

### 13. Paratuberkulose - Paratuberculosis (Johne's Disease)

Köhler, H., Möbius, P.

#### Summary

Paratuberculosis is distributed in cattle herds all over Germany (fig. 1); goat and sheep flocks as well as zoo ruminants are also affected. In 2018, 490 cases in ruminants were reported in the German animal disease reporting system (TSN). Data about the prevalence on individual animal as well as herd level and on the proportion of infected zoo animals are not available.

There is a great diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) genotypes in Germany. Altogether, 93 different MAP genotypes have been detected until now in about 400 isolates from different hosts and regions in Germany using multi-target genotyping. Furthermore, in 2018, isolates from Germany exhibiting 89 different MAP-C (cattle type group) genotypes could be assigned to 11 of 14 global phylogenetic MAP groups using a new SNP-based assay. These results confirm the high phylogenetic diversity of German MAP-C type strains also at a global scale.

Furthermore, in three affected goat flocks from Thuringia, four different MAP-C genotypes were identified. These genotypes were also found in cattle herds in Thuringia and other Federal States.

In 2018, experimental studies related to the licensing process for three different real-time PCRs for the detection of MAP in faecal samples and other matrices were finalized. Diagnostic samples received by the National Reference Laboratory mainly contained faecal and tissue samples from small ruminants and from wild ruminants kept in zoological gardens.

Current research at FLI aims at identifying and characterizing early diagnostic biomarkers for paratuberculosis with special emphasis on volatile organic compounds (VOC). Furthermore, by the use of a new SNP-based method for the characterization of MAP isolates, it was possible to assign MAP isolates from

Germany to global phylogenetic MAP groups. Phylogenetic diverse MAP genotypes from Germany and other regions worldwide will be investigated to unveil common putative virulence factors of MAP as well as to identify specific virulence properties in individual strains or genotypes.

The National Recommendations for Hygienic Requirements in Ruminant Husbandry, which contain special recommendations for measures against paratuberculosis in cattle husbandry, continue to apply. In November 2017, a control regulation for paratuberculosis was set in force in Lower Saxony.

#### Zusammenfassung

Die Paratuberkulose ist in Rinderbeständen in ganz Deutschland verbreitet (Abb. 1), betrifft aber ebenso Schaf- und Ziegenbestände sowie (Wild-) Wiederkäuer in zoologischen Gärten. Im Jahr 2018 wurden im Tierseuchennachrichtensystem (TSN) 490 Fälle bei Wiederkäuern erfasst. Eine systematische, bundesweite Untersuchung der Prävalenz der Erkrankung auf Herden- und Einzeltierebene bzw. innerhalb von zoologischen Gärten existiert jedoch nicht.

Die Diversität von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) Genotypen in Deutschland ist hoch. Insgesamt wurden bis 2018 93 verschiedene MAP-Genotypen in ungefähr 400 Isolaten von verschiedenen Wirtsspezies und Regionen in Deutschland bestimmt. Mithilfe eines neuen SNP-basierten Typisierungsverfahrens konnten einige dieser Isolate, die 89 verschiedene MAP-C (Rindertyp-Gruppe) Genotypen aufwiesen, elf von bisher insgesamt 14 globalen phylogenetischen MAP-Gruppen zugeordnet werden. Dieses Ergebnis bestätigt die große phylogenetische Diversität von MAP-C-Typ-Stämmen aus Deutschland auch im globalen Maßstab.

In drei betroffenen Ziegenbeständen in Thüringen wurden vier verschiedene MAP-C Genotypen gefunden, welche auch bei Rindern in Thüringen und in anderen Bundesländern auftraten.

Im Jahr 2018 fanden experimentelle Untersuchungen im Rahmen der Zulassung von drei Real-time PCR Kits zum MAP-Nachweis in Kot- und Gewebeproben ihren Abschluss. Die labordiagnostischen Untersuchungen konzentrierten sich auf Kot- und Organproben von kleinen Wiederkäuern sowie von Wildwiederkäuern aus zoologischen Gärten und Tierparks mit dem Verdacht auf Paratuberkulose.

Aktuelle Forschungsvorhaben des FLI zielen auf die Identifizierung und Charakterisierung früher diagnostischer Biomarker für die Paratuberkulose mit besonderem Augenmerk auf flüchtige organische Substanzen (VOC). Eine Fragestellung ist dabei, ob durch die VOC-Analyse im Luftraum über Kulturen eine Verkürzung und Vereinfachung der kulturellen Diagnostik von MAP erreicht werden kann.

