

Dieses Projekt wurde mit Mitteln der Europäischen Union
und des Freistaates Thüringen gefördert:

„Tätigkeit von operationellen Gruppen der Europäischen Innovationspartnerschaft
(EIP) „Landwirtschaftliche Produktivität und Nachhaltigkeit“



Abschlussbericht der Operationellen Gruppe – ParaVac

Titel des EIP-Agri Innovationsvorhabens

Verfahren zur Senkung der Paratuberkulose-Neuinfektionsrate in Milchziegenbetrieben durch Impfung

Förderkennzeichen TAB: 2019 LFE 0017

Projektlaufzeit: 01.02.2020-15.03.2023

Projektförderung (Summe Zuschuss): EUR 224.777,44

Vertreter der OG

Projektkoordination/ Ansprechpartner: Friedrich-Loeffler-Institut / Dr. Heike Köhler

Mitglieder der Operationellen Gruppe und assoziierte Partner:

Thüringer Tierseuchenkasse, Landwirtschaftsbetrieb Hof Rösebach



THÜRINGER
TIERSEUCHENKASSE



Anstalt des
öffentlichen Rechts

Autoren des Abschlussberichts

Unter Mitwirkung von Dr. Heike Köhler, Prof. Dr. Karsten Donat, Chris Pickrodt, Dr. Udo Moog, Frank Burkhardt

Datum: 21.11.2023

Informationen für die landwirtschaftliche Praxis

OG: ParaVac

Projekt: Verfahren zur Senkung der Paratuberkulose-Neuinfektionsrate in Milchziegenbetrieben durch Impfung

Ausgangslage und Zielsetzung

Intensiv wirtschaftende Milchziegenbetriebe sind häufig stark von Paratuberkulose, einer chronischen Darminfektion, betroffen. Die OG schloss sich zusammen um zu untersuchen, ob durch die Impfung in Kombination mit Hygiene- und Managementmaßnahmen eine Senkung der Paratuberkulose-Prävalenz möglich ist und ob es dadurch zu einer verminderten Erregerausscheidung in die Milch/Kolostrum kommt. Auf dieser Basis sollten Empfehlungen für die Paratuberkulose-Bekämpfung in Milchziegenbetrieben erarbeitet werden.

Projektdurchführung

Nach einer Gesamtbestandsimpfung im Jahr 2018 wurden im Projektverlauf jährlich alle weiblichen Lämmer, die zur Bestands-Remontierung vorgesehen waren, mit einer Inaktivat-Vakzine gegen Paratuberkulose geimpft.

Durch halbjährliche kulturelle Untersuchung (insgesamt 6) von Kotproben aller Ziegen älter als 6 Monate wurde der Anteil der Ziegen ermittelt, die den Erreger der Paratuberkulose ausscheiden.

Um Ansteckungsquellen für Lämmer zu identifizieren, wurden das Vorkommen und die Menge des Paratuberkulose-Erregers auf der Euterhaut und im Kolostrum von Mutterziegen unmittelbar nach der Ablammung, sowie in Proben aus der Stallumgebung (Einstreu, Staub, Wasser, Futter) untersucht.

Zusätzlich wurde in einem Stallgefährtenvergleich zwischen infizierten und unverdächtigen Ziegen der Einfluss der Paratuberkulose auf Stoffwechsel- und Milchleistungsparameter untersucht.

Ergebnisse und Erfahrungen

Die Prävalenz Erreger-ausscheidender Ziegen sank von 30,0 % im Jahr 2018 auf 3,5 % im Herbst 2022. Dazu trugen sowohl die Impfung als auch die Entfernung bekannter Ausscheider bei.

Der Paratuberkulose-Erreger war nicht im Kolostrum geimpfter Mutterziegen nachweisbar, bei wenigen Tieren wurde jedoch eine geringe Kontamination der Euterhaut festgestellt. Da kein Vergleich mit ungeimpften Ziegen möglich war konnte nicht abgeklärt werden, ob es infolge der Impfung zu einer Verminderung der Belastung gekommen ist.

Vermehrungsfähige Paratuberkulose-Erreger waren in der Einstreu und im Staub aus der Stallumgebung nachweisbar. Bereiche mit hohem Tierverkehr waren besonders häufig positiv. Der Erregernachweis in Ablammbuchten machte deutlich, dass in diesen Bereichen eine Ansteckung der Nachzucht leicht möglich ist. Genetisches Material des Paratuberkulose-Erregers wurde in Einstreu, Staub, Futter und Wasserproben nachgewiesen. Das zeigt, dass der Erreger luftgetragen im gesamten Bestand verteilt werden kann.

In weiterführenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob auf der Basis von Umgebungsproben ein Verfahren entwickelt werden kann, mit dem der Paratuberkulose-Status eines Bestandes auf einfache und kostengünstige Weise zu ermitteln ist.

Bei dem Stallgefährtenvergleich klinisch-chemischer Parameter zur Bewertung der Stoffwechselsituation zwischen unverdächtigen und infizierten Ziegen wurde festgestellt, dass es bereits bei infizierten Tieren, die noch keine Symptome einer Infektion zeigen, zu einer

Verminderung des Gesamtproteins und des Albumingehaltes im Blutserum kommt. Diese Abweichungen sind bei starken Ausscheidern besonders ausgeprägt und gekoppelt mit einer deutlich verminderten Milchmenge pro Tag.

Empfehlungen für die Praxis

Aus den Ergebnissen leiten sich folgende Handlungsempfehlungen für Ziegenhalter ab:

- Umgebungsuntersuchungen sind geeignet für die Bestimmung des Paratuberkulose-Status einer Herde
- Die Lämmeraufzucht sollte mutterlos in einem separaten Bereich (räumlich/baulich getrennt von den adulten Tieren) erfolgen. Die Trennung von Mutter und Lamm ist schnellstmöglich nach der Geburt vorzunehmen.
- Lämmer von bekannt positiven Tieren sollten nicht für die Eigenremontierung genutzt werden.
- Kolostrum oder Milch von bekannten Paratuberkulose-positiven Tieren sollten nicht vertränkt werden, ebenso wenig wie Mischkolostrum.
- Bekannt positive Tiere sollten getrennt aufgestellt und baldmöglichst aus der Herde entfernt werden.
- Bei schlechter Milchleistung sollten diese Tiere sofort entfernt werden – eine starke Erregerausscheidung ist wahrscheinlich.
- Die Impfung trägt zur Reduzierung der Ausscheidung des Paratuberkulose-Erregers bei und sollte in Paratuberkulose-infizierten Ziegenbeständen implementiert werden. Nach einer einmaligen Impfung aller adulten Ziegen sollte die jährliche Nachzucht möglichst frühzeitig geimpft werden.

Diese Empfehlungen für die Bekämpfung der Paratuberkulose bei Milchziegen werden in Form eines Leitfadens auf der Homepage des FLI, Nationales Referenzlabor (NRL) für Paratuberkulose zur Verfügung gestellt und werden direkt in die Beratungstätigkeit des Thüringer Schaf- und Ziegengesundheitsdienstes einfließen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
A Kurzdarstellung	4
I Kurze Zusammenfassung des Projektes (Deutsch)	4
II Mitglieder der OG	6
III Verwendung der Zuwendungen	6
B Eingehende Darstellung	8
I Situation zu Projektbeginn	8
• Ausgangssituation und Bedarf/Problembeschreibung	8
• Stand des Wissens.....	8
II Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens	11
III Projektverlauf	11
C Ergebnisse des Innovationsprojektes.....	15
I Aufführung der Ergebnisse	15
• Prävalenzentwicklung im Bestand.....	15
• Identifizierung von Infektionsquellen sowie Charakterisierung des Infektionsdrucks im Bestand	16
• Auswirkungen der MAP-Infektion auf die Milchleistung und auf Stoffwechselfparameter	19
II Diskussion der Ergebnisse.....	21
III Nutzung der Ergebnisse und Empfehlungen für die Praxis	22
IV Ausblick: Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit.....	22
V Öffentlichkeitsarbeit (Wissenstransfer & Erfahrungsaustausch)	23
VI Schlussfolgerungen	24
D Zusammenarbeit der Operationellen Gruppe	24
Anhang.....	26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der im Rahmen der Methodenevaluierung verglichenen drei Aufarbeitungsmethoden zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ziegenkolostrum

Abbildung 2: Lokalisation der definierten Entnahmestellen für Umgebungsproben im Ziegenstall.

Abbildung 3: Entnahme von Kolostrum (links) und von Eutertupfern (rechts) bei Ziegen im Projektbetrieb

Abbildung 4: Stalleingänge vor (links) und nach der Asphaltierung (rechts)

Abbildung 5: Ersatz der Trogränken (links) durch Schwimmertränken (rechts)

Abbildung 6: Ergebnisse der kulturellen Gesamtbestandsuntersuchungen von Kotproben nach Abschluss der Lammzeiten in den Jahren 2018, 2020, 2021 und 2022.

Abbildung 7: Ergebnisse der real time PCR (C_T -Werte) einer Verdünnungsreihe MAP-gespikten Kolostrums nach Aufarbeitung mit ADIAPURE ParaTB Milk Kit (Methode 1 = nativ, Methode 2 = Zentrifugation).

Abbildung 8: Ergebnisse der real time PCR (Ct-Werte) bei Untersuchung von Tupferproben von Euterhaut, die mit den Suspensionen einer Verdünnungsreihe von MAP kontaminiert wurde. Vergleich von trockenen und angefeuchteten Tupfern.

Abbildung 9: links: Kolostrumproben nach erfolgter Immunomagnetseparation im Magnetständer, rechts: Ergebnisse der DNA-Amplifikation in der real time PCR (alle Proben negativ)

Abbildung 10: links: Eutertupfer in destilliertem Wasser, rechts: Ergebnisse der DNA-Amplifikation in der real time PCR (wenige Proben mit positiven Signalen)

Abbildung 11: links: Ergebnis des kulturellen Anzucht - Koloniewachstum von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* auf Herrold's Egg Yolk Medium mit Mycobactin (Becton Dickinson); rechts: Ergebnisse der DNA-Amplifikation in der real time PCR (viele Proben mit positiven Signalen)

Abbildung 12: Analyseergebnisse der im Ziegenstall entnommenen Umgebungsproben vom Mai 2020.

Abbildung 13: Kleinste quadratische Mittelwerte ($\pm 95\%$ Konfidenzintervall) für Gesamtprotein (a) und Albumin (b) von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* unverdächtigen (1) und -infizierten (2) Ziegen entsprechend der Klassifizierung anhand des Ergebnisses der Kotkultur (a = aktuell keine Ausscheidung, b = schwache Ausscheidung, c = starke Ausscheidung).

Abbildung 14: Kleinste quadratische Mittelwerte ($\pm 95\%$ Konfidenzintervall) für die Milchmenge von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* unverdächtigen (1) und -infizierten (2) Ziegen entsprechend der Klassifizierung anhand des Ergebnisses der Kotkultur (a = aktuell keine Ausscheidung, b = schwache Ausscheidung, c = starke Ausscheidung).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Budget, Kostenplan

Tabelle 2: Ablauf des Vorhabens, Zeitplan mit Arbeitspaketen und Meilensteinen

Tabelle 3: Entwicklung des Anteils an Ziegen älter als 1 Jahr, bei denen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* kulturell im Kot nachgewiesen werden konnte

A Kurzdarstellung

I Kurze Zusammenfassung des Projektes (Deutsch)

Paratuberkulose, eine chronische Darminfektion hervorgerufen durch *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), stellt für Milchziegenbestände auch in Thüringen ein zunehmendes gesundheitliches Problem dar und gefährdet die wirtschaftliche Wettbewerbsfähigkeit der betroffenen Betriebe. In stark durchseuchten Beständen ist eine schnelle Entfernung aller Test-positiven Tiere ohne zum Teil existenzbedrohende wirtschaftliche Folgen nicht möglich. Eine vertretbare Alternative könnte die Impfung der Tiere in Kombination mit geeigneten Managementmaßnahmen darstellen. In dieser Operationellen Gruppe kooperierten ein Thüringer Milchziegenbetrieb, der nach Bioland-Kriterien arbeitet, die Thüringer Tierseuchenkasse mit ihrem Schaf- und Ziegengesundheitsdienst und das Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose, um zu untersuchen, ob durch die Impfung in Kombination mit Hygiene- und Managementmaßnahmen eine Senkung der Paratuberkulose-Prävalenz möglich ist und ob dadurch die Erregerausscheidung in die Milch/Kolostrum sowie der Infektionsdruck in der Stallumgebung beeinflusst wird. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen der Infektion auf den Stoffwechsel und die Milchleistung der Tiere analysiert werden. Auf dieser Basis sollten Empfehlungen für die Paratuberkulose-Bekämpfung in Milchziegenbetrieben unter Einbeziehung der Impfung erarbeitet werden.

Nach einer Gesamtbestandsimpfung im Jahr 2018 wurden im Projektverlauf jährlich alle weiblichen Lämmer, die zur Bestandsremontierung vorgesehen waren, mit einer inaktivierten Vakzine gegen MAP geimpft. Die Entwicklung des Anteils der Ziegen, die MAP ausschieden, wurde über einen Zeitraum von drei Jahren durch 6 halbjährliche kulturelle Untersuchungen von Kotproben aller Ziegen älter als 6 Monate ermittelt. Um Ansteckungsquellen für die Lämmer zu identifizieren, wurden a) das Vorkommen und die Menge an MAP auf der Euterhaut und im Kolostrum von Mutterziegen unmittelbar nach der Ablammung untersucht und b) durch wiederholte Testung von Proben aus der Stallumgebung (Einstreu, Staub, Wasser, Futter) die Bereiche im Stall lokalisiert, von denen ein besonders hohes Risiko einer Exposition mit MAP ausgeht. Über den Zeitraum eines Produktionsjahrs erfolgte ein Stallgefährtenvergleich zwischen MAP-positiven und altersgleichen MAP-unverdächtigen Ziegen, der die Auswertung der Ergebnisse der monatlichen Milchleistungsprüfung sowie eine vierteljährliche Untersuchung von Stoffwechselfparametern in Blutproben der einbezogenen Tiere beinhaltete. Die Prävalenz Erreger-ausscheidender Ziegen sank von 30,0 % im Jahr 2018 vor Implementierung der Impfstrategie auf 3,5 % im Herbst 2022. Jedoch kam es trotz Impfung im Lammalter weiterhin zu MAP-Infektionen in der Herde. Der Paratuberkulose-Erreger war nicht im Kolostrum von Mutterziegen aus dem Bestand nachweisbar und nur bei wenigen Ziegen wurde MAP auf der Euterhaut nachgewiesen. Vermehrungsfähige Paratuberkulose-Erreger waren in der Einstreu und selten im Staub aus der Stallumgebung nachweisbar. Bereiche mit hohem Tierverkehr, wie das Melkkarussell, waren besonders häufig positiv. Der Erregernachweis in Ablambbuchten machte deutlich, dass in diesen Bereichen eine Ansteckung der Nachzucht leicht möglich ist. Bei dem Stallgefährtenvergleich zwischen unverdächtigen und infizierten laktierenden Ziegen wurde festgestellt, dass es bereits bei infizierten Tieren, die noch keine Symptome einer Infektion zeigen, zu einer Verminderung des Gesamtproteingehaltes und des Albumingehaltes im Blutserum kam. Diese Abweichungen waren bei starken Ausscheidern besonders ausgeprägt und gekoppelt mit einer deutlich verminderten Milchmenge pro Tag.

Zusammenfassend erwies sich die Impfung gegen Paratuberkulose als sinnvoller Aspekt im Rahmen eines Sanierungskonzeptes, der aber als alleinige Maßnahme nicht zur Eradikation der Erkrankung führen wird. Um das Expositionsrisiko für Jungtiere gezielt minimieren zu können ist die Identifizierung der Stallbereiche mit einer besonders hohen MAP-Belastung sinnvoll.

Summary (English)

Herd health of dairy goats in Thuringia is increasingly affected by paratuberculosis, a chronic intestinal infection caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), endangering the economic competitiveness of the farms. In heavily affected farms, the rapid removal of all test-positive animals is not possible without existence-threatening economic consequences. Vaccination could be a reasonable alternative in combination with suitable management measures. A Thuringian dairy goat farm working according to Bioland criteria collaborated in this operational group with the Sheep and Goat Health Service of the Thuringian Animal Diseases Fund and the National Reference Laboratory for Paratuberculosis at the Friedrich-Loeffler-Institut to investigate if reduction of paratuberculosis prevalence is possible by vaccination in combination with hygienic and management measures, and whether this influences shedding of MAP via milk or colostrum as well as environmental contamination in the barn. In addition, it was planned to analyse the effects of the infection on the metabolism and milk yield of the animals. On this basis, recommendations for paratuberculosis control in dairy goat farms were to be developed, including vaccination.

After a whole-herd vaccination in 2018, the annual female replacement kids were vaccinated with an inactivated vaccine against MAP. The development of the proportion of MAP shedders was observed over a three-years period by six bi-annual whole-herd faecal culture examinations of all goats older than six months. To identify sources of infection for the kids, a) presence and amount of MAP on the udder skin and within colostrum of does was examined immediately after kidding and, b) areas in the barn that pose a particularly high risk of exposure to MAP were localized by repeated testing of samples from the barn environment (bedding, dust, water, feed). Over the period of one production year, a herd mate comparison was made between MAP-positive and age-matched MAP-non-suspect goats, which included the evaluation of the results of the monthly milk performance test and a quarterly examination of metabolic parameters in blood samples of the animals.

Prevalence of MAP shedding goats decreased from 30.0 % in the year 2018 before implementation of the vaccination strategy to 3.5 % in autumn 2022. However, despite vaccination of kids, MAP infections still occurred in the herd. MAP was not detectable in colostrum and was only present on the udder skin of a few does. Viable MAP was isolated from bedding and rarely in dust from the barn environment. High animal traffic areas, such as the milking parlour, were more likely to yield positive culture results. Cultivation of MAP from kidding pens indicated this area as a possible infection site. Herd mate comparison between non-suspect and infected lactating goats revealed reduced total protein and albumin concentrations in serum even in goats that did not show signs of infection. These deviations were most pronounced in heavy shedders and accompanied by a markedly reduced daily milk yield.

In summary, vaccination against paratuberculosis is a meaningful tool within the framework of a herd control program, but as a sole measure it will not lead to eradication of the disease. In order to be able to specifically minimise the exposure risk for young animals, it makes sense to identify the stable areas with a particularly high MAP load.

II Mitglieder der OG

- **Landwirtschaftsbetrieb Hof Rösebach (BUR)**

Produktion von Ziegenmilch, Erzeugnissen aus Ziegenmilch und Direktvermarktung; Bereitstellung der Tiere und dazugehöriger Daten zur Auswertung sowie von Umgebungsproben, Umsetzung von Managementmaßnahmen (Impfung), personelle Hilfestellung bei der Probenahme

- **Thüringer Tierseuchenkasse, Schaf- und Ziegengesundheitsdienst (ThürTSK, Forschungspartner, Beratung)**

Mitarbeit bei der Probenahme, Stoffwechselanalysen, Beratungstätigkeit im Projektverlauf, Mitarbeit bei der Datenauswertung und bei der Erstellung wissenschaftlicher Publikationen, Mitarbeit bei der Erarbeitung von Handlungsempfehlungen

- **Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese (FLI, Forschungspartner, Projektkoordination)**

Probenahme von Einzeltier und Umgebungsproben, bakteriologische und molekularbiologische Laboruntersuchung der Proben, Datenauswertung, Erstellung wissenschaftlicher Publikationen, Federführung bei der Erarbeitung von Handlungsempfehlungen, Vortragstätigkeit, Projektkoordination

Die Probenahmen erfolgten im Landwirtschaftsbetrieb Hof Rösebach in Ifta, Wartburgkreis, Thüringen. Die Analysen der Proben erfolgten im TGD-Labor in Jena, Thüringen und im NRL für Paratuberkulose am Institut für molekulare Pathogenese des FLI in Jena, Thüringen.

III Verwendung der Zuwendungen

Tab. 1: Budget, Kostenplan

Ausgaben	Plan	IST				Zuschuss (80 %)
	(gem. Bescheid vom 10.12.2021)	abgerechnet	davon nicht zuwendungsfähig	Saldo	Zuschuss Bemessungsbetrag	
Reisetätigkeit	7.608,00	7.608,00	7,60	7.600,40	7.600,40	6.080,32
Personal	175.772,00	175.772,00	136,00	175.636,00	175.636,00	140.508,80
Wissenschaftliche Untersuchungen/Tests	66.120,00	68.197,22	0,00	68.197,22	66.120,00	52.896,00
Sachkosten/ -ausgaben	1.770,00	1.770,00	0,00	1.770,00	1.770,00	1.416,00
Gemeinkosten (15 %)	26.365,80	26.365,80	20,40	26.345,40	26.345,40	21.076,32
Öffentlichkeitsarbeit	3.500,00	3.500,00	0,00	3.500,00	3.500,00	2.800,00
Summe	281.135,80	283.213,02	164,00	283.049,02	280.971,80	224.777,44

Tab. 2: Ablauf des Vorhabens, Zeitplan mit Arbeitspaketen und Meilensteinen

Arbeitspaket (AP)	Zeitraum	Inhalt	Meilenstein
1	04/2020 – 03/2021	Methodenetablierung MAP-Nachweis in Kolostrum	03/2021: Nachweisverfahren von MAP in Kolostrum etabliert, Nachweisgrenze ermittelt
2	02/2018 (& 10/2018)	Ermittlung des Anteils an MAP-Ausscheidern vor Beginn der Impfung	Aus betriebswirtschaftlichen Gründen erfolgte die erste Impfung des Gesamtbestandes bereits im Jahr 2018, mehr als ein Jahr vor Projektbeginn. Im Vorfeld erfolgte die erste und einzige Gesamtbestandsuntersuchung ungeimpfter Tiere mittels Kotproben durch das FLI. Die Ergebnisse dieser Untersuchung dienten zur Berechnung des Anteils an MAP-Ausscheidern vor der Impfung. Der Infektionsdruck in der Umgebung des Bestandes vor der Impfung konnte nicht ermittelt werden.
3	Änderung Projektplan	Ermittlung des Infektionsdrucks im Bestand vor Beginn der Impfung	
4	05/2020 – 08/2021	Ermittlung des Ausmaßes der Milchleistungsminderung bei MAP-infizierten Ziegen	08/2021: Probenahmen zum Stallgefährtenvergleich abgeschlossen Der Stallgefährtenvergleich wurde inhaltlich ausgeweitet und umfasste neben den Daten der Milchleistungsprüfung (MLP) auch die Untersuchung von Stoffwechselfparametern.
5	27.07.2020 28.05.2021 27.04.2022	Impfung	04/2022: Jährliche Impfung der weiblichen Nachzucht abgeschlossen
6	04/2020 – 11/2022	Ermittlung des Anteils an MAP-Ausscheidern nach Impfung	11/2022: Sechs halbjährliche Gesamtbestandsuntersuchungen (Probenahmen) abgeschlossen. Abschluss der kulturellen Anzucht 06/2023.
7	05/2020 – 07/2022	Erfassung des Infektionsdrucks im Bestand nach Impfung	02/2023: Regelmäßige Umgebungsprobenahme abgeschlossen, räumliche und zeitliche Verteilung positiver Proben ermittelt.
8	07/2020 – 03/2023	Umsetzung gezielter seuchenhygienischer Maßnahmen im Bestand	03/2023: Neue seuchenhygienische Maßnahmen etabliert: Asphaltierung der Stallzugänge, Ersatz von Wassertrögen durch Selbsttränken Die Kolostrumerhitzung wurde nicht erprobt.
9	01/2021 – 03/2023	Statistische Auswertung und Erarbeitung von Empfehlungen zur Paratuberkulosebekämpfung in Milchziegenbetrieben	03/2023 – Statistische Analysen weitestgehend abgeschlossen. Erarbeitung des Leitfadens begonnen.

