

Amtliche Methode und Falldefinition

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* *subsp. paratuberculosis*)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differentialdiagnose	3
1.4 Diagnostische Indikation	3
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	3
1.6 Rechtsgrundlagen.....	3
2. Untersuchungsmaterial	4
2.1 Erregernachweis	4
2.2 Antikörpernachweis	4
3. Untersuchungsgang	5
3.1. Erregernachweis	5
3.2 Genomnachweis	10
3.3 Nachweis von Antikörpern gegen MAP	11
Literatur	11
Anhang	12
Protokolle	12
Rezepturen.....	16
Falldefinition - Paratuberkulose; <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	21

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Paratuberkulose wird durch *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen. Das Wirtsspektrum umfasst Haus- und Wildwiederkäuer sowie Kameliden. MAP sind kleine, pleomorphe, gerade oder gebogene, unbewegliche, säurefeste Stäbchen von 0,3 bis 2,0 µm Länge und 0,3 bis 0,5 µm Dicke.

1.2 Klinische Symptomatik

Klinische Symptome treten nach einer z. T. mehrjährigen Inkubationszeit erst im Finalstadium der Erkrankung auf und äußern sich in anhaltenden therapieresistenten Durchfällen, Unterhautödemen sowie fortschreitender Abmagerung bis zur Kachexie. Bei Schafen wird Durchfall nur selten, bei Ziegen zunehmend häufiger beobachtet. Die Paratuberkulose ist nicht heilbar und endet infolge von Malabsorption und Proteinmangel tödlich.

1.3 Differenzialdiagnose

Durchfallerkrankungen infektiöser und metabolischer Genese, Intoxikationen.

1.4 Diagnostische Indikation

Handelsuntersuchungen, klinischer Verdacht, Teilnahme an einem Monitoring- oder Sanierungsprogramm.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungsämter, Tiergesundheitsämter bzw. staatliche Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsämter der Bundesländer oder die von den Ländern beauftragten Einrichtungen.
- Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor (NRL) für Paratuberkulose im Institut für molekulare Pathogenese, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Tel.: 03641 804-2240

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Empfehlungen des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern, Abschnitt III.1 Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose in Rinderhaltungen vom 7. Juli 2014, BAnz AT v. 01.08.2014 B1.
- Erste Bekanntmachung zur Änderung der Bekanntmachung von Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern vom 19. August 2014, BAnz AT 28.08.2014 B1

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz) in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Tierseuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser Seuchen darstellen
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen
- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Erregernachweis

- von lebenden Tieren: Kotproben
- von Schlachttieren, getöteten oder verendeten Tieren: Darminhalt, veränderte Darmschleimhaut (vorwiegend Jejunum oder Ileum), Ileozäkklappe und die zugehörigen Mesenterial-Lymphknoten
- aus dem Bestand: Umgebungskotproben, Sockentupfer, Gülle

2.2 Antikörpernachweis

- Blutserum, Plasma, Milch, Milchserum

3. Untersuchungsgang

3.1. Erregernachweis

3.1.1 Mikroskopischer Nachweis

Die mikroskopische Untersuchung von Kotproben ist nur bei klinisch kranken Tieren sinnvoll. Bei veränderten Darmabschnitten und den zugehörigen Lymphknoten ist die Nachweisrate relativ hoch.

Vorbehandlung

AVID-Methode alt

1 TL Untersuchungsmaterial mit 3 TL 15%iger Sputofluol-Lösung (siehe Anhang) homogenisieren

Einwirkzeit ca. 10 min bei Raumtemperatur (RT)

Zentrifugation (20 min bei 3.000 U/min)

Sediment auf Objektträger dünn ausstreichen

Methode LAVES Oldenburg

5 g Kot mit Seesand mörsern

bis zur Gießbarkeit mit 15%igem Sputofluol verdünnen

in 100 ml Glasgefäß umgießen und mit 15%igem Sputofluol auf 50 ml auffüllen, 10 min Einwirkzeit bei RT,

15 min zentrifugieren bei 3.000 x g,

Sediment auf Objektträger dünn ausstreichen

Färbung

- Herstellung von Objektträger-Ausstrichpräparaten von vorbehandelten bzw. nicht vorbehandelten Untersuchungsmaterialien (dünn auftragen).
- Es stehen Protokolle für den lichtmikroskopischen oder fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Mykobakterien zur Verfügung.