Durch die Etablierung einer neuen SNP-basierten Methode zur Charakterisierung von MAP-Isolaten wurde eine Zuordnung der MAP-Genotypen aus Deutschland zu großen globalen MAP-Clustern und ein Vergleich eigener zu internationalen Studien ermöglicht. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für eine Stammauswahl zur geplanten Identifizierung von Virulenzfaktoren und Virulenzeigenschaften von MAP. Das SNP-basierte Typisierungsverfahren wurde hinsichtlich der Frage geprüft, inwiefern es sich für die Untersuchung von epidemiologischen Zusammenhängen eignet.

Die „Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern“, die „Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose in Rinderhaltungen“ enthalten, gelten weiterhin. Niedersachsen hat als einziges Bundesland eine „Verordnung zum Schutz der Rinder gegen Paratuberkulose“ in Kraft gesetzt.

### Labordiagnostische Untersuchungen

Die Primärdiagnostik der Paratuberkulose erfolgt in Deutschland in den Untersuchungsämtern der Länder bzw. der Tiergesundheitsdienste. Das nationale Referenzlabor (NRL) für Paratuberkulose sieht seine Aufgaben in der Entwicklung und Implementierung neuer diagnostischer Tests sowie in der Unterstützung der Untersuchungsämter bei der Sicherung der Qualität etablierter diagnostischer Methoden. Ein Schwerpunkt der NRL-Tätigkeit im Jahr 2018 lag in der Optimierung des kulturellen Nachweises von MAP in Kotproben vom Schaf. Die Untersuchungen werden 2019 fortgesetzt.

Weiterhin ist das NRL an der Zulassung und Chargenprüfung kommerziell verfügbarer diagnostischer Tests beteiligt. Im Rahmen der Zulassung von drei Real-time PCR-Kits zum MAP-Nachweis in verschiedenen Probenmatrices wurden umfangreiche experimentelle Untersuchungen durchgeführt und abgeschlossen. Diese konzentrierten sich auf Kot- und Organproben von kleinen Wiederkäuern sowie von Wildwiederkäuern aus zoologischen Gärten und Tierparks mit dem Verdacht auf Paratuberkulose.

### Statistische Angaben

Die Paratuberkulose ist in Deutschland eine meldepflichtige Tierkrankheit. Im Tierseuchennachrichtensystem (TSN) wurden im Jahr 2018 beim Rind 450 Fälle erfasst (Tab. 1), die in ganz Deutschland verbreitet waren (Abb. 1). Im Vergleich zu den Vorjahren gingen die Meldezahlen bei Schaf und Ziege leicht zurück. Als wichtigste Untersuchungsgründe wurden klinischer Seuchenverdacht (n = 220), Monitoringuntersuchungen (n = 155), sonstige Diagnostik (z. B. Einsendung verendeter Tiere, n = 69) und Pflichtuntersuchungen (n = 25) benannt. PCR (n = 195) und kultureller Erregernachweis (n = 201) kamen etwa gleich häufig als primäre diagnostische Methoden zur Anwendung. 65 Feststellungen basierten auf der serologischen Diagnostik bzw. dem Antikörpernachweis, obwohl gemäß Falldefinition der

Antikörpernachweis nur den Verdacht auf Paratuberkulose begründet.

### Epidemiologische Untersuchungen

Die am FLI etablierte komplementäre Genotypisierung für MAP ermöglicht eine Charakterisierung des Erregers mit sehr hoher Diskriminierungskraft. Die Ergebnisse von drei Typisierungsmethoden mit insgesamt 13 verschiedenen Zielregionen (IS900-RFLP [2 Pattern], MIRU-VNTR- [8 Loci] und MLSSR [3 Loci]) werden dabei kombiniert. Diese Methode ist sehr aufwändig und deshalb nicht immer vollständig anwendbar. Die Ergebnisse sind aber sehr gut für epidemiologische Studien zu verwenden. Die Genotypisierung von ca. 400 MAP-Isolaten, vorwiegend von Rindern aber auch von acht weiteren Wirtsspezies aus verschiedenen Regionen, ergab 93 MAP-Genotypen für Isolate aus Deutschland. Zusätzlich wurde eine weitere Methode zur Differenzierung von MAP am FLI etabliert. Mit Hilfe des neuen „Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP)-based assays“ [Leão *et al.*, 2016] konnten die verschiedenen Genotypen aus Deutschland elf von bisher 14 globalen phylogenetischen Clustern zugeordnet werden. Dieses Ergebnis zeigt die hohe Diversität von MAP in Deutschland im Weltmaßstab und die globale Verbreitung von MAP-Subtypen, die auch in Deutschland vorkommen. Es reflektiert die lange Geschichte der Paratuberkulose in Deutschland basierend auf einem intensiven nationalen und internationalen Tierhandel.