B Eingehende Darstellung

I Situation zu Projektbeginn

- ***Ausgangssituation und Bedarf/Problembeschreibung***

Die Paratuberkulose, hervorgerufen durch *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), ist in Deutschland flächendeckend verbreitet. Sie stellt für Milchziegenbestände auch in Thüringen ein zunehmendes gesundheitliches Problem dar und gefährdet damit die wirtschaftliche Wettbewerbsfähigkeit der betroffenen Bestände. Wirksame Verfahren zur Eindämmung bzw. Bekämpfung dieser Krankheit fördern daher die Wettbewerbsfähigkeit der Landwirtschaftsbetriebe.

Hinweise für die Bekämpfung lassen sich aus den „Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern“ des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), die schwerpunktmäßig auf Rinder abzielen, ableiten. Für die Bekämpfung beim Rind wird eine Kombination aus Diagnostik, Entfernung von Test-positiven Tieren und Implementierung wirksamer Hygiene- und Managementmaßnahmen empfohlen. Konkrete Vorgaben die an die Bedingungen bei der Haltung von kleinen Wiederkäuern, insbesondere Milchziegen, adaptiert sind existieren jedoch nicht. In stark durchseuchten Betrieben ist eine schnelle Entfernung aller Test-positiven Tiere ohne zum Teil existenzbedrohende wirtschaftliche Folgen nicht möglich. Eine ökonomische Alternative könnte die Impfung der Tiere in Kombination mit geeigneten Managementmaßnahmen darstellen. In Spanien ist eine Inaktivat-Vakzine zum Einsatz bei kleinen Wiederkäuern erhältlich (Gudair[®], CZ Veterinaria, Spanien). Diese Vakzine wird in verschiedenen Ländern (inklusive Deutschland) bereits in Ziegenbeständen eingesetzt. Daten über Wirksamkeit im Sinne einer Senkung der Neuinfektionsrate liegen aber bisher nicht vor. Diese sind jedoch notwendig, um die Wirksamkeit des Verfahrens bewerten zu können.

Durch eine Kooperation zwischen einem Praxisbetrieb, der nach Bioland-Kriterien arbeitet und in dem ein Anteil an MAP-Ausscheidern von 30,0 % festgestellt wurde, der Thüringer Tierseuchenkasse und dem Friedrich-Loeffler-Institut sollte untersucht werden, ob durch die Impfung in Kombination mit Hygiene- und Managementmaßnahmen eine Senkung der Paratuberkulose-Prävalenz in einem großen, intensiv wirtschaftenden Milchziegenbetrieb möglich ist und ob es dadurch zu einer verminderten Erregerausscheidung in die Milch/Kolostrum kommt. Auf dieser Basis sollten Empfehlungen für die Paratuberkulose-Bekämpfung in Milchziegenbetrieben unter Einbeziehung der Impfung erarbeitet werden. Das konkrete Ausmaß der wirtschaftlichen Folgen der Paratuberkulose für Milchziegenbetriebe (Milchleistungsminderung, Beeinträchtigung des Zuchtviehhandels) sollte analysiert werden.

- ***Stand des Wissens***

Die Paratuberkulose, eine chronische granulomatöse Enteritis, stellt weltweit eine der wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten der Wiederkäuer dar. Sie ist in Deutschland bei Rindern flächendeckend verbreitet und betrifft ebenso Schaf- und Ziegenbestände. Seit 2009 steigt die Zahl der jährlich im Tierseuchennachrichtensystem (TSN) gemeldeten Fälle bei Ziegen kontinuierlich an. In Thüringen sind 18,2 % der Ziegenbestände von Paratuberkulose betroffen, die scheinbare Intra-Herden-Prävalenz beträgt 14,2 % (1). Insbesondere in Milchziegenbetrieben führt die Erkrankung zu erheblichen direkten und indirekten Verlusten, die durch verminderte Milchleistung und Fruchtbarkeit (2), therapieresistente Durchfälle, Abmagerung bis zur Kachexie und Todesfälle bedingt sind (3). Eine Therapie steht nicht zur Verfügung. Bei Rindern wurde pro Milchkuh mit positivem kulturellem MAP-Nachweis eine mittlere Reduktion der Milchleistung um 5,9% im Vergleich zu MAP-negativen Stallgefährten ermittelt (4). Die Einbußen bei Schafen schätzt man auf 38,33 USD pro Tier und Jahr (5). Daten über den tatsächlichen Umfang der Milchleistungsverluste

infolge einer MAP-Infektion bei Ziegen existieren bisher nicht, und sollen in Rahmen des Projekts erhoben werden. Es ist zudem von erheblichen Gewinneinbußen und erhöhten Kosten, nicht zuletzt durch Diagnostik, Therapieversuche und Bekämpfungsmaßnahmen, auszugehen (6).

Auf Grund ihrer wirtschaftlichen und gesundheitlichen Konsequenzen ist die Paratuberkulose in Deutschland seit 1970 meldepflichtig. Sie wurde im Tiergesundheitsrechtsakt der Europäischen Union (VO (EU) 2016/429) gelistet und in der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 Kategorie E (Monitoring) eingestuft. Sie wird von der Weltorganisation für Tiergesundheit (WOAH) auf der Liste der notifizierungspflichtigen Tierkrankheiten geführt (Terrestrial Animal Health Code, 2022).

Seit Jahren wird eine Bedeutung von MAP in der Pathogenese von Morbus Crohn (MC), einer chronischen entzündlichen Erkrankung des Gastrointestinaltraktes beim Menschen, kontrovers diskutiert. Die Datenlage in der Fachliteratur ist widersprüchlich. Eine statistische Meta-Analyse von Studien zum zoonotischen Potenzial von MAP ergab, dass bei MC-Patienten ein erhöhtes Risiko für das Vorkommen von MAP-Genom bzw. von spezifischen Antikörpern gegen MAP besteht als bei Kontrollpersonen mit anderen Darmerkrankungen bzw. gesunden Personen (7). Andererseits belegen viele Studien, dass es sich bei MC um ein multifaktorielles Syndrom handelt, in dessen Ätiologie verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. Dazu gehören Dysbalancen in der Darmflora, eine gestörte Funktion der Darmschleimhaut (leaky gut), Dysregulationen der Abwehrmechanismen im Darm, genetische Disposition sowie sozio-ökonomische Faktoren. Das Robert-Koch-Institut (RKI) und das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) kamen in einer systematischen Literaturstudie (8) zu dem Ergebnis: „die identifizierten und ausgewerteten Studien [...] erlauben es bestenfalls, die Hypothese aufzustellen bzw. zu unterstützen, dass MAP am Krankheitsgeschehen von Morbus Crohn beteiligt sein könnte.“ Eine Exposition von Menschen mit MAP durch kontaminierte Lebensmittel wie Milchprodukte, rohes Fleisch und Trinkwasser ist in zahlreichen Studien dokumentiert (9). Aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes gilt es deshalb, durch hygienische und Bekämpfungsmaßnahmen in betroffenen Beständen den Eintrag von MAP in die Lebensmittelkette so gering wie möglich zu halten. In der Rohmilch von Ziegen war der MAP-Nachweis mittels PCR möglich (10). Zahlreiche Milchziegenbetriebe haben sich auf die Herstellung von Rohmilchkäse spezialisiert. Daher spielt dieser Aspekt bei Milchziegen eine große Rolle.

Ziegen gelten als weniger resistent gegenüber einer MAP-Infektion als Rinder und Schafe (11). Die effektive Infektionsdosis steigt mit zunehmendem Alter der Tiere. Adulte Tiere werden, außer bei extrem hohem Infektionsdruck, als resistent gegenüber einer Infektion angesehen (6). Risikofaktoren, die zur individuellen Empfänglichkeit beitragen sind schlechte Hygiene, kontaminierte Milch, unzureichende Fütterung und ein schlechter Allgemeinzustand (6). Risikofaktoren für Herden sind u.a. eine Herdengröße über 200 Tiere (12) und eine intensive Tierhaltung (13). Infizierte Wiederkäuer scheiden den Erreger über den Kot, Kolostrum oder Milch schon in einem Stadium aus, in dem die gegenwärtig verfügbaren diagnostischen Verfahren die Tiere noch nicht als infiziert erkennen können. Daraus resultiert, dass mit einer einmaligen Untersuchung eine Identifizierung aller betroffenen Tiere nicht möglich ist. Infizierte Tiere verbleiben über lange Zeit unerkannt im Bestand und tragen zu einer Exposition empfänglicher Jungtiere bei. MAP ist zudem durch eine lange Überlebensfähigkeit in der Umwelt charakterisiert. Die Bekämpfung der Erkrankung erfordert deshalb eine Merzung positiver Tiere in Kombination mit begleitenden Maßnahmen, die zur Unterbrechung der Infektkette und zur Senkung des Infektionsdrucks beitragen. In ziegenhaltenden Betrieben hat sich die mutterlose Aufzucht der Lämmer als Verfahren zur Infektkettenunterbrechung bewährt (14).

Die Umsetzung umfassender seuchenhygienischer Maßnahmen stellt für stark durchseuchte Betriebe eine hohe wirtschaftliche Belastung dar. Die Impfung wird dagegen als kosteneffektive Strategie zur Beherrschung der Paratuberkulose angesehen (15). Die Effekte der Impfung bei Rind und kleinen Wiederkäuern wurden international in zahlreichen Studien untersucht und in Meta-Analysen zusammengefasst. Zur Anwendung kamen Lebendvakzinen und Inaktivat-Vakzinen. Die existierenden Vakzinen verzögern das Auftreten klinischer Symptome, verbessern das Körpergewicht, vermindern die Mortalität und die fäkale Erregerausscheidung und reduzieren das Ausmaß der pathologischen Veränderungen an Darm und Lymphknoten (16-18). Es gibt Hinweise darauf, dass bei geimpften Ziegen auch die Streuung von MAP in das Eutergewebe, und damit potenziell auch eine laktogene Ausscheidung des Erregers vermindert wird (eigene unveröffentlichte Daten). Diese Daten lassen vermuten, dass die Impfung zu einer Senkung des Infektionsdrucks im Bestand und damit auch zu einer Verminderung der Neuinfektionsrate beitragen kann.

Derzeit ist in der EU lediglich in Spanien eine Inaktivat-Vakzine auf dem Markt, die für die Anwendung bei kleinen Wiederkäuern konzipiert ist (Gudair[®], CZ Veterinaria, Spanien). Für diesen Impfstoff existiert in Deutschland keine Zulassung durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI), deshalb ist eine Anwendung nur auf der Basis einer Ausnahmegenehmigung durch die zuständigen Landesbehörden in Abstimmung mit dem PEI möglich. Bisher wird der Impfstoff in einigen Milchziegenbeständen eingesetzt, die durch die Klinik für kleine Klauentiere der TiHo Hannover betreut werden. Es zeigte sich, dass Gudair[®] bei Ziegen eine Serokonversion hervorruft (19). Bisher liegen keine Daten dazu vor, ob die Impfung zu einer Reduktion der laktogenen MAP-Ausscheidung führt und wie die Neuinfektionsrate beeinflusst wird.

Die Bekämpfung der Paratuberkulose in Deutschland erfolgt vorwiegend auf freiwilliger Basis. Durch das BMEL wurden im Jahr 2014 „Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern“ veröffentlicht (20), die unter dem Punkt III „Hygienemaßnahmen bei besonderen Krankheiten“ fachlich fundierte Maßnahmen zum Schutz gegen die Paratuberkulose in Rinderhaltungen enthalten. Vergleichbare Empfehlungen für Ziegen, insbesondere Milchziegenhaltungen gibt es bisher nicht. Daher sollen in diesem Projekt Basisdaten für solche Empfehlungen erarbeitet werden.

Literaturquellen:

1. Wehrle F, Moog U, Donat K, Köhler H, Klassen A. Verbreitung der Paratuberkulose in Thüringer Schaf- und Ziegenherden. Tierärztliche Praxis (im Review).
2. Kostoulas P, Leontides L, Billinis C, Amiridis GS, Florou M. The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity. *Prev Vet Med.* 2006;74(2-3):226-38.
3. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology.* 1997;116(3):217-61.
4. McAloon CG, Whyte P, More SJ, Green MJ, O'Grady L, Garcia A, et al. The effect of paratuberculosis on milk yield-A systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci.* 2016;99(2):1449-60.
5. Vinodhkumar OR, Gunaseelan L, Ronald BSM, Sakthivelan SM. Slaughterhouse prevalence of ovine paratuberculosis in Southern India. *Trop Anim Health Pro.* 2013;45(4):1063-9.
6. Djonne B. Paratuberculosis in goats. In: Behr MA, Collins, D. M., editor. *Paratuberculosis Organism, Disease, Control.* Wallingford, Cambridge MA: CAB International; 2010. p. 169-78.
7. Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(9):607-13.
8. Schrauder A, Ammon A, Stark K, Euler U, Bräunig J, Weise E. Morbus Crohn und *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* - eine Literaturstudie. 2003.
9. Waddell L, Rajic A, Stark K, McEwen SA. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Prev Vet Med.* 2016;132:32-48.
10. Djonne B, Jensen MR, Grant IR, Holstad G. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol.* 2003;92(1-2):135-43.
11. Stewart DJ, Vaughan JA, Stiles PL, Noske PJ, Tizard MLV, Prowse SJ, et al. A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Veterinary Microbiology.* 2007;122(1-2):83-96.

12. Mainar-Jaime RC, Vazquez-Boland JA. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain). *Prev Vet Med.* 1998;34(4):317-27.
13. Barrero-Dominguez B, Luque I, Huerta B, Gomez-Laguna J, Galan-Relano A, Gomez-Gascon L, Sanchez M, Astorga RJ. Paratuberculosis in dairy goat flocks from southern Spain: risk factors associated with seroprevalence. *Vet Rec.* 2019;185:600. doi: 10.1136/vr.105465.
14. Nagel-Alne GE, Asheim LJ, Hardaker JB, Sølverød L, Lindheim D, Valle PS. The Norwegian Healthier Goats programme – A financial cost-benefit analysis. *Prev Vet Med.* 2014;114:96-105.
15. Juste RA, Perez V. Control of Paratuberculosis in Sheep and Goats. *Vet Clin N Am-Food A.* 2011;27(1):127.
16. Bastida F, Juste RA. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines.* 2011;9:8.
17. Gierke F. Evaluation der Impfung gegen Paratuberkulose beim Rind als Bekämpfungsmaßnahme : Abschlussbericht zum Projekt. Friedrich-Loeffler-Inst., 2009.
18. Jayaraman S, Jain M, Dhama K, Singh S V, Datta M, Jain N, Chaubey K K, Gupta S, Aseri GK, Khare N, Yadav P, Bhatia AK, Sohal JS. DIVA technology: indispensable tool for the control of Johne´s disease. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.* 2016;4(1).
19. Stau A, Ganter M. Impfreaktionen und Nebenwirkungen einer Vakzination gegen Paratuberkulose bei Milchziegen. *Tierärztl Praxis.* 2012; 40 G(1):14-20.
20. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), 2014. Empfehlungen des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern. Banz AT 01.08.2014 B1, 1-17.

II Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens

Ziel dieses Innovationsprojektes war es,

- 1) zu ermitteln, in welcher Größenordnung über einen Zeitraum von drei Jahren durch die Impfung mit einer Inaktivat-Vakzine die Neuinfektionsrate in einem intensiv wirtschaftenden Milchziegenbestand reduziert wird,
- 2) festzustellen, ob ein Risiko besteht, dass infizierte Ziegen MAP lactogen ausscheiden und ob dieses Risiko durch die Impfung beeinflusst wird,
- 3) Empfehlungen für die Paratuberkulosebekämpfung in Milchziegenbetrieben unter Einbeziehung der Impfung zu erarbeiten und
- 4) über einen Stallgefährtenvergleich das Ausmaß der Milchleistungsminderung bei MAP-infizierten Ziegen zu ermitteln.

III Projektverlauf

- Das Ziel des **AP1** war es, eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von MAP in Kolostrum von Ziegen zu etablieren. Es wurden drei verschiedene Methoden erprobt und zwei davon hinsichtlich ihrer analytischen Sensitivität verglichen (Abb. 1). Es sollte das Verfahren ausgewählt werden, das für den MAP-Nachweis in Kolostrum am geeignetsten ist.
- **AP 2** hatte zum Inhalt, den Anteil an MAP-Ausscheidern vor Beginn der Impfung zu ermitteln, um die Ausgangssituation bezüglich der Paratuberkulose-Prävalenz im Bestand zu erfassen. Dies wurde retrospektiv anhand der Ergebnisse einer Gesamtbestandsuntersuchung im Jahr 2018 getan, die durch das FLI in Zusammenarbeit mit der Thür-TSK durchgeführt wurde. Es erfolgte die kulturelle Untersuchung von Einzeltierkotproben auf MAP. Dabei wurde das in der Amtlichen Methodensammlung, die vom FLI herausgegeben wird, veröffentlichte Verfahren angewendet.

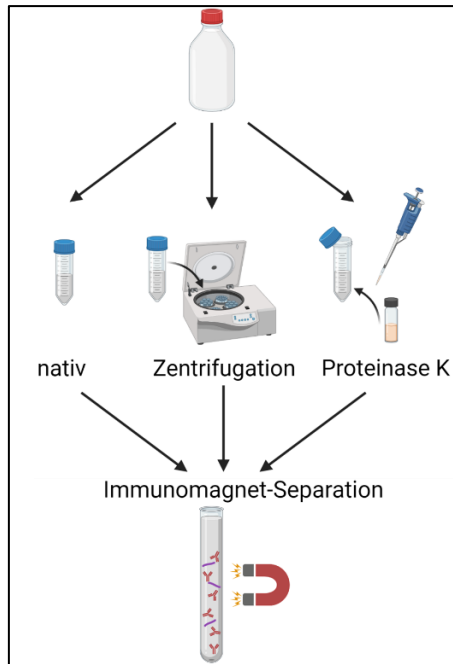


Abb. 1: Schematische Darstellung der im Rahmen der Methodenevaluierung verglichenen drei Aufarbeitungsmethoden zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ziegenkolostrum (© Chris Pickrodt. Created with BioRender.com.)

- **AP3/AP7:** Da auf Grund der hohen Erkrankungsrate im Bestand die erste Impfung des Gesamtbestandes mit der Inaktivat-Vakzine Gudair® bereits Ende 2018 sowie im Lauf des Jahres 2019 erfolgen musste, war eine Ermittlung des Infektionsdrucks im Bestand vor der Impfung nicht mehr möglich. Die erste Probenahme in diesem Arbeitspaket fand daher unmittelbar nach Projektbeginn in der Stallumgebung der geimpften Herde statt. Um die MAP-Belastung der Stallumgebung beurteilen zu können wurden verschiedene Entnahmeorte definiert an welchen jeweils verschiedene Probenmaterialien (Einstreu, Staub, Wasser, Futter) entnommen wurden (Abb. 2).

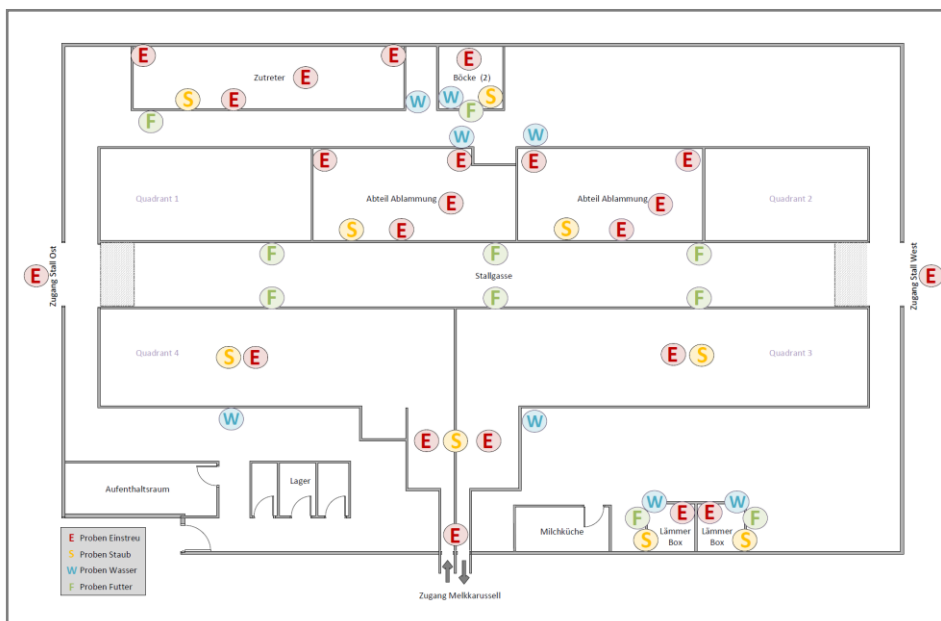


Abb. 2: Lokalisation der definierten Entnahmestellen für Umgebungsproben im Ziegenstall. E = Einstreu, S = Staub, W = Wasser, F = Futter (© Chris Pickrodt)

Um die Einflüsse eines zeitlichen Verlaufes und insbesondere der abnehmenden Anzahl an MAP-Ausscheidern in der Herde abzubilden fanden innerhalb der Projektzeit acht Probennahmen statt. Die Aufarbeitung der Proben mit anschließender Untersuchung auf vermehrungsfähige Erreger und Erreger-DNA fand mit eigens dafür etablierten Methoden statt (s. Publikation 2 im Anhang). Des Weiteren wurden während zwei Lammzeiten direkt nach der Ablammung Kolostrumproben und Eutertupfer (s. Abb. 3) von 55 Ziegen sowie das an die Lämmer vertränkte Sammelkolostrum entnommen. Diese Proben wurden mit den im AP1 evaluierten Methoden untersucht (s. Publikation 1 im Anhang).



Abb. 3: Entnahme von Kolostrum (links) und von Eutertupfern (rechts) bei Ziegen im Projektbetrieb (© FLI)

- **AP4:** Die Datenerfassung für die Ermittlung der Milchleistungsminderung und Paratuberkulose-bedingter gesundheitlicher Veränderungen im Stallgefährtenvergleich zwischen MAP-positiven und altersgleichen MAP-unverdächtigen Ziegen fand über den Zeitraum eines Produktionsjahres statt. Dies beinhaltete die monatlichen Ergebnisse der Milchleistungsprüfung sowie die Untersuchung von Einzeltierkotproben zur Bestimmung des aktuellen Ausscheidungsstatus. In Ergänzung des ursprünglichen Projektplans wurde eine vierteljährliche Untersuchung von Stoffwechselfparametern bei beiden Gruppen in den Arbeitsplan aufgenommen. Die Untersuchung der Kotproben fand im FLI, die der Blutserumproben durch das Labor der ThürTSK statt. Im Anschluss erfolgte eine statistische Auswertung aller Daten mittels linearer gemischter Modelle, um signifikante Unterschiede zwischen den Stallgefährten zu ermitteln.
- **AP5:** Im Juli 2020 fand die Impfung der Lämmer des Jahrgangs 2020 mit der Inaktivat-Vakzine Gudair® planmäßig statt. Es wurden 120 Lämmer im Alter von etwa 5 Monaten immunisiert. Im Jahr 2021 wurden keine im Betrieb geborenen Lämmern zur Remontierung der Herde genutzt. Stattdessen wurden 30 weibliche Ziegen sowie ein Bocklamm aus einer anderen, MAP-unverdächtigen, Haltung von Thüringer Wald Ziegen zugekauft. Die Impfung dieser Tiere mit der Inaktivat-Vakzine Gudair® fand im Alter von ca. 3 Monaten noch im Herkunftsbestand statt. Die Tiere wurden im September 2021 in den Projektbestand verbracht. 2022 remontierte der Projektbetrieb erneut aus der eigenen Nachzucht. Es wurden 78 Lämmer im Alter von etwa 3 Monaten mit der Inaktivat-Vakzine Gudair® immunisiert.
- **AP6:** Im halbjährlichen Abstand wurden jeweils nach der Lammzeit im Frühjahr und gegen Ende der Weidesaison zum Herbstende alle im Betrieb befindlichen Ziegen im Alter von mehr als 6 Monaten beprobt. Hierfür wurde von jedem Tier eine Kotprobe entnommen und

kulturell untersucht um eine aktuelle Ausscheidung von MAP festzustellen und den jeweiligen Infektionsstatus der Einzeltiere zu definieren. Die Anzucht erfolgte in Übereinstimmung mit dem in der Amtlichen Methodensammlung veröffentlichten Verfahren. Eine Ziege galt als positiv sobald MAP in mindestens einer der zwischen 2018 und 2022 entnommenen Kotproben nachgewiesen wurde.

