdächtigen und unverdächtigen Betrieben gibt hinsichtlich möglicher Risikofaktoren für das Vorkommen von Paratuberkulose. Entsprechend der Einschlusskriterien bei der Auswahl der Betriebe als Fall oder Kontrolle weisen die verdächtigen Betriebe (F-2) eine höhere Remontierungsrate und weniger tragende Rinder auf als Kontrollbetriebe. Keine Unterschiede konnten bisher bezüglich der Abgänge wegen mangelnder Leistung gefunden werden. Kontrollbetriebe haben etwas häufiger Abkalbeboxen für einzelne Kühe, während unabhängig von der Betriebskategorie die meisten Betriebe Abkalbeboxen für mehrere Kühen hatten. In der subjektiven Beurteilung der Studentierärzte wurden verdächtige Betriebe häufiger als schlecht oder eher schlecht beurteilt als unverdächtige Betriebe bezüglich der Betreuung der Kühe, der Betriebsorganisation, des Hygienestatus und der Qualität der Tierbeobachtung.

Weiterführende Untersuchungen sind wie folgt geplant:

Die Einflüsse des betrieblichen Managements auf den MAP-Status des Betriebes sollen ebenfalls mit Hilfe der Prozedur LCA in SAS ermittelt werden, wobei eine schrittweise Vorwärtsselektion mit und ohne Interaktionen durchgeführt werden soll. Die Schätzung eines OR erfolgt dann dabei durch eine multinomiale logistische Regression, wobei das OR den Anstieg der Chance infiziert zu sein angibt abhängig von einem Anstieg der Ausprägung der Einflussgröße um eine Einheit.

Annahme: Tierbezogene und betriebliche Faktoren beeinflussen (A) die Prävalenzschätzung, (B) die beste Testkombination und ggf. (C) die Testgüte.

$$y_{FKStatusBetrieb} = \beta_0 + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + \dots,$$

wobei y die im LCA-Modell geschätzten posterior probabilities innerhalb der zu untersuchenden Betriebsgruppe sind.

Falls eine Schätzung von latenten Klassen nach wie vor nicht möglich ist, wird eine manuelle Definition des Paratuberkulosestatus vorgenommen und ein logistisches Regressionsmodell angepasst.

3.1.4. Internationaler Erfahrungsaustausch

Während der Projektlaufzeit wurden durch das IBEI vorhandene Kontakte gepflegt sowie neue geknüpft. Die wichtigsten für dieses Projekt relevanten Erkenntnisse sind in Form von Spiegelstrichen im Folgenden zusammen gefasst.

Die geplante und bereits vorbereitete Literaturrecherche zur Analyse von MAP auf Rinderbetrieben, seinen Risikofaktoren und den erforderlichen statistischen Methoden wurde vertieft. Informationen eines im Frühjahr 2013 als online-Kurs an der University of Sydney, Australien, von Ian Gardner gehaltenen Moduls für Postgraduierte zum Thema „Diagnostic Tests“ (mit überwiegenden Beispielen aus der MAP-Überwachung) wurden einbezogen.

Erkenntnisse aus dem Austausch mit Soren S. Nielsen (Dänemark) während ECVPH-Tagung 2013 in Turin, Italien:

- ➔ Man kann untersuchen, mit welchen Tests man möchte, wenn man die Landwirte nicht davon überzeugen kann, wie wichtig ihr eigenes Engagement im Bereich der Hygiene und des Betriebsmanagements ist, wird man keine nachhaltigen Erfolge mit einem Bekämpfungsprogramm haben.

Dies war im Übrigen auch ein wichtiges Resümee von Michael Collins, der im Frühjahr 2012 zu einem Besuch an der TiHo war und über seine langjährigen Erfahrungen mit der äußerst stark subventionierten Paratuberkulosebekämpfung in den USA berichtet hat. Seine Erkenntnis war, dass allein der wiederkehrende Besuch eines erfahrenen Tierarztes, den Erfolg der Bekämpfung aufrechterhalten hat. So war eines seiner Beispiele, dass dieser Tierarzt immer wieder auf die Schwachstellen im Hygienemanagement hinweisen bzw. daran erinnern müsse, da betriebliche Abläufe einfach zu sehr der Praktikabilität, dem Zeitdruck und menschlicher Nachlässigkeit unterworfen seien. Er zeigte, dass die

Paratuberkuloseprävalenz nach der Kürzung der staatlichen Förderung (wodurch keine persönliche Betreuung der Betriebe mehr möglich war) nunmehr in den USA wieder steigt.

- ➔ Weiterhin wies Prof. Nielsen darauf hin, dass er gezeigt hätte, dass jedes Ziel einer Untersuchung aus Paratuberkulose die Zusammensetzung und Art der eingesetzten Tests beeinflussen muss. So sollten beispielsweise für Prävalenzuntersuchungen andere Tests verwendet werden als in Bekämpfungsprogrammen oder bei Einzeltieruntersuchungen (Nielsen, 2011; Nielsen, 2014).

Besuch des MAP-Forums zum internationalen Austausch über MAP-Bekämpfungsprogramme in Parma, Italien, Juni 2014 sowie gemeinsamer Vortrag mit Dr. Karsten Donat (vgl. Anhang „Proceedingsband S. 31) sowie Besuch des International Congress of Paratuberculosis (ICP) in Parma, Italien, Juni 2014:

- ➔ Es zeigte sich, dass abhängig von der Prävalenz in den Ländern unterschiedliche Ziele verfolgt werden. So befinden sich die skandinavischen Ländern u.ä. in der finalen Eradikationsphase oder können (bereits) auf Freiheit von der Erkrankung testen. Daher benötigen sie Testverfahren mit einer hohen Genauigkeit, um nicht zu viele aber auch nicht zu wenige Tiere zu eradikieren. Daher sind auch die Bekämpfungsverfahren sehr stringend, leiden aber ebenfalls unter der schlechten Testgüte der zur Verfügung stehenden Verfahren.
Andere Länder mit Prävalenzen - ähnlich den für Deutschland zu erwartenden- kämpfen seit langen Jahren mit freiwilligen oder verpflichtenden Programmen gegen die Paratuberkulose (Niederlande, Dänemark, Australien, Neuseeland, USA, Canada, etc.). Keines der Länder hat es jedoch bisher geschafft, eine so nachhaltige und effiziente Senkung der Prävalenz herbeizuführen, dass an eine Eradikation in naher Zukunft gedacht werden kann. Alle Länder schlussfolgern, dass zum einen die Testverfahren dafür nicht ausreichend sind, jedoch zum anderen auch, dass die Kombination aus einem schwierigen Erreger und hohen Anforderungen an die Compliance der Tierhalter aufgrund des für diese teils undeutlichen wirtschaftlichen Schadens die Bekämpfung auch weiterhin stark erschweren werden.
- ➔ Neue Testverfahren sind nach wie vor entweder stark invasiv (bspw. Lymphknotenanalysen), haben nach wie vor keine Praxisreife erlangt (bspw. IFN-gamma-Tests) oder sie konzentrieren sich eher auf die Identifikation der genetischen Unterschiede zwischen Paratuberkulose-Subtypen. Diese Testverfahren sind somit als Ersatz- oder Ergänzungsverfahren für Bekämpfungsprogramme derzeit nach wie vor nicht geeignet.

- ➔ Im Rahmen der Tagung wurde durch das IBEL ein Flow-chart begonnen, mit dessen Hilfe eine Überblick über die Einflüsse auf die Schätzung der Herdenprävalenz (und Testgüte) erlangt werden sollte (vgl. Abb. 1):

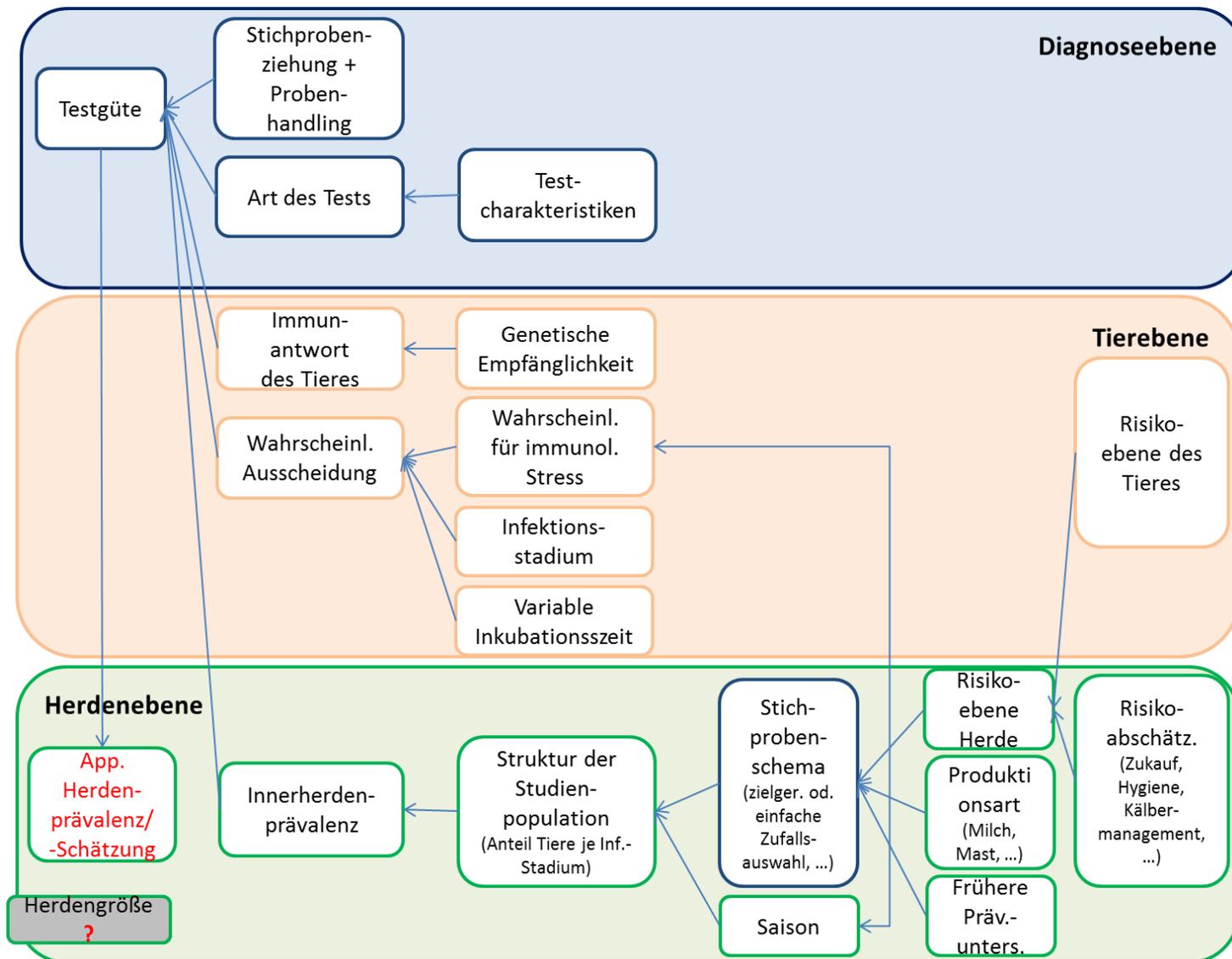


Abbildung 1: Ebenen der Einflüsse auf die Schätzung der Herdenprävalenz (und Testgüte)

3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Eine ideale Testkombination hängt spezifisch vom Bekämpfungsziel und der Zusammensetzung der Studienpopulation ab und muss daher immer wieder individuell erarbeitet werden. Weltweit gibt es mittlerweile eine fast unüberschaubare Menge an Teststrategien. Ansätze, mit einer Teststrategie alle Testziele ideal abzudecken haben weniger zum Erfolg geführt als Ansätze, ein vornehmliches Ziel zu definieren und daran die Teststrategie auszurichten (z.B. in Australien). Zukünftige Bekämpfungsprogramme sollten daher zunächst Ziele, Zielpopulation (inkl. der Charakteristika wie Altersstruktur, erwarteter Prävalenz, Nutzungsrichtung) und Anforderungen an die Testverfahren definieren, um dann die geeigneten Testverfahren zu identifizieren.