Lichtmikroskopischer Nachweis:

- Färbung nach Ziehl-Neelsen (Warmfärbung, siehe Anhang oder kommerzielle Hersteller, z. B. Merck, BD)
- Modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung (Kaltfärbung, z. B. TB-Kinyoun-Färbeset [BD], Tb-color [Merck], AFB-Color Färbeset [Sigma-Aldrich])

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis (bei Organproben zur Erhöhung der Sensitivität sinnvoll):

- Akridin-Orange-Färbung (siehe Anhang)
- Auramin-Rhodamin-Färbung (z. B. Auramin-Rhodamin-Färbeset [BD], Tb-Fluor [Merck], AFB-Fluor [Sigma-Aldrich])

3.1.2 Kultureller Nachweis

Nach positiver Kultur ist eine Bestätigungsuntersuchung zur Identifizierung von MAP zwingend erforderlich. Sie kann durch kulturellen Nachweis der Mycobactin-Abhängigkeit und/oder durch spezifische PCR (s. u.) erfolgen. Der Nachweis der Mycobactin-Abhängigkeit ist bereits bei der Primärkultur möglich. Dies erfordert die kulturelle Anzucht des Probenmaterials auf der gleichen Anzahl Mycobactin-haltiger und Mycobactin-freier Nährmedien.

3.1.2.1 Dekontamination

Dekontamination von Kotproben/Umgebungskotproben/Gülle

- 30 ml HPC (0,75 %) in 50 ml-Gefäße vorlegen
- Kotprobe gut durchrühren, ca. 3 g Kot in das 50 ml-Gefäß mit HPC (0,75 %) geben.
- Gefäß fest verschließen, manuell gut schütteln, ca. 2 bis 5 min bei RT stehen lassen, damit die groben Bestandteile sedimentieren können.
- Ca. 15 bis 20 ml des Überstandes in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gießen, dieses Röhrchen gut verschließen (das Sediment verwerfen).
- Zentrifugenröhrchen mit dem Überstand auf dem Laborschüttler bei ca. 200 U/min und RT für 30 min schütteln.
- Röhrchen anschließend aufrecht bei RT im Dunkeln inkubieren.
- Nach der Einwirkzeit (s. u.) den Überstand bis auf 1 bis 2 ml Sediment dekantieren.

Um den Aufwand zu vermindern, kann auch folgendermaßen verfahren werden:

- 3 g Kot in die Gefäße mit 30 ml 0,75 % HPC einwiegen.
- Das Gefäß verschließen und 30 min schütteln.
- Anschließend Proben bei RT im Dunkeln inkubieren, Überstand bis auf 1 bis 2 ml Sediment dekantieren.

Verbliebene Grobpartikel im Sediment können sich bei der Kultivierung störend auswirken.

Die Einwirkzeit des HPC (0,75 %) richtet sich nach dem Ausmaß der Kontamination und kann zwischen 24 und 96 h betragen. Durch die Dauer der Dekontamination wird die Nachweisrate nach einer Kulturzeit von zwölf Wochen nicht wesentlich beeinflusst, die Nachweisrate nach sechs Wochen Kulturzeit ist bei einer Dekontaminationsdauer von 48 h am höchsten.

Vorbereitung und Dekontamination von Sockentupfern

- Sockentupfer mit einer sterilen Schere kleinschneiden.
- 3 g abwiegen und in ein 50 ml-Gefäß geben.
- 30 ml 0,75%iges HPC dazugeben.
- Kräftig vortexen und anschließend 5 min bei 200 rpm schütteln.
- 5 min bei RT sedimentieren lassen.

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

- Überstand ohne Vlies (Socken) in ein neues 50 ml-Gefäß geben, Restflüssigkeit und Socken entsorgen.
- 30 min bei 200 rpm (RT) schütteln.
- Röhrchen anschließend aufrecht 48 h bei RT im Dunkeln inkubieren.
- Überstand bis auf 1 bis 2 ml Sediment dekantieren.

Dekontamination von Organproben

- Das Organmaterial vom Fettgewebe befreien.
- Darmstücke aufschneiden, evtl. Kotrückstände mit sterilem PBS-Puffer, pH 7,2, abspülen.
- Lymphknoten ggf. in vergällten Alkohol tauchen, kurz abflammen, aufschneiden.
- Ca. 1 g Gewebe von verschiedenen Stellen entnehmen.
- Gewebe mittels Schere zerkleinern.

A - Homogenisieren des Gewebes mit dem Stomacher (Methode FLI)

- Zerkleinertes Gewebe in sterilem Stomacherbeutel sammeln.
- 7 ml HPC, 0,9 %, zugeben.
- 6 min im Stomacher homogenisieren.
- Homogenisiertes Gewebe in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen umfüllen.
- Röhrchen 5 bis 10 min bei 200 U/min, RT auf dem Laborschüttler schütteln.

B - Homogenisieren des Gewebes mit dem Ultraturrax (Methode CVUA-RRW Krefeld)

- Zugabe von ca. 7 ml HPC, 0,75 %
- mit Ultraturrax (niedrigste Umdrehungszahl) ca. 1 bis 2 min zerkleinern,
- dann mit HPC auffüllen (ca. 30 ml).
- Proben intensiv mit der Hand schütteln.