- **AP8:** Zum Schutz der Tiere wurde zunächst entschieden, auf die ursprünglich im AP 8 geplante Implementierung eines Verfahrens zur Erhitzung von Kolostrum zu verzichten, da sich bei der Erprobung des Verfahrens im Jahr 2019 die Tiergesundheit der Lämmer verschlechterte. Auf Grund der insgesamt negativen Ergebnisse der Untersuchung von Kolostrum auf das Vorhandensein von MAP (AP3 und 7) wurde schließlich endgültig auf eine Kolostrumerhitzung verzichtet.

Auf Grundlage der positiven Kulturergebnisse aus den Untersuchungen der Stallumgebung wurden die Eingänge zum Stallgebäude asphaltiert. Über die zuvor unbefestigte Fläche wird die Ziegenherde während der Weidesaison täglich zweimal getrieben. Diese Maßnahme ermöglicht eine einfache Reinigung und dadurch effektive Reduzierung des Erregers und dessen Eintrag in das Stallgebäude (Abb. 4).



Abb. 4: Stalleingänge vor (links) und nach der Asphaltierung (rechts) (© FLI)

Des Weiteren erfolgte die Umstellung der Trogtränken, in welchen mehrfach MAP-DNA nachgewiesen werden konnte auf kleinvolumige, erhöht angebrachte Schwimmertränken. Da in diesen Tränken ständig frisches Tränkwasser aus der Leitung nachfließt und die Standzeiten des Wassers sehr gering sind, kann auf diesem Weg die Aufnahme von MAP-kontaminiertem Wasser weitestgehend unterbunden werden (Abb. 5).



Abb. 5: Ersatz der Trogtränken (links) durch Schwimmertränken (rechts) (© FLI)

Zusätzlich wurden bereits im Betriebsmanagement implementierte Maßnahmen in Bezug auf die Lämmeraufzucht weiter beibehalten. Dies schließt die schnellstmögliche Trennung von Mutter und Lamm und deren separate Aufzucht in einem gesonderten Stallbereich ein.

- **AP9:** Die in AP 2 (Prävalenz vor Impfung), 4 (Stallgefährtenvergleich), 6 (Prävalenzentwicklung) und 7 (Infektionsdruck Umgebung) gewonnenen Ergebnisse wurden im Projektverlauf ausgewertet.

Um die Entwicklung der Paratuberkulose-Prävalenz im Bestand von der Erstuntersuchung bis zum Ende des Projektzeitraums bewerten zu können wurde der jeweilige Anteil an aktuellen Ausscheidern bei den Gesamtbestandsuntersuchungen bestimmt und miteinander verglichen. Zur Identifikation von Gruppenunterschieden im Stallgefährtenvergleich wurden für die einzelnen Stoffwechsel- und Milchleistungsparameter statistische Modelle (linear mixed models) entwickelt und berechnet. Die Zusammenhänge zwischen definierten Charakteristika der entnommenen Umgebungsproben und den Ergebnissen der kulturellen und molekularbiologischen Untersuchung auf MAP wurden durch eine logistische Regression beschrieben. Außerdem erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden miteinander (Interrater-Reliabilität) sowie die Berechnung des Zusammenhangs zwischen DNA-Gehalt und kulturellem Wachstumsindex (Rangkorrelation nach Spearman).

C Ergebnisse des Innovationsprojektes

I Aufführung der Ergebnisse

- **Prävalenzentwicklung im Bestand**

Die Prävalenz Erreger-ausscheidender Ziegen sank von 30,0 % im Jahr 2018 nach der Immunisierung des Gesamtbestandes und der jährlichen Nachzucht auf 3,5 % im Herbst 2022 (Tab. 1). Damit konnte eine starke Reduktion der Erkrankungsprävalenz dokumentiert werden, wozu sehr wahrscheinlich sowohl die Impfung als auch die Entfernung bekannter Ausscheider beitrugen. Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass es trotz Impfung im Lammalter weiterhin zu Infektionen in der Herde kommt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass bei den geimpften Tieren der Zeitpunkt der ersten Ausscheidung später eintritt als bei ungeimpften Tieren (Abb. 6). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Impfung gegen Paratuberkulose einen sinnvollen Aspekt im Rahmen eines Sanierungskonzeptes darstellt aber als alleinige Maßnahme nicht zur Eradikation der Erkrankung führen wird.

Tab. 3: Entwicklung des Anteils an Ziegen älter als 1 Jahr, bei denen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* kulturell im Kot nachgewiesen werden konnte

Bestandsuntersuchung Ziegen > 1 Jahr	Anzahl Proben		davon positiv	
	n	n	%	
2018 Februar	307	92	30,0	
2020 April	286	28	9,8	
2020 Oktober	308	18	5,8	
2021 Mai	414	13	3,1	
2021 November	382	9	2,4	
2022 Mai	407	7	1,7	
2022 November	434	15	3,5	

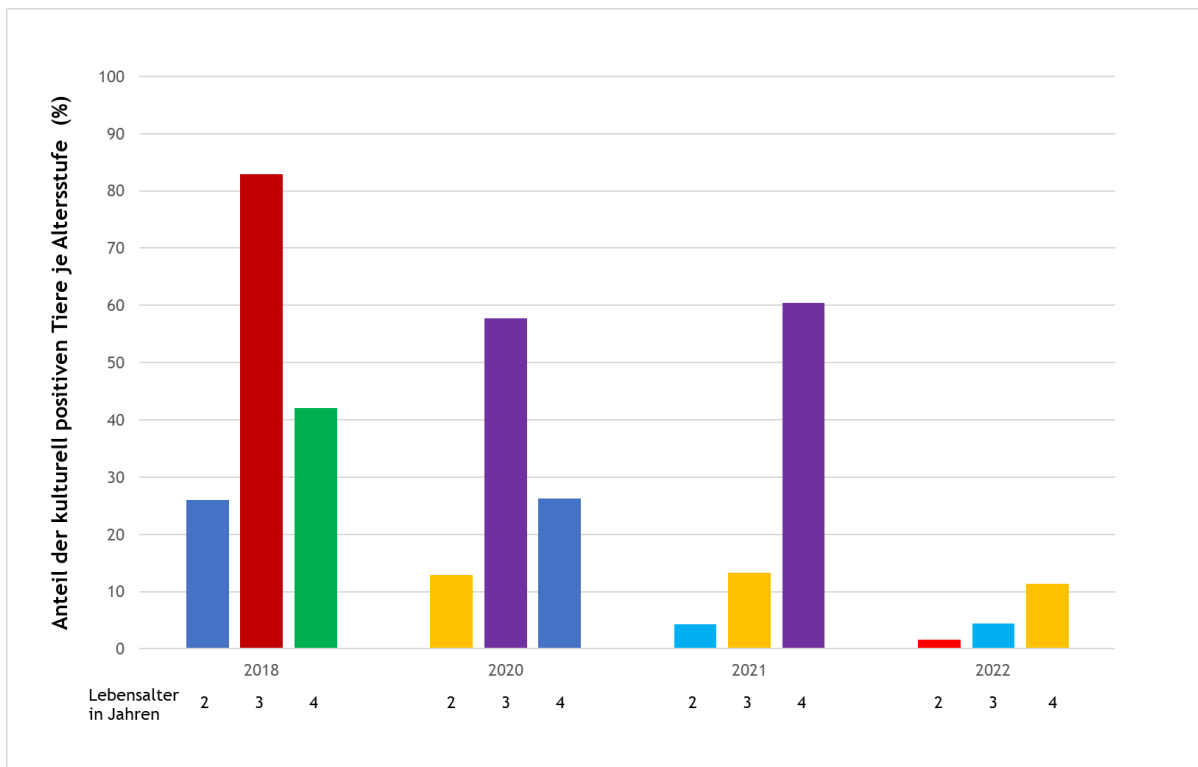


Abb. 6: Ergebnisse der kulturellen Gesamtbestandsuntersuchungen von Kotproben nach Abschluss der Lammzeiten in den Jahren 2018, 2020, 2021 und 2022. Dargestellt ist der Anteil an MAP-Ausscheidern bei Tieren im Alter von 2-4 Jahren getrennt nach Lebensalter. Gleiche Balkenfarben symbolisieren gleiche Geburtsjahrgänge in unterschiedlichen Probenahmen. (© Heike Köhler)

- **Identifizierung von Infektionsquellen sowie Charakterisierung des Infektionsdrucks im Bestand**

Für den Nachweis von MAP im Kolostrum von Ziegen und auf deren Euterhaut wurden im Projekt neue Analysemethoden etabliert und hinsichtlich ihrer Nachweisgrenze evaluiert. Im Vorversuch der Kolostrummethode etablierung stellte sich die Vorinkubation der Probe mit Proteinase K als nicht praktikabel dar. Daher wurden Verdünnungsreihen zur Bestimmung der minimalen Nachweisgrenze nur für native Proben und Kolostrum nach einem Zentrifugationsschritt angefertigt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit einem kommerziell vertriebenen Kit, der für die Immunomagnetseparation von MAP aus Rindermilchproben entwickelt wurde (ADIAPURE ParaTB Milk Kit, Bio-X). Daran schloss sich die Untersuchung mittels eines für den MAP-Nachweis zugelassenen real-time PCR-Kits an (ADIAVET ParaTB real time, Bio-X). Der Vergleich der Evaluierungsergebnisse beider Methoden zeigte, dass die Zentrifugation der Proben vor dem Separationsschritt nicht zu einer deutlich niedrigeren Nachweisgrenze führte (Abb. 7). Daher wurde entschieden, die nativen Proben für die Analyse auf MAP zu nutzen. Für diese Vorgehensweise konnte die minimale Nachweisgrenze von 33 – 79 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE)/ml bestimmt werden. Dies entspricht den Angaben für Rindermilch des Herstellers des Separationskits.

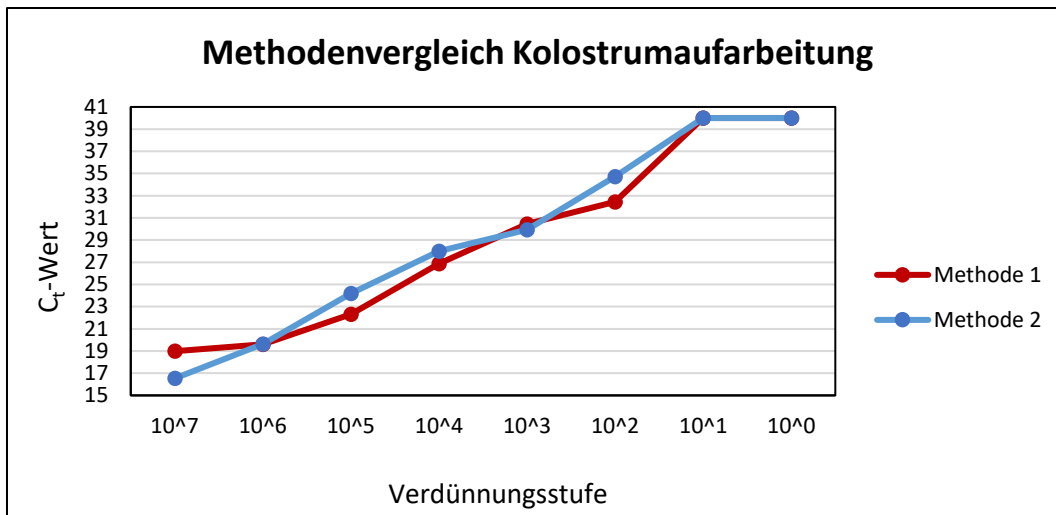


Abb. 7: Ergebnisse der real time PCR (C_T-Werte) einer Verdünnungsreihe MAP-gespickten Kolostrums nach Aufarbeitung mit ADIAPURE ParaTB Milk Kit (Methode 1 = nativ, Methode 2 = Zentrifugation). Je höher der C_T-Wert, desto geringer der Gehalt an MAP-DNA in der Probe. (© Chris Pickrodt)

Im Methodenvergleich für den Nachweis von MAP auf der Euterhaut wurden trockene mit wasserbefeuchteten Tupfern verglichen (Abb. 8). Neben der Analyse auf MAP-DNA fand zusätzlich eine kulturelle Anzucht statt. Die Auswertung beider Untersuchungsmethoden zeigte einen geringen Vorteil der trockenen gegenüber den feuchten Tupfern insbesondere in der Kultur. Daher und um eine weitere Kontaminationsgefahr während der Probenahme auszuschließen, die von der zur Befeuchtung genutzten Flüssigkeit potentiell ausgehen kann, wurden die Untersuchungen im Bestand mit trockenen Tupfern durchgeführt. Die minimale Nachweisgrenze für die kulturelle Anzucht lag bei 10² – 10⁴ KbE/cm² und für den Nachweis von MAP-DNA bei 1,6 – 2,1 x 10² KbE/cm².

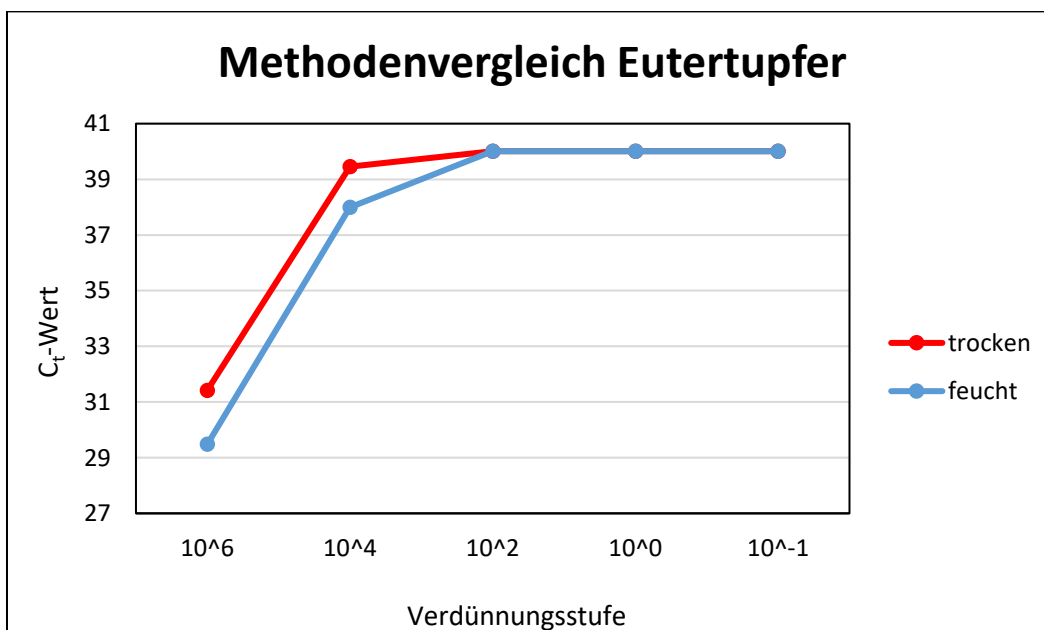


Abb. 8: Ergebnisse der real time PCR (C_T-Werte) bei Untersuchung von Tupferproben von Euterhaut, die mit den Suspensionen einer Verdünnungsreihe von MAP kontaminiert wurde. Vergleich von trockenen und angefeuchteten Tupfern. Je höher der C_T-Wert, desto geringer der Gehalt an MAP-DNA in der Probe. (© Chris Pickrodt)

Der Paratuberkulose-Erreger war nicht im Kolostrum von geimpften Mutterziegen nachweisbar. Da kein Vergleich mit ungeimpften Ziegen möglich war konnte nicht abgeklärt werden, ob es sich dabei um einen Effekt der Impfung handelt. Die Euterhaut zeigte nur eine geringe MAP-Belastung (Abb. 9 und 10, s. auch Publikation 1 im Anhang).

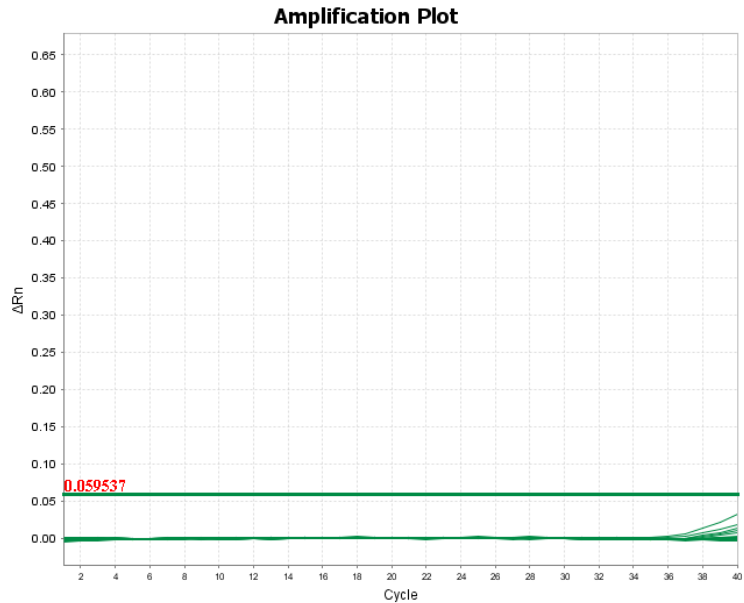
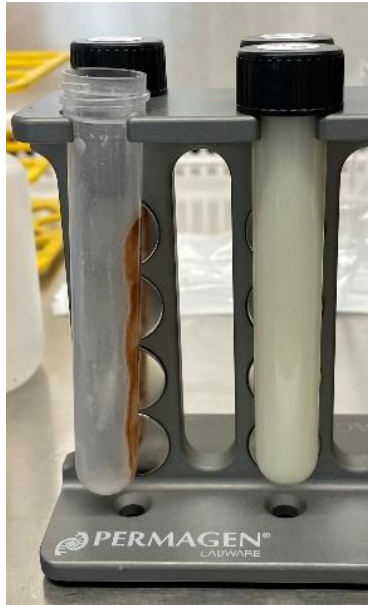


Abb. 9: links: Kolostrumproben nach erfolgter Immunomagnetseparation im Magnetständer, rechts: Ergebnisse der DNA-Amplifikation in der real time PCR (alle Proben negativ) (© FLI)

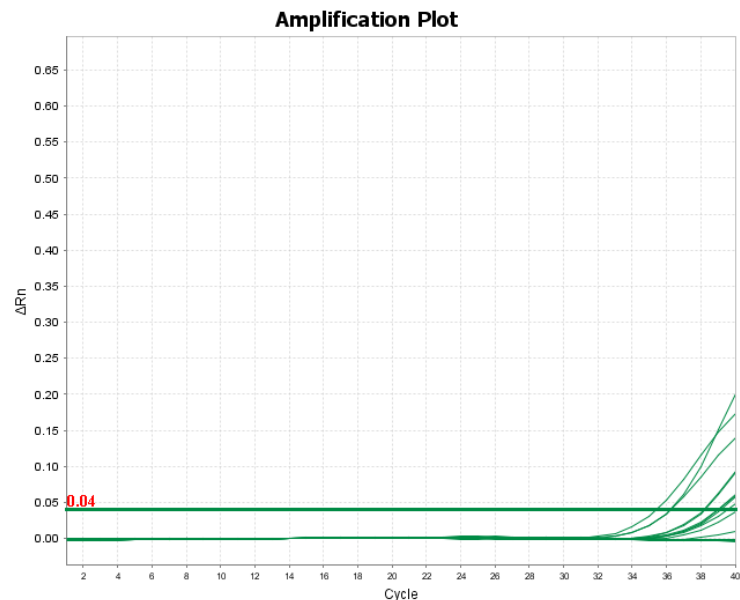
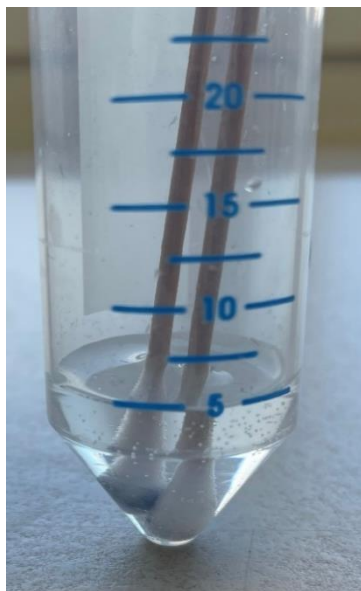


Abb. 10: links: Eutertupfer in destilliertem Wasser, rechts: Ergebnisse der DNA-Amplifikation in der real time PCR (wenige Proben mit positiven Signalen) (© FLI)

Vermehrungsfähige Paratuberkulose-Erreger waren in der Einstreu und im Staub aus der Stallumgebung nachweisbar. Bereiche mit hohem Tierverkehr (z.B. das Melkkarussell) waren besonders häufig positiv (Abb. 11 und 12). Der Erregernachweis in Ablammbuchten machte deutlich, dass in diesen Bereichen eine Ansteckung der Nachzucht leicht möglich ist. Genetisches Material des Paratuberkulose-Erregers wurde in Einstreu, Staub, Futter und

Wasserproben nachgewiesen. Das zeigt, dass der Erreger luftgetragen im gesamten Bestand verteilt werden kann. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage zur Identifikation von Risikobereichen für die Übertragung von MAP innerhalb eines Ziegenstalls (s. Publikation 2 im Anhang).

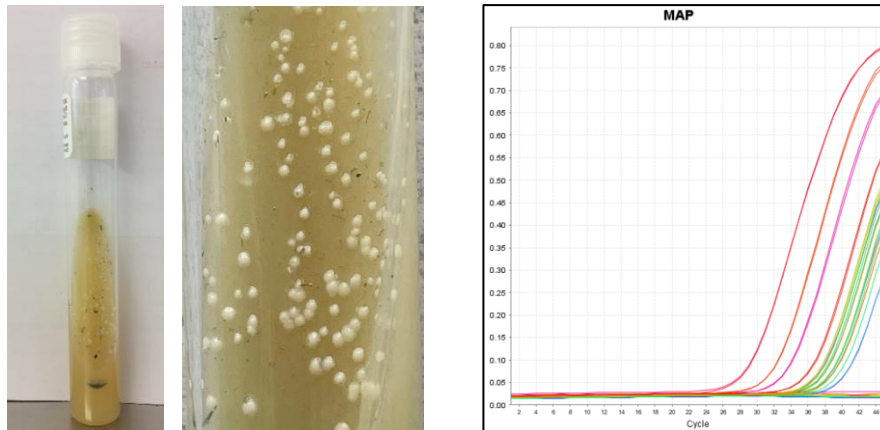


Abb. 11: links: Ergebnis des kulturellen Anzucht - Koloniewachstum von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* auf Herrold's Egg Yolk Medium mit Mycobactin (Becton Dickinson); rechts: Ergebnisse der DNA-Amplifikation in der real time PCR (viele Proben mit positiven Signalen) (© FLI)

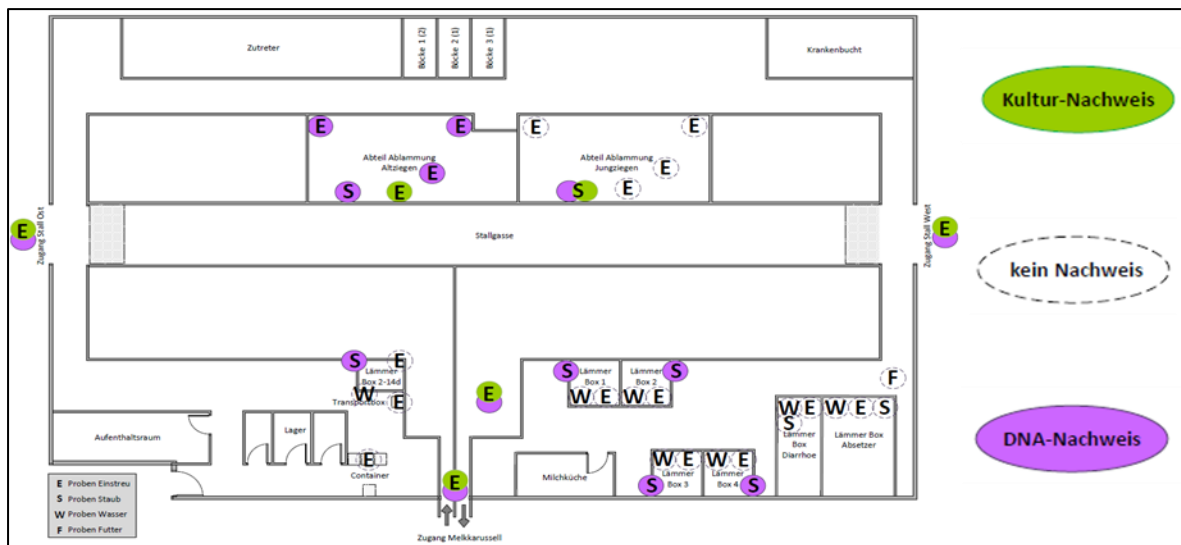


Abb. 12: Analyseergebnisse der im Ziegenstall entnommenen Umgebungsproben vom Mai 2020. Violett = Nachweis MAP-DNA, grün = kultureller MAP-Nachweis, weiß = kein Erregernachweis; E = Einstreu, S = Staub, W = Wasser, F = Futter. (© Chris Pickrodt)

- **Auswirkungen der MAP-Infektion auf die Milchleistung und auf Stoffwechselfparameter**

Bei dem Stallgefährtenvergleich zwischen unverdächtigen und infizierten laktierenden Ziegen wurde festgestellt, dass es bereits bei infizierten Tieren, die noch keine Symptome einer Infektion zeigen, zu einer Verminderung des Gesamtprotein- und Albumingehaltes im Blutserum kommt (Abb. 13). Diese Abweichungen sind bei starken Ausscheidern besonders ausgeprägt und gekoppelt mit einer deutlich verminderten Milchmenge pro Tag

(Abb. 14). Die Erkenntnisse der Blutuntersuchungen bestätigen vergleichbare Erkenntnisse die bereits bei Rindern gewonnen wurden. Durch unsere Arbeiten wurde erstmals systematisch beschrieben, dass es auch bei Ziegen infolge der Paratuberkulose zu einer statistisch nachgewiesenen Milchleistungsminderung kommt.