Die Ergebnisse der hier dargestellten Studie zu parallel verwendeten labordiagnostischen Testverfahren lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- Gerade für die unverdächtigen Tiere sollte zukünftig der Fokus auf den DEN-basierten Verfahren liegen. Hier kann nicht auf eine Einzelkot-Kultur und eine Einzelkot-PCR verzichtet werden, wenn es darum geht, diese Tiere „frei zu testen“. Die Kombination aus diesen beiden Verfahren führt zu den meisten erkennbaren Tieren. Somit lässt sich hier schlussfolgern, dass - auch wenn die Einzelkot-Kultur kostenintensiv und langwierig ist – sie doch noch nicht zu den verzichtbaren Verfahren gehört.
- Für die Einzeltiertestung gibt es nach wie vor keine Testverfahren, die allein oder in einer minimalen Kombination mit anderen Verfahren eine kostengünstige und verlässliche Aussage darüber zulassen, ob ein Einzeltier Paratuberkulose infiziert ist oder nicht.
- Für eine Herdenuntersuchung (z.B. zum Benchmarken oder zur Qualitätssicherung) bei bisher unverdächtigen Herden mit dem Ziel der Erfassung des Herdenstatus erscheinen, basierend auf den hier analysierten Daten, diejenigen Verfahren, die Kot von Einzeltieren verwenden ein wichtiger Bestandteil eines Gesamtverfahren zu sein.
- Für eine Herdenuntersuchung (z.B. als Kick-off für nachfolgende Bekämpfung) bei verdächtigen Herden mit dem Ziel der Erfassung des Herdenstatus kommt basierend auf dem explorativen Charakter der hier dargestellten Ergebnisse nur die 2er-Testkombination aus Kot-Kultur und Umgebungskultur in Frage, da sie den Herdenstatus etwas genauer zu erfassen scheint als bei Einsatz nur eines einzelnen Testverfahrens.
- Die geringe Korrelation zwischen den Testergebnissen zeigt Bedarf dafür auf, einerseits die vorhandenen Testverfahren nur unter Berücksichtigung der hier diskutierten Faktoren (Bekämpfungsziel, Zielpopulation, etc.) und nicht allein einzusetzen. Jedoch muss neben einer parallel Untersuchung auch weiterhin über sequentielle Untersuchungen nachgedacht

werden, um dadurch Betriebe identifizieren zu können, in denen die Herdenprävalenz so gering ist, dass sie in einer einzigen Status-Quo-Untersuchung nicht erkannt werden können.

Erfahrungen aus dem internationalen Austausch zeigen, dass das Ziel eines Kontrollprogrammes sich in den letzten Jahrzehnten von einem Ansatz zur Sicherung der nationalen Tiergesundheit hin zu einem Ansatz zur Sicherung der Wettbewerbsfähigkeit und Wirtschaftlichkeit entwickelt hat. Somit liegt es aus Sicht der Berichtstatter auf der Hand, dass es einen positiven Effekt haben wird, wenn weniger staatliche Organe die Betreiber der Kontrollprogramme sind als eher privatwirtschaftliche Unternehmen. Darüber hinaus versprechen Ansätze erfolgversprechender zu sein, bei denen die gesamte Tiergesundheit eines Betriebes gemeinsam mit dem Landwirt in den Fokus genommen wird. Somit können finanziell und personell aufwändige Maßnahmen eher wirtschaftlich interessant werden für Landwirte, wenn dadurch auch andere betriebliche Probleme gelöst werden können als nur die sehr langfristig wirkende Paratuberkulose. Aus der Sicht der Berichtstatter sollte hier der Staat weiterhin eine beratende und lenkende Rolle einnehmen und durch start-up Finanzierung den Beginn initiieren und im weiteren Verlauf in die Entwicklungen eingebunden sein.

Des Weiteren sollte überdacht werden, ob eine Überarbeitung der Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien; BMELV, 2005) vorgenommen werden kann. Die Berichtstatter haben dazu in diesem Bericht bereits erste Ansätze zusammengetragen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel des hier vorgestellten Projektes war es, eine Strategie zu entwickeln, mit der die Testgüte eines gesamten Bekämpfungsverfahrens verbessert werden kann, indem verschiedene Testverfahren gleichzeitig angewendet werden (Paralleltestung). Die Projektlaufzeit betrug 18,5 Monate. Das Projekt war logistisch an den Botulismus-Verbund angebunden. Im Projekt wurden 93 Milchviehbetriebe in Niedersachsen und Schleswig-Holstein übergreifend untersucht. Je Betrieb wurden Einzeltier- und Betriebsproben mit sechs unterschiedlichen Test-Probenmaterial-Kombinationen untersucht, so dass pro Betrieb 45 Testergebnisse vorlagen. Vor der Untersuchung einer optimalen, minimalen Testkombination wurden basierend auf unterschiedlichen Bekämpfungszielen verschiedene Szenarien definiert, an denen die Testkombinationen beurteilt werden konnten.

Für die dargestellte Studie können folgende Ergebnisse zusammengefasst werden:

- Die Güte eines Testverfahrens hängt sehr stark von der Zielpopulation ab, in der er eingesetzt wird. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, dass es zusätzlich zu den weiterhin benötigten

Evaluationsstudien von Testverfahren auch wichtig ist, in Studien und Bekämpfungsprogrammen eine Verifikation der Testgüte der eingesetzten Verfahren durchzuführen, um die Qualität der Studie bzw. des Programmes zu sichern.

- Bei der Planung eines Bekämpfungsprogramms kann eine Risiko-basierte Auswahl der zu beprobenden Tiere die Auffindungswahrscheinlichkeit infizierter Tiere erhöhen.
- Bei der Planung eines Bekämpfungsprogramms sollten vorbereitende Studien durchgeführt werden, die nicht nur ermitteln, ob und welche Risikofaktoren einen infizierten Betrieb determinieren sondern insbesondere auch, welchen Einfluss das Hygienebewusstsein und die Einstellung des Tierhalters gegenüber der Gefahr einer Infektion mit Paratuberkulose spielt.
- In Bekämpfungsprogrammen, bei denen auch Einzeltiertests gewünscht sind, sollten Verfahren mit direktem Erregernachweis eingesetzt werden, da diese von den hier untersuchten Tests am besten geeignet zu sein scheinen, um Betriebe mit einem chronischen Krankheitsgeschehen auf das Vorkommen von Paratuberkulose zu untersuchen.
- Für die Untersuchung von unverdächtigen Einzeltieren gibt es nach wie vor keine Testverfahren, die allein oder in einer minimalen Kombination mit anderen Verfahren eine kostengünstige, schnelle und dennoch verlässliche Aussage darüber zulassen, ob ein Einzeltier Paratuberkulose infiziert ist oder nicht. Wenn überhaupt sind dazu DEN-basierte Verfahren in der Matrix Kot geeignet.
- Für die Untersuchung von unverdächtigen Betrieben mit dem Ziel der Erfassung des Herdenstatus erscheinen basierend auf den hier analysierten Daten, die Einzelkot-basierten Verfahren als wichtiger Bestandteil eines Gesamtverfahren besonders gut geeignet zu sein.
- Für die Untersuchung von verdächtigen Betrieben mit dem Ziel der Erfassung des Herdenstatus kommt basierend auf dem explorativen Charakter der hier dargestellten Ergebnisse und zum derzeitigen Stand der Auswertungen nur die 2er-Testkombination aus Kot-Kultur und Umgebungskultur.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich aus der Sicht der Berichtersteller folgende weitere Handlungsoptionen:

- Weitere Datenanalysen: Aufgrund der besonderen Erfordernisse bei der Einbeziehung von DEN-basierten Testverfahren zur Paratuberkulose-Diagnostik sowie dem hier bestätigten Einfluss durch die Studienpopulation auf die realisierten Testgüten sind weiterführende deskriptive wie auch induktive Analysen notwendig, um die ermittelten Ergebnisse zu sichern und gegebenenfalls weitere Testkombinationen zu identifizieren, die die Prävalenzschätzung im Gesamtverfahren verbessern. Es soll damit auch ermittelt werden, ob die Kombination aus ELISA und Umgebungskot-Kultur ebenfalls zu einer verbesserten Nachweisrate führen

könnte. Dies muss dann jedoch in nachfolgenden Studien größeren Umfangs untersucht werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass dann weiterhin die Sensitivität des ELISAs gering bliebe.

➤ Verbesserung der Nachweisrate durch Kombination der vorhandenen Testverfahren:

Grundsätzlich kann derzeit angenommen werden, dass unter den hier untersuchten Testverfahren keine optimale und minimale Kombination ist, die eine kostengünstige und schnelle Lösung für das jeweilige Bekämpfungsprogramm bietet. Vielmehr erscheinen Tests in der Matrix Kot weiterhin als am besten geeignet. Neben einer parallelen Testung von Betrieben muss weiterhin über sequentielle Untersuchungen nachgedacht werden, um dadurch Betriebe identifizieren zu können, in denen die Herdenprävalenz so gering ist, dass sie in einer einzigen Status-Quo-Untersuchung nicht erkannt werden können. .

➤ Neue diagnostische Ansätze: Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass es derzeit an spezifischen diagnostischen Testsystemen fehlt, so dass eine frühe Sanierung nicht erfolgen und der Erfolg der Sanierung nicht zeitnah kontrolliert werden kann. Hierdurch verlaufen angestrebte Bestandssanierungen bisher nur sehr langsam, mit hohen Kosten und mit nur sehr eingeschränktem Erfolg.

Daher erscheint es nunmehr notwendig, grundsätzlich die bisherigen Testsysteme zu überdenken. So scheinen die bisherigen traditionellen, indirekten Ansätze des Erregernachweises in der mykobakteriellen Diagnostik bei der Paratuberkulosediagnostik zu versagen und ein sicherer Interferon- γ Test zur Erkennung der Paratuberkulose im Frühstadium vor der Erregerausscheidung ist zudem derzeit nicht verfügbar. Weiterhin sind alle bisher in der mykobakteriellen Diagnostik eingesetzten Testverfahren proteinbasiert. Proteingemische haben jedoch durch den hohen Anteil von in allen Mykobakterien-Spezies vorkommenden immunogenen Proteinen den Nachteil einer hohen Kreuzreaktivität, was zu einer geringen Spezifität führt. Testsystemen mit einzelnen Proteinen, wie sie derzeit für die Interferon- γ -Tests erprobt werden, fehlt es oft an der Reinheit und der angestrebten Sensitivität. Da Proteine über die MHC-Rezeptoren des Wirts als Antigen präsentiert werden, kann es zu Einzeltier- bzw. Rasse-abhängigen Unterschieden in der Immunantwort kommen. Demgegenüber hat sich gezeigt, dass mykobakterielle Lipide oder Glycolipide, also Fette, die den wesentlichen Teil der mykobakteriellen Zellhülle ausmachen, mögliche neue Diagnostika darstellen. Mykobakterielle Lipide sind stark immunogen, Spezies spezifisch und werden über CD1-Rezeptoren präsentiert, wodurch eine höhere diagnostische Sicherheit erreicht werden kann. In der Entwicklung Lipid-basierter Testsysteme sieht das Institut für Mikrobiologie daher eine vielversprechende, neue diagnostische Möglichkeit die Paratuberkulose zu verbessern.