Probendekontamination (A und B)

- Röhrchen 24 h bei RT im Dunkeln inkubieren. Bei hohem Grad an Autolyse bzw. Kontamination kann die Dauer der Dekontamination verlängert werden.
- Nach der Dekontamination 50 ml-Zentrifugenröhrchen bei 1.880 x g und 20 °C für 20 min zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.
- Sediment in 1 ml PBS-Puffer pH 7,2 resuspendieren, vortexen.

C - Homogenisieren des Gewebes im Mörser (Methode LAVES Oldenburg)

- 3 g Organmaterial (Darm, Lymphknoten) in steriler Porzellanmörserchale einwiegen und mit Seesand gut mörsern.

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

Probendekontamination (C)

- 30 ml HPC (0,75 %) zugeben, kurz umrühren und Seesand 5 min sedimentieren lassen,
- umfüllen in Schraubverschlussgefäße, 30 min auf dem Laborschüttler schütteln.
- Proben bei RT mindestens 24 h stehen lassen.
- Überstand in Zentrifugenröhrchen umfüllen, 30 min bei 3.000 x g zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Sediment verimpfen.

3.1.2.2 Inokulation und Bebrütung

Vor der Inokulation werden die Nährmedien auf RT temperiert. Beimpft werden mit dem dekontaminierten Untersuchungsmaterial mindestens drei Röhrchen Herrold´s Egg Yolk Medium mit Mycobactin und ANV (Rezeptur siehe Anhang, eigene Herstellung oder kommerzielle Anbieter, z. B. BD) und ggf. die gleiche Anzahl Röhrchen Herrold´s Egg Yolk Medium ohne Mycobactin, mit ANV (Rezeptur siehe Anhang, eigene Herstellung oder kommerzielle Anbieter, z. B. BD).

Bei kleinen Wiederkäuern und Wildwiederkäuern sollten zusätzlich ein bis zwei Röhrchen eines Vollei-Nährmediums mit Mycobactin (z. B. modifizierter Mycobacterien 7H11 Agar oder Löwenstein-Jensen-Medium mit Mycobactin, Rezeptur siehe Anhang, eigene Herstellung) beimpft werden, da bei diesen Tierarten MAP-Stämme vorkommen können, die besondere Nährmedienansprüche haben.

Inokulation

Die Nährmedien werden mit jeweils 200 µl des Sedimentes beimpft (Filterspitzen benutzen).

Röhrchen anschließend für sechs bis sieben Tage in leichter Schräglage bei 37 ± 2 °C unter aeroben Bedingungen inkubieren (Nährbodenoberfläche sollte waagrecht sein). Nach sechs bis sieben Tagen die Röhrchen aufrecht stellen.

Weitere Bebrütung der Kulturröhrchen in senkrechter Stellung bei Proben von Rindern mindestens 12, besser jedoch bis zu 16 Wochen, bei Proben von Ziegen bis zu sechs Monate, bei Proben von Schaf und Wildwiederkäuern bis zu neun Monaten.

Regelmäßige Überprüfung der Kulturröhrchen auf Koloniewachstum, ggf. dritte und vierte Woche unter einem Stereomikroskop (10- bis 20-fache Vergrößerung, alternativ: Lupe), danach makroskopisch (ohne Lupe). Ggf. ab der vierten Woche Spülen der Kulturröhrchen mit 250 µl PBS-Puffer, Poolen der Spülflüssigkeit von allen Röhrchen, die zu einer Probe gehören. Untersuchung der Spülproben mit PCR (siehe dort).

Kulturergebnis

Nach drei bis vier Wochen Bebrütung können unter dem Stereomikroskop (Lupe) auf den Mycobactin-haltigen Nährböden zarte, grauweiße Kolonien erkennbar sein.

Nach fünf bis sechs Wochen sind die Kolonien auch makroskopisch erkennbar. Sie zeigen ein weißlich-graues, glattes, glänzendes Aussehen. Die halbkugeligen Kolonien werden mit längerer Bebrütungsdauer flacher und erreichen einen Durchmesser bis zu 5 mm. Bei kleinen Wiederkäuern und Wildtieren können extrem langsam wachsende, vereinzelt auch gelb-orange pigmentierte, Kolonien von MAP auftreten.

3.1.2.3 Identifizierung

Identifizierung über Subkultur

Langsam wachsende Kolonien, die auch in Subkultur nur auf Mycobactin-haltigen, nicht dagegen auf Nährböden ohne Mycobactin-Zusatz wachsen und sich in der Ziehl-Neelsen-Färbung als säurefeste Stäbchen (oft verklumpt) erweisen, können als *M. avium* subsp. *paratuberculosis* identifiziert werden.

Im Interesse der Zeitersparnis wird empfohlen, die Identifizierung über Subkultur durch die Identifizierung mittels PCR zu ersetzen. Die Sicherheit des MAP-Nachweises wird durch Ergänzung mit molekularbiologischen Nachweismethoden (PCR) erhöht.