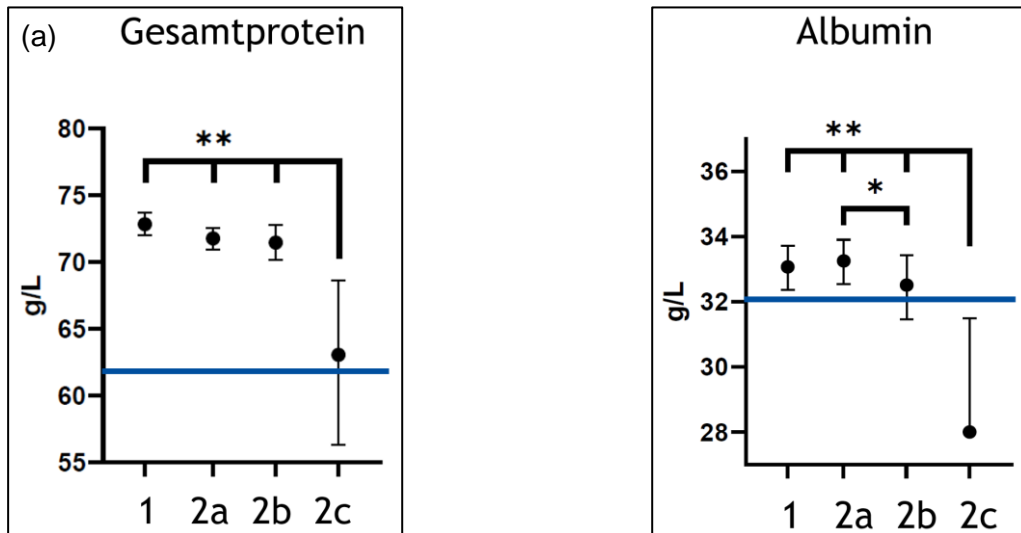


Abb. 13: Kleinste-Quadrate-Mittelwerte (\pm 95% Konfidenzintervall) für Gesamtprotein (a) und Albumin (b) von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* unverdächtigen (1) und -infizierten (2) Ziegen entsprechend der Klassifizierung anhand des Ergebnisses der Kotkultur (a = aktuell keine Ausscheidung, b = schwache Ausscheidung, c = starke Ausscheidung). Die blaue Linie markiert den unteren Referenzwert des jeweiligen Parameters nach den Laborbewertungsmaßstäben der ThürTSK. Signifikante Gruppenunterschiede sind gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). (© Chris Pickrodt)

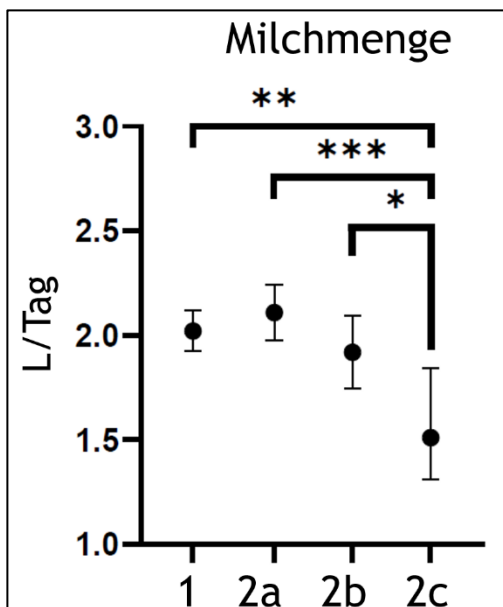


Abb. 14: Kleinste-Quadrate-Mittelwerte (\pm 95% Konfidenzintervall) für die Milchmenge von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* unverdächtigen (1) und -infizierten (2) Ziegen entsprechend der Klassifizierung anhand des Ergebnisses der Kotkultur (a = aktuell keine Ausscheidung, b = schwache Ausscheidung, c = starke Ausscheidung). Signifikante Gruppenunterschiede sind gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (© Chris Pickrodt)

Aus den Untersuchungen und statistischen Auswertungen der Umgebungsproben konnte neben der Identifikation von potentiellen Risikobereichen für die Übertragung von MAP auf naive Lämmer auch die Empfehlung abgeleitet werden, diese Proben zur Bestimmung des Paratuberkulose-Bestandsstatus zu nutzen. Dieses im Vergleich zu Einzeltieruntersuchungen deutlich kostengünstigere Verfahren wird bereits seit mehreren Jahren erfolgreich in der

Überwachung von Rinderbetrieben eingesetzt, wohingegen die Anwendung in Schaf- und Ziegenhaltungen bisher nicht etabliert ist.

Im Rahmen der Methodenevaluierung für den Nachweis von MAP in Kolostrum und mittels Eutertupfer wurden verschiedene Methodiken miteinander verglichen. Aufgrund nur geringfügiger Abweichungen wurde sich in beiden Fällen für jeweils jene Methode entschieden, welche eine geringere Kontaminationsgefahr sowie höhere Praktikabilität aufweisen.

Da eine Untersuchung der Umgebungsbelastung mit MAP vor der Implementierung der Impfung nicht möglich war konnte nicht erfasst werden, ob es infolge der Impfung zu einer Reduzierung der Umgebungscontamination kam. Der Anteil an MAP-Ausscheidern in der Herde hatte keinen deutlichen Einfluss auf den Anteil an kulturell oder molekularbiologisch positiven Umgebungsproben.

Die in der Projektplanung formulierten Ziele wurden weitestgehend erreicht. Es konnte eine starke Reduktion der Paratuberkulose-Prävalenz im Bestand in einem relativ kurzen Zeitraum von nur 4 Jahren unter Einbeziehung der Impfung als Sanierungsmaßnahme dokumentiert werden. Der Einfluss der Impfung auf die Neuinfektionsrate konnte nicht verlässlich ermittelt werden, weil im Jahr 2021 durch den Landwirt vorübergehend eine Änderung im Management der Jungtiere erfolgte. Es wurde keine eigene Nachzucht für die Remontierung eingesetzt. Stattdessen wurden 30 Jungziegen aus einem Paratuberkulose-unverdächtigen Bestand im Alter von ca. 6 Monaten zugestellt. Diese Tiere befanden sich in der ersten Lebensmonaten, in denen die höchste Empfänglichkeit für eine MAP-Infektion vorliegt, in einer MAP-freien Umgebung. Sie wurden im Alter von 12 Wochen mit Gudair® geimpft. Wir gehen davon aus, dass für diese Tiere nach der Zustallung in den Projektbetrieb bereits ein geringeres Infektionsrisiko bestand, als in einem früheren Lebensalter bestanden hätte.

Für die Untersuchung von Kolostrum wurde ein praktikables Verfahren etabliert. Ebenso konnte der Infektionsdruck in der direkten Tierumgebung der Ziegen beschrieben werden. Aufgrund des hohen Anteils an MAP-positiven Tieren im Jahr 2018, der mit einem tierschutzrelevanten Krankheitsgeschehen im Bestand verbunden war, musste bereits vor Projektbeginn mit der Impfung der Tiere begonnen werden. Demzufolge war der geplante ausgeweitete systematische Vergleich von Proben vor und nach der durchgeführten Impfung nicht möglich. Es konnte somit nicht untersucht werden, ob die Impfung einen Einfluss auf den MAP-Gehalt von Kolostrum hat. Erfreulicherweise wurde MAP nicht im Kolostrum nachgewiesen und es wurde auch nur bei einem geringen Prozentsatz der untersuchten Tiere eine Kontamination der Euterhaut mit MAP gefunden, so dass das Risiko einer Exposition der Lämmer mit MAP auf diesem Weg als gering anzusehen ist.

Im Rahmen des Stallgefährtenvergleiches wurden die Auswirkungen einer Paratuberkulose-Infektion auf verschiedene Milchleistungsparameter ausgewertet. Eine umfassende Analyse der wirtschaftlichen Auswirkungen auf das Betriebsergebnis erfolgte nicht, da infolge der Corona-Pandemie eine wirtschaftliche Ausnahmesituation bestand, deren Auswirkungen auf das Betriebsergebnis schwer abschätzbar waren.

II Diskussion der Ergebnisse

In den Rahmen dieses Projektes durchgeführten explorativen Studien wurden Methoden entwickelt und Erkenntnisse gewonnen, die unmittelbar in die praktische Bekämpfung der Paratuberkulose in Milchziegenbeständen überführt werden können.

Unsere Studien bestätigten Daten aus der Literatur, dass die Impfung mit einer Inaktivat-Vakzine gegen MAP zu einer Senkung der Paratuberkulose-Prävalenz in Ziegenbeständen

beiträgt und demzufolge eine wichtige Säule der Paratuberkulose-Bekämpfung darstellt. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob eine Reduktion der Neuinfektionsrate erreicht wird.

Die von uns entwickelten Methoden zum MAP-Nachweis im Kolostrum und in verschiedenen Umgebungsproben können genutzt werden, um bestandsspezifische Risikofaktoren für eine Exposition von Jungtieren mit MAP zu identifizieren. Diese Erkenntnisse bilden die Basis für Festlegung von Hygiene- und Managementmaßnahmen im bestandsspezifischen Paratuberkulose-Bekämpfungsplan. Eine besonders hohe Nachweisrate von MAP war in Bereichen hohen Tierverkehrs zu verzeichnen. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Untersuchung von Umgebungsproben zur Identifizierung MAP-positiver und MAP-unverdächtiger Bestände zu nutzen, wie es bereits in Rinderbeständen praktiziert wird. Als nächster Schritt ist die Erprobung dieses Verfahrens in einer größeren Anzahl MAP-positiver und MAP-unverdächtiger Ziegenbestände erforderlich, um die diagnostischen Charakteristika dieses Verfahrens (Sensitivität, Spezifität, Untergrenze der Intra-Herden-Prävalenz) auszuloten.

Wir konnten zeigen, dass es bereits bei Ziegen ohne deutliche klinische Symptomatik der Paratuberkulose zu Veränderungen in Stoffwechselfparametern des Blutes und zu einer Reduzierung der täglichen Milchmenge kommt. Dies war bei starken Ausscheidern besonders ausgeprägt. Die Kenntnis der konkreten wirtschaftlichen Auswirkungen dieser Leistungsminderungen sollte für Tierhalter ein Anreiz sein, die Bekämpfung der Paratuberkulose im eigenen Bestand voran zu treiben.

III Nutzung der Ergebnisse und Empfehlungen für die Praxis

Die während des Projektzeitraums gewonnenen Erkenntnisse wurden in Form eines Leitfadens mit konkreten Handlungsempfehlungen für Ziegenbestände im Hinblick auf die Bekämpfung und Prävention der Paratuberkulose zusammengefasst (s. Auszug im Anhang). Er wird auf der Homepage des FLI, auf der Seite des NRL für Paratuberkulose veröffentlicht und den Landwirten über die ThürTSK zur Verfügung gestellt.

IV Ausblick: Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit

Ausgehend von den Ergebnissen des Nachweises von MAP in der Stallumgebung der Ziegen ergibt sich die Frage, ob auf dieser Basis ein Verfahren entwickelt werden kann, mit dem der Paratuberkulose-Status eines Bestandes auf einfache und kostengünstige Weise zu ermitteln ist. Dazu sind Untersuchungen in einer repräsentativen Anzahl Paratuberkulose-positiver und -unverdächtiger Bestände erforderlich. Dort muss geprüft werden, ob sich die gute Eignung der Probenmatrix Staub bestätigt oder ob andere Probenmatrizes besonders geeignet sind und ob eine einmalige Untersuchung genügt oder wiederholte Untersuchungen notwendig sind, um die Nachweissicherheit zu erhöhen. Außerdem ist zu ermitteln, wo die unteren Grenzen der Intra-Herden-Prävalenz liegen, die auf diese Weise erfasst werden können. Mit diesem weiteren Entwicklungsschritt könnte in ähnlicher Weise wie bei Milchkuhherden die Überwachung von Milchziegenherden auf Paratuberkulose durchgeführt werden. Eine Markteinführung dieses Überwachungsverfahrens wäre perspektivisch im Rahmen eines Programms zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Milchziegenbeständen denkbar.

Die Erkenntnis, dass es bereits bei klinisch unauffälligen, mit MAP-infizierten Ziegen zu einer Minderung der Milchleistung kommt deutet darauf hin, dass die Paratuberkulose ähnlich wie beim Rind zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen in Milchziegenbeständen führt. Dies sollte gleichermaßen in einer repräsentativen Anzahl Paratuberkulose-positiver und -unverdächtiger Bestände weiter untersucht werden.

Es wurden in diesem Projekt keine Ergebnisse generiert, die für eine direkte Markteinführung geeignet waren.

V Öffentlichkeitsarbeit (Wissenstransfer & Erfahrungsaustausch)

Die Ergebnisse wurden bisher in zwei wissenschaftlichen Artikeln in internationalen Fachzeitschriften mit Peer-Review-System publiziert. Eine weitere Publikation ist in Vorbereitung.

- Pickrodt C, Donat K, Moog U, Köhler H. Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of Mycobacterium avium Subsp. paratuberculosis. *Animals* 2022, 12(14):1779. <https://doi.org/10.3390/ani12141779>
- Pickrodt C; Donat K; Moog U; Köhler H. Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn—Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention. *Animals* 2023, 13:1688. <https://doi.org/10.3390/ani13101688>

Die Studie und ausgewählte Ergebnisse daraus wurden auf mehreren nationalen und internationalen wissenschaftlichen Fachtagungen sowie im Rahmen von Weiterbildungsveranstaltungen für Ziegen- und Schafzüchter vorgestellt:

- Pickrodt, C., Köhler, H., Donat, K., Moog U. 2021. Verfahren zur Senkung der Paratuberkulose-Neuinfektionsrate in Milchziegenbetrieben durch Impfung (Projektvorstellung ParaVac). Gemeinsame Arbeitstagung der Nationalen Referenzlabore Chlamydiose, Q-Fieber, Paratuberkulose und Tuberkulose der Rinder. Jena: 2021.04.21-22
- Pickrodt C. Reducing paratuberculosis incidence in dairy goat herds by vaccination. Euring, B., Harzer, M., Kamutzki, C., Kreyer, S., Wagner, F. C., & Ohlmann, S. (Eds.). (2021). 9. Leipziger Doktorand:Innenforum: der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Programm & Abstracts (1. Auflage, 1 Online-Ressource). Universität Leipzig. <https://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:15-qucosa2-753877>
- Pickrodt C, Donat K, Moog U, Köhler H. Analyse möglicher Infektionsquellen für Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milchziegenhaltungen, 2021. Tagung der DVG-Fachgruppe "Krankheiten kleiner Wiederkäuer"; Online; 25.-26. August 2021.
- Pickrodt C. Paratuberkulose beim kleinen Wiederkäuer. 15. Gemeinsame Tagung zur Schaf- und Ziegengesundheit. Arnstadt, 16. September 2021
- Pickrodt C, Köhler H, Donat K. Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in environmental samples from a dairy goat farm in Germany, 2022. 15th International Colloquium on Paratuberculosis: Dublin, Ireland, 12-16 June 2022.
- Pickrodt C, Donat K, Moog U, Köhler H. No evidence of transmission of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the udder skin into the colostrum of dairy goats, 2022. 15th International Colloquium on Paratuberculosis: Dublin, Ireland, 12-16 June 2022.
- Pickrodt C, Köhler H, Gärtner T, Gernand E, Moog U, Donat K. Unterschiede hinsichtlich metabolischer Parameter und der Milchleistung zwischen Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) -positiven Ziegen und ihren MAP-unverdächtigen Stallgefährten, 2022. Tagung der DVG-Fachgruppe Kleine Wiederkäuer & Neuweltkamele: Triesdorf, 08. bis 09. September 2022.
- Pickrodt C, Köhler H. Paratuberkulosedagnostik: mehr als nur Kot – Alternative Untersuchungsmaterialien in der epidemiologischen Bestandsdiagnostik, 2022. 40.

Arbeits- und Fortbildungstagung der DVG-Fachgruppe AVID, Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik, Kloster Banz und Online, 14. bis 16. September 2022, Tagung der DVG-Fachgruppe AVID Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik.

Der Leitfaden mit konkreten Handlungsempfehlungen für Ziegenhalter im Hinblick auf die Bekämpfung und Prävention der Paratuberkulose wird auf der Homepage des FLI, auf der Seite des NRL für Paratuberkulose, der Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

Im Rahmen der Beratungstätigkeit des Thüringer Schaf- und Ziegengesundheitsdienstes werden die Ziegenhalter anhand des Leitfadens über die Erkrankung, mögliche Eintragsquellen sowie Möglichkeiten zur Verminderung des Expositionsrisikos für die besonders empfänglichen Jungtiere, die Möglichkeit der Impfung und andere Bekämpfungsmaßnahmen informiert und darauf aufbauend bei Bedarf konkrete bestandsspezifische Maßnahmenpläne erarbeitet.

VI Schlussfolgerungen

Die Ziele des Projekts wurden weitestgehend erreicht. Es wurde bestätigt, dass die Impfung zu einer Reduzierung des Anteils an MAP-Ausscheidern im Bestand beiträgt.

Erstmalig wurden durch die Untersuchung von Kolostrum, Euterhaut und verschiedenen Probenmatrizes und Lokalisationen in der Stallumgebung die Bereiche identifiziert, von denen in Ziegenhaltungen ein besonders hohes Risiko für die Übertragung der MAP-Infektion ausgeht.

Anhand der Ergebnisse des Stallgefährtenvergleichs konnte erstmals belegt werden, dass eine MAP-Infektion bei Milchziegen bereits zur Verminderung der Milchleistung und zur Beeinflussung von Parametern des Eiweißstoffwechsels führt, wenn die Tiere noch keine klinischen Krankheitszeichen aufweisen.

Da aus wirtschaftlichen Gründen bereits vor Beginn des Projektes eine Impfung des Gesamtbestandes mit der Inaktivat-Vakzine gegen MAP erforderlich war, konnte nicht untersucht werden, ob die Impfung die Belastung der Stallumgebung sowie des Kolostrums und der Euterhaut der Ziegen mit MAP beeinflusst.

Aus der Sicht unserer Kooperation hat sich die Bildung einer operationellen Gruppe im Rahmen der Europäischen Innovationspartnerschaft „Landwirtschaftliche Produktivität und Nachhaltigkeit“ (EIP Agri) als geeignet erwiesen, um die Innovation in der landwirtschaftlichen Produktion voranzubringen. Die Zusammenarbeit zwischen dem landwirtschaftlichen Primärproduzenten Hof Rösebach, Ifta, mit dem Schaf- und Ziegengesundheitsdienst der Thüringer Tierseuchenkasse als Forschungspartner und Berater für die Landwirtschaft sowie mit dem FLI als Forschungspartner und Projektkoordinator war erforderlich, um die o.g. Innovationen zu generieren. Nur so wurde das erforderliche Wissen, notwendige Kompetenzen und Methoden zusammengeführt und der Wissensaustausch ermöglicht.

D Zusammenarbeit der Operationellen Gruppe

Die Zusammenarbeit der Operationellen Gruppe (OG) wurde durch regelmäßige Bestandsbesuche im Landwirtschaftsbetrieb durch Projektbeteiligte des FLI und der ThürTSK und damit verbundene Projektberatungen gestaltet. Dies ermöglichte einen intensiven Austausch der Partner über Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen und die daraus

zu ziehenden Konsequenzen für Hygienemaßnahmen und Herdenmanagement im Landwirtschaftsbetrieb. Am Projektende fand eine Abschlussveranstaltung der OG unter Einbeziehung des Bestandstierarztes und von Vertreterinnen der Thüringer Aufbaubank statt, in denen die Ergebnisse des Projektes vorgestellt und daraus resultierende allgemeingültige Handlungsempfehlungen für Ziegenbestände diskutiert wurden. Der Landwirtschaftsbetrieb wird auch weiterhin regelmäßig durch den Schaf- und Ziegengesundheitsdienst der ThürTSK beraten und betreut.

Während der gesamten Projektzeit bestand ein reger Kontakt zum Innovationsdienstleister. Fragen bezüglich der Präsentation von Projektergebnissen wurden auf diesem Wege beantwortet sowie Einladungen zu verschiedenen Veranstaltungen kommuniziert. Außerdem wurden der OG Möglichkeiten für weitere Förderungen vorgestellt.

Kontakte mit anderen OGs konnten auf Grund der Spezifik des Projekts nicht geknüpft werden.

Anhang

Publikationen

Chris Pickrodt, Karsten Donat, Udo Moog, Heike Köhler: Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. in: *Animals (Basel)*. 2022 Jul 11;12(14):1779. doi: 10.3390/ani12141779

Chris Pickrodt, Karsten Donat, Udo Moog, Heike Köhler: *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn – Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention. in: *Animals (Basel)*. 2023 May 18;13(10):1688. doi: 10.3390/ani13101688

Leitfaden für die Bekämpfung der Paratuberkulose bei Ziegen (in Fertigstellung)

Article

Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*

Chris Pickrodt ¹, Karsten Donat ^{2,3}, Udo Moog ² and Heike Köhler ^{1,*}

¹ Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; chris.pickrodt@fli.de

² Thuringian Animal Diseases Fund, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Germany; kdonat@thtsk.de (K.D.); umoog@thtsk.de (U.M.)

³ Clinic for Obstetrics, Gynaecology and Andrology for Large and Small Animal Science with Veterinary Ambulance, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Straße 106, 35392 Giessen, Germany

* Correspondence: heike.koehler@fli.de; Tel.: +49-3641-804-2240

Simple Summary: The analysis of transmission routes for paratuberculosis as well as their prevention are critical for effective disease control. The aim of the present study was to assess the importance of colostrum and the udder skin as routes for transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) within a dairy goat herd. Swabs of the udder skin and colostrum samples were collected from goats of a paratuberculosis-infected herd during lambing season and analyzed for MAP DNA. Additionally, cultivation of the swabs was performed. MAP could not be detected in the colostrum. A low number of udder skin swabs was positive for MAP DNA but no bacteria could be cultured. Because the detection methods are imperfect, the occurrence of MAP in colostrum or on the udder skin can never be completely excluded. Therefore, present recommendations concerning colostrum and youngstock management should still be re-evaluated, but applied in goat herds within a paratuberculosis control program until the role of colostrum and udder skin for within-herd transmission of MAP is further investigated.