Weiterhin plant das Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit ein LAMP (Loop mediated isothermal amplification) –Assay zum direkten Nachweis von *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* zu entwickeln. Für einige bakterielle Erreger sind bereits Assays entwickelt worden, welche ohne Kultivierungsschritte Erreger-DNA direkt aus problematischen Probenmatrizes nachweisen können. So könnte im Vergleich zum klassisch kulturellen Nachweis, welcher bis zu 3 Monate dauern kann, eine enorme Beschleunigung des Nachweises erfolgen. Der Vorteil gegenüber PCR basierten Verfahren besteht in der Unempfindlichkeit gegenüber PCR-inhibierenden Substanzen, welche besonders in Kot und Umweltproben vorkommen, und diese Assays inhibieren können. Da es tragbare Geräte gibt, mit welchen sowohl die isothermale Amplifizierung als auch Detektion der entstehenden Fluoreszenzsignale erfolgen kann, wäre eine Untersuchung von Probenmaterial vor Ort -also direkt auf den Betrieben- denkbar. Das Verfahren bietet aufgrund der Verwendung von sechs Primern eine besonders hohe Spezifität. Auch die Sensitivität entspricht mindestens der PCR-basierter Verfahren. Im Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit sind bereits erfolgreich Vorversuche durchgeführt worden.

- Umgang mit vorhandenen Informationen zu Paratuberkulose: Solange also keine besseren Testverfahren vorliegen, sollte man sich weiterhin eingehender damit befassen, welche Informationen schon heute über Paratuberkulose vorliegen und durch welche Faktoren diese beeinflusst sind. Daher wird derzeit zusammen mit dem FLI in Jena (Frau Dr. Köhler) eine wissenschaftliche Arbeit geplant zu den Einflüssen auf die Prävalenzschätzung aus TSN-Melddaten für Paratuberkulose. Dabei sollen der Einfluss durch das Bewusstsein der an der Meldung beteiligten Personengruppen ebenso analysiert werden wie Hinweise auf das Vorkommen von Meldungen auf der Basis von Antikörpernachweis, die Qualität der Meldedaten oder das Meldeaufkommen über die Zeit.
- Planung neuer Bekämpfungsprogramme: Solange keine neuen Verfahren mit einer deutlich besseren Testgüte vorliegen, darf jedoch die Paratuberkuloseüberwachung und – Bekämpfung nicht vernachlässigt werden. Daher sollten zukünftig die Ziele von Bekämpfungsprogrammen expliziter beschrieben und differenziert werden so wie es im Rahmen dieses Projektes bereits begonnen wurde. Eine klare Definition der Bekämpfungsziele hängt nach Ansicht der Berichterstatter von den Entscheidungsträgern ab, die das Programm aufbauen möchten. Daher ist ein wichtiger nächster Schritt, dass ein Netzwerk bzw. eine Expertengruppe mit Vertretern aller wichtigen zukünftigen Programmpartner zusammengestellt wird. Die Organisation sollte einer neutralen Institution obliegen, die bezüglich des Bekämpfungsprogramms selbst keine eigenen, direkten wirtschaftlichen oder politischen Ziele verfolgt. Das IBEI hat Erfahrungen in der Netzwerk-

und Teambildung und plant, einen wie hier beschriebenen Prozess in Gang zu setzen, sobald eine finanzielle Förderung hierfür zur Verfügung steht.

- Tiergesundheitsprogramm: Aufgrund der hohen wirtschaftlichen Schäden durch Paratuberkulose und der ebenso hohen und langfristigen Kosten für die Bekämpfung der Paratuberkulose wird es notwendig sein, ein Bekämpfungsprogramm zu entwickeln, das die Landwirte auch finanziell von einer Teilnahme überzeugt. Dies erscheint derzeit nur machbar, indem das Bekämpfungsprogramm in ein breit angelegtes Tiergesundheitsmanagementprogramm integriert wird, bei dem sämtliche Maßnahmen gegen Paratuberkulose auch einen Mehrwert für weitere Betriebsprobleme haben, die bereits nach kürzerer Zeit zu einem messbaren Erfolg führen (anders als dies bei der Paratuberkulose sein wird). Ein solches Programm sollte Kosten-Nutzen-Analysen (vgl. iCull in DK) ebenso beinhalten wie ein Risikoanalyse-Schema, auf dessen Grundlage der begleitende Tierarzt gemeinsam mit dem betroffenen Landwirt einen individuellen Managementplan ausgearbeiten kann. Vorarbeiten für ein solches Programm sind bereits im sog. Botulismus-Projekt erfolgt und sind durch die Partner IBEI und RiKli weiterhin geplant.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

LMQS - Alle Laboruntersuchungen konnten ohne zeitliche Verzögerungen wie geplant durchgeführt werden. Die praktischen Labortätigkeiten im LMQS wurden dem Zeitplan entsprechend Anfang März 2014 abgeschlossen.

Mibi - Alle ursprünglich geplanten Ziele wurden erreicht. Allerdings gab es Zeitverzögerungen, da die kulturelle Anzucht, sowie die Durchführung der ELISA Tests sich verzögert hatten.

IBEI - Insgesamt war der Zeitpunkt des Vorliegens sämtlicher Probenergebnisse deutlich gegenüber der Projektplanung verzögert. So lagen die letzten Daten erst am 7.8.2014 vor, wobei diese zeitlich spätestens am 30.6.2014 benötigt worden wären, um eine eingehende statistische Analyse zu gewährleisten. Trotz der bewilligten Verschiebung des Berichtszeitpunktes um einem Monat und umfangreichen Vorbereitungen (z.B. Programmieren in der Statistiksoftware SAS®) ließ sich diese Verzögerung nicht vollständig kompensieren, da sich der avisierte Abschluss der Probenuntersuchungen weiter verzögerte, so dass dies zu den hier beschriebenen Einschränkung der Analysen des Partners IBEI führte. Nichtsdestotrotz wurden die bereits vorbereiteten Auswertungen aktualisiert und notwendige weitere analytische Schritte durchgeführt, die erst basierend auf allen

Testergebnissen angeschlossen werden konnten. Für diese Analyseschritte und die abschließende Berichterstattung standen somit nur etwas mehr als sieben Wochen zur Verfügung, die sämtlich außerhalb des Förderzeitraums lagen. Dieser Zeitraum lag somit deutlich unter dem geplanten Zeitraum.

Gegenüber der ursprünglichen Planung war es daher nicht möglich mittels der latenten Klassenanalyse die wahre Herdenprävalenz, die realisierten Testgüten der eingesetzten Tests mit einer ausreichenden Sicherheit (vgl. Klassifikationsprobleme und Standardfehlerkalkulation in Kap. 3.1.2.3) zu analysieren. Somit können zum jetzigen Zeitpunkt statistisch signifikante Schlüsse im Hinblick auf die Höhe der Modellschätzer nicht gezogen werden. Des Weiteren konnten bisher verschiedene mit erhobene mögliche Risikofaktoren für das Vorkommen von Paratuberkulose auf Milchviehbetrieben nicht analysiert werden. Dies war vor Untersuchungsbeginn nicht zu erwarten. Unabhängig von diesem Verfahren konnten jedoch sämtliche anderen Analysen durchgeführt werden und dennoch klare Schlussfolgerungen gezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

Aly SS, Anderson RJ, Whitlock RH et al. Cost-effectiveness of diagnostic strategies to identify *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis super-shedder cows in a large dairy herd using antibody enzyme-linked immunosorbent assays, quantitative real-time polymerase chain reaction, and bacterial culture. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24 (5):821-32.

Anonymous. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE - World Organisation for Animal Health; 2012. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf

Anonymous. Standard Operating Procedure (SOP) for OIE Validation and Certification of Diagnostic Assays. OIE - World Organisation for Animal Health; 2009. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/en_fichier_SOP.Pdf

Banoo S, Bell D, Bossuyt P et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nature reviews. Microbiology* 2010; 8 (12 Suppl):S17-29.

Bolton MW, Pillars RB, Kaneene JB et al. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in naturally exposed dairy heifers and associated risk factors. *J Dairy Sci* 2011; 94 (9):4669-75.

Boulais C, Wacker R, Augustin JC et al. Modeling the occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bulk raw milk and the impact of management options for exposure mitigation. *J Food Prot* 2011; 74 (7):1126-36.

Chiodini RJ, Chamberlin WM, Pfaller S. What is *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis? 2011; 77 (5).

Collins MT. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011a; 27 (3):581-91.

Collins MT. Food safety concerns regarding paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011b; 27 (3):631-6.

Collins MT, Gardner IA, Garry FB et al. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229 (12):1912-9.

Costanzo G, Pinedo FA, Mon ML et al. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Vet Microbiol* 2012; 156 (1-2):183-8.

Donaghy JA, Johnston J, Rowe MT. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in cheese, milk powder and milk using IS900 and f57-based qPCR assays. *J Appl Microbiol* 2011; 110 (2):479-89.

Donat K, Schau U, Soschinka A. [Identification of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infected dairy herds by environmental sampling]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011; 124 (9-10):360-7.

Donat K, Schau U, Soschinka A et al. [Herd prevalence studies of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) in cattle using serological tests: opportunities, limitations and costs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2012; 125 (9-10):361-70.

Eisenberg SW, Nielen M, Hoeboer J et al. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis within and around a dairy barn under experimental conditions. *J Dairy Sci* 2012; 95 (11):6477-82.

Gardner IA, Nielsen SS, Whittington RJ et al. Consensus-based reporting standards for diagnostic test accuracy studies for paratuberculosis in ruminants. *Prev Vet Med* 2011; 101 (1-2):18-34.

Garry F. Control of paratuberculosis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011; 27 (3):599-607.

Geraghty, T., Graham, D. A., Mullaney, P. and More, S. J. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev. Vet. Med.* 2014. 116(1): 1-11.

Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev Argent Microbiol* 2012; 44 (3):201-15. Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* 2000; 45 (1-2):3-22.

Grant, I. R., Pope, C. M., O'Riordan, L. M., Ball, H. J., & Rowe, M. T. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Veterinary microbiology*, 2000; 77(3):369-378.

Hanifian S, Khani S, Barzegari A et al. Quantitative real-time PCR and culture examination of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at farm level. *Vet Microbiol* 2013; 162 (1):160-5.

Kennedy D. International efforts at paratuberculosis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011; 27 (3):647-54.