Im Jahr 2018 wurden MAP-Isolate aus drei verschiedenen Thüringer Ziegenbeständen mit Paratuberkulose charakterisiert. In Bestand Nr. 1 wurde MAP aus Kotproben von 90 Ziegen kulturell isoliert (Speziesbestätigung mittels PCR). Serologisch zeigten nur 37 % dieser Tiere ein positives Ergebnis (IDVET PTB). 45 von 46 Isolaten besaßen den gleichen Genotyp. Zusätzlich wurden die Isolate beider Genotypen mittels „SNP-based assay“ auch zwei verschiedenen

phylogenetischen Clustern zugeordnet. Aus den Paratuberkulose-positiven Ziegenbeständen Nr. 2 und Nr. 3 wurden zwei weitere Genotypen isoliert. Die in den Ziegen detektierten Genotypen traten in Deutschland, unter anderem auch in Thüringen, ebenfalls in Rinderbeständen auf.

Paratuberkulose kommt in Deutschland auch bei wild lebenden Wiederkäuern vor. Eine Übertragung von MAP zwischen Rind und Rotwild wurde mittels kombinierter Genotypisierung im Rahmen eigener Untersuchungen im Gebiet des Nationalparks Eifel in Nordrhein-Westfalen nachgewiesen (Fritsch *et al.*, 2012). Im Jahr 2018 wurde aus einem vereiterten Lymphknoten eines aufgebrochenen aber ansonsten unauffälligen Frischlings (Fundort: Nordrhein-Westfalen) MAP isoliert und charakterisiert. Das Isolat wies einen in Deutschland bei Rindern weit verbreiteten Genotyp auf. Eine Übertragung über die Umwelt wird vermutet. Damit wurde nach Mensch und klinisch krankem Esel (Stief *et al.*, 2014) MAP in Deutschland aus einem dritten Wirt isoliert, der nicht zu den Wiederkäuern zählt. Dieser Befund belegt erneut die weite Verbreitung von MAP in der Umwelt und eine Aufnahme des Paratuberkuloseerregers auch durch Nichtwiederkäuer.

### Forschung

2017/2018 wurde am FLI der „SNP-based assay“ von Leão *et al.* (2016) etabliert. Diese Methode basiert auf Vollgenomanalysen von 133 Isolaten verschiedener Wirtsspezies aus 17 Regionen der Welt und ermöglicht eine Zuordnung von MAP-Isolaten zu 14 phylogenetischen Gruppen und Subgruppen. Außerdem wurde untersucht, ob sich diese Methode auch für epidemiologische Untersuchungen eignet.

156 MAP-C-Typ Isolate, die 89 verschiedene Genotypen umfassten (Kombination aus IS900-RFLP, MIRU-VNTR und MLSSR) und von neun Wirtsspezies aus zwölf Bundesländern in Deutschland stammten, wurden mit dem „SNP-based assay“ charakterisiert.

Die Studie zeigte die phylogenetisch hohe Diversität von deutschen MAP-C-Typ-Stämmen in einer globalen Dimension. Die Genotypen bzw. Isolate aus Deutschland gehörten zu neun von zehn Untergruppen innerhalb der Subgruppe A und zur Subgruppe B, welche durch Leão *et al.* (2016) definiert wurden. Übereinstimmend mit Leão *et al.* (2016) fanden sich in Klade 10 Isolate bzw. deren Genotypen mit der größten Anzahl an Wirtsspezies (n = 7); dazu gehörten auch der Mensch und das Bison. Es wurden zusätzlich viele Genotypen mit unbekanntem SNP-Profil gefunden, die phylogenetisch zur Subgruppe A gehören. Unabhängig von der geographischen Herkunft oder der Wirtstierspezies gehörten identische Genotypen in den meisten Fällen zur gleichen phylogenetischen Gruppe. Epidemiologische Verknüpfungen von MAP-Stämmen aus Rind und Rotwild, welche mit Hilfe der kombinierten Genotypisierung für das Gebiet des Eifel-Nationalparks in einer früheren Studie aufgedeckt wurden, konnten mit Hilfe des „SNP-based assays“ im Wesentlichen bestätigt werden.

Die Ergebnisse bekräftigen, dass MAP-C-Typ-Stämme keine Wirtsassoziation besitzen und phylogenetisch verwandte Stämme in Wiederkäuern und Nichtwiederkäuern vorkommen. Die phylogenetische Zuordnung von Isolaten mit dem SNP-basierten Assay kann ein Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung dieser Isolate und die Untersuchung von Übertragungswegen sein.

In einem von der DFG geförderten Forschungsvorhaben wurde untersucht, ob im Luftraum über bakteriellen Kulturen (*headspace*) spezifische Profile flüchtiger organischer Substanzen (VOC) nachweisbar sind und ob diese Profile diagnostisch genutzt werden können. Dazu wurden die VOC-Muster im Luftraum (*headspace*) über MAP-Kulturen aus drei unabhängigen Studien, in denen unterschiedliche Kulturbedingungen vorlagen und verschiedene Präkonzentrierungsmethoden zum Einsatz kamen,

vergleichend untersucht. Unabhängig von der methodischen Variabilität konnten 28 definierte VOC unterschiedlicher chemischer Stoffklassen als indikativ für MAP-Wachstum identifiziert werden. Weiterführende Untersuchungen sollen nun klären, ob dieses VOC-Profil auch für die Identifizierung von MAP-Wachstum in diagnostischen Proben geeignet ist.