Abstract: Oral intake of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in first days of life is considered to be the main route of infection for paratuberculosis. This can be related to a direct contact to contaminated feces or feeding of MAP containing colostrum. Colostrum is believed to become contaminated either by lactogenic shedding or introduction of MAP from environmental sources. In this pilot study, the presence of MAP in individual and bulk colostrum samples from a paratuberculosis-infected, vaccinated dairy goat herd in Germany and the effect of udder skin disinfection on the MAP load of colostrum were examined. In order to distinguish between lactogenic shedding and fecal contamination, 49 udder skin swabs were cultivated on solid medium whereas 29 swabs were additionally analyzed by qPCR. qPCR was applied on 110 individual colostrum samples collected from 55 goats, one before and one after disinfection with a mycobactericidal disinfectant, and 14 bulk colostrum samples. MAP DNA was detected in 10.3% (3/29) of the swab samples, but no viable MAP was cultivated from any sample. These results indicate a low-level MAP contamination of the udder skin and colostrum of milking goats suggesting a low risk of MAP transmission via these routes.

Keywords: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP); goats; colostrum; udder skin swab



Citation: Pickrodt, C.; Donat, K.; Moog, U.; Köhler, H. Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. *Animals* **2022**, *12*, 1779. <https://doi.org/10.3390/ani12141779>

Academic Editors: Alfonso Zecconi and Fulvio Marsilio

Received: 28 April 2022

Accepted: 8 July 2022

Published: 11 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) causes a chronic wasting disease in ruminants known as paratuberculosis or Johne's disease. Symptoms such as emaciation despite normal feed intake, diarrhea and a decrease in milk yield are observed

partly after years of incubation. During the subclinical stage of the disease, the pathogen is already shed into the environment, primarily with the feces. Starting intermittent shedding frequency as well as intensity increases with disease progression [1–3]. Studies also revealed an increasing likelihood of a lactogenic shedding of MAP in animals showing clinical symptoms [4].

Infection occurs at a very young age, usually in the first days of life. This period is particularly relevant for disease control because susceptibility for the pathogen decreases with increasing age [5]. As the pathogen is most commonly ingested orally, MAP contaminated colostrum may serve as a source for earliest infection [1]. MAP was first detected in milk samples from clinically symptomatic cows in 1929 [6]. Further studies proved the presence in milk from asymptomatic cows [7] as well as in colostrum [8].

In contrast to bovine milk, studies about the prevalence of MAP in goat milk are rare. The percentage of DNA-positive samples varied considerably among studies, ranging from 1.94% to 37.74%. The results depended on the country where the study was conducted, which is probably associated with the locally common husbandry conditions. A high prevalence was found in India, whereas it was low in Brazil, Norway and the Netherlands [9]. Currently, there is no comparable study for German goat herds.

The presence of MAP in milk can be attributed on the one hand to lactogenic shedding or, otherwise, may result from external contamination occurring during or after milking [5,8,10]. Inappropriate milking or storage of the milk can lead to contamination with MAP containing feces or an introduction of the pathogen out of the farm environment. MAP has been detected in bedding, water, and dust samples from cattle and sheep farms in several studies [11–13]. In particular, herds with a high prevalence of MAP-shedding animals are at risk of intensive indoor spread [14]. Since MAP shows a long survival time in the environment [15], airborne spread or a transmission from burdened bedding over the udder skin into the milk during the milking process is conceivable. Diarrhea as a clinical symptom associated with heavy shedding of the pathogen may increase the contamination of the bedding and thus the risk of a transmission of MAP to the udder skin of other herd members as well.

Whether MAP can be transferred via the udder skin into the milk is not yet known. In part, this is due to the fact that no validated methods to determine the presence of MAP on the udder skin and in goat colostrum or milk are available.

This study focused on two different objectives. First, the prevalence of MAP on the udder skin and in the colostrum of dairy goats of a herd in Germany should be determined. As a carry-over of MAP from the farm environment via the udder skin into the colostrum is a conceivable route for contamination, the effect of a disinfection of the udder skin on the occurrence of MAP in the colostrum should be evaluated as well.

Validated diagnostic tools for the detection of MAP on the udder skin as well as in goat colostrum do not exist. Therefore, new methods for DNA extraction had to be developed and evaluated with respect to their limit of detection in combination with established kits for the molecular detection of MAP.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Welfare and Legislation

This study was carried out in strict accordance with European and national laws for the care and use of animals. It was approved by the Animal Health and Welfare Unit of the Thuringian State Office for Consumer Protection (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103). During the entire study every effort was made to minimize suffering.

2.2. Study Herd

Samples were collected from a commercial organic dairy herd of approximately 350 lactating goats in Thuringia, Germany, in March and May 2020, as well as in February and March 2021. Fecal shedding of MAP was detected by culture in 92 out of 307 (30.0%) of the herds' goats in 2018. Subsequently, all adult goats and the female youngstock had

been vaccinated with an inactivated vaccine (Gudair, CZ Vaccines, O Porriño, Spain). Further herd examinations in 2020 and 2021 revealed an apparent within-herd prevalence of 7.8% and 3.1% MAP shedders, respectively. Fecal shedding of each goat was repeatedly determined by fecal culture following a standardized protocol [16]. Goats with at least one positive culture result for MAP were considered as infected.

Rotational grazing was performed during the grazing season between May and November when goats are only driven into the barn for milking twice a day. The deep litter was removed before the end of the grazing season and new bedding material was added every day as necessary ensuring clean coat and udder skin. Dried off goats were grouped in separated pens approximately six weeks before lambing. The rotary milking parlor was located in the building but separated from the animal area by walls. Milking was performed without a prior cleaning of the udder or of the milking equipment within one milking time. The first three milk yields after lambing were obtained with a separate portable milking machine, and the milked colostrum of all goats during one milking time was collected in a bucket and fed as bulk colostrum to the goat kids.

Kids were raised at the farm for replacement. They were separated directly after birth and fed manually within the first five hours of life. After two further feedings of bulk colostrum, feeding was changed to an ad libitum supply of commercial milk replacer. During five days each of the lambing seasons in 2020 and 2021, every goat lambing within that time was sampled for the study regardless of the individual paratuberculosis status, body condition, age and number of parturitions. Samples were collected during the first milking time in the rotary milking parlor. In total, 110 individual colostrum samples and 49 swab samples from the udder skin as well as 14 bulk colostrum samples were obtained. In addition, udder skin swabs were taken from every goat of which individual colostrum samples were collected. From six goats, only colostrum was obtained. Four goats were sampled twice (in 2020 and in 2021); therefore, 55 individual samples were received from 51 goats. Five additional goats, not sampled individually, contributed to the bulk colostrum samples.

2.3. Detection of MAP Contamination of Udder Skin

2.3.1. Evaluation of Sampling Method for Swab Samples

Preparation of Bacteria

A dilution series was prepared consisting of a MAP-isolate (20MA0472) from a fecal sample of a goat from the study herd. To classify the MAP strain type, the PCR according to Collins et al. [17] was performed revealing the affiliation to the cattle-type (C-type).

The isolate was first sub-cultivated on Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and Amphotericin, Nalidixic acid and Vancomycin (HEYM, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and later transferred to Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) with glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), Middlebrook OACD enrichment and Mycobactin J (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) for further propagation at 37 °C. The suspensions optical density (OD) was measured at 580 nm and adjusted to 0.35 OD₅₈₀, followed by 10-fold serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁹) in distilled water. In total, 100 µL of each dilution was plated on Middlebrook agar 7H10 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) with glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), Middlebrook OACD enrichment, Mycobactin J (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and amphotericin B (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) to determine the bacterial counts of the suspension. Colony counts were obtained after 5 weeks of incubation at 37 °C.

Sampling Using Dry and Moistened Cotton Swabs

The udder skins of three adult goats from a paratuberculosis non-suspect herd were obtained after regular slaughter at a slaughterhouse. They were used to determine and compare the detection limit for MAP after sampling with dry and moistened cotton swabs. Remains of the glandular tissue were removed from the skins and 24 pieces of 10 cm² each were cut out and fastened on polystyrene pads.

A total of 1 mL of the 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-9} dilution as well as a distilled water control was evenly applied to four skin pieces each. After overnight drying, two of the four prepared skin pieces were sampled with dry sterile cotton swabs (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Germany) and two pieces were sampled with sterile cotton swabs moistened with distilled water. Two swabs were gently rubbed over each skin piece. Sticks were shortened and both swabs were transferred together into a sterile tube and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A second trial using only dry cotton swabs to increase the number of comparable attempts was performed. The abdominal skin of three 3-month-old goat kids from the same farm as the adult goats which underwent necropsy for a different study was transferred from the dissection hall to the laboratory. Hair and subcutaneous fat were removed. Five pieces of 10 cm^2 each were cut out per skin and fastened on polystyrene pads. A dilution series from 10^{-1} to 10^{-9} was prepared and the bacterial count was determined as described above. An amount of 1 mL of the dilution steps was applied to the skin parts and dried overnight. The skin pieces were sampled with dry sterile cotton swabs (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Germany) the same way as described above.

Real-Time PCR (qPCR)

Each sample was analyzed by qPCR and culture. Therefore, swabs were thawed within the tube, 5.5 mL distilled water was added and the tube was placed in a shaking incubator for 48 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 50 rpm. After vortexing, 500 μL of the liquid was transferred to a 1.5 mL tube and DNA extraction was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium), a detection method based on the amplification of the insertion element IS900 of MAP, following instructions provided by the manufacturer. A reaction volume of 20 μL and 5 μL DNA template was used. A negative (nuclease-free water) and a positive control (provided within the kit) were included in each qPCR run. In total, 1 μL exogenous internal control of amplification (EPC-Amp) was added to each sample. qPCR was run on the QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Germany). The reaction conditions were 2 min at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 45 cycles of 15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 30 s at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Data were analyzed using the QuantStudio Design & Analysis Software, v1.5.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Mean cycle threshold (C_t) values of the duplicates were determined. Samples with C_t values ≤ 40.0 were considered positive. Values above the detection limit of 40.0 were considered negative and defined as 40.01 for analysis.

Bacterial Cultivation

A total of 5 mL of 1.5% Hexadecylpyridinium chloride monohydrate solution (HPC, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) was added to the remaining fluid and swabs in the tube. After shaking for 20 min at 200 rpm on a platform shaker, the tubes with the swabs were stored in the dark for 48 h at room temperature. Swabs were removed, and the supernatants were discarded to 5 mL and vortexed. Then, 250 μL was transferred on each of three slopes of HEYM and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 weeks. Examination of bacterial growth was conducted every second week starting after 42 days.

2.3.2. Udder Swab Samples Collected in the Study Herd Animals

As described above, 49 milking goats were sampled directly after parturition during the first milking time on the collection days in the lambing periods in 2020 (number of samples (n) = 20) and 2021 (n = 29). The infection status of every participating goat was repeatedly determined before and during the study by fecal culture following a standardized protocol [16]. Goats with at least one positive culture result for MAP were considered as infected. This applied for five of the 49 samples (10.2%). Detailed information about the origin of the samples is provided in Table 1.

Table 1. Type and number of samples from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)-positive and negative goats within the study. A bulk colostrum sample was defined as originating from MAP-positive goats if at least one of the contributing goats was classified as MAP-positive.

Sample Classification	Number of MAP-Positive Goats	Number of MAP-Negative Goats	Total
udder swab	5	44	49
individual colostrum from non-disinfected udder	9	46	55
individual colostrum from disinfected udder	9	46	55
bulk colostrum	7	7	14

Sampling

Swab samples ($n = 49$) of the udder skin of the goats were taken with sterile cotton swabs (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Germany) while standing in the rotary milking parlor. Two dry swabs were successively rubbed over both udder halves and the teats of the goat. After shortening the sticks, both swabs were stored in a sterile tube, frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and transferred to the laboratory.

The samples from 2021 were analyzed by culture and qPCR the same way as described above. Samples from 2020 were analyzed by culture only. Deviating from the procedure applied in 2021, swabs were thawed within the tube and 5 mL of 0.75% HPC instead of 5 mL of 1.5% HPC were added to achieve a final concentration of 0.75% HPC in both years. The subsequent steps of bacterial cultivation remained unchanged.

2.4. Detection of MAP in Goat Colostrum

2.4.1. Evaluation of Detection Method for MAP in Goat Colostrum

After adjusting the bacterial suspension to 0.35 OD_{580} , 10-fold serial dilutions (10^{-1} to 10^{-8}) of MAP isolate 20MA0472 were prepared in bulk goat colostrum from the studied herd as well as in distilled water which was analyzed for bacterial counting the same way as described above. Two times 10 mL of every dilution were processed directly after preparation using the ADIAPURE PARATB MILK kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) according to manufacturers' instructions to extract MAP DNA based on immunomagnetic separation (IMS). Subsequently, the extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) under the same conditions described above and mean C_t values were determined. Samples with C_t values ≤ 40.0 were considered positive. Values above the detection limit of 40.0 were considered negative and defined as 40.01 for analysis.

The experiment was performed twice, each time with newly prepared spiked colostrum.

2.4.2. Colostrum Samples Collected in the Study Herd Animals

As described above, 55 milking goats were sampled directly after parturition during the first milking time. Bulk colostrum consisted of the milk from two to twelve goats. The age of the individually sampled goats varied between one and seven years. None of the goats showed clinical signs of paratuberculosis. Nine of the 55 individual colostrum sample sets (16.4%) originated from goats with at least one positive fecal culture result during regular herd examinations since 2018. A bulk colostrum sample was defined as originating from MAP-positive goats if at least one of the contributing goats was classified as MAP-positive. Seven of 14 collected bulks (50.0%) contained the milk of one (3/7; 42.9%) or two (4/7; 57.1%) infected goats. Detailed information about the origin of the samples is provided in Table 1 and Figure 1.

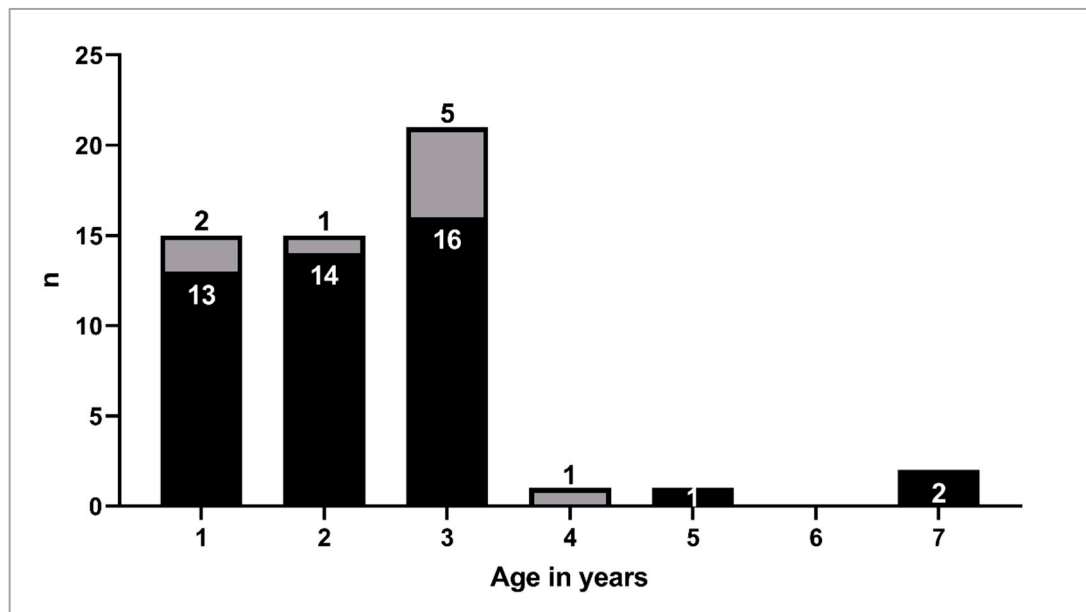


Figure 1. Age distribution and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) status of the sampled goats within the study ($n = 55$). MAP-negative (black, $n = 46$), MAP-positive (gray, $n = 9$).

Sampling

Two colostrum samples ($n = 110$) of approximately 30 mL each were obtained per animal on the day of lambing from both udder halves while standing in the rotary milking parlor. The first one was taken from the non-disinfected udder followed by a second sample after cleaning with a mycobactericidal disinfectant (Sterilium Tissue, BODE CHEMIE GmbH, Hamburg, Germany) and discard of the first milk. Furthermore, bulk colostrum samples ($n = 14$) were collected for analysis. A total of 50 mL of the separate bulks were bottled out of the collection bucket into a vial after the end of the milking time. All samples were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ directly after collection, transferred to the laboratory and kept at this temperature until further processing.

Samples were thawed at room temperature. In total, 10 mL of each colostrum sample was processed using the ADIAPURE PARATB MILK kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). DNA extracts were examined in duplicate by the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) following instructions provided by the manufacturer. Mean C_t values of the duplicates were determined. Samples with C_t values ≤ 40.0 were considered positive. Values above the detection limit of 40.0 were considered negative and defined as 40.01 for analysis.

2.5. Data Analysis

Data analysis was performed using Microsoft Office Excel version 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Figures were created using GraphPad Prism software version 9.1.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. MAP Contamination of Udder Skin

3.1.1. Detection Limit of MAP in Swab Samples

The colony counts revealed total MAP numbers in the OD-adjusted bacterial suspensions of 1.6×10^7 cfu/mL for the comparison of dry and moistened swabs (trial 1) and 2.1×10^7 cfu/mL for the following experiment with dry swabs only (trial 2).

C_t values obtained from dry swabs were higher than from moistened swabs in the 10^2 dilution (31.4 vs. 29.8). This difference disappeared in the 10^{-4} dilution (38.1 vs. 37.6) (Figure 2a). Apart from one detection in the 10^{-6} dilution of the MAP-suspension, C_t

values were regularly measured up to the 10^{-4} dilution corresponding to a MAP load of $1.6\text{--}2.1 \times 10^2$ cfu/cm² of skin when dry cotton swabs were used (Figure 2b).

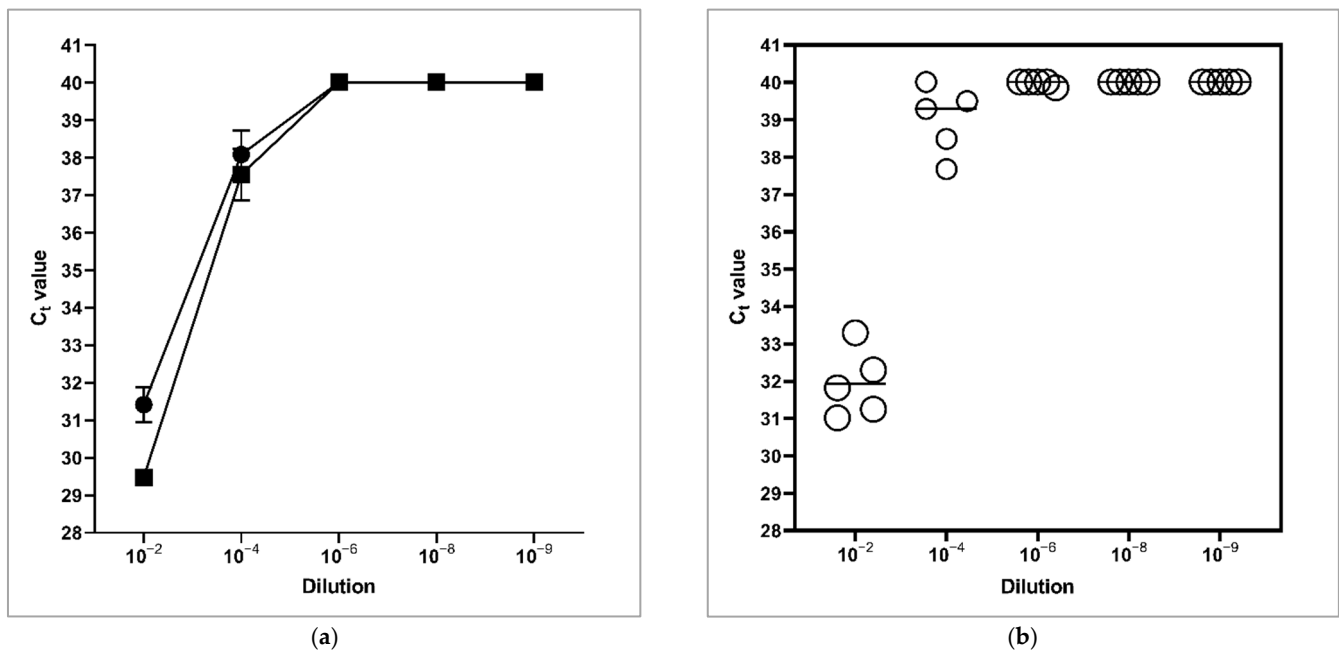


Figure 2. C_t values obtained for serial dilutions of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on udder skin by sampling with cotton swabs after DNA extraction using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). (a) Comparison of dry (●) and moistened swabs (■) expressed as means \pm SD; (b) Comparison of dry swabs from trial 1 and 2. Each dot represents an individual sample. Mean C_t values of the dilutions are denoted by horizontal lines.

MAP was cultivated out of all dry (5/5, 100%) and all moistened (2/2, 100%) swab samples of the 10^{-2} dilution within six weeks after inoculation and out of 3/5 (60%) of the dry swab samples of the 10^{-4} dilution within six to eight weeks after inoculation. MAP was not isolated from all other dry and moistened swabs of the dilutions 10^{-4} to 10^{-9} . Hence, the detection limit by culture for viable MAP on the udder skin of goats using dry swabs is between 10^2 and 10^4 cfu/cm².

3.1.2. Detection of MAP on the Udder Skin of Goats from a MAP-Positive Dairy Herd

MAP could not be cultivated from any of the processed swab samples ($n = 49$). C_t values of 35.8, 38.7 and 39.5, respectively, were detected in three of the 29 swab samples (10.3%), which were analyzed by qPCR. All positive samples originated from MAP-negative goats.

3.2. MAP Contamination of Colostrum

3.2.1. Detection Limit of MAP in Spiked Colostrum Samples

The colony counts revealed total MAP numbers in the OD-adjusted bacterial suspensions of 7.9×10^7 cfu/mL for the first trial and 3.3×10^7 cfu/mL for the second trial. The lowest dilution in spiked colostrum giving a detectable qPCR signal was about 10^{-6} (Figure 3), corresponding to a MAP load of 33–79 cfu/mL. Lower bacterial counts were not detectable. Hence, the detection limit for MAP DNA in goat colostrum is between 33 and 79 cfu/mL.

3.2.2. Detection of MAP in Colostrum of Goats from a MAP-Positive Dairy Herd

MAP could be detected neither in one of the 110 colostrum samples from 55 different goats nor in the 14 bulk colostrum samples by qPCR. All individual colostrum samples

obtained before and after a cleaning of the udder with a mycobactericidal disinfectant were negative.

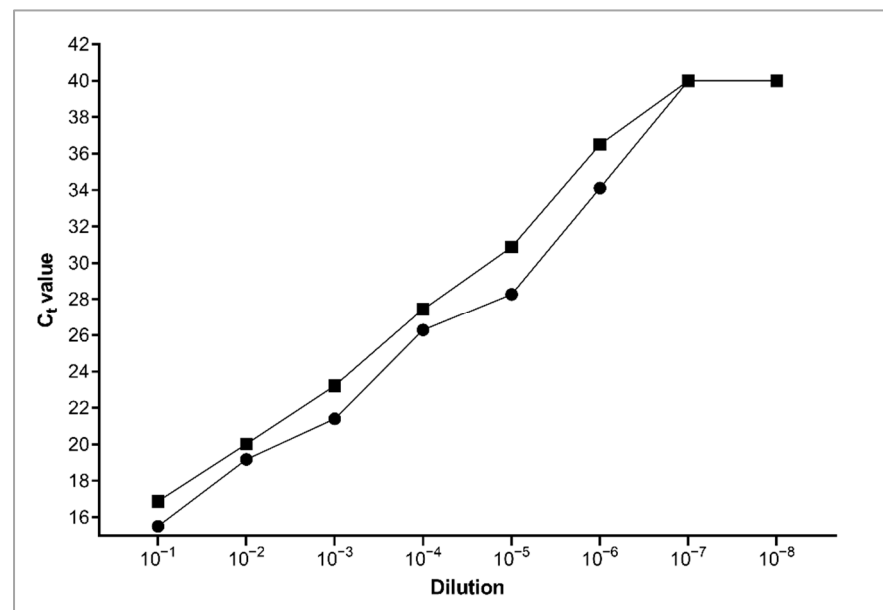


Figure 3. C_t values obtained for serial dilutions of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in caprine colostrum after DNA extraction using the ADIAPURE PARATB MILK kit and the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). Trial 1 (■) and trial 2 (●).