PCR zur Identifizierung von MAP in Kulturmaterial

Diese Methode dient der Identifizierung von MAP in Spülproben von Kulturen bzw. von Koloniematerial.

DNA-Isolierung

A von Koloniematerial

- Koloniematerial einzeln von festen Nährmedien abnehmen und mittels Impföse in 100 µl Aqua dest. einreiben, Tube verschließen, vortexen.
- Inaktivierung 20 min bei 80 °C (Wasserbad, Thermomixer).
- Zellaufschluss im Ultraschallbad, 10 min, 35 kHz, RT.
- 10 min unter leichtem Schütteln bei 99 - 100 °C kochen (Wasserbad, Thermomixer).
- Tube abkühlen lassen.
- 5 min bei 12.000 rpm zentrifugieren, Überstand möglichst quantitativ in ein neues Tube überführen.
- Erneut für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugieren, Überstand möglichst quantitativ in ein neues Tube überführen.
- Probe bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C ± 3 °C aufbewahren.

B durch Spülen der Kulturen mit verdächtigen Kolonien bzw. noch vor dem sichtbaren Wachstum

- Kräftiges Abspülen der gesamten Kulturoberfläche durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit 250 µl PBS.
- Mischen aller Spülflüssigkeiten einer Probe (mehrere Kulturröhrchen je Probe!) in einem Reaktionsgefäß.
- Inaktivierung 20 min bei 80 °C (Wasserbad, Thermomixer).
- Zellaufschluss im Ultraschallbad, 10 min, 35 kHz, RT.
- 10 min unter leichtem Schütteln bei 99 -100 °C kochen (Wasserbad, Thermomixer).
- 5 min mit ca. 12.000 g zentrifugieren, Überstand abnehmen.
- Erneute Zentrifugation für 5 min mit ca. 12.000 g.
- Überstand direkt in der PCR einsetzen.

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

Die DNA-Isolierung nach Einreiben von Koloniematerial in Aqua dest. bzw. aus der Spülflüssigkeit kann auch mittels kommerzieller DNA-Extraktionskits nach Herstellerangaben erfolgen. Die Proben sind zuvor 20 min bei 80 °C zu inaktivieren. Vor der eigentlichen DNA-Extraktion ist ein mechanischer Zellaufschluss erforderlich (s. dazu die Gebrauchsinformationen der DNA-Extraktionskits).

PCR

Die PCR dient der Absicherung positiver Kulturen. Es können Endpunkt- und real-time PCR-Protokolle (s. 3.2 Genomnachweis) und verschiedene Targetsequenzen zum Einsatz kommen, u. a.:

- IS900, Primer s204 - s749 nach Englund *et al.*, 1999
- F57, Primer F57, R57 und F57Rn nach Vansnick *et al.*, 2004
- ISMAP02, nach Ireng *et al.*, 2009

3.1.2.4 Ergebnismitteilung und Wertung

Ein starker Keimgehalt ist in der Regel schon nach vier bis sechs Wochen Kulturdauer deutlich zu erkennen und mit Nachweis von mehr als 30 gewachsenen Kolonien auf dem Nährboden verbunden. Ein geringer Keimgehalt wird teilweise erst nach zwölf Wochen Kulturdauer sichtbar in Form weniger Kolonien (ca. ein bis zehn Kolonien). Mittlere Keimgehalte werden in der Regel schon nach sechs Wochen Kulturdauer sichtbar. Bei kleinen Wiederkäuern und Wildtieren ist mit z. T. deutlich längeren Kultivierungszeiten zu rechnen (s. 3.1.2.2).

3.2 Genomnachweis

Für den Genomnachweis von MAP stehen zugelassene kommerzielle real-time PCR-Kits zur Verfügung:

https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf.

Kot- und Gewebe sind vor der Entnahme der Proben für die DNA-Extraktion gut zu homogenisieren (siehe auch 3.1.2.1). Die DNA-Extraktion aus Kot- und Gewebeproben kann mittels Magnetextraktion oder Säulenbasierten Extraktionsverfahren erfolgen, die auf das jeweilige PCR-Verfahren abgestimmt sind. Vor der eigentlichen DNA-Extraktion ist ein mechanischer Zellaufschluss erforderlich (s. dazu die Gebrauchsinformationen der DNA-Extraktionskits).

Vorbereitung von Sockentupfern für die DNA-Extraktion

- Sockentupfer mit einer sterilen Schere kleinschneiden.
- 3 g abwiegen und in ein 50 ml-Gefäß geben.
- 20 ml steriles A. dest. zugeben, Röhrchen verschließen, kräftig vortexen.
- 10 - 20 min bei RT sedimentieren lassen.
- 10 ml Überstand abnehmen und entweder auf Filter, die sich in Zentrifugenröhrchen befinden (z. B. Adiafilter), pipettieren oder direkt in ein neues Röhrchen überführen.
- Zentrifugation 5 min bei 3.000 x g, RT.