Khol JL, Geisbauer E, Wassertheurer M et al. Outcome of three commercial serum ELISAs and faecal detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in consecutive samples from a cattle herd with low prevalence of paratuberculosis (Johne's disease). *Transbound Emerg Dis* 2012; 59 (3):197-207.

Köhler H, Burkert B, Pavlik I, Diller R, Geue L, Conraths FJ, Martin G. Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine serum. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 2008; 121:203-210.

Kralik P, Beran V, Pavlik I. Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. *BMC Res Notes* 2012; 5 (114):1756-0500.

Kralik P, Slana I, Kralova A et al. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. *Vet Microbiol* 2011; 149 (1-2):133-8.

Lavers, C. J., McKenna, S. L., Dohoo, I. R., Barkema, H. W., & Keefe, G. P. Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. *The Canadian veterinary journal*, 2013; 54(11): 1053.

Leite, F. L., Stokes, K. D., Robbe-Austerman, S., & Stabel, J. R. Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013; 25(1):27-34.

Logar K, Kopinc R, Bandelj P et al. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC Vet Res* 2012; 8 (49):1746-6148.

Messelhauser U, Kampf P, Hormansdorfer S et al. Culture and molecular method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy products. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (1):295-7.

Mitchell RM, Medley GF, Collins MT et al. A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiol Infect* 2012; 140 (2):231-46.

Mon ML, Viale M, Baschetti G et al. Search for *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet Med Int* 2012; 860362 (10):24.

Moravkova M, Babak V, Kralova A et al. Culture- and quantitative *IS900* real-time PCR-based analysis of the persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a controlled dairy cow farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (18):6608-14.

Mundo SL, Gilardoni LR, Hoffman FJ et al. Rapid and sensitive method to identify *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow milk using DNA-methylase Genotyping. *Appl Environ Microbiol* 2012; 28:28.

Munster P, Fechner K, Volkel I et al. Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in a German zoological garden determined by *IS900* semi-nested and quantitative real-time PCR. *Vet Microbiol* 2012; 14 (12):00687-6.

Nielsen, SS. Developments in diagnosis and control of bovine paratuberculosis. I: *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2014; 9 (012): 1-12.

Nielsen SS, Toft N. Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149 (1-2):6-10.

Nielsen SS, Toft N, Gardner IA. Structured approach to design of diagnostic test evaluation studies for chronic progressive infections in animals. *Vet Microbiol* 2011a; 150 (1-2):115-25.

Nielsen SS, Toft N, Gardner IA. Structured approach to design of diagnostic test evaluation studies for chronic progressive infections in animals. *Veterinary Microbiology* 2011b; 150 (1- 2):115-25.

O'Shea BJ. The Johne's paradigm: from detection to management to treatment. *Virulence* 2011; 2 (4):264-6.

Okura H, Toft N, Nielsen SS. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: a systematic review and meta-analysis. *Vet Microbiol* 2012; 157 (3- 4):253-63.

Probst C, Kubitzka H. Amtliche Methodensammlung. F-L-I-Bf Tiergesundheit, editor. Greifswald-Insel Riems: Friedrich-Löffler-Institut - Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit; 2011. Available from: http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Amtliche_Methodensammlung/Methodensammlung_201112.pdf

Pruvot M, Forde TL, Steele J et al. The modification and evaluation of an ELISA test for the surveillance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in wild ruminants. *BMC Vet Res* 2013; 9 (5):1746-6148.

Raizman EA, Wells SJ, Munoz-Zanzi CA et al. Estimated within-herd prevalence (WHP) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a sample of Minnesota dairy herds using bacterial culture of pooled fecal samples. *Can J Vet Res* 2011; 75 (2):112-6.

Sergeant E. Risk based surveillance made simple. *Epidemiol. et santé anim.* 2011; 59-60:72-4. Sidoti F, Banche G, Astegiano S et al. Validation and standardization of IS900 and F57 realtime quantitative PCR assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can J Microbiol* 2011; 57 (5):347-54.

Slana I, Kralik P, Kralova A et al. Short communication: Examination of milk filters by realtime PCR as a herd-level indicator of the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. *J Dairy Sci* 2012; 95 (3):1162-5.

Smith RL, Schukken YH, Pradhan AK et al. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Prev Vet Med* 2011; 102 (1):1-9.

Stabel, J. R., S. J. Wells, and B. A. Wagner. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 2002. 85(3): 525-531.

Sweeney RW, Collins MT, Koets AP et al. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Intern Med* 2012; 26 (6):1239-50.

Wadhwa A, Bannantine JP, Byrem TM et al. Optimization of serum EVELISA for milk testing of Johne's disease. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9 (8):749-54.

Wilson DJ, Rood K, Biswas P et al. Herd-level prevalence of Johne's disease in Utah and adjacent areas of the intermountain west as detected by a bulk-tank milk surveillance project. *J Dairy Sci* 2010; 93 (12):5792-7.

7. Anhang

7.1. Mibi - Anhang

Tabelle 10 Gesamtübersicht Ergebnisse Mibi. (x) Kultur auf HEYM Schrägagarrröhrchen , angeimpft mit 150µl Flüssigsuspensions-Ausstrich. (-) Kultur auf HEYM Schrägagarrröhrchen , angeimpft mit Impföse. N.A. Not applicable. Beim Nachweis durch Real Time PCR durch LMQS: Ct-Werte für den MAP-DNA-Nachweis, die kleiner 30 waren, wurden als „+++“ gewertet, Werte die sich zwischen 30 und 34 befanden als „++“ und Werte von 34 bis 37 als „+“. Werte über 40 wurden als negativ bewertet (siehe Material und Methoden LMQS).

Kultur positiv Anzahl	Kultur&E LISA positiv	Auftrag Nr	Interne Nummer	Betrieb Nr.	Tier / Probe Nr.	PCR IS900	ELISA (%)	ZN	Ergebnis
		70353	95/13	50	12x(x)	pos	N.A.	pos	pos
		70353	95/13	50	14x(x)	pos	N.A.	pos	pos
		70353	95/13	50	14x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70353	95/13	50	2x(x)	pos	neg (6,08)	pos	pos
1	1	70353	95/13	50	4	neg	116,4	neg	neg
		70362	122/13	51	11x(x)	pos	N.A.	pos	pos
		70362	122/13	51	11x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70362	122/13	51	13x(x)	pos	N.A.	pos	pos
		70362	122/13	51	13x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70362	122/13	51	14x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70362	122/13	51	3x(x)	pos	93,4	pos	pos
2	2	70362	122/13	51	3x(-)	pos	93,4	pos	pos
	3	70370	46/13	52	1	N.A	83,5	N.A	neg
	4	70411	101/13	57	10	N.A	70,1	N.A	neg
	5	70507	152/13	69	4	N.A	64,3	N.A	neg
	6	70515	144/13	70	6	N.A	91,8	N.A	neg
		70571	182/13	77	8x(x)	pos	112,5	pos	pos
		70571	182/13	77	8x(-)	pos	112,5	pos	pos
		70571	182/13	77	11x(x)	pos	N.A.	pos	pos
		70571	182/13	77	11x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70571	182/13	77	13x(x)	pos	N.A.	pos	pos
		70571	182/13	77	13x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70571	182/13	77	14x(x)	pos	N.A.	pos	pos
3	7	70571	182/13	77	14x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70595	54/2012	80	2x(x)	pos	72,7	pos	pos
4	8	70595	54/2012	80	2x(-)	pos	72,7	pos	pos
5	9	70643	141/13	86	13x(x)	pos	N.A.	pos	pos
6	10	70659	195/13	88	13x(-)	neg	N.A.	pos	pos
	11	70715	205/13	95	9	N.A.	67,19	neg	neg
7	12	70731	208	97	4x(+)	PCR-inhbit	neg (-3,25)	pos	pos
8	13	70755	212/13	100	12x(+)	pos	N.A.	pos	pos
		70787	217/13	104	5x(+)	pos	neg (6,35)	pos	pos
		70787	217/13	104	8x(+)	pos	167,40	pos	pos
		70787	217/13	104	8x(-)	pos	167,40	pos	pos
		70787	217/13	104	11x(+)	neg	N.A.	pos	pos
		70787	217/13	104	12x(+)	pos	N.A.	pos	pos
		70787	217/13	104	13x(+)	pos	N.A.	pos	pos
9	14	70787	217/13	104	13x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70811	227/13	107	10x(-)	PCR-inhbit	81,14	pos	pos
		70811	227/13	107	13x(+)	PCR-inhbit	N.A.	pos	pos
		70811	227/13	107	13x(-)	neg	N.A.	pos	pos
		70811	227/13	107	14x(+)	neg	N.A.	pos	pos
10	15	70811	227/13	107	14x(-)	pos	N.A.	pos	pos
11	16	70851	239/13	112	13x(+)	pos	N.A.	pos	pos
12	17	70858	235/13	113	8x(-)	neg	neg (-7,08)	pos	pos
13	18	70867	254/13	114	6x(-)	neg	neg (-8,72)	pos	pos
14	19	70875	238/13	115	14x(-)	PCR-inhbit	N.A.	pos	pos
		70907	248/13	119	2x(+)	pos	neg (-6,05)	pos	pos
		70907	248/13	119	11x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70907	248/13	119	11x(+)	pos	N.A.	pos	pos
		70907	248/13	119	12x(-)	pos	N.A.	pos	pos
		70907	248/13	119	12x(+)	pos	N.A.	pos	pos
15	20	70907	248/13	119	14x(-)	pos	N.A.	pos	pos
	21	70954	282/13	125	1	N.A.	110,29	N.A.	neg
	22	70987	273/14	129	1	N.A.	73,07	N.A.	neg
	23	71028	270/14	134	1	N.A.	69,17	N.A.	neg

Kultur positiv Anzahl	Kultur&E LISA positiv	Auftrag Nr	Interne Nummer	Betrieb Nr.	Tier / Probe Nr.	PCR IS900	ELISA (%)	ZN	Ergebnis
		71068	278/14	139	1	N.A.	68,81	N.A.	neg
16	24	71068	278/14	139	11x(-)	pos	N.A.	pos	pos
17	25	71076	2165/1	140	3x(-)	pos	82,5	pos	pos
				4					

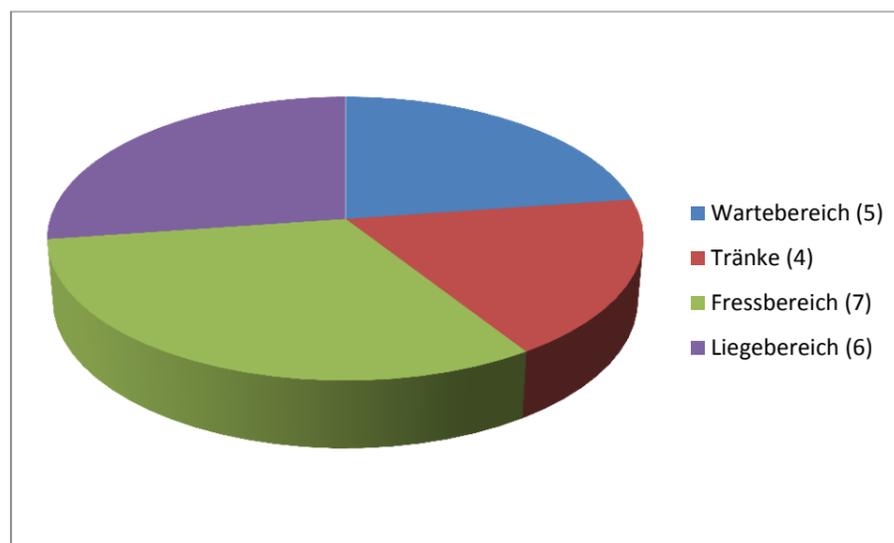


Abbildung 2: Verteilung der positiven Umweltproben über die verschiedenen Probenahmeorte (n=12 Betriebe; in diesem Diagramm ist der Fall-Kontrollstatus der Betriebe bisher nicht berücksichtigt.)