4. Discussion

This study analyzed colostrum samples and swabs of the udder skin from milking goats of a paratuberculosis-positive herd to determine the prevalence of MAP on the udder skin and in the colostrum. Furthermore, the effect of a disinfection of the udder on the occurrence of MAP in the colostrum was evaluated to ascertain if this measure can prevent a possible carry over of MAP out of the farm environment via the udder skin into the colostrum.

Assessment of MAP prevalence on the udder skin as a source of contamination of colostrum or milk was the first part of the study. For the sampling, a new protocol based on wiping sterile cotton swabs over the udder skin was developed and tested for its sensitivity concerning the detection of MAP DNA by qPCR and viable MAP by culture. Furthermore, we examined if dry or moistened swabs achieved better results. MAP DNA could be detected for amounts of 1.6 to 2.1×10^2 cfu/cm² and cultivation was successful down to bacterial loads between 10^2 and 10^4 cfu/cm². The direct comparison between dry and moistened cotton swabs revealed similar C_t values for DNA detection. Because of the comparable analytic sensitivity of both variants, it was decided to use dry swabs for the sampling of the goats in this study. This would also prevent a potential cross contamination using the same fluid to moisten different swabs during sampling at the farm.

In contrast to Pithua et al. [10], who detected MAP DNA in 60% of teat swabs of milking cows from a herd with paratuberculosis, in the present study, MAP could only be detected in 10.3% (3/29) of the samples. The high C_t values in combination with the completely negative culture results indicate a low contamination of the udder skin of dairy goats from the study herd with MAP. All positive samples originated from MAP-negative goats. This fact and the negative results of five MAP-positive animals lead to the assumption that the occurrence of MAP on the udder skin is independent from the fecal MAP status of the individual goat. However, the small number of samples allows no conclusion about the significance of this finding.

MAP DNA was not detected in the colostrum samples of the goats before and after disinfection of the udder skin. These results are in contrast to the common assumption that MAP can be shed into colostrum. For dairy cows, evidence for that transmission route is provided by some studies [4,8]. External contamination of colostrum by feces is discussed as an alternative source for MAP introduction [5,8,10]. Because of the limited number of studies concerning MAP detection in colostrum in small ruminants [9,18] it is difficult to rate our results in the context of the current knowledge concerning this field of research.

The fact that MAP DNA was not found in the 55 individual colostrum samples obtained aseptically after disinfection of the udder provided evidence that lactogenic shedding did not occur in the goats of our study. However, it cannot be ruled out that the MAP load of the colostrum, if any, was below the detection limit of our method, which amounted to 33–79 cfu/mL. As the commercial test kit for the detection of MAP used in this study was only validated for bovine milk, the detection limit for goat colostrum had to be determined in advance. Analysis of milk samples is hampered by the high content of protein and fat contributing to a low sensitivity of direct PCR without any further preparation of the sample [19]. This situation worsens when colostrum has to be examined due to its characteristic composition. Colostrum contains a higher proportion of fat, protein and somatic cells than milk [4,20]. Sample preparation by IMS has been proven to be an effective way to lower the detection limit of MAP in milk samples [19]. The specific method of IMS enables the separation of the desired bacteria from other PCR-inhibiting contents and their concentration. Using colostrum from the study herd, a limit of detection between approximately 33 and 79 cfu/mL was revealed. This is comparable to the limits of an IMS protocol developed by Grant [21] for the analysis of bovine milk samples with 20 cfu/mL. Therefore, a serious failure of the detection method is unlikely.

As shown by another study, an interference between the antibodies used for IMS and host antibodies induced by vaccination is unlikely. Djørne et al. [22] analyzed milk samples from goats at different points of lactation with a self-designed IMS method. There was no difference between vaccinated and unvaccinated animals concerning the percentage of positive samples.

Currently there is no certain knowledge about the amount of MAP shed into milk or the colostrum [23]. For infected but asymptomatic cows, a number of 2–8 cfu per 50 mL milk was suggested [7]. Stabel et al. [4] showed a relation between clinical disease stage and probability of lactogenic shedding of MAP. In total, 12.6% of analyzed milk samples from cows with subclinical and 49.2% from cows with clinical paratuberculosis were positive using direct PCR. Furthermore, the amount of MAP was higher in samples from clinically affected cows. An association between the occurrence of lactogenic and the intensity of fecal shedding in cows was also observed [8]. In that study, MAP was more often detected in the colostrum of high fecal shedders than of light shedders, but colostrum from two non-shedding cows was also positive for MAP. As there was not one goat in the clinical stage of paratuberculosis and just 16.4% (9/55) were diagnosed as infected with MAP in our study, this may have influenced the allover negative results. Furthermore, the whole study herd was vaccinated against paratuberculosis. The goal of this measure was to reduce MAP-shedding and to protract the clinical stage of the disease [2]. The probability to detect MAP in colostrum samples resulting from lactogenic shedding of the pathogen was therefore lower as if the study would have been carried out in a herd with a higher disease prevalence or if just infected goats or animals showing clinical symptoms of paratuberculosis would have been sampled. Additionally, 30 out of the 55 examined goats (54.5%) were two years or younger (Figure 1). As the severity of the disease increases with age [1], as a consequence, the likelihood of lactogenic shedding is low, as younger goats are more likely not to shed MAP into the colostrum. This assumption is supported by findings of Djørne et al. [22], who analyzed milk samples from goats of different ages and revealed that older goats showed more often positive results than younger goats. Nevertheless, the goats selected for this investigation represent the age profile of the study herd which is typical for a commercial dairy herd. In consideration of the limitations resulting from the

age as well as the corresponding stage of disease and amount of shedding, we decided not to apply any selection criteria to the sampled goats to avoid a selection bias.

Lactogenic shedding of MAP is assumed to be discontinuous as has been shown for fecal shedding [24,25]. During the dry period, MAP is possibly transferred within macrophages from the intestine over the lymphatic system to the udder. This can lead to an accumulation in the colostrum because macrophages are the most common mononuclear cells in the first milk [26,27]. This assumption was strengthened by studies where cows were sampled several times during lactation and more colostrum than milk samples were positive for MAP [4,8]. Similar results were observed for the lactogenic shedding in asymptomatic sheep. However, whereas six out of 20 examined sheep showed lactogenic shedding approximately ten days after parturition, no positive milk sample was obtained from goats (0/9) at this point [24]. This matches the negative results of the analyzed goat colostrum samples in our study. MAP-infected goats in the subclinical stage of disease appear to have a lower likelihood for MAP-positive colostrum than other ruminant species. In a study from The Netherlands, MAP could not be detected in any colostrum sample from animals in the subclinical stage of disease, whereas it was detected in four percent of the milk samples obtained later during lactation [18]. MAP was also detected in milk samples from dairy goats during different timepoints of lactation in a study from India [25]. Although the number of relevant studies is very small, there seems to be a genus difference which cannot be explained at the moment. Further studies are necessary to prove this difference and to elucidate the pathogenetic mechanisms behind it.

In addition to the individual colostrum samples, the analyzed bulk colostrum had also tested negative for the occurrence of MAP. These results were not surprising as the bulk colostrum was composed of the colostrum of two to twelve goats, where MAP was not detected in the individual samples. Even if MAP was detected in a small number of individual samples, the dilution effect resulting from pooling of different colostrum would have led to a further reduction of MAP per mL, possibly below the detection limit. Bulk colostrum in the study herd is prepared by milking individual goats into a container using a separate milking machine. This practice does not seem to be a source of contamination of the colostrum with MAP from the environment.

Due to the detection limit of 33–79 cfu/mL, the negative bulk colostrum samples can contain a small number of MAP, as already discussed. If this amount per mL is summed up to the recommended amount of colostrum of about 500 mL that the kid should receive within the first day of life, this can cause a total MAP intake of up to 10^4 cfu. Compared to an assumed infectious dose of 50 to 1000 cfu [26], an infection remains possible. This underlines the necessity of good colostrum management in the herd.

Despite the missing detection of MAP in the analyzed colostrum samples, general recommendations concerning youngstock rearing in paratuberculosis-infected herds should be applied. This includes the feeding of colostrum only from MAP-negative goats. Furthermore, the feeding of bulk colostrum is critical and should be avoided wherever possible. This may reduce the potential spread of even low numbers of MAP to several kids in herds with a high prevalence of MAP-shedding goats. Moreover, hygienic collection, storage and feeding is the basis for a good kid health in general. This can also include a preventive disinfection or cleaning of the udder before milking colostrum to minimize contamination with MAP as well as other bacteria.

In the present study, the assumed transfer of MAP over the udder skin into the colostrum could not be proven because most of the udder skin swabs were negative and MAP could not be detected in the colostrum samples before disinfection. Nevertheless, this finding remains a hypothesis and should be further examined. The presumably higher prevalence of MAP on the udder skin of dairy cows in comparison to goats suggests performing such a study in cattle as well.

5. Conclusions

MAP DNA could not be detected in colostrum samples from milking goats of a paratuberculosis-positive vaccinated herd. Despite contamination of the farm environment due to fecal shedders, the transmission of MAP onto the udder skin is low. The results suggest a minor risk of MAP transmission into the colostrum from the udder skin during the milking process. These findings stand in contrast to results from dairy cows where MAP detection in both sample types has been reported. As this pilot study only analyzed a small number of samples from one farm, further studies in dairy goat herds have to be conducted to confirm reproducibility of the presented results, preferably using the methods evaluated for this study to ensure comparability.

Common recommendations concerning colostrum and youngstock management for herds of small ruminants are often derived from cattle. With respect to the assumed differences between these genera concerning the presence of MAP in colostrum, recommendations regarding hygiene improvement for the control of paratuberculosis in small ruminants should be re-evaluated.

Author Contributions: Conceptualization, C.P., K.D., U.M. and H.K.; formal analysis, C.P. and U.M.; funding acquisition, K.D. and H.K.; methodology, C.P. and H.K.; project administration, H.K.; visualization, C.P. and H.K.; writing—original draft, C.P. and H.K.; writing—review and editing, K.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) via the Thüringer Aufbaubank, grant number 2019 LFE 0017.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Thuringian State Office for Consumer Protection, which is competent authority for research ethics approval in Thuringia (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103, date of approval 1 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank the dairy goat farmer involved in this study for his cooperation and friendly support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Windsor, P.A. Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* **2015**, *181*, 161–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Whittington, R.; Donat, K.; Weber, M.F.; Kelton, D.; Nielsen, S.S.; Eisenberg, S.; Arrigoni, N.; Juste, R.; Sáez, J.L.; Dhand, N.; et al. Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Collins, P.; Davies, D.; Matthews, P. Mycobacterial infection in goats: Diagnosis and pathogenicity of the organism. *Br. Veter. J.* **1984**, *140*, 196–201. [[CrossRef](#)]
4. Stabel, J.; Bradner, L.; Robbe-Austerman, S.; Beitz, D. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 6296–6304. [[CrossRef](#)]
5. Windsor, P.A.; Whittington, R.J. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Veter J.* **2010**, *184*, 37–44. [[CrossRef](#)]
6. Alexejeff-Goloff, N.A. Zur Frage der Pathogenese und Bazillenausscheidung bei Rinderparatuberkulose. *Zeits. Infekt. Krank. Haus.* **1929**, *36*, 313–317.
7. Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H.; Rosenberger, A.E. Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 166–171. [[CrossRef](#)]
8. Streeter, R.N.; Hoffsis, G.F.; Bech-Nielsen, S.; Shulaw, W.P.; Rings, D.M. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* **1995**, *56*, 1322–1324.
9. Roberto, J.P.d.L.; Limeira, C.H.; Barnabé, N.N.D.C.; Soares, R.R.; Silva, M.L.C.R.; Gomes, A.A.D.B.; Higino, S.S.D.S.; de Azevedo, S.S.; Alves, C.J. Antibody detection and molecular analysis for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) in goat milk: Systematic review and meta-analysis. *Res. Vet. Sci.* **2021**, *135*, 72–77. [[CrossRef](#)]
10. Pithua, P.; Wells, S.J.; Godden, S.M.; Stabel, J.R. Evaluation of the association between fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* and detection in colostrum and on teat skin surfaces of dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2011**, *238*, 94–100. [[CrossRef](#)]

11. Lombard, J.; Wagner, B.; Smith, R.; McCluskey, B.; Harris, B.; Payeur, J.; Garry, F.; Salman, M. Evaluation of Environmental Sampling and Culture to Determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Distribution and Herd Infection Status on US Dairy Operations. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 4163–4171. [[CrossRef](#)]
12. Whittington, R.J.; Marsh, I.B.; Taylor, P.J.; Marshall, D.J.; Taragel, C.; Reddacliff, L.A. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* **2003**, *81*, 559–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Eisenberg, S.; Nielen, M.; Santema, W.; Houwers, D.; Heederik, D.; Koets, A. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet. Microbiol.* **2010**, *143*, 284–292. [[CrossRef](#)]
14. Donat, K.; Schau, U.; Soschinka, A. Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mithilfe von Umgebungskotproben. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **2011**, *124*, 360–367. [[CrossRef](#)]
15. Whittington, R.J.; Marshall, D.J.; Nicholls, P.J.; Marsh, I.B.; Reddacliff, L.A. Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2989–3004. [[CrossRef](#)]
16. Friedrich-Loeffler-Institut. Paratuberkulose: Amtliche Methode und Falldefinition. Available online: https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00058039 (accessed on 5 May 2020).
17. Collins, D.M.; De Zoete, M.; Cavaignac, S.M. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains from Cattle and Sheep Can Be Distinguished by a PCR Test Based on a Novel DNA Sequence Difference. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 4760–4762. [[CrossRef](#)]
18. Lievaart-Peterson, K.; Lutikholt, S.; Gonggrijp, M.; Ruuls, R.; Ravestloot, L.; Koets, A.P. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA and Antibodies in Dairy Goat Colostrum and Milk. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Husakova, M.; Dziejzinska, R.; Slana, I. Magnetic Separation Methods for the Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Various Types of Matrices: A Review. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 5869854. [[CrossRef](#)]
20. Sánchez-Macías, D.; Moreno-Indias, I.; Castro, N.; Morales-delaNuez, A.; Argüello, A. From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 10–16. [[CrossRef](#)]
21. Grant, I. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet. Microbiol.* **2000**, *77*, 369–378. [[CrossRef](#)]
22. Dønne, B.; Jensen, M.; Grant, I.; Holstad, G. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* **2003**, *92*, 135–143. [[CrossRef](#)]
23. Barkema, H.W.; Orsel, K.; Nielsen, S.S.; Koets, A.P.; Rutten, V.P.M.G.; Bannantine, J.P.; Keefe, G.P.; Kelton, D.F.; Wells, S.J.; Whittington, R.J.; et al. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 125–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nebbia, P.; Robino, P.; Zoppi, S.; De Meneghi, D. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Rumin. Res.* **2006**, *66*, 116–120. [[CrossRef](#)]
25. Singh, M.; Gupta, S.; Chaubey, K.K.; Singh, S.V.; Sohal, J.S. Profiling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the milk of lactating goats using antigen-antibody based assays. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *64*, 53–60. [[CrossRef](#)]
26. Chiodini, R.J. Immunology: Resistance to Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **1996**, *12*, 313–343. [[CrossRef](#)]
27. Hurley, D.J.; Kensinger, M.H.; Mastro, A.M.; Wilson, R.A. An evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and non-specific esterase staining. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1990**, *25*, 177–193. [[CrossRef](#)]

Article

Mycobacterium avium subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn—Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention

Chris Pickrodt ^{1,2}, Karsten Donat ^{2,3}, Udo Moog ³ and Heike Köhler ^{1,*}

¹ Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany; chris.pickrodt@fli.de

² Clinic for Obstetrics, Gynaecology and Andrology for Large and Small Animal Science with Veterinary Ambulance, Justus-Liebig-University Gießen, Frankfurter Straße 106, 35392 Gießen, Germany; kdonat@thtsk.de

³ Thuringian Animal Diseases Fund, Victor-Goerttler-Straße 4, 07745 Jena, Germany; umoog@thtsk.de

* Correspondence: heike.koehler@fli.de; Tel.: +49-3641-804-2240

Simple Summary: Paratuberculosis is a chronic inflammatory disease leading to emaciation and production losses in ruminants. Important aspects of disease control are the detection of infected herds and environmental areas where contact between animals and the causative pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is possible. Bedding, dust, feed, and water samples were collected from the barn of a paratuberculosis-infected dairy goat herd and analyzed for culturable MAP and MAP DNA. Cultivation was successful in 28 bedding and one dust sample, while MAP DNA was detected in 117 out of 256 samples from all materials. Samples collected from areas of high animal traffic, such as the milking parlor, were more likely to reveal positive results than adult and young goat areas. Positive culture results were also obtained from kidding pens, constituting this barn area as a possible infection site. Overall, environmental sampling may be suitable for the detection of MAP in goat herds and the identification of potential critical areas for pathogen transmission. These results should be taken into account for paratuberculosis control programs in goat herds to improve their efficiency and, thus, animal welfare.

Abstract: Environmental samples are often used to classify the paratuberculosis status of cattle herds. The disease is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), predominantly through oral ingestion during infancy. In this explorative study, the presence of MAP was determined in the barn environment of a paratuberculosis-infected vaccinated dairy goat herd. A total of 256 bedding, dust, feed, and water samples were collected at eight time points and examined using culture and qPCR. Detection rates of both methods were compared, and factors determining MAP confirmation were identified. MAP was cultured from 28 bedding and one dust sample, while MAP DNA was detected in all materials (117/256). Samples from high animal traffic areas and those collected during the indoor season were more likely to yield positive culture and qPCR results. Cultivation of MAP from kidding pens indicated this area as a possible infection site. Dust proved to be the most suitable material for detecting MAP DNA, as bedding was for MAP culture. Environmental sampling was demonstrated to be an effective way to detect MAP in a dairy goat herd. qPCR results could confirm herd infection, while culture results provided insight into crucial areas for MAP transmission. These findings should be considered when designing farm-specific paratuberculosis control plans.

Keywords: small ruminants; Johne's disease; MAP; environmental sampling; bedding; dust; feed; water; transmission; control program



Citation: Pickrodt, C.; Donat, K.; Moog, U.; Köhler, H. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Different Environmental Samples from a Dairy Goat Barn—Implications for Sampling Strategies for Paratuberculosis Diagnostic and Prevention. *Animals* **2023**, *13*, 1688. <https://doi.org/10.3390/ani13101688>

Academic Editor: Valentina Virginia Eban

Received: 28 March 2023

Revised: 11 May 2023

Accepted: 12 May 2023

Published: 18 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Paratuberculosis is a chronic inflammatory intestinal disease of major economic importance in domestic ruminants. It is caused by an infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) which usually occurs in the first days of life. The slow disease progression results in a long incubation period until symptoms such as diarrhea, decreasing milk yield, and emaciation up to death appear. Possible routes of transmission include oral ingestion of the pathogen, inhalation, or in-utero infection [1–6].

MAP is shed with the feces of infected animals and can remain infectious in the environment for almost one year, even outside a suitable host [1,7]. Detection of MAP in samples taken from the immediate environment of the animals can be exploited in two directions. First, when applied in the monitoring of paratuberculosis, this approach can be used for the identification of MAP-positive herds, ensuring a high probability of truly positive results. This is an important aspect of many control programs [8–10]. Environmental sampling for MAP detection, whether molecular biological or cultural, is considered to be cost-effective and highly specific [10–12]. Secondly, this diagnostic approach can identify areas with a high bacterial load that may serve as infection sources for susceptible animals in the herd. This can be valuable information in the framework of veterinary risk assessment within a herd aiming to improve hygiene and management.

Most studies concerning MAP detection in environmental samples have been conducted in cattle farms. Due to the partly considerable differences in the husbandry conditions of cattle and small ruminants, it is not possible to transfer the results obtained to other animal species without further verification. Only one previous study focused on grazing sheep flocks, including some combined herds of sheep and goats [13]. Systematic environmental sampling in dairy goat barns has not yet been conducted.

Different materials have been analyzed for the presence of MAP. As the pathogen is shed with feces, most studies conducted focused on manure samples. However, MAP has also been found in dust, water, feed, and soil samples from in and outside the barn [9–17]. A comparison between different matrices collected in the same barn to determine which is best suited for MAP detection in goat barns has been lacking. Barn areas with high animal traffic, such as alleyways and the milking parlor, revealed the highest incidence of MAP-positive samples in several studies in cattle, whereas calving pens and youngstock areas were less affected [9–12,18]. In this regard, both culture and qPCR appear to be appropriate detection methods and comparable in terms of their performance [14–16]. However, herds with a low prevalence may be misclassified as uninfected due to negative environmental samples caused by intermittent pathogen shedding or dilution as well as dissemination effects [17]. For this reason, repeated collection of multiple environmental samples is recommended to increase sensitivity [9,19,20].

The approach of drawing implications for disease management from environmental sampling results has been rarely investigated in cattle [21] but so far not in goats. The main objective during youngstock rearing should always be to prevent exposure of kids, lambs, and calves to MAP as long as possible. Although the minimal infectious dose has not yet been determined, the later exposure occurs, and the less MAP is taken up, the lower the likelihood for successful infection and or fast clinical expression may be [1,22,23]. High-risk areas for pathogen transmission should be identified, results critically evaluated, and measures for MAP reduction and contact minimization implemented in every individual farm-level paratuberculosis control plan.

Here, we present the results of an explorative study conducted on one dairy goat farm. It focused on MAP detection in environmental samples from a goat barn, as previously shown for cattle and sheep farms. The objective was to evaluate the suitability of different sample materials, sites, seasons, and analysis methods (qPCR and culture) for identifying a paratuberculosis-infected goat herd. In addition, the study aimed at determining crucial barn areas for exposure of kids to MAP to enable their integration into management strategies for effective disease control.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Welfare and Legislation

The study was approved by the Animal Health and Welfare Unit of the Thuringian State Office for Consumer Protection (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103) and carried out in accordance with European and national laws. Every effort was made to minimize suffering.

2.2. Study Herd

The study was conducted in an organic dairy goat farm in Thuringia, Germany, between 2020 and 2022. The herd was affected by paratuberculosis. MAP was first confirmed culturally in 2018 in different tissues of a clinically affected goat after diagnostic necropsy. Because of numerous clinical cases, all adult goats and the annual female youngstock were subsequently vaccinated with an inactivated vaccine (Gudair, CZ Vaccines, O Porriño, Spain), while goats showing severe clinical signs of paratuberculosis were culled.

Young and adult goats were kept in loose housing on deep litter in different open pens within the same building. The rotary milking parlor was located in a separate part of the building attached to the animal husbandry area. The parlor was entered from a passage from the waiting area adjacent to a part of the lactating goat pen. All lactating goats were driven into the waiting pen for milking twice a day.

Kids were raised at the farm for replacement. They were separated from the doe immediately after birth. About 20 age-grouped kids each were kept in temporary detached pens until reaching a body weight of about 15 kg. At about five months of age, the juvenile goats were moved from the group pen in the kid-rearing area to the juvenile goat pen on the opposite side of the building, and the kid pens were deconstructed afterwards. The kid-rearing area was cleaned and disinfected using white hydrated and slaked lime (calcium hydroxide) before new kid pens were built during the next kidding season.