### Staatliche Maßnahmen

Die Paratuberkulose ist nicht bekämpfungspflichtig. Die „Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern“ enthalten die deutschlandweite Bekämpfungsstrategie, die in den „Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose in Rinderhaltungen“ formuliert ist. In sieben Bundesländern werden, zum Teil schon seit mehr als zehn Jahren, freiwillige Programme zur Kontrolle bzw. Bekämpfung der Paratuberkulose durchgeführt. Im November 2017 trat in Niedersachsen und damit erstmals in einem Bundesland die „Verordnung zum Schutz der Rinder gegen Paratuberkulose“ in Kraft.

### Zoonosepotenzial

Es gibt auch weiterhin keine wissenschaftlich gesicherten Erkenntnisse über einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Morbus Crohn des Menschen und der Paratuberkulose bei Wiederkäuern.

### Veröffentlichungen

[1] Fontana S, Pacciarini M, Boifava M, Pellesi R, Casto B, Gastaldelli M, Koehler H, Pozzato N, Casalnuovo F, Boniotti MB. 2018. Development and evaluation of two multi-antigen serological assays for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Microbiol Meth* 153:118-126.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.013>

[2] Küntzel A, Oertel P, Trefz P, Miekisch W, Schubert JK, Köhler H, Reinhold P. 2018. Animal science meets agricultural practice: Preliminary results of an innovative technical approach for exhaled breath analysis in cattle under field conditions. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. DOI 10.2376/0005-9366-17101

[3] Möbius P, Köhler H. 2018. Assignment of MAP type C strains from Germany to global phylogenetic MAP groups. 14th International Colloquium on Paratuberculosis, June 04 - 08 2018, Riviera Maya, Mexico [O-02.1, page 96].

Tabelle 1: In TSN gemeldete Paratuberkulose-Fälle 2018

Jahr	Rind	Schaf	Ziege	Andere Tierarten/ Boviden/ Muffelwild	Gesamt
2018	450	21	15	4	490

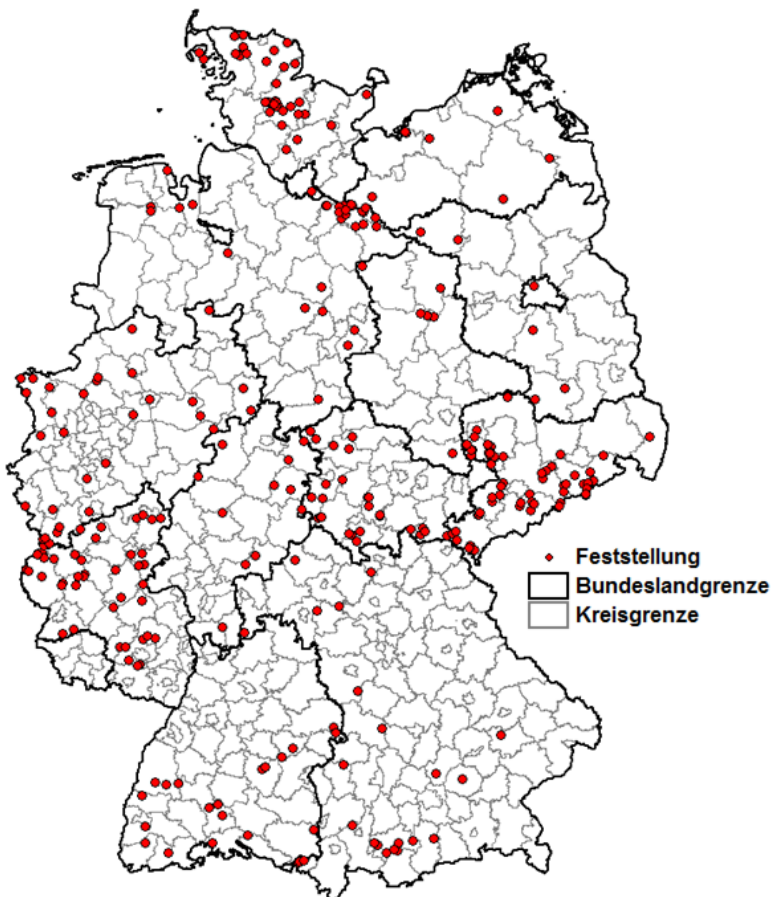


Abb. 1: Regionale Verteilung der im Jahr 2018 in Deutschland gemeldeten Paratuberkulosefälle (Quelle: TSN)