7.2. IBEI – Anhang

7.2.1. Kombination aus diagnostischen Testverfahren

Tabelle 11: Ergebnisse der latenten Klassenanalyse mittels Standardmethodik in SAS Proc LCA (Schätzung von Prävalenz, Sensitivität und Spezifität) auf Einzeltierebene

Einzelkot-Kultur	Serum-ELISA	Einzelkot-PCR	Einzelmilch-PCR	Prev. Unverdächtige Kontrolliere	Prev_StdErr	Sensitivität (StdErr)				Spezifität (StdErr)			
						Einzelkot-Kultur	Serum-ELISA	Einzelkot-PCR	Einzelmilch-PCR	Einzelkot-Kultur	Serum-ELISA	Einzelkot-PCR	Einzelmilch-PCR
2er Testkombinationen													
X	X			0,4944	0,0083	0,0149				0,9855	0,9915		
X		X		0,4910	0,0058		0,0094			0,9831		0,9978	
X			x	0,0158	0,0114			0,0000		0,9886			1,0000
	X	x		0,4909		0,0059	0,0095				0,9827	0,9979	
	X		x	0,0164		0,0117		0,0000			0,9883		1,0000
		X	X	0,0139			0,0058	0,0000				0,9943	1,0000
3er Testkombinationen													
X	X	x		0,2814	0,0058	0,0059	0,0160			0,9864	0,9860	0,9983	
X	X		x	0,4792	0,0083	0,0150		0,0000		0,9857	0,9913		1,0000
X		X	x	0,4756	0,0057		0,0097	0,0000		0,9834		0,9978	1,0000
	X	X	x	0,4754		0,0058	0,0097	0,0000			0,9830	0,9979	1,0000
4er Testkombination													
X	X	X	X	0,3002	0,0059	0,006	0,0153	0		0,9862	0,9858	0,9984	1

Tabelle 12: Modellgütekriterien von 1-6 latente Klassenmodellen auf Einzeltierebene

latent classes	conversion in ... iterations	percentage of seeds associated with the best fitted model [%] ⁵	df _{estimated} (df<30 allows for trust in G ² statistic)	G ²	AIC	BIC	I	Entropy (indicates certainty of class assignment to individuals in subsequent analysis)	p _{G²} ²	ΔG ²	Δdf	Δp _{G²} ²
not restricted												
1	4	100	11	119,14	127,14	146,48	-407,38	1	0,0000			
2	56	100	6	22,03	40,03	83,33	-358,82	0,96	0,0012			
3	4990	100	1	3,48	31,48	99,17	-349,55	0,96	0,0621			
4	model did not converge in 5000 iterations											
5	model did not converge in 5000 iterations											
6	model did not converge in 5000 iterations											
restricted by "Fall-Kontroll-Status"												
1	4	100	43	158,19	166,19	185,53	-407,38	1	0,0000	39,05	32	0,1825
2 ⁴	103	100	36	43,41	65,41	118,59	-349,99	0,97	0,1848	21,38	30	0,8756
3	39	12	29	20,83	56,83	143,87	-338,7	0,98	0,8653	17,35	28	0,9414
4	947	26	22	8,44	58,44	179,32	-332,5	0,81	0,9958	8,44	22	0,9958
5	2056	29	15	5,04	69,04	223,76	-330,80	57	0,9918	5,04	15	0,9918
6	model did not converge in 5000 iterations											
restricted by "combi-Status"												
1	4	100	91	192,37	200,37	219,71	-407,38	1	- ³	73,23	80	0,6908
2 ⁴	60	100	81	74,1	102,1	169,79	-348,24	0,97	- ³	52,07	75	- ³
3	95	1	71	47,9	95,9	211,94	-335,14	0,98	- ³	44,42	70	- ³
4	570	9	61	27,14	95,14	259,53	-324,76	0,82	- ³	27,14	61	- ³
5	2337	5	51	13,51	101,51	314,26	-317,95	0,98	- ³	13,51	51	- ³
6	model did not converge in 5000 iterations											

³ = p-values not reported due to the magnitude of degrees of freedom

Tabelle 13: Ergebnisse der latenten Klassenanalyse mittels Standardmethodik in SAS Proc LCA (Schätzung von Prävalenz, Sensitivität und Spezifität) auf Herdenebene -2er-Testkombinationen

Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur	Prev_K	Prev_StdErr	Prev_F1	Prev_StdErr	Prev_F2	Prev_StdErr	Sensitivität (StdErr)				Spezifität (StdErr)				
											Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur	Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR
FK-Status Betrieb (2 Tests) = Kontrolle [N/W=8,75 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																			
mb_12_betr	lm_12_betr				0,2024						0,4781	0,4781			0,9828	0,9828			
mb_12_betr		mb_11_betr			0,2883						0,3328		0,4983		0,9768		0,9243		
mb_12_betr			lm_16_betr		0,2645						0,3204		0,2594		0,9624			0,9789	
mb_12_betr				mb_04_betr	0,4213						0,0473			0,0601	0,8365				0,9946
	lm_12_betr	mb_11_betr			0,2248							0,4622	0,7024			0,9911	0,9522		
	lm_12_betr		lm_16_betr		0,2645							0,3204		0,2594		0,9624		0,9789	
	lm_12_betr			mb_04_betr	0,4213							0,0473			0,8365				0,9946
		mb_11_betr	lm_16_betr		0,3621								0,3354	0,176			0,8781	0,9664	
		mb_11_betr		mb_04_betr	0,3716									0,076			0,7255		0,997
			lm_16_betr	mb_04_betr	0,0961									0,6685	0,2623			0,9844	0,9995
FK-Status Betrieb (2 Tests) = Fall-1 (ungeimpft) [N/W=6,25 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																			
mb_12_betr	lm_12_betr										0,2367				0,9663	0,984			
mb_12_betr		mb_11_betr									0,2761				0,9624		0,9624		
mb_12_betr			lm_16_betr								0,1809			0,4057	0,9502			0,998	
mb_12_betr				mb_04_betr							0,3618			0,627	0,9456				0,8581
	lm_12_betr	mb_11_betr									0,2367		0,5992	0,7073		0,984	0,9663		
	lm_12_betr		lm_16_betr								0,1547			0,4666		0,9727		0,9981	
	lm_12_betr			mb_04_betr							0,2706			0,9201		0,9953			0,9127
		mb_11_betr	lm_16_betr								0,1809			0,8275	0,4057		0,9502	0,998	
		mb_11_betr		mb_04_betr							0,317			0,7851			0,976		0,903
			lm_16_betr	mb_04_betr							0,2407			0,3118	0,8549			0,9975	0,8589
FK-Status Betrieb (2 Ttests) = Fall-2 (geimpft) [N/W=8,25 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																			
mb_12_betr	lm_12_betr										0,168				0,9983	0,9681			
mb_12_betr		mb_11_betr									0,1711			0,5904	0,9928		0,9823		
mb_12_betr			lm_16_betr								0,1366			0,5785	0,9933			0,9933	
mb_12_betr				mb_04_betr							0,0929			0,8542	0,9985				0,9985
	lm_12_betr	mb_11_betr									0,2748		0,496	0,3699		0,9413	0,9762		
	lm_12_betr		lm_16_betr								0,2248			0,362		0,9472		0,9914	
	lm_12_betr			mb_04_betr							0,168			0,5035		0,9681			0,9983
		mb_11_betr	lm_16_betr								0,1711			0,5904	0,4701		0,9823	0,9928	
		mb_11_betr		mb_04_betr							0,1711			0,5904	0,4701		0,9823		0,9928
			lm_16_betr	mb_04_betr							0,1366			0,5785	0,5785			0,9933	0,9933

Tabelle 14: Ergebnisse der latenten Klassenanalyse mittels Standardmethodik in SAS Proc LCA (Schätzung von Prävalenz, Sensitivität und Spezifität) auf Herdenebene -3er-Testkombinationen

Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur	Prev_K Prev_StdErr	Prev_F1 Prev_StdErr	Prev_F2 Prev_StdErr	Sensitivität (StdErr)					Spezifität (StdErr)					
								Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur	Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur	
FK-Status Betrieb (3 Tests) = KONTROLLE [N/W=4,375 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																		
mb_12_betr	lm_12_betr	mb_11_betr			0,1093			0,4992	0,7613	0,7853				0,9383	0,974	0,8799		
mb_12_betr	lm_12_betr		lm_16_betr		0,1244			0,5806	0,5806		0,2567			0,9584	0,9584		0,9409	
mb_12_betr	lm_12_betr			mb_04_betr	0,2112			0,4698	0,4698			0,0025		0,9856	0,9856			0,9641
mb_12_betr		mb_11_betr	lm_16_betr		0,1218			0,5468		0,5827	0,2656			0,9517		0,8584	0,9417	
mb_12_betr		mb_11_betr		mb_04_betr	0,3348			0,301		0,4897		0,0019		0,9816		0,9488		0,9577
mb_12_betr			lm_16_betr	mb_04_betr	0,1099			0,3052			0,6732	0,2332		0,9119			0,995	0,9995
	lm_12_betr	mb_11_betr	lm_16_betr		0,1659				0,5939	0,7126	0,1868				0,9876	0,9089	0,9358	
	lm_12_betr	mb_11_betr		mb_04_betr	0,2387				0,4398	0,7004		0,0019			0,9919	0,9632		0,9627
	lm_12_betr		lm_16_betr	mb_04_betr	0,1099				0,3052		0,6732	0,2332			0,9119		0,995	0,9995
		mb_11_betr	lm_16_betr	mb_04_betr	0,1069					0,3118	0,6718	0,239				0,8149	0,9926	0,9995
FK-Status Betrieb (3 Tests) = FALL-1 (ungeimpft) [N/W=3,125 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																		
mb_12_betr	lm_12_betr	mb_11_betr				0,1281		0,8525	0,8464	0,8525				0,9083	0,954	0,9083		
mb_12_betr	lm_12_betr		lm_16_betr			0,1382		0,83	0,8182		0,5158			0,913	0,9581		0,9982	
mb_12_betr	lm_12_betr			mb_04_betr		0,17		0,6608	0,8556			0,9162		0,903	0,9955			0,8132
mb_12_betr		mb_11_betr	lm_16_betr			0,1344		0,8249		0,8249	0,5284			0,9089		0,9089	0,9982	
mb_12_betr		mb_11_betr		mb_04_betr		0,1716		0,6544		0,8541		0,8751		0,9027		0,9478		0,8054
mb_12_betr			lm_16_betr	mb_04_betr		0,1214		0,8199			0,5767	0,8441		0,8975			0,9981	0,7625
	lm_12_betr	mb_11_betr	lm_16_betr			0,1382			0,8182	0,83	0,5158				0,9581	0,913	0,9982	
	lm_12_betr	mb_11_betr		mb_04_betr		0,2216			0,6735	0,6744		0,9204			0,9954	0,9436		0,8617
	lm_12_betr		lm_16_betr	mb_04_betr		0,1775			0,823		0,4132	0,924			0,9954		0,9981	0,8216
		mb_11_betr	lm_16_betr	mb_04_betr		0,1828				0,8309	0,4022	0,8649				0,9528	0,9981	0,812
FK-Status Betrieb (3 Tests) = FALL-2 (geimpft) [N/W=4,125 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																		
mb_12_betr	lm_12_betr	mb_11_betr					0,1039	0,7742	0,8688	0,5396				0,9983	0,9079	0,9334		
mb_12_betr	lm_12_betr		lm_16_betr				0,1032	0,7785	0,869		0,5381			0,9983	0,9074		0,9671	
mb_12_betr	lm_12_betr			mb_04_betr			0,0929	0,8544	0,8831			0,8544		0,9985	0,9003			0,9985
mb_12_betr		mb_11_betr	lm_16_betr				0,0724	0,7474		0,7534	0,7474			0,9701		0,9375	0,9701	
mb_12_betr		mb_11_betr		mb_04_betr			0,0929	0,8543		0,5887		0,8543		0,9985		0,9335		0,9985
mb_12_betr			lm_16_betr	mb_04_betr			0,0928	0,8545			0,5843	0,8545		0,9985			0,9669	0,9985
	lm_12_betr	mb_11_betr	lm_16_betr				0,073		0,7583	0,7481	0,7418				0,8721	0,9374	0,97	
	lm_12_betr	mb_11_betr		mb_04_betr			0,1039		0,8688	0,5396		0,7742			0,9079	0,9334		0,9983
	lm_12_betr		lm_16_betr	mb_04_betr			0,1032		0,869		0,5381	0,7785			0,9074		0,9671	0,9983
		mb_11_betr	lm_16_betr	mb_04_betr			0,0724			0,7534	0,7474	0,7474				0,9375	0,9701	0,9701