Rotational grazing was performed during the grazing season between May and November. Young goats were turned out to graze after their first kidding. In 2020 and 2021, dried-off goats were grouped in separate pens approximately two months before kidding, whereas no dry goat/kidding pens were set up in 2022. The deep litter was removed from the pens before the end of each grazing season, followed by cleaning and disinfection using slake lime. In between, new bedding material was added every day as necessary to ensure clean udder skins and coats.

2.3. Study Design

Environmental samples were collected at eight environmental sampling events (ES) between 2020 and 2022. ES 1, 2, and 3 were conducted within a six-month interval, while the sampling frequency was enhanced to approximately every three months from ES 4 onwards (Figure 1).

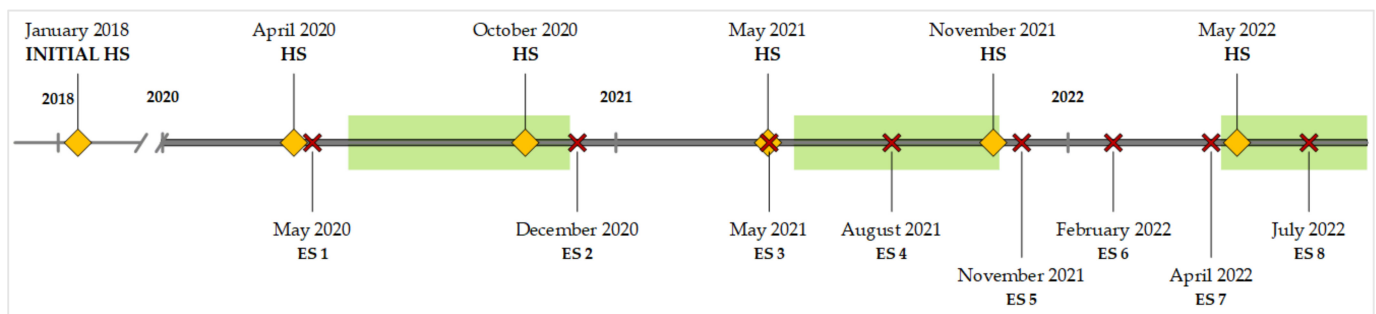


Figure 1. Sampling schedule for fecal and environmental samples between 2018 and 2022. HS = herd sampling (♦), ES = environmental sampling (×). Grazing seasons are marked as green boxes.

Herd sampling to determine fecal shedding of MAP was first conducted in February 2018 and then biannually between 2020 and 2022 (Figure 1).

2.4. Environmental Sample Collection

The following nine sampling sites were defined: entrances to the barn, waiting area in front of the milking parlor, milking parlor, exit of the milking parlor, lactating goat pen (divided into four quadrants: Q1–Q4), dry goat/kidding pen(s), buck pen, juvenile goat pen, and goat kid pen(s). If more than one dry goat/kidding or goat kid pen existed at the same time, each pen was sampled individually. Four different materials (bedding, dust, water, feed) were collected from each site if available. Due to herd management, it was not possible to sample all locations or collect all different sampling materials at each ES. A detailed breakdown of all collected environmental samples ($n = 256$) at the respective ES and sampling sites is provided in Appendix A (Table A1).

Bedding material from approximately five spots within a whole pen or pen quadrant was combined into one composite sample. Deviating from this procedure, four individual samples were collected from kidding pens. Feed samples were collected out of racks or from the ground when forage was offered in front of the respective pen. Each feed and bedding sample was collected manually using a fresh glove. The samples contained between 50 and 250 g of forage or bedding with fecal material. The material was placed in a plastic bag, transferred to the laboratory, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dust samples were scraped from the surface of the barn facilities in a 50 mL tube using a scalpel. Water from drinking troughs was collected using a 1 L vial scooped through the trough. Dust and water samples were transferred to the laboratory and stored at room temperature until further processing.

2.5. Sample Preparation and Analysis

2.5.1. Fecal Samples

Fecal samples from every goat older than one year were examined by bacterial culture according to the official manual of diagnostic procedures published by the Friedrich-Loeffler-Institute [24]. In short, 3 g of feces were decontaminated over 48 h at room temperature using 30 mL of 0.75% hexadecylpyridinium chloride monohydrate solution (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). The supernatants were discarded, and 200 μL of the remainder were transferred on each of three slopes of Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and Amphotericin, Nalidixic acid and Vancomycin (HEYM, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Cultures were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for up to six months. Examination of bacterial growth was conducted every second week, starting after 42 days. The presence of MAP was confirmed by IS900 PCR [25] of characteristic colonies.

2.5.2. Bedding and Feed Samples

Samples were thawed overnight and processed according to Whittington et al. [7], modified as follows: 50 g of each sample was placed in a lockable plastic container. Then, 500 mL of sterile distilled water was added to cover the material completely. After intensively shaking by hand, containers were agitated in a shaking incubator overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 50 rpm. Stepwise, the liquid was poured off and collected in 50 mL vials, followed by centrifugation at 4200 rpm for 20 min. Two aliquots of 3 g each from the obtained pellet were portioned into two vials for further cultural and molecular biological examination. If the total pellet weight was below 6 g, the pellet was divided into two equal parts, and volumes of further additives were adjusted proportionally.

Based on the procedure applied to the fecal samples, the first aliquot of this pellet was processed for bacterial cultivation in the same way as described above using three slopes of HEYM (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Examination of bacterial growth was conducted over six months, and the presence of MAP was confirmed by IS900 PCR [25] of characteristic colonies. Based on the approach of Köhler et al. [26], a colony score (CS) from 0 to 5 was used to estimate MAP growth semi-quantitatively (0 = 0; 1 = 1–10; 2 = 11–20; 3 = 21–50; 4 = 51–100 individual colonies per slope; 5 = bacterial lawn). The week of ap-

pearance (WA) was also documented. For numerical estimation of the MAP concentration in the sample, a growth index (GI) for each slope was calculated using the formula:

$$GI = CS \times 100/WA \quad (1)$$

followed by determination of the mean of all inoculated slopes of the sample.

For qPCR analysis, 20 mL of sterile distilled water was added to the second aliquot of the pellet. After vigorous vortexing, the sample was left in an upright position for 20 min at room temperature for sedimentation. Then, 10 mL of the supernatant was centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min using an ADIAFILTER (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) to concentrate bacteria and remove PCR-inhibiting substances. The resulting pellet was suspended in 500 μ L sterile distilled water. Then, 300 mg zirconia/glass beads (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) were added and the sample was placed in a Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany) for 10 min at 30 Hz to mechanically disrupt contained bacteria and centrifuged at $15,000 \times g$ for 5 min afterwards. DNA extraction was performed from the supernatant using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium), a detection method based on the amplification of the insertion element IS900 of MAP, following instructions provided by the manufacturer. Data were analyzed using QuantStudio Design & Analysis Software, v1.5.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cycle threshold (C_t) values of the duplicates were determined. Values without a specific qPCR signal were assigned to 45.0. The mean C_t values of the duplicates were calculated and used for sample classification. Samples with mean C_t values ≤ 40.0 were considered positive, and values > 40.0 were considered negative.

2.5.3. Dust Samples

A total of 20 mL of sterile distilled water was added to each sample and the tube vigorously vortexed. After overnight incubation at room temperature, the liquid was divided into two aliquots, and each aliquot was centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min using an ADIAFILTER (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium). Supernatants were discarded, and the pellets were further used, one for cultural and one for qPCR analysis as described above, with slight modifications. The pellet used for bacterial cultivation was decontaminated with only 5 mL of 0.75% hexadecylpyridinium chloride monohydrate solution (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany).

2.5.4. Trough Water Samples

The whole sample volume of 1 L was stepwise centrifuged in tubes of 50 mL at 4200 rpm for 20 min. The resulting pellet was suspended in 2 mL of sterile distilled water, from which 1 mL was further processed for bacterial cultivation according to the method described for the dust samples.

From samples obtained during ES 1, 2 and 3, 500 μ L of the remaining 1 mL specimen were processed for qPCR analysis as described for the bedding and feed samples. From ES 4 onwards, 9 mL sterile distilled water was added to the remaining 1 mL specimen, and further DNA extraction was performed using the ADIAPURE PARATB MILK kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) according to the manufacturer's instructions to extract MAP DNA by immunomagnetic separation. Subsequently, the extracts were analyzed in duplicate with the ADIAVET PARATB REAL TIME PCR kit (Adiagene, Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgium) under the same conditions as described above.

2.6. Data and Statistical Analysis

The Kappa coefficient was calculated for dichotomized MAP detection results (positive or negative) in environmental samples using culture and qPCR to measure the agreement between both detection methods. The result was classified as described by Landis and Koch [27].

Spearman's rank correlation coefficient was calculated to analyze the relationship between the GI (semi-quantitative culture result) and C_t values from qPCR sample analysis for all analyzed samples as well as each individual material if at least one positive culture result was obtained.

Characteristics listed in Table 1 were recorded for each environmental sample. The sampling sites were assigned to the following sampling locations: adult goat area (lactating goat pen, dry goat/kidding pen, buck pen), high animal traffic area (waiting area in front of the milking parlor, milking parlor, exit of the milking parlor), and youngstock area (juvenile goat pen, goat kid pen). Entrances to the barn were allocated to high animal traffic area during the grazing season and to adult goat area during the indoor season.

Table 1. Overview of recorded characteristics and conditions of environmental samples. (MAP = *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, HS = herd sampling).

Characteristic	Conditions
Material	Bedding Dust Feed Water
Location	Adult goat area High animal traffic area Youngstock area
Season	Grazing Indoor
Percentage of MAP shedders at nearest HS	Number culture-positive fecal samples/number analyzed fecal samples \times 100

Logistic regression models were used to determine the likelihood of a positive environmental culture and qPCR result related to the sample characteristics. The dichotomized result of MAP detection by the respective method was set as the dependent variable. Material, location, and season as categorical, as well as the percentage of MAP shedding goats at the nearest herd examination as a numeric independent variable, were entered into the qPCR model. Because there were no cases in certain characteristic condition groups, the independent variable 'material' was excluded from the culture model. For the same reason, samples from the youngstock area were not included. The fit of the models was assessed using the $-2 \log$ -likelihood value.

In general, the statistical significance level was set at $p = 0.05$. Data evaluation and statistical analysis were performed using Microsoft Office Excel version 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and MedCalc version 14.8.1; (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium). Figures were created using MedCalc and Microsoft Visio version 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3. Results

3.1. Herd Examination Using Fecal Culture

Herd examination using fecal culture was conducted six times between 2018 and 2022. Only a small number of the inoculated slants showed fungal growth. However, this did not result in any sample that could not be assessed. The proportion of positive fecal samples dropped from 30.0% (January 2018) to 1.7% (May 2022) over the period of four years, but fecal shedding was present at all time points during the study period (Table 2).

Table 2. Number and culture result of fecal samples collected during six examinations between 2018 and 2022 from goats older than one year.

Herd Examination	Number of Collected Samples	Positive Fecal Culture	
		<i>n</i>	%
2018 January	307	92	30.0
2020 April	286	27	9.4
2020 October	309	16	5.2
2021 May	414	13	3.1
2021 November	382	9	2.4
2022 May	407	7	1.7

3.2. Analysis Results of Environmental Samples

MAP was cultivated out of 28 (25.2%) bedding samples and one (1.8%) dust sample, whereas all water and feed samples were negative for viable MAP. This adds up to cultural MAP detection in 10.5% (29/256) of all environmental samples. Calculated GI ranged from 3.85 to 50.00 (see also Table 4). Fungal growth was partially observed in some dust samples and a few bedding samples, especially towards the end of the cultivation period. Positive culture results were obtained at 7 of 8 sampling time points. In August 2021 (ES4), cultivation of MAP was not possible from any environmental sample (Table A2). Culture-positive samples were obtained from various sites of the goat housing area but not from the youngstock area. Bacterial cultivation succeeded several times from bedding samples from the kidding pen and lactating goat pen as well as the milking area (waiting area, parlor, and exit). This area showed the most culture-positive bedding samples (47.6%), while the milking parlor was the sampling site with the highest proportion of MAP-positive samples (6/8; 75.0%). These sites, grouped together with the barn entrance during the grazing season as areas of high animal traffic, yielded 44.4% (12/27) of the culture-positive bedding samples. Bedding samples from other areas of the lactating goat pen were culturally positive in 38.1% of cases, and thus, this was the sampling site with the second most MAP detections. Kidding pens of adult goats were ranked third with 34.8% (8/23) (Figure 2). The culture-positive dust sample was collected from a kidding pen.

Positive qPCR results were obtained from 37 (64.9%) dust, 55 (49.6%) bedding, 12 (34.3%) water, and 13 (24.5%) feed samples, resulting in MAP DNA detection in 45.7% (117/256) of all environmental samples. The lowest measured C_t value was 27.57, obtained from a water sample. Minimum values of the other matrices were 28.58 (bedding), 31.29 (dust), and 36.11 (feed). The mean C_t value over all positive samples from all matrices was 35.62 (see also Table 4). During every ES, MAP DNA was detected in dust and bedding samples, whereas this was not the case for water and feed specimens (Table A2). In contrast to MAP culture, positive qPCR results were obtained from all areas of the stable, including the area of youngstock rearing and the buck pen (Figure 3).

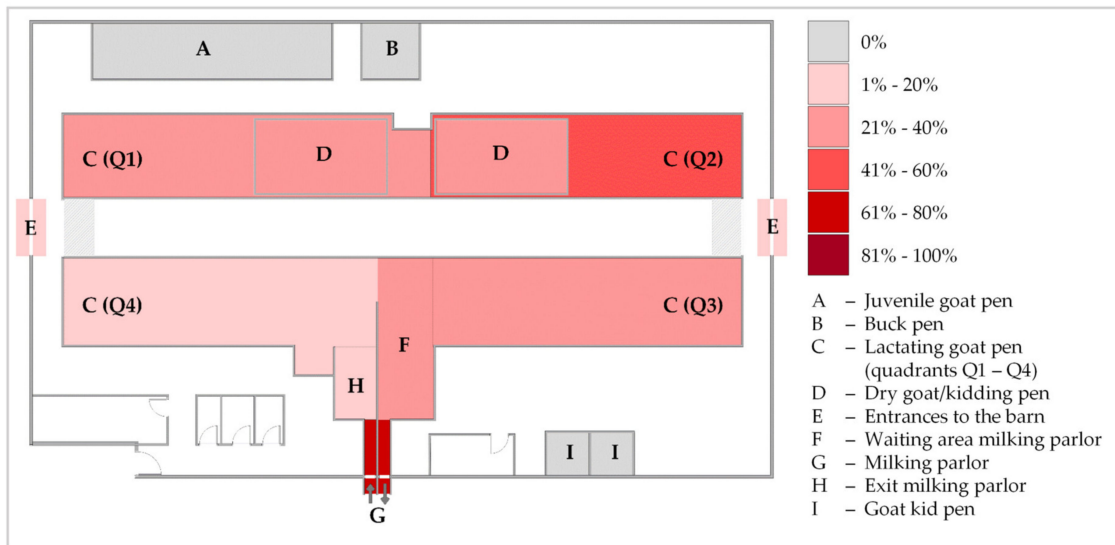


Figure 2. Heatmap indicating the percentage of culture-positive bedding samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the different sampling sites in the dairy goat barn over the study period. Dry goat/kidding pens (D) were set up temporarily within quadrants Q1 and Q2 during the kidding season in 2020 and 2021.

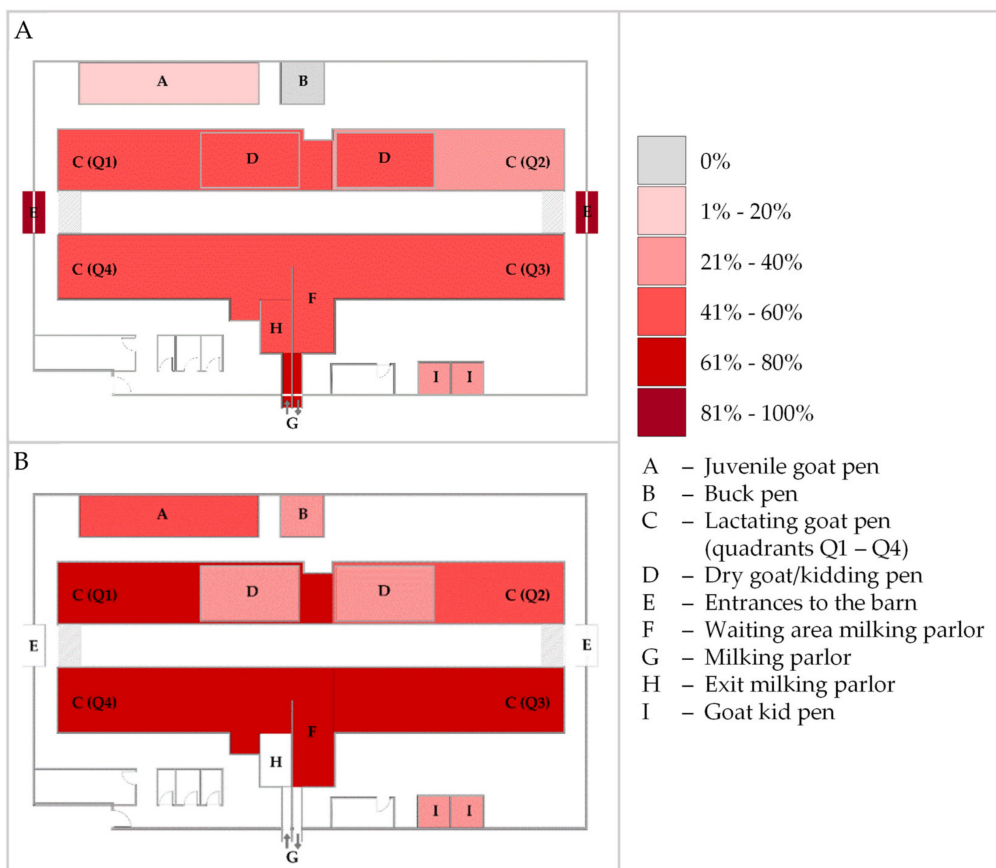


Figure 3. Heatmap indicating the percentage of qPCR-positive bedding (A) and dust (B) samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the different sampling sites in the dairy goat barn over the study period. Dry goat/kidding pens (D) were set up temporarily within quadrants Q1 and Q2 during the kidding season in 2020 and 2021. No dust samples were collected from the barn exits (E), the milking parlor (G), and its exit (H).

3.3. Statistical Analysis

3.3.1. Cohen's Kappa

A slight agreement ($\kappa = 0.20$, 95% CI 0.11–0.28) [27] was observed between the MAP detection results (positive or negative) from environmental sample analysis by cultivation and qPCR (Table 3).

Table 3. Contingency table of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection results by culture and qPCR from 256 analyzed environmental samples used for Kappa test analysis.

qPCR Result	Culture Result		Σ
	Negative	Positive	
Negative	135 (52.7%)	4 (1.6%)	139
Positive	92 (35.9%)	25 (9.8%)	117
Σ	227	29	256

3.3.2. Spearman's Rank Correlation

GI (semi-quantitative culture results) for cultivation on HEYM and qPCR C_t values of all environmental samples were significantly negatively correlated, with a corresponding Spearman's rank correlation coefficient of $\rho = -0.401$ (95% CI -0.499 – -0.293). Bedding samples revealed the strongest correlation ($\rho = -0.529$), followed by dust samples ($\rho = -0.204$). No correlation was calculated for feed and water samples due to complete negative culture results (Figure 4, Table 4).

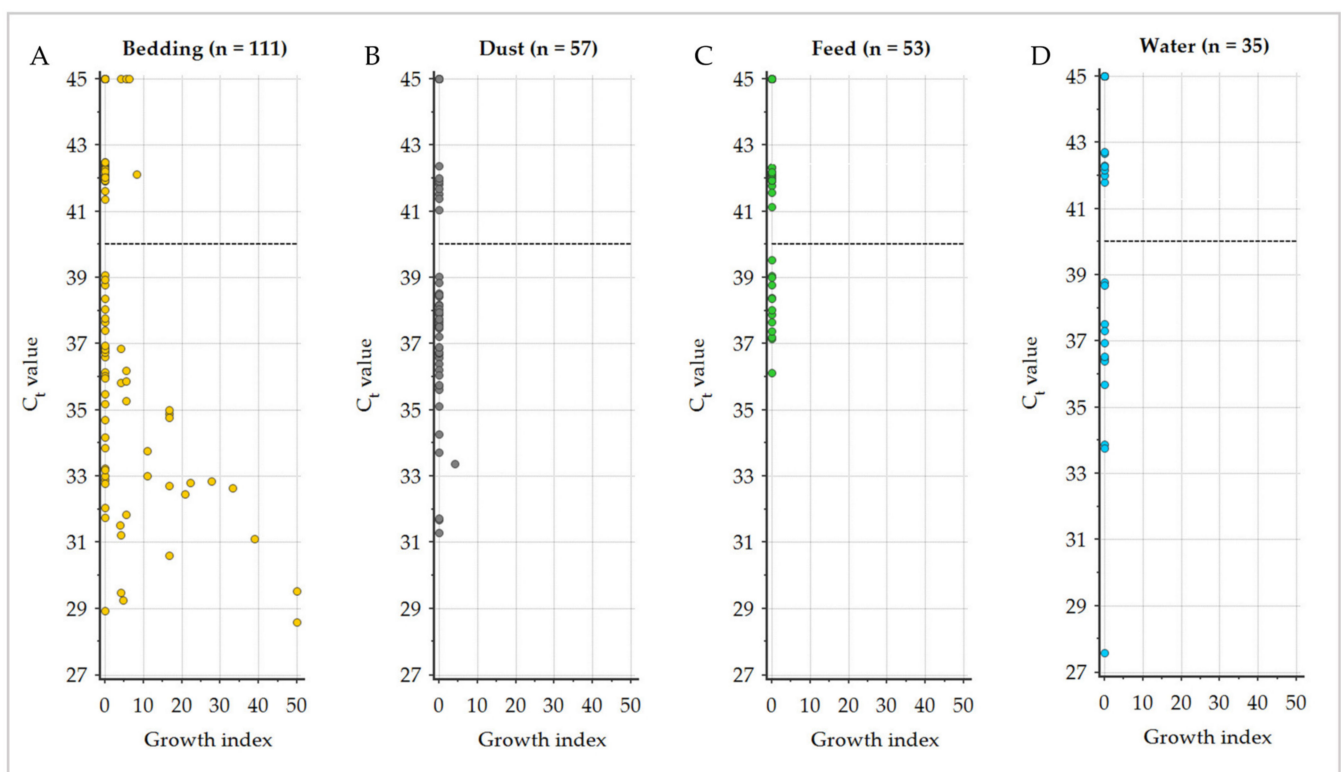


Figure 4. Distribution of the C_t values of qPCR analysis relative to the calculated growth index (semi-quantitative culture results) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the different sampling materials (A): bedding, (B): dust, (C): feed, (D): water displayed with the qPCR classification cut-off (40.0; dashed line).

Table 4. Spearman’s rank correlation for growth index (GI) and C_t values of environmental samples tested for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using bacterial culture and qPCR.

Material	ρ	<i>p</i> -Value	Mean GI of Culture Positive Samples (Minimum, Maximum)	Mean C _t of qPCR Positive Samples (Minimum, Maximum)
All	−0.401	<0.001 *	14.64 (3.85, 50.00)	35.62 (27.57, 39.52)
Bedding	−0.529	<0.001 *	15.01 (3.85, 50.00)	34.41 (28.58, 39.08)
Dust	−0.204	0.128	4.17 (4.17, 4.17)	36.52 (31.29, 39.02)
Feed	—	—	—	38.03 (36.11, 39.52)
Water	—	—	—	35.79 (27.57, 38.78)

ρ = Spearman’s rank coefficient. *: $p \leq 0.05$.

3.3.3. Logistic Regression

The logistic regression model for positive qPCR results revealed no significant effect of the percentage of MAP-shedding goats on the likelihood of MAP DNA detection ($p = 0.07$). The odds for a positive qPCR result were higher in dust than in any other material, with an odds ratio (OR) of 2.49 compared with bedding as reference and for samples collected during the indoor season with an OR for grazing season of 0.49. Samples from feed had a lower OR (0.385) than bedding. Further, samples collected from areas of high animal traffic were associated with higher odds for MAP DNA detection (OR: 3.03) compared to those from areas where adult goats are kept, while no difference was observed between the latter and samples from youngstock areas ($p = 0.095$) (Table 5).