- Überstand und ggf. Filter entsorgen.
- Pellet mit A. dest. aufnehmen (z. B. 500 µl, Volumen hängt von dem nachfolgend angewandten DNA-Extraktionsverfahren ab).
- Gut homogenisieren.
- Die DNA-Extraktion je nach Herstellerangaben durchführen.

3.3 Nachweis von Antikörpern gegen MAP

Zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP stehen mehrere zugelassene ELISA zur Verfügung:

https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf.

Der Antikörpernachweis ist für die Einzeltierdiagnostik der Paratuberkulose nur eingeschränkt geeignet. Im Gegensatz hierzu ist die serologische Bestandsuntersuchung für eine orientierende Einstufung von Beständen durchaus geeignet, vorausgesetzt es werden alle Tiere über 24 Monate in die Untersuchung einbezogen. Aus einer einmaligen serologischen Bestandsuntersuchung kann im negativen Falle kein Bestandsstatus abgeleitet werden. Erst wiederholte serologische Untersuchungen ggf. in Verbindung mit direkten Erregernachweisen sind hinsichtlich des Bestandsstatus aussagekräftig. Der verwendete serologische Test oder die Kombination mehrerer Tests sollte eine Spezifität von mindestens 98,5 % gewährleisten. Kommerzielle Tests müssen nach Prüfung mit definierten Proben im NRL für Paratuberkulose Mindestwerte für die Sensitivität und Spezifität erreichen (derzeitiger Stand: 53,6 % Sensitivität, 98,5 % Spezifität). Die Mitteilung der Untersuchungsergebnisse sollte die Angabe der Methode bzw. der Testbezeichnung beinhalten.

Der Antikörpernachweis in Pools aus bis zu 50 Einzelmilchproben oder in Tankmilchproben in Beständen mit ≤ 50 ist möglich, jedoch nur für die Identifizierung von Herden mit einer hohen Prävalenz von MAP-Ausscheidern geeignet. Für die Verwendung der für Einzelmilchuntersuchungen zugelassenen ELISAs zu diesem Zweck ist eine Ausnahmegenehmigung durch die zuständige Landesbehörde erforderlich.

Literatur

- Bölske G, Johansson KE. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 1999 Mar; 33(3):163-71.
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F., 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 100, 197-204.
- Irengé, L.M., Walravens, K., Govaerts, M., Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K., Gala, J.-L., 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet. Microbiol.* 136, 166-172.

Durchführungsschritte

- Fixierte Präparate werden mit Carbol-Fuchsin-Lösung übergossen.
- Diese werden dreimal bis zur Dampfbildung (etwa 80 °C) mittels eines Bunsenbrenners erwärmt.
- Nach 5 min wird die Farblösung mit Wasser abgespült.
- Präparate werden mit Salzsäure - Alkohol in Färbeküvetten entfärbt, bis keine Farbschlieren mehr sichtbar sind.
- Nach Spülung mit Wasser werden die Präparate mit Methylenblau-Lösung (in Färbeküvetten) etwa 2 min gegengefärbt.
- Nach erneuter Spülung mit Wasser werden die Präparate an der Luft getrocknet.

Hinweis: Anstelle von Fuchsin und Methylenblau können auch andere kontrastierende basische Farbstoffe verwendet werden z. B. Nachtblau-Bismarckbraun-Kombination bei Personal mit Rot-Grün-Schwäche.

Bei der technischen Durchführung der Färbung muss darauf geachtet werden, dass die Übertragung säurefester Stäbchen von einem Objektträger auf einen anderen vermieden wird.

- Die Färbungen werden im Anschluss mikroskopisch im Hellfeld untersucht.
- Die Untersuchung wird bei 90- bis 100-facher Objektivvergrößerung mit Immersionsöl durchgeführt.
- Das Präparat ist so lange zu durchmustern, bis eine Beurteilung entsprechend dem Bewertungsmaßstab nach Tabelle 1 möglich ist.

Ergebnis

Mykobakterien heben sich bei guter Färbung deutlich von dem mehr oder weniger amorphen Hintergrund ab.

hier: **leuchtend rot auf blauem Grund**

Tabelle 1: Bewertungsmaßstab der mittels Ziehl-Neelsen-Färbung ermittelten Befunde

<u>Bewertungsmaßstab</u>	<u>Anzahl der säurefesten Stäbchen</u>
Negativ	keine je Ausstrich (mindestens 100 Blickfelder)
kontrollbedürftig ¹⁾	1 - 3 je Ausstrich (mindestens 100 Blickfelder)
+	4 - 10 je 100 Blickfelder
++	1 - 10 je 10 Blickfelder
+++	1 - 10 je Blickfeld
++++	> 10 je Blickfeld

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

¹⁾ Befunde, bei denen nur einzelne säurefeste Stäbchen im ganzen Ausstrich gefunden werden, sind nicht sicher zu beurteilen. Handelt es sich dabei um einen diagnostisch noch unklaren Fall, so ist eine Kontrolle durch Wiederholungsuntersuchung sowie durch die kulturelle Methode angezeigt.