Tabelle 15: Ergebnisse der latenten Klassenanalyse mittels Standardmethodik in SAS Proc LCA (Schätzung von Prävalenz, Sensitivität und Spezifität) auf Herdenebene -4er-Testkombinationen

Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur	Sensitivität (StdErr)										Spezifität																	
					Prev_K	Prev_StdErr	Prev_F1	Prev_StdErr	Prev_F2	Prev_StdErr	Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur	Einzelkot-Kultur	Einzelkot-PCR	Serum-ELISA	Einzelmilch-PCR	Umgeb.-Kot-Kultur												
FK-Status Betrieb (4 tests) = KONTROLLE [N/W=2,1875 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																																
X	X	X	X		0,0949	0,0617						0,5503	0,3032	0,8039	0,2619	0,8238	0,2494	0,2771	0,2459			0,9375	0,0435	0,9676	0,0389	0,8741	0,0621	0,937	0,0431			
X	X	X		X	0,1122	0,0822						0,4905	0,3095	0,7526	0,321	0,7776	0,3004		0,0033	0,0278			0,9385	0,0447	0,9752	0,0424	0,881	0,0651		0,9679	0,0315	
X	X		X	x	0,1627	0,1465						0,3973	0,2659	0,3973	0,2659			0,4501	0,3698	0,1636	0,1925			0,9446	0,0678	0,9446	0,0678		0,99	0,0365	0,9995	0,0043
X		X	X	x	0,1135	0,0944						0,3223	0,267			0,3412	0,2721	0,6456	0,4261	0,2268	0,2413			0,9152	0,0578		0,82	0,0735	0,9937	0,0279	0,9995	0,0039
	X	X	X	x	0,1759	0,1815								0,5674	0,4947	0,7206	0,2737	0,1672	0,2012	0,0031	0,0261				0,9885	0,0407	0,9181	0,1312	0,9328	0,0483	0,9657	0,0345
FK-Status Betrieb (4 tests) = FALL-1 (ungeimpft) [N/W=1,5625 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																																
X	X	X	x			0,1222	0,0666					0,8752	0,184	0,8693	0,1873	0,8752	0,184	0,574	0,2668			0,9069	0,0618	0,9523	0,0456	0,9069	0,0618	0,9982	0,0089			
X	X	X		x		0,1847	0,0906					0,609	0,2552	0,7888	0,2473	0,71	0,2134			0,9253	0,1232			0,9002	0,066	0,9941	0,0209	0,925	0,0689		0,8283	0,0932
X	X		X	X		0,1629	0,076					0,6812	0,2264	0,8849	0,1663			0,4461	0,2365	0,9205	0,1308			0,9027	0,0643	0,9947	0,0186		0,9981	0,0093	0,8082	0,0864
X		X	X	x		0,1471	0,0811					0,7407	0,2701			0,8853	0,1701	0,4883	0,2705	0,9033	0,157			0,9035	0,0639		0,9312	0,0655	0,9982	0,0092	0,7917	0,0925
	X	X	X	X		0,1977	0,0903							0,7451	0,234	0,7068	0,2101	0,3748	0,22	0,928	0,1188				0,9949	0,0179	0,9342	0,0628	0,9981	0,0097	0,841	0,0899
FK-Status Betrieb (4 tests) = FALL-2 (geimpft) [N/W=2,0625 (geringe Zellbesetzung ist zu erwarten, wenn N/W<5)]																																
X	X	X	x				0,0947	0,0529				0,8367	0,2199	0,874	0,1838	0,5733	0,2687	0,5692	0,2689			0,9981	0,0089	0,9008	0,0553	0,9328	0,0456	0,9662	0,0331			
X	X	X		x			0,0918	0,0506				0,8629	0,1884	0,8821	0,1731	0,5851	0,2638			0,8629	0,1884			0,9985	0,007	0,8993	0,0547	0,9325	0,0455		0,9985	0,007
X	X		X	x			0,0918	0,0506				0,8631	0,1882	0,8821	0,1731			0,5809	0,2642	0,8631	0,1882			0,9985	0,007	0,8993	0,0547		0,9658	0,033	0,9985	0,007
X		X	X	X			0,0921	0,0508				0,8603	0,1917			0,5863	0,2635	0,582	0,2639	0,8603	0,1917			0,9985	0,007		0,9328	0,0455	0,9662	0,033	0,9985	0,007
	X	X	X	X			0,0947	0,0529						0,874	0,1838	0,5733	0,2687	0,5692	0,2689	0,8367	0,2199				0,9008	0,0553	0,9328	0,0456	0,9662	0,0331	0,9981	0,0089

Tabelle 16: Modellgütekriterien von 1-6 latente Klassenmodellen auf Herdenebene

latent classes	conversion in ... iterations	percentage of seeds associated with the best fitted model [%] ⁵	df _{estimated} (df<60 allows for trust in G ² statistic)	G ²	p _{G²}	AIC	BIC	I	Entropy (indicates certainty of class assignment to individuals in subsequent analysis)	ΔG ²	Δdf	Δp _{G²}
not restricted (6 tests)												
1	4	100	57	90,95	0,0028	102,95	118,15	-186,41	1			
2	15	100	50	13,32	1,0000	39,32	72,24	-147,59	0,98			
3	1992	99	43	9,2	1,0000	49,20	99,85	-145,53	0,57			
4	345	92	36	6,02	1,0000	60,02	128,40	-143,94	0,6			
5	685	26	29	3,61	1,0000	71,61	157,72	-142,74	0,63			
6	2096	32	22	2,91	1,0000	84,91	188,74	-142,38	0,58			
restricted by "FK-Status Betrieb" (6 tests)												
1	4	100	185	132,72	0,9986	144,72	159,92	-186,41	1	41,77	128	⁻³
2	16	100	176	54,32	1,0000	84,32	122,31	-147,21	0,98	41,00	126	⁻³
3	138	73	167	39,39	1,0000	87,39	148,17	-139,74	0,82	30,19	124	⁻³
4	180	9	158	29,96	1,0000	95,96	179,54	-135,03	0,84	23,94	122	⁻³
5	259	32	149	20,21	1,0000	104,21	210,58	-130,15	0,85	16,60	120	⁻³
6	216	17	140	13,22	1,0000	115,22	244,38	-126,66	0,89	10,31	118	⁻³

3 = p-values not reported due to the magnitude of degrees of freedom

7.2.2. Internationaler Erfahrungsaustausch

Proceedingsband des MAP-Forums

Proceedings of the 4th ParaTB Forum

21 June 2014
Parma, Italy

Sponsored by



Approaches to Controlling Paratuberculosis in Germany – Conditioned by Voluntariness and Federalism

Campe, Amely¹; Köhler, Heike²; Donat, Karsten³

¹*Department of Biometry, Epidemiology and Information Processing, University of Veterinary Medicine and WHO Centre for Research and Training in Veterinary Public Health, Hannover, Germany*

²*Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, Germany*

³*Animal Health Service, Thuringian Animal Diseases Fund, Jena, Germany*

PRESENT SITUATION

Paratuberculosis was described first scientifically in 1895 by Heinrich A. Johne, a German bacteriologist, pathologist and veterinarian born in Dresden (Johne and Frothingham, 1895). The first activities to control paratuberculosis in endemic regions were initiated in the 1920's. The disease was endemic at that time predominantly in parts of Mecklenburg-Western Pomerania, north-western parts of Lower-Saxony, at the western borders of Westphalia and in Baden-Wuerttemberg (Huber, 1941).

Today paratuberculosis is a reportable animal disease (Anonymous, 2013). In 2005 the federal government published guidelines recommending hygienic measures, diagnostic approaches and status definitions of paratuberculosis in ruminant farms (Anonymous, 2005). These guidelines intended to harmonize measures taken in the German federal states with the overall aim to reduce clinical cases and economic losses for the farms. Prevention of a further spread of paratuberculosis and prevalence reduction were additional intentions. The guidelines include recommendations for:

- Hygiene measures (especially for the handling of young stock, colostrum management, restocking and purchase of cattle),
- Monitoring measures (clinical symptoms, serological as well as bacteriological testing),
- Measures to prepare an extensive, nationwide monitoring program to assess the prevalence of paratuberculosis.

Several of the listed hygienic measures are well-established in paratuberculosis control, i.e. rearing of calves separated from adult cattle, no cross-usage of materials (e.g. forks, wheelbarrows) and clothing between age groups, colostrum only from test-negative mothers. Moreover, some of the suggested measures go even further, i.e. washing cows prior to calving or testing every animal having diarrhoea lasting more than five days by faecal culture or PCR for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). Since these guidelines have been published, producers consider most of the recommended measures expensive and difficult to be implemented and maintained.

Several federal states have taken first steps to assess paratuberculosis prevalence in (mostly dairy) cattle during the past ten years. Most of the federal states conducted baseline cross-sectional studies to get an impression of the current situation (see Table one). Results are difficult to compare because of the not harmonized study design, the sampling strategy, the tests used and the interpretation of test results. As concerns sampling strategies different study populations

were addressed (random selection, acquisition by vet, parallel testing of Bovine herpes virus 1 (BoHV1) surveillance samples, clinically suspicious or post-abortion animals). The age of the tested animals differed between the studies as well (all; >20 mth; >24mths). Different herd sizes were handled differently between the studies for sample size calculations. Most of the studies used serum samples applying commercial ELISA-tests, whereas some studies also included testing of individual milk samples or faecal culture. Some studies did not correct the apparent prevalence for test accuracy, whereas others corrected the apparent prevalence according to Rogan and Gladen (1978) based on the manufacturers specifications and on the manufacturers cut-off. Denzin et al. (2011) calculated 6.7% (3.0%-10.4%) as true prevalence for Saxony-Anhalt.