Table 5. Outcome of the logistic regression model to estimate the relationship of the qPCR results of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to different environmental sample characteristics.

Characteristic	Positive qPCR Result		Negative qPCR Result		β^a	S.E. ^b β	<i>p</i> -Value	OR ^c	95% CI ^d (OR)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%						
Material	Bedding	55	49.55	56	50.45	reference	—	—	—	
	Dust	37	64.91	20	35.09	0.913	0.363	0.012 *	2.49	1.22–5.08
	Feed	13	24.53	40	75.47	−0.965	0.399	0.016 *	0.38	0.17–0.83
	Water	12	34.29	23	65.71	−0.359	0.431	0.405	0.70	0.30–1.63
Location	Adult goat area	70	44.87	86	55.13	reference	—	—	—	—
	High animal traffic area	23	71.88	9	28.12	1.109	0.475	0.020 *	3.03	1.20–7.68
	Youngstock area	24	35.29	44	64.71	−0.563	0.338	0.095	0.57	0.29–1.10
Season	Grazing	25	40.32	37	59.68	−0.710	0.342	0.038 *	0.49	0.25–0.96
	Indoor	92	47.42	102	52.58	reference	—	—	—	—
Percentage of MAP shedders at nearest herd sampling					−0.105	0.058	0.069	0.90	0.80–1.01	

^a β : logistic regression coefficient, ^b S.E.: standard error, ^c OR: odds ratio, ^d 95% CI: lower and upper limits of the 95% confidence interval. *: $p \leq 0.05$

Another logistic regression was performed for positive culture results. The sampling location was modified by only distinguishing between high animal traffic areas and adult goat areas because MAP was not cultivated out of any sample collected from the youngstock area. The season and the percentage of MAP-shedding goats in the herd at the nearest herd examination were used in the same way as in the model described above. Of the three variables entered into the regression model, the location and season contributed significantly to the prediction of a positive culture result ($p = 0.029$; $p = 0.034$), while the percentage of MAP-shedding goats showed no significant effect. The odds for MAP cultivation were higher in samples collected from high animal traffic (OR: 3.34) compared

to those from other adult goat areas. In addition, sampling during grazing season revealed a lower likelihood (OR: 0.24) for positive culture results (Table 6).

Table 6. Outcome of the logistic regression model to estimate the relationship of the culture results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to different bedding sample characteristics.

Characteristic	Positive Culture Result		Negative Culture Result		β^a	S.E. β^b	p -Value	OR c	95% CI d (OR)	
	n	%	n	%						
Location	Adult goat area	16	27.12	43	72.88	reference	—	—	—	
	High animal traffic area	12	44.44	15	55.56	1.025	0.552	0.029 *	3.34	1.13–9.84
Season	Grazing	4	18.18	18	81.82	−1.443	0.681	0.034 *	0.24	0.06–0.90
	Indoor	24	37.50	40	62.50	reference	—	—	—	—
Percentage of MAP shedders at nearest herd sampling						−0.105	0.058	0.069	0.90	0.80–1.01

^a β : logistic regression coefficient, ^b S.E.: standard error, ^c OR: odds ratio, ^d 95% CI: lower and upper limits of the 95% confidence interval. *: $p \leq 0.05$

4. Discussion

This study was the first to evaluate the presence of MAP in various environmental materials collected from a dairy goat barn. The results allowed us to derive recommendations (1) for suitable sampling sites for the identification of infected goat herds using environmental sampling and (2) for measures to reduce MAP exposure of goat kids by classification of potential high-risk areas in the barn.

Overall, the detection of MAP in environmental samples was possible by both, qPCR and culture. This led to the conclusion that environmental samples are a suitable matrix for paratuberculosis confirmation in dairy goat herds. However, certain limitations must be considered.

MAP was only cultivated from bedding and dust, whereas samples from all materials were MAP DNA-positive. Dust samples had a significantly higher probability for qPCR-positive results than the other sampling matrices, while 96.6% of the culture-positive environmental samples were obtained from bedding. This indicates that the environmental sampling material should be selected depending on the intended analysis method.

The agreement between both detection methods was assessed as slight ($\kappa = 0.20$). This is mainly caused by 93 samples (35.9%) that were qPCR-positive but culture-negative. Fecal shedding of MAP by infected animals leads to the spread of the pathogen in the environment and, thereby, to multiple potential infection sources [5,13]. The first contact material, if present, would be bedding. Drying of the feces in combination with air circulation can lead to dissemination and sedimentary deposition. This sediment, which may or may not contain MAP, can settle on the bedding itself, on feed and water surfaces, or accumulate as dust on diverse objects in the barn [28]. The main factor for higher odds of MAP DNA detection in the dust samples is probably accumulation. Fresh forage is presented twice a day, the water in all troughs is changed daily, and new bedding material is provided when necessary. In contrast, the barn is only cleaned once a year in total, which provides a long period of time for dust to accumulate on the surfaces of barn facilities. In addition, Eisenberg et al. [14] showed that even after a cattle farm was completely destocked and cleaned with a high-pressure cleaner, MAP DNA could be found in analyzed dust samples. MAP can survive outside a suitable host for up to one year if appropriate environmental conditions are present [7]. However, in addition to viable, qPCR methods can also detect non-viable pathogens. Moreover, the existence of dormant or viable but non-cultivable states is confirmed for MAP. Dormancy describes the ability of bacteria to survive as a non-spore-forming cell without replication, mainly induced by unfavorable environmental

conditions [7]. Bacteria in this reversible state may have also been detected by qPCR but caused false negative culture results.

Sample handling might also play a role in the rate of detection of culturable MAP. Freezing environmental manure samples before cultural analysis leads to lower numbers of cultivated colony-forming units per sample compared to direct sample processing [15]. In addition, decontamination during the cultivation process may adversely affect MAP viability. For samples containing small numbers of MAP which may be irregularly distributed, pellet partitioning during sample preparation can lead to false negative results of one or both analytical methods. This is demonstrated by four bedding samples from which MAP could be cultivated while being negative in qPCR. The impact of the environmental sample preparation methods used in this study on the analytical sensitivity of cultural and molecular biological MAP detection was not determined. Principle procedures were based on techniques successfully used in former studies [7,14]. A decrease of 10^2 viable organisms was identified for soil samples spiked with feces from paratuberculosis-infected animals [13], leading to the assumption that low numbers of culturable MAP in the environmental samples may not have been detected, resulting in false negative sample classification. Taking all the mentioned factors into account, an underestimation of the true contamination of the barn environment with viable MAP is likely.

Nevertheless, a negative correlation between the C_t value and the GI was observed. A comparable relationship was reported for environmental manure samples from dairy cow herds in the US [15]. The Spearman's rank correlation coefficient reported by Aly et al. [15] for frozen environmental samples ($\rho = -0.611$) was higher than the one calculated in the current study for all sampling materials ($\rho = -0.401$). However, when only bedding samples, which would be equivalent to the manure samples, were considered, the negative correlation was even stronger ($\rho = -0.529$), demonstrating the influence of the sample material.

Since there are no former studies concerning MAP detection in dairy goat barns, comparisons can only be made with studies conducted in cattle farms. Most of these studies analyzed mixed manure samples and, thus, areas frequented daily by large numbers of adult animals, such as alleyways and the milking parlor. In each study, these areas were identified as having the highest probability for culturable MAP [9–11,17,18]. Similar results were obtained in the goat housing. Here, the milking area, and especially the milking parlor, revealed the most culture-positive bedding samples. Logistic regression results underscore this finding by calculating an OR of 3.34 for the probability of bedding samples from areas of high animal traffic being positive for MAP culture compared to samples from other adult goat areas. However, viable MAP was detected in more than one-third of the bedding samples from the kidding pens of adult goats. Opposing results were reported from cattle farms where MAP was cultivated only occasionally from calving pens (14.3–17%) which were considered a sampling site with lower contamination [9,10,17,18]. The most likely explanation for this finding is the difference in the time span cows and goats normally spend in these pens. Dairy cows are usually dried off and separated from lactating cows approximately six weeks before calving. While separate dry cow and calving pens exist on most cattle farms, goats in the study herd stayed in the same pen until after kidding. In addition, in most dairy cow herds, calving pens are cleaned daily or at short time intervals, whereas in the goat kidding pen, only fresh bedding was added throughout the whole kidding season. This can lead to an accumulation of MAP even if just one shedding doe is present in the pen.

Because the probability of pathogen shedding rises with the age of the animal [5], the lack of detection of culturable MAP from samples from the kid and juvenile goat areas is plausible. Raizman et al. [18] were also unable to cultivate MAP from samples from pre-weaned calf pens, whereas 3% of samples from post-weaned calf areas were MAP-positive. This may be due to early pathogen shedding or, more likely in herds with high paratuberculosis prevalence, an introduction from the adult cow area through common devices, footwear, etc., as also mentioned by Field et al. [21], who detected MAP DNA in

21% of boot swab samples from pre-weaned calf areas. The construction modalities of the goat kid pens at the study farm, which do not require entering under normal circumstances, most likely avoid this route of pathogen entry.

However, MAP DNA was detected at every sampling site in the goat barn. This includes areas that are accessed by adult goats as well as pens where kids and juvenile goats are kept. Other studies reported comparable results for cattle husbandries [12,14]. Environmental samples from areas of high animal traffic had a higher probability of being qPCR positive (OR: 3.03) than those from other adult goat areas. No significant difference was observed between the young and adult goat area, which is in clear contrast to the culture results, where MAP was not cultivated from any sample collected in the youngstock area. Dust was the matrix with the highest proportion of positive MAP DNA results. Because the milking herd and kids are kept in one common air space, airborne distribution of MAP, viable or not, from adult to young goat areas is likely, especially because of the proximity between the milking parlor and the goat kid pens in the studied barn. Higher average C_t values from all materials, in particular bedding, from young compared to adult goat areas support the assumption of directed dissemination between these barn compartments. Eisenberg et al. [14] confirmed airborne distribution of MAP by pathogen detection high above the animal level where fecal contamination was unfeasible. In contrast to samples from the ground of cubicles, there was no difference concerning the likelihood of positive dust samples collected above animal level between stocked and non-stocked barn areas.

Considering the results of qPCR and cultural analysis, the milking parlor is the most recommended sampling site for both analysis methods. The farm management and husbandry conditions of the studied goat herd were very similar to those that can be found in other commercial dairy goat farms in Germany as well as other countries with a commercial dairy industry in goats. However, since samples from only one herd and barn were examined in this explorative study, the current results must be confirmed in a larger comprehensive study, including several dairy goat farms.

Two of the eight ES (ES 4 and 8) were conducted during grazing season when only the juvenile goats were in the barn throughout the whole day. The remaining dairy herd was driven inside twice a day for milking. MAP DNA was detected at every ES, while MAP could be cultivated at 7 of 8 ES. No cultivation out of any sample was possible in August 2021 (ES 4). The logistic regression model for both analysis methods identified the season (indoor vs. grazing) as a significant variable concerning the likelihood of a positive analysis result. In both cases, samples collected during grazing season had a lower probability for MAP detection (qPCR: OR = 0.49; culture: OR = 0.24). Other studies in cattle farms determined no seasonal effect [11] or reported a higher percentage of positive samples during spring and summer in comparison to autumn and winter [9]; however, some frequently positive locations were not sampled at all times of the year in the second study. The studies provide no information concerning pasture use at the farms. The data from the current study indicate that the time animals spend inside the barn is important. Prolonged stays raise the likelihood of defecation and, thereby, the risk of MAP spread by shedding animals. Furthermore, intense animal movement may contribute to dust formation and airborne distribution in the housing [12,28]. Thus, MAP detection in environmental samples will be more successful during time periods when the majority of the herd stays inside the barn continuously.

Eisenberg et al. [14] cultivated MAP from several dust and water samples from a cattle farm. These data contrast with the present study. Firstly, fecal contamination of the trough water was possible in the cattle barn, whereas this was most likely not the case in the studied goat barn. More important, in contrast to the current study, only paratuberculosis-positive cattle which had previously shed MAP were introduced into the barn. Biannual testing of the goat herd showed that during the study period, only between 9.4% and 1.7% of the animals were active shedders of MAP. As intermittent shedding is known to occur during the subclinical disease stage [3] and the herd samplings were not carried out

together with the ES, these numbers only allow an approximate estimation of the precise situation at the particular ES.

Environmental manure or bedding samples are considered to be a form of pooled fecal sample due to the potential composition of feces from several animals. Thus, a dilution effect may lead to false negative results in herds with low disease prevalence [11]. Therefore, different studies tried to evaluate the correlation between MAP-positive environmental samples and disease prevalence. Donat et al. [10] estimated 87% sensitivity for the cultivation of manure samples from herds with a fecal prevalence > 2.0%. Eisenberg et al. [12] detected culturable MAP in settled-dust samples from cattle herds with low (one enzyme-linked immunosorbent-assay positive animal) but more frequently in herds with higher (two or more enzyme-linked immunosorbent assay positive animals) paratuberculosis prevalence. In the present study, logistic regression revealed no association between the number of MAP-shedding goats at the nearest herd sampling and the likelihood of MAP detection in environmental samples by culture or qPCR. A possible explanation for continuously positive qPCR results is that, despite the decreasing number of MAP shedders, the pathogen's DNA persists in the environment for a long time and, as mentioned earlier, is not completely eliminated by normal cleaning and disinfection routines. This assumption is supported by Eisenberg et al. [12], who detected MAP DNA in more than 50% of low- and high-prevalence cattle herds. The amount of MAP shed with the feces can vary with regard to the disease stage and the individual animal [3]. It is conceivable that one high-shedding doe introduces the same number of bacteria into the environment as several light shedders, leading to consistent cultural detection of MAP. Therefore, areas that are passed by each animal are favorable for MAP detection, even in herds with only a few active shedders.

The herd examinations indicate a decreasing number of MAP-shedding goats within the herd during the course of the study. However, the data on MAP detection in environmental samples imply that a small number of active MAP shedders in the herd can sufficiently contaminate the barn environment and, thus, maintain potential infection risks.

In 2018, two years before the first ES was conducted, vaccination was included in herd management as a measure to control paratuberculosis. Despite vaccination, the barn environment was still considerably contaminated with MAP. It has to be assumed that new infections occurred in each birth cohort. The findings of this study point out that vaccination as a single measure in disease control does not lead to a complete prevention of environmental contamination with MAP and, thereby, enables the disease to maintain in the herd.

In addition to demonstrating that MAP can be found in the environment of a paratuberculosis-infected dairy goat herd, the results of the present study also allow the identification of potential risk areas for MAP transmission at the farm level. MAP was detected in dust samples in the kid-rearing area, but only by molecular biological methods. As viable pathogens are needed to cause an infection, this route of exposure is probably less critical for kids. Nevertheless, a clear structural separation of adult and young animals would be preferable in general for a further reduction of airborne MAP dissemination between these groups. However, the successful cultivation of MAP from a dust sample from the kidding area is a cause for concern. Even if one out of 57 samples is still far less than what was detected in studies in cattle farms [12,14], the sampling site is the problematic aspect. In addition to the dust sample, MAP could be cultivated from several bedding samples in this area. If kids are not immediately separated from the does after parturition, as realized using the snatching method [5,29], the likelihood of MAP intake increases over time. To minimize the environmental MAP burden of this sensitive barn area, it is recommended to set up separate kidding pens for known MAP-infected animals, to shorten the cleaning and disinfection intervals, and not to use kids from infected does for replacement.

Bedding samples from the kidding and lactating goat pens revealed a high bacterial load. This is a possible risk for contamination of the udder skin, enabling MAP intake when kids are allowed to suckle from the does. Even though a study to detect MAP on

the udder skin of the goats from this herd revealed only low pathogen prevalence (10.3% qPCR-positive udder swabs) [30], the detection limits of the methods may underestimate the issue. This is another argument for the recommendation of immediate separation of the kids from the does.

The high MAP contamination of the milking parlor only plays a minor role in disease transmission since this area is only accessed by adult animals for a short time. It is assumed that a relatively high dose would be required to infect these animals [5]. In addition, environmental MAP contamination of the milk during the milking process was not detected [30]. However, the present results highlight this location as a suitable sampling site to determine the paratuberculosis-herd status using environmental samples.

Each analysis method has its specific advantages and disadvantages. When decisions about the appropriate method have to be made, the discussed key points, in combination with the objective of the investigation, should be taken into account. qPCR is an appropriate method for the identification of infected herds. Confirmation of MAP in the environment is a strong initial indicator of the presence of infected animals. MAP viability does not influence the analysis results, which increases the probability of pathogen detection. In this study, MAP DNA was detected in 117 out of 256 environmental samples, and thus, if only one sample had been taken, the MAP infection of the goat herd would have been identified in almost half of the instances. The likelihood can be increased if recommendations concerning sampling material, location, and season are considered during sample collection. Cultivation of environmental samples revealed fewer positive results (11.3%). However, MAP could be cultivated from 60.0% of bedding samples collected from high animal traffic areas during the indoor season. Therefore, this analysis method can also be suitable for paratuberculosis status determination and for confirmation of positive qPCR results. The lower limits of the within-herd prevalence of MAP-shedding animals resulting in a positive test outcome using environmental samples still have to be determined. A similarly important application of bacterial culture, however, is the identification of barn areas of high contamination with culturable MAP which serve as possible infection sites.

5. Conclusions

Environmental sampling can be an appropriate method for the identification of MAP-infected dairy goat herds and barn areas with a high bacterial load. To increase the probability of MAP detection, the collection of bedding or dust samples from areas with high animal traffic, especially from the milking parlor, is recommended. The applied analysis method should be chosen depending on the aim of the examination. qPCR is suitable for making a general statement about whether paratuberculosis is present in the herd or whether the direct animal environment is contaminated with MAP. Instead, cultural analysis can confirm that animals are actually shedding MAP, and identify crucial areas where the youngstock is at risk of being exposed to the pathogen and from which MAP can be spread in the barn, respectively. Detection of culturable MAP should be considered more important than solely DNA detection because of their potential role in paratuberculosis transmission. Incorporating these findings into the development of individual paratuberculosis control plans for husbandries of goats may promote efficient and effective disease control. However, to ensure the external validity of the obtained results, further research in a larger number of goat herds with different husbandry conditions and prevalence levels is needed.

Author Contributions: Conceptualization, C.P., K.D., U.M. and H.K.; methodology, C.P. and H.K.; formal analysis, C.P. and H.K.; investigation, C.P. and H.K.; resources, C.P. and H.K.; data curation, C.P. and H.K.; writing—original draft preparation, C.P. and H.K.; writing—review and editing, C.P., K.D., U.M. and H.K.; visualization, C.P.; supervision, K.D. and H.K.; project administration, K.D. and H.K.; funding acquisition, K.D. and H.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) via the Thüringer Aufbaubank, grant number 2019 LFE 0017.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Thuringian State Office for Consumer Protection, which is the competent authority for research ethics approval in Thuringia (file reference: 2684-04-04-BFI-20-103, date of approval 1 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The dataset analyzed during the current study is available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We wish to acknowledge the dairy goat farmer involved in this study for his cooperation and friendly support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Table A1. Number of environmental samples of different materials from nine sampling sites in a dairy goat barn collected at eight environmental sampling events (ES) (total $n = 256$). B = bedding ($n = 111$), D = dust ($n = 57$), F = feed ($n = 53$), W = water ($n = 35$).

Sampling Site	ES 1				ES 2				ES 3				ES 4				ES 5				ES 6				ES 7				ES 8			
	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W	B	D	F	W
Buck pen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dry goat/kidding pen(s)	8	2	—	—	7	2	—	—	12	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Entrances to the barn	2	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—
Goat kid pen(s)	9	7	1	7	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	2	1	1	1	1	1
Juvenile goat pen	—	—	—	—	3	1	1	1	—	—	—	—	1	1	1	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lactating goat pen	—	—	—	—	1	1	10	—	—	—	—	—	4	4	6	1	4	4	6	4	4	4	6	4	4	6	4	4	4	6	4	4
Milking rotary	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—
Milking rotary waiting area	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	1	—	—	1	1	—	—	1	1	—	—	1	1	—	—	1	1	—	—
Milking rotary exit	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—

Table A2. Number of positive samples of bacterial culture and qPCR for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples per environmental sampling event (ES) (total $n = 256$).

Analysis Result	Sampling Material	Environmental Sampling Event								Σ
		ES 1	ES 2	ES 3	ES 4	ES 5	ES 6	ES 7	ES 8	
Culture positive	Bedding	5/21	3/15	5/16	0/11	5/11	6/11	2/14	2/12	28/111
	Dust	1/9	0/5	0/4	0/7	0/7	0/7	0/10	0/8	1/57
	Feed	0/1	0/11	N.s.	0/8	0/8	0/8	0/10	0/7	0/53
	Water	0/3	0/1	0/2	0/2	0/5	0/6	0/7	0/5	0/35
qPCR positive	Bedding	8/21	6/15	7/16	2/11	9/11	10/11	6/14	7/12	55/111
	Dust	7/9	2/5	1/4	6/7	3/7	5/7	7/10	6/8	37/57
	Feed	0/1	3/11	N.s.	0/8	1/8	3/8	6/10	0/7	13/53
	Water	1/7	0/1	0/2	1/2	0/5	3/6	6/7	1/5	12/35

N.s. = no sample of this material was collected.

References

- Sweeney, R.W. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **1996**, *12*, 305–312. [CrossRef]
- Whittington, R.J.; Windsor, P.A. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* **2009**, *179*, 60–69. [CrossRef]
- Windsor, P.A. Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* **2015**, *181*, 161–169. [CrossRef]
- Eisenberg, S.W.F.; Koets, A.P.; Nielen, M.; Heederik, D.; Mortier, R.; de Buck, J.; Orsel, K. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Res.* **2011**, *42*, 117. [CrossRef]

5. Windsor, P.A.; Whittington, R.J. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* **2010**, *184*, 37–44. [CrossRef]
6. Smith, M.C.; Sherman, D.M.; van Metre, D.C. *Goat Medicine*, 3rd ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2022; pp. 476–485.
7. Whittington, R.J.; Marshall, D.J.; Nicholls, P.J.; Marsh, I.B.; Reddacliff, L.A. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2989–3004. [CrossRef]
8. Whittington, R.; Donat, K.; Weber, M.F.; Kelton, D.; Nielsen, S.S.; Eisenberg, S.; Arrigoni, N.; Juste, R.; Sáez, J.L.; Dhand, N.; et al. Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 198. [CrossRef]
9. Wolf, R.; Barkema, H.W.; Buck, J.d.; Orsel, K. Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 275–287. [CrossRef] [PubMed]
10. Donat, K.; Schau, U.; Soschinka, A. Identifizierung von mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Milchviehbeständen mithilfe von Umgebungskotproben. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **2011**, *124*, 360–367. [CrossRef] [PubMed]
11. Lombard, J.E.; Wagner, B.A.; Smith, R.L.; McCluskey, B.J.; Harris, B.N.; Payeur, J.B.; Garry, F.B.; Salman, M.D. Evaluation of Environmental Sampling and Culture to Determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Distribution and Herd Infection Status on US Dairy Operations. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 4163–4171. [CrossRef] [PubMed]
12. Eisenberg, S.W.F.; Koets, A.P.; Hoeboer, J.; Bouman, M.; Heederik, D.; Nielen, M. Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial Dutch dairy farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6310–6312. [CrossRef] [PubMed]
13. Whittington, R.J.; Marsh, I.B.; Taylor, P.J.; Marshall, D.J.; Taragel, C.; Reddacliff, L.A. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* **2003**, *81*, 559–563. [CrossRef] [PubMed]
14. Eisenberg, S.W.F.; Nielen, M.; Santema, W.; Houwers, D.J.; Heederik, D.; Koets, A.P. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet. Microbiol.* **2010**, *143*, 284–292. [CrossRef] [PubMed]
15. Aly, S.S.; Mangold, B.L