Acridinorange-Färbung (Fluoreszenz-Methode zum Nachweis von Mykobakterien)

Material

Ausstrichpräparate

Bei der Herstellung der Präparate für diese Untersuchung sollte möglichst frisches, nur wenige Stunden altes Untersuchungsgut verwendet werden. Durch längere Aufbewahrung des Untersuchungsgutes bei Raumtemperatur (18 °C bis 28 °C) kommt es zur Vermehrung von Kontaminationskeimen. Vor allem Sporenbildner können nach Salzsäure-Alkohol-Behandlung eine Fluoreszenz aufweisen, welche die Beurteilung erheblich erschwert.

Verzeichnis der Reagenzien

Acridinorange-Lösung:

farbloses Phenol (Kristalle)	5 ml
Glycerin	25 ml
95 % Alkohol	25 ml
Acridinorange	0,1 g
Aqua dest.	50 ml

- 24 h in brauner Flasche lösen.

Salzsäure - Alkohol

konz. Salzsäure	0,5 ml
Alkohol, 95%ig	74,0 ml
Aqua dest.	25,5 ml
Methylenblau	0,2 g

Immersionsöl

Verzeichnis der Geräte

Färbebank

- Mikroskop mit Filterkombinationen

Verzeichnis der Gebrauchsmaterialien

Pinzetten
Einmalhandschuhe
Spritzflaschen
Schutzbrille

Durchführungsschritte

- Acridinorange-Lösung auf die fixierten Präparate geben und 15 min einwirken lassen.
- Abspülen mit Aqua dest.
- 2 min mit Salzsäure - Alkohol entfärben.
- Abspülen mit Aqua dest.,
- Präparat lufttrocknen lassen.

Bei der technischen Durchführung der Färbung muss darauf geachtet werden, dass die Übertragung säurefester Stäbchen von einem Objektträger auf einen anderen vermieden wird.

Gefärbte Ausstriche dürfen unter keinen Umständen mit Filterpapier getrocknet werden, da mikroskopisch kleine Papierfasern durch ihre Fluoreszenz Mykobakterien ähneln können. Sie müssen vor Licht geschützt werden, da unter Lichteinwirkung die Fluoreszenz der Mykobakterien nachlässt.

Die Proben werden mittels Fluoreszenzmikroskopie durchmustert. Es kann mit geringer Objektivvergrößerung und Trockenobjektiven gearbeitet werden.

Ergebnis und Kontrolle

Präparate sind so lange zu durchmustern, bis eine Beurteilung entsprechend dem Bewertungsmaßstab nach Tabelle 2 möglich ist.

Tabelle 2: Bewertungsmaßstab der mittels Acridinorange-Färbung ermittelten Befunde

<u>Bewertungsmaßstab</u>	<u>Anzahl der fluoreszierenden Stäbchen</u>
Negativ	keine je Ausstrich (mindestens 100 Blickfelder)
kontrollbedürftig ¹⁾	1 - 10 je Ausstrich (mindestens 100 Blickfelder)
+	10 - 50 je 100 Blickfelder
++	5 - 50 je 10 Blickfelder
+++	5 - 50 je Blickfeld
++++	> 50 je Blickfeld

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

¹⁾ Befunde, bei denen nur einzelne fluoreszierende Stäbchen im ganzen Ausstrich gefunden werden, sind nicht sicher zu beurteilen. Handelt es sich dabei um einen diagnostisch noch unklaren Fall, so ist eine Kontrolle durch Wiederholungsuntersuchung sowie durch die kulturelle Methode angezeigt.

Rezepturen

Sputofluol (Merck, Darmstadt)

Herstellung der 15%igen Lösung mit sterilem Aqua dest.

HPC

Hexadecylpyridiniumchlorid Monohydrat syn. N-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat (Merck, SIGMA)

Herstellung der 0,75%igen bzw. 0,9%igen HPC-Lösung mit sterilem Aqua dest.

Herrold´s Egg Yolk Medium mit Mycobactin und ANV

Chemikalien, Reagenzien

Herrold´s Egg Yolk Agar-Basis

NaCl

Caseinpepton

Fleischextrakt „Lab-Lemco“

Agar

Glycerin

Aqua dest.

Supplemente

2%ige Malachitgrün-Lösung

Eigelb

Natriumpyruvat

Mycobactin J (Allied Monitor), die Substanz ist in Ampullen zu je 2 mg abgepackt.