Therefore, a consideration of test accuracy estimates and a calculation would have been preferable over the apparent here as well (see Table one). However, it has to be questioned, if these calculations of the true prevalence can be meaningfully interpreted, although test evaluation studies are available even for Germany. It can be assumed that the study populations of the federal states of Germany do not resemble the study population of the test evaluation studies enough to allow for applying test accuracy estimates. Up to now only one study for Thuringia measured test accuracy based on the specific study population they intended to investigate (Donat et al., 2012).

Table One: Apparent Prevalence of paratuberculosis – based on published data of several federal states in Germany.

Federal State	Apparent Prevalence	Test	Medium	Study Population (Animal Subgroup)
Animal Level				
Bavaria (Köhler et al., 2011)	0.012	culture	faeces	n=10,013 / 431 farms (all)
Bavaria (Böttcher & Gangl, 2004)	0.980	Svanovir	Serum	n=2,748 / 119 farms (all)
Bavaria (Böttcher & Gangl, 2004)	0.450	Herd Check	Serum	n=2,748 / 119 farms (all)
Bavaria (Böttcher & Gangl, 2004)	0.180	Pourquier	Serum	n=2,748 / 119 farms (all)
Saxony and Thuringia (Köhler et al., 2011)	0.287	culture	faeces	-- (cattle for slaughter)
Hesse (Köhler et al., 2011)	0.140	culture	faeces	n=278 / [unknown number] farms (all)
Lower Saxony (Köhler et al., 2011)	0.105	culture	faeces	n=9,962 / 368 farms (all)
Mecklenburg-Westpomerania (Hacker et al., 2004)	0.122	Svanovir	milk/ Serum	milk samples (n=2,766); blood serum samples (n=231; all >20 months)
Rheinland-Palatinate (Köhler et al., 2011)	0.089	culture	faeces	n=1,927 / 233 farms (all)
Saxony-Anhalt (Denzin et al., 2011)	0.042	Pourquier	Serum	n=896 (all: female >24 mth)

Federal State	Apparent Prevalence	Test	Medium	Study Population (Animal Subgroup)
Thuringia (2006-2010) (Köhler et al., 2011)	0.048	culture	faeces	n=101,006 / 73-128 farms (all)
Saxony (pos=+ and inconclusive) (Donat et al., 2005)	0.096	Herd Check	Serum	n=55,394 / 493 farms (all)
Herd level				
Bavaria (Köhler et al., 2011)	0.107	culture	faeces	n=10,013 / 431 farms (all)
Bavaria (Böttcher & Gangl, 2004)	0.240	Svanovir	Serum	n=2,748 / 119 farms (all)
Bavaria (Böttcher & Gangl, 2004)	0.015	Herd Check	Serum	n=2,748 / 119 farms (all)
Bavaria (Böttcher & Gangl, 2004)	0.090	Pourquier	Serum	n=2,748 / 119 farms (all)
Lower Saxony (Köhler et al., 2011)	0.538	culture	faeces	n=9,962 / 368 farms (all)
Mecklenburg-Westpomerania (Hacker et al., 2004)	0.847	Svanovir	milk/ Serum	milk samples (n=2,766); blood serum samples (n=231; all: >20 months)
Rheinland-Palatinate (Köhler et al., 2011)	0.399	culture	faeces	n=1,927 / 233 farms (all)
Saxony (pos=+ and inconclusive) (Donat et al., 2005)	0.420	Herd Check	Serum	n=55,394 / 493 farms
Thuringia (2006-2010) (Köhler et al., 2011)	0.486	culture	faeces	n=101,006 / 73-128 farms (all)

Further investigations concerning the suitability of alternative, pooling methods have been performed in Germany, as well (e.g. bulk milk, milk filters, environmental sampling).

Furthermore, MAP was cultured from 28.7 % of cattle without macroscopic lesions indicative for paratuberculosis in a slaughterhouse-study covering mainly animals from East German regions (Elze et al., 2013). Apart from dairy cattle paratuberculosis is also prevalent in sheep and dairy goats.

Based on these data it can be assumed, that there are considerable differences regarding the prevalence of paratuberculosis in the federal states of Germany. However, it cannot be deduced, if these differences yield from the different sampling strategies, the tests used and the different test performances or if they can be attributed to structural or regional differences. A systematic investigation of disease prevalence on herd and individual level is still due.

Apart from assessing the current situation in concerted studies more than 6,600 confirmed cases have been reported to the Animal Disease Information System (ISN) hosted by the Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) between 1995 and April 2014. However, it has to be taken into account, that reports are biased by the disease awareness, triggered by regional control or compensation programs, and willingness of the farmer and the reporter to investigate cattle for this disease.

This is especially important, because positive results might hamper animal trade and export for several subsequent years.

Although a nationwide program has not been set up by now, several attempts have been made at regional level to monitor and control paratuberculosis. Most important to be mentioned is a control program with financial grants in Lower Saxony which was in place since 1998 (after conceding financial aids since 1973). The principle of the program, which lasts for five years per farm, is to screen cattle elder than two years with an ELISA test and to follow them up six months later with a faecal culture and skip between tests every six month further on. Mandatory measures to be taken by the farmer are the culling of positive animals, special treatment of calves (guideline available) as well as avoidance of introduction (purchase of free animals) and spread (no manure fertilization on pastures).

Farmers taking part in that program could ask back financial aids of the animal diseases fund for their slaughtered/culled animals. Costs for diagnostic testing and extinction of positive animals amounted to about 1.74 Mio. Euro in ten years. Therefore, financial grants were skipped in 2013 due to ineffectiveness as regards sanitation of paratuberculosis on any participating farm. The involved farmers reported their willingness and awareness of necessity to control paratuberculosis; however, they do not trust in the (long-term) effectiveness of their efforts at present.

At present, voluntary regional control programs exist in some federal states (North Rhine-Westphalia, Saxony, and Thuringia). They established own guidelines for testing, status definition and trade control. According to the statutes of the regional animal diseases funds, some federal states (Baden-Wuerttemberg, Bavaria, Brandenburg, North Rhine-Westphalia, Mecklenburg-Western Pomerania, Saxony, and Thuringia) provide aid to compensate for animals eliminated due to clinical signs or positive test results, or cover diagnostic costs, if farmers follow all terms and conditions of the statute and, if existent, the regional control program.

PARATUBERCULOSIS CONTROL IN THURINGIA

Thuringia has a 15 years history in paratuberculosis control. For decades the “Iron Curtain” prevented the introduction of paratuberculosis. About five years after the heavy purchase of Holstein Friesian dairy cows from the western part of Europe the first clinical cases appeared. During the first years attempts were made to control this reemerging infectious disease by culling of clinical cases, later on including the test positives, combined with compensation by the Animal Disease Fund. After very few years this approach was abandoned because of excessive increase of costs.

The first control program came into effect in 2003. It focused on improvement of the hygienic standard of calving, colostrum management, calf hygiene, food hygiene, and the elimination or pasteurization of waste milk for calf feeding purposes. The program included a bi-annual serological herd screening for MAP-antibodies by ELISA (test sensitivity 70.0%, specificity 76.6 %) and retesting of all MAP-antibody-positives by faecal culture. Faecal culture positive animals had to be culled within one month. Colostrum from antibody-positives was excluded from feeding. After five years the effect of the program was evaluated. There were no herds without ELISA-positive cows, and farmers complained about the increasing number of ELISA-positives

in their herds and problems to find cows for colostrum supply. The limited specificity of the ELISA test was considered to be the main cause for this effect.

Meanwhile a study of the national reference laboratory at the FLI had been published revealing a sensitivity of the test used in the control program of <20%, ranging from 15.1% for cows once positive in faecal culture to 40.2% for cows that were repeatedly culture positive (Gierke, 2010). Not surprisingly, the first whole-herd screenings by faecal culture in the control program herds identified a high number of MAP-shedders that had not been detected by the ELISA test. This higher within-herd prevalence resulted in a fading compliance of farmers to the control program which demanded large efforts without perceptible improvements. Analyzing our control program herds, it was recognized that the survival of MAP shedders within the herd after receiving the test result correlated to incidence reduction: If shedders were not removed from the herd or culled only after a long period, incidence did not decrease. Furthermore, the effect of control was related to management measures and hygiene status: Separate calving pens for MAP shedders and staff hygiene were significantly correlated to incidence reduction.

From these years the following was learned:

- Use a test you can trust, i.e. a highly specific test.
- Keep general management recommendations simple.
- Recommend herd-specific measures to improve the hygienic standard after on-farm status analysis.
- Do not make farmers afraid of killing their farms by culling their cattle.
- Ask the farmers about their goals and potentials and give realistic future prospects.
- Use the limited public money to support diagnostic tests rather than pay compensation and do not cover costs completely.

As a part of the re-evaluation of the control program in 2013, 116 Thuringian cattle farmers (82% dairy farmers, 27% already enrolled in the control program) responded in an anonymous survey (Table two). The results clearly indicate, that a danger to the milk and beef industries image by paratuberculosis is realized by a high percentage of cattle farmers and that the expected economic impact of paratuberculosis on milk production is another main stimulus to control the disease. Purchasing animals, nearly all cattle farmers are interested in the paratuberculosis status of the herd of origin. This leads to the conclusion, that the designated paratuberculosis status of a herd should guarantee a high level of security that an animal purchased from this herd will not introduce MAP into another herd.

Table Two: Results of an anonymous survey among Thuringian cattle farmers concerning their opinion about paratuberculosis control in 2013.

Question	Responders	Yes		No	
		n	%	n	%
Do you consider paratuberculosis as a dangerous infectious disease?	116	85	73.28	31	26.72
Do you consider paratuberculosis a threat for the economy of milk production?	116	90	77.59	26	22.41
Do you expect a danger to the milk and beef industries image by paratuberculosis?	114	106	92.98	8	7.02
Do you expect that your herd is affected by paratuberculosis?	115	37	32.17	78	67.83
Are you already enrolled in the voluntary control program?	113	31	27.43	82	72.57
Would you take part in the paratuberculosis control, if MAP was detected in your herd?	111	100	90.09	11	9.91
Are you interested in the paratuberculosis status of the herd of origin, if you purchase cattle?	116	115	99.14	1	0.86
Would you favor a mandatory control program in Germany?	115	89	77.39	26	22.61

Environmental sampling was applied within the control program herds to evaluate, if it was a cost-saving and easy-to-use approach to diagnose paratuberculosis at herd level, concerning the most efficient sampling strategies and its reliability in herds with low prevalence. A threshold level was calculated of the apparent Within Herd Prevalence (WHP), determined by individual faecal culture of all cows, thus allowing for the detection of a herd as MAP-positive at certain probability levels. The combination of three samples (milking area, main cow alleyways, holding pen) performed best with a WHP threshold of 2.9% for 50% probability of detection to 6.2% for 90% probability of detection when tested simultaneously both by faecal culture and qPCR (own data, submitted for publication). Similar thresholds were demonstrated for a combination of one boot swab and one slurry sample applying faecal culture and qPCR simultaneously (own data, not yet published).

Therefore, the control program was revised and the main pillars of the control measures were modified as follows:

- **Farm hygiene:** Herd-specific recommendations that can be realized 365 days a year with particular focus on measures with evidence to reduce the incidence:
 - Separate caving pens for MAP-positive cows (own data, not yet published).
 - Prevent contact of neonates to other cows after calving (Pillars et al. 2011).
 - Withdraw waste milk for calf feeding purposes or pasteurize (Pillars et al. 2011).
 - Ensure a high level of personal hygiene in calve rearing (own data, not yet published).
- **Diagnosis:** Annual testing of first lactation cows and all to date negatively tested cows by faecal culture.
- **Culling:** Is organized in accordance with the farmers objectives and potentials:

- High prevalent herds: do not rebreed shedders, cull if other problems occur.
 - Low prevalent herds: cull shedders immediately, if open; otherwise do not rebreed (there are serious ethical concerns to cull pregnant cows in Germany).
- **Status definition:** “Paratuberculosis-unsuspicious” cattle herds have:
- No positive results in the annual herd checks by faecal culture over three years (similar to level 6 of the national program standard of the USDA).
 - Purchased cattle only from herds in the same status (i.e. verification of status).
 - Maintenance of the status: herd check with no positive results every two years (from 2015: every three years and environmental sampling in the years in between).
- **Trade control:** Purchase cattle only from herds having the same status (i.e. control or verification or unsuspecting).

At present 115 herds (92 dairy, 23 beef cattle) with about 38.000 cows are enrolled in the program which represents about 25% of the Thuringian population (115.000 dairy cows, 40.000 beef cows). Out of these herds, 34 acquired the status “paratuberculosis-unsuspicious” during the last five years, and none of those herds had a reintroduction of MAP until now. Certainly, most of these herds are “historically free”, i.e. MAP was never introduced. Because these are nearly 30% of all involved herds, it can be concluded, that a relevant proportion of the Thuringian cattle herds is still free from paratuberculosis. Therefore, these herds are to be identified and protected by effective control of animal trade. Purchasing cattle, farmers of these herds are strongly recommended to ask for the paratuberculosis status of the herd of origin.

Previous experience indicate that without doubt, stamping out paratuberculosis in affected herds is a challenge. Fortunately, a few Thuringian herds had very few shedders and after immediate culling of these cows positive test results never occurred. These herds are now certified as “paratuberculosis-unsuspicious”. Analyzing the cumulative incidence of MAP-shedders in a subset of 25 control program herds, a reduction of the median of MAP incidence from 11.05% (n = 25) in 2008 to 4.04% (n = 25) in 2012 was observed (Figure one). Therefore, five years of control are a realistic period of time to halve paratuberculosis incidence.

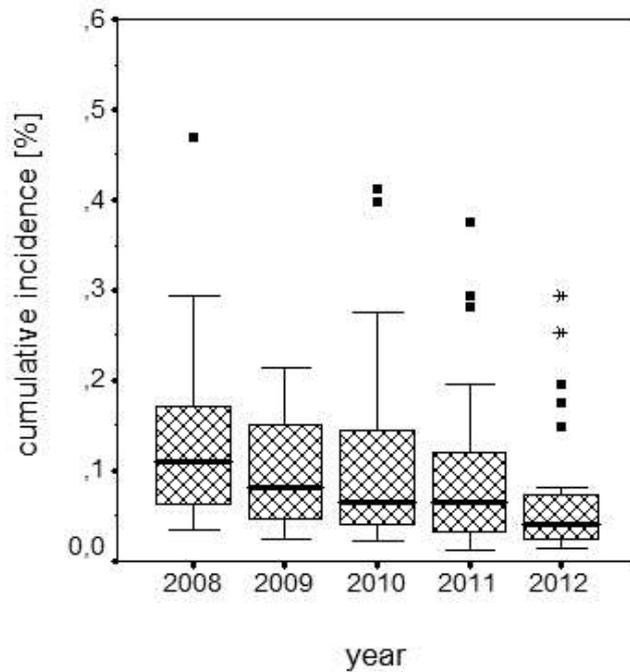


Figure One: Median and inter-quartile range of the cumulative incidence of cows shedding *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) in five consecutive years in 25 dairy herds enrolled in the Thuringian paratuberculosis control program. ■ Statistical outliers, *Extreme values.

Considering the experiences from the Thuringian control program, a double tracked and partly risk based approach to control paratuberculosis can be suggested (Figure two) taking into account that stamping out the disease within some years is not a realistic objective for highly prevalent herds:

- Track A: Cattle breeders and probably paratuberculosis-free herds should aim to be certified as a “paratuberculosis-unsuspicious” herd in accordance with the rules described above.
- Track B: Dairy farmers should at least control paratuberculosis in their herds to a level that ensures a reduction or elimination of economic losses.

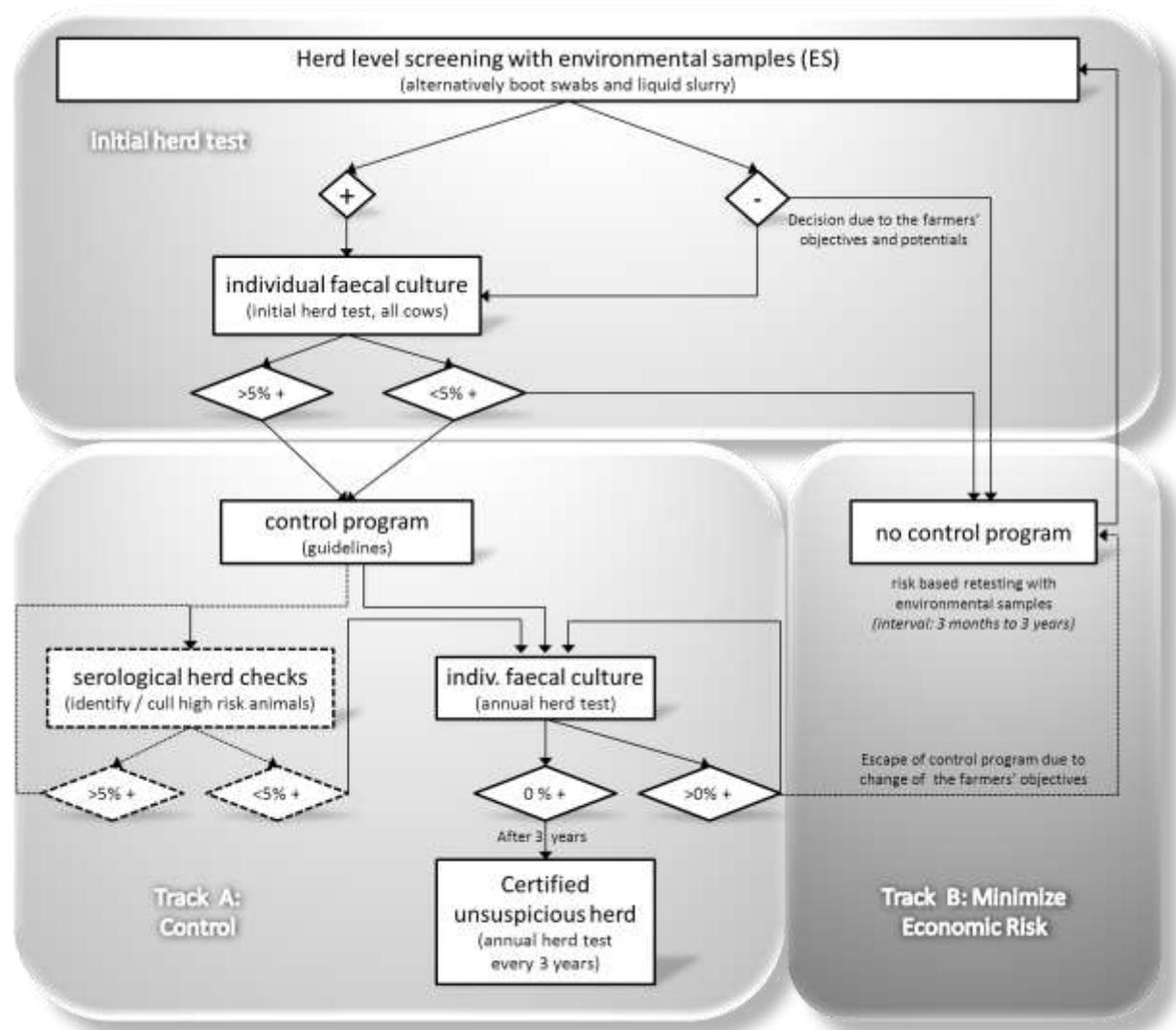


Figure Two: Proposed strategy for paratuberculosis control considering the experiences from the Thuringian control program.

REFERENCES

Anonymous - Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV). Leitlinie für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinie). BAnz. Nr. 28, 10.02.2005, p. 2165.

Anonymus: Regulation on reportable diseases - Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten - in the amended version of 12. Feb. 2011 (BGBl. I p. 252), last amended by article 2 of the regulation of 12. June 2013 (BGBl. I p. 1576).

Boettcher, J., Gangl, A., 2004. Mycobacterium avium spp. paratuberculosis - Combined Serological Testing and Classification of Individual Animals and Herds. J. Vet. Med. B 51, 443-448.

Denzin, N., Gehrman, B., Ewert, B., Rohde, H., 2011. Estimation of the prevalence at animal level of paratuberculosis in female cattle of Saxony-Anhalt (Germany). Veterinary Science Development 1e:10, 42-46.

- Donat, K., Eulenberger, K., Kämpfer, P., 2005. Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Saxony. *Tieraerztl Umschau* 60, 497-501.
- Donat, K., Schau, U., Soschinka, A., Kohler, H., 2012. [Herd prevalence studies of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) in cattle using serological tests: opportunities, limitations and costs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 125, 361-370.
- Elze, J., Liebler-Tenorio, E., Ziller, M., Köhler, H., 2013. Comparison of prevalence estimation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection by sampling slaughtered cattle with macroscopic lesions vs. systematic sampling. *Epidemiology and infection* 141, 1536-1544.
- Gierke, F. (2010) Detection of factors influencing the intra vitam diagnosis of paratuberculosis. [in German]. Berlin: Mensch & Buch, 2010
- Hacker, U., Hüttner, K., Konow, M., 2004. [Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommern, Germany]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 117, 140-144.
- Johne, H.A. and Frothingham, L. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Z. Thiermed. Vergl. Path.* 21. 1895. 438-454.
- Huber, F. Das Vorkommen der Paratuberkulose des Rindes in Großdeutschland [Thesis]. 1941. University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany.
- Köhler, H., Burkert, B., Pavlik, I., Diller, R., Geue, L., Conraths, F.J., Martin, G., 2008. Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in bovine serum. *Berl Münch Tierärztl* 121, 203-210.
- Köhler, H., Bormann, E., Möbius, P., Menge, C., 2011. Paratuberculosis - Need for action and options of action. *Yearly Report of the Friedrich-Loeffler-Institut*, 56-61.
- Pillars RB, Grooms DL, Gardiner JC, Kaneene JB, 2011: Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds. *Prev Vet Med.* 98:10-18.
- Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating Prevalence from Results of a Screening-Test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71-76.