Amphotericin B

Nalidixinsäure

Vancomycin

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

Herstellungsvorschrift:

In einen 1-Liter-Kolben werden folgende Substanzen eingewogen:

NaCl	4,0 g
Caseinpepton	9,0 g
Fleischextrakt „Lab-Lemco“	2,7 g
Agar	15,0 g
Glycerin	27,0 ml

Die Substanzen werden in 870 ml Aqua dest. suspendiert und gelöst.

pH-Wert auf $7,3 \pm 0,2$ einstellen (NaOH).

Fraktioniert im Dampftopf sterilisieren bzw. 15 min bei 121 °C autoklavieren, abkühlen auf 50 °C .

Sukzessive Zugabe der folgenden Substanzen:

2%ige Malachitgrün-Lösung (steril)	5,0 ml
Eigelbsuspension	100,0 ml
Amphotericin B (in sterilem Wasser gelöst)	50,0 mg
Nalidixinsäure (in sterilem Wasser gelöst)	50,0 mg
Vancomycin (in sterilem Wasser gelöst)	50,0 mg
Natriumpyruvat (steril, gelöst)	4,1 g
Mycobactin J gelöst in Ethanol (durch Spritzenvorsatzfilter filtrieren)	2,0 mg

Gründlich mischen

pH-Wert prüfen: $7,0 \pm 0,2$

Abfüllen zu je 6 ml in Kulturröhrchen.

Verschließen der Röhrchen.

Röhrchen in Schräglage bei Raumtemperatur erstarren lassen.

Weitere Aufbewahrung der Nährböden im Kühlschrank ($8 - 10\text{ °C}$) bis zu maximal acht Wochen (dazu in PE-Beutel einschweißen).

Kontrolle:

Nährmedium sollte eine grünlich-trübe Färbung aufweisen.

Sterilkontrolle: 7 d bei $37 \pm 2\text{ °C}$ bebrüten.

Herrold´s Egg Yolk Medium ohne Mycobactin, mit ANV

Herstellung des Nährmediums in o. a. Weise ohne Zusatz von Mycobactin.

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

Modifizierter Mycobacterien 7H11 Agar mit Vollei und Amphotericin B

Chemikalien, Reagenzien

Mycobacterien 7H11 Agar-Basis (BD)
Glycerin
L-Asparagin-Monohydrat
Aqua dest.

Supplemente

Vollei
Middlebrook OADC
Selectatabs
Amphotericin B
Mycobactin J

Herstellungsvorschrift

In einen 1-Liter Kolben werden folgende Substanzen eingewogen:

Mycobacterien 7H11 Agar-Basis	21,0 g
Glycerin	25,0 ml
L-Asparagin-Monohydrat	0,3 g

Die Substanzen werden in 900 ml Aqua dest. suspendiert und gelöst.

pH-Wert auf $6,6 \pm 0,2$ überprüfen und ggf. einstellen.

Fraktioniert im Dampftopf sterilisieren bzw. 15 min bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ autoklavieren, abkühlen auf $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sukzessive Zugabe der folgenden Substanzen:

Vollei	200,0 ml
Middlebrook OADC	100,0 ml
Selectatabs	2 Stk
Amphotericin B	40,0 mg
Mycobactin J	2,0 mg

Gründlich mischen

End-pH-Wert prüfen: $7,0 \pm 0,2$

Abfüllen zu je 6 ml in Kulturröhrchen.

Verschließen der Röhrchen.

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

Röhrchen in Schräglage bei Raumtemperatur erstarren lassen.

Weitere Aufbewahrung der Nährböden im Kühlschrank (8 - 10 °C) bis zu maximal acht Wochen (dazu in PE-Beutel einschweißen).

Kontrolle:

Nährmedium sollte eine gelblich-trübe Färbung aufweisen.

Sterilkontrolle: 7 d bei 37 ± 2 °C bebrüten.

Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Medium (mit Mycobactin)

Chemikalien, Reagenzien

Löwenstein-Jensen-Basis

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)

Magnesiumcitrat

L-Asparagin-Monohydrat

Kartoffelmehl

Malachitgrün

Glycerin 87 %

Aqua demin.

Supplemente

Polymyxin B

Amphotericin B

Nalidixinsäure

Trimethoprim

Azlocillin

Mycobactin J

Vollei

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

Herstellungsvorschrift

In einen 1-Liter-Kolben werden folgende Substanzen eingewogen:

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1,56 g
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,15 g
Magnesiumcitrat	0,37 g
L-Asparagin-Monohydrat	2,25 g
Kartoffelmehl	18,75 g
Malachitgrün	0,25 g
Glycerin 87 %	7,5 ml

Die Substanzen werden in 375 ml Aqua dest. suspendiert und gelöst.

pH-Wert auf $4,8 \pm 0,2$ überprüfen und ggf. einstellen.

15 min bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ autoklavieren,

abkühlen auf $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zugabe von:

Vollei	625,0 ml
--------	----------

Supplemente vorsichtig einmischen:

Polymyxin B	6,6 mg
Nalidixinsäure	20,0 mg
Trimethoprim	5,0 mg
Azlocillin	10,0 mg
Amphotericin B	50,0 mg
Mycobactin J	2,5 mg

Abfüllen zu je 6 ml in Kulturröhrchen.

Verschließen der Röhrchen.

Röhrchen in Schräglage in strömendem Dampf etwa 10 min koagulieren lassen.

Weitere Aufbewahrung der Nährböden im Kühlschrank (8 bis $10 \text{ }^\circ\text{C}$) bis zu maximal acht Wochen (dazu in PE-Beutel einschweißen).

Kontrolle

Nährmedium sollte eine grünlich-trübe Färbung aufweisen.

Sterilkontrolle: 7 d bei $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bebrüten.

Falldefinition - Paratuberkulose; *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*

Klinisches Bild

Klinische Symptome treten erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auf. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch progressive Abmagerung bis zur Kachexie und einen Rückgang der Milchleistung. Beim Rind (seltener bei Schaf, Ziege und Wildwiederkäuern) kann intermittierender, später chronischer therapieresistenter Durchfall beobachtet werden.

Inkubationszeit: sechs Monate bis mehr als zehn Jahre

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

im Kot, postmortal auch in der Dünndarmschleimhaut bzw. in Mesenteriallymphknoten:

- Mikroskopie (Nachweis säurefester Stäbchen)
- Kultureller Erregernachweis
- Genomnachweis mittels PCR

Indirekter Nachweis:

- Antikörpernachweis in Blutserum oder Milch (ELISA)

Zusatzinformation

Eine Serokonversion tritt erst im Alter von zwei bis drei Jahren und nicht bei allen Tieren auf. Die Sensitivität der ELISAs ist gering; sie wird beeinflusst von der Zusammensetzung der Tierpopulation und vom jeweiligen Antigen. Es sollten ELISAs mit einer Spezifität von ~ 99 % eingesetzt werden. Der alleinige Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* mittels ELISA begründet nur einen Verdacht auf Paratuberkulose. Positive Ergebnisse des Antikörpernachweises in Blutserum oder Milch mittels ELISA führen nicht zur Feststellung eines zu meldenden Falles.

Der Erregernachweis im Kot ist bei subklinisch infizierten Tieren häufig nicht möglich.

Der alleinige Nachweis säurefester Stäbchen (Ziehl-Neelsen-Färbung) weist nur auf das Vorhandensein von Mykobakterien hin.

Das alleinige nicht negative Ergebnis des Genomnachweises mittels PCR im Kot eines Einzeltiers ohne klinische Symptome bzw. ohne epidemiologischen Zusammenhang mit einem Paratuberkulose-Fall begründet nur einen Verdacht auf Paratuberkulose.

Epidemiologischer Zusammenhang

Die Infektion erfolgt vorwiegend oral, seltener intrauterin. Die Erkrankung wird durch Tierhandel und durch direkte Kontakte zwischen empfänglichen und ausscheidenden Tieren verbreitet. Größte epidemiologische

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

Bedeutung haben junge, subklinisch infizierte Tiere, bei denen sowohl der Erregernachweis als auch der Antikörpernachweis noch nicht möglich ist.

Voraussetzung für den Verdacht

- Vorliegen klinischer Symptome
- Positives Ergebnis des Antikörpernachweises in Blutserum oder Milch mittels ELISA
- Nicht negatives Ergebnis des Genomnachweises mittels PCR im Kot eines Einzeltiers

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles:

- klinischer Verdacht, der durch kulturellen Erregernachweis oder Genomnachweis aus Kot bzw. postmortal in Dünndarmschleimhaut oder Mesenteriallymphknoten bestätigt wird, oder
- kultureller Erregernachweis aus Kot oder Organmaterial bei klinisch unauffälligen Tieren oder
- positives Ergebnis des Genomnachweises mittels PCR im Kot bei einem Tier oder einer Gruppe von Tieren, die einen epidemiologischen Zusammenhang mit einem bestätigten Fall aufweisen, oder
- typische postmortale Befunde mit kulturellem Erregernachweis bzw. Genomnachweis.

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Empfehlungen des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern, Abschnitt III.1 Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose in Rinderhaltungen vom 7. Juli 2014, BAnz AT v. 01.08.2014 B1.
- Erste Bekanntmachung zur Änderung der Bekanntmachung von Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern vom 19. August 2014, BAnz AT 28.08.2014 B1
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz) in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Tierseuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser Seuchen darstellen
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen

Paratuberkulose (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)

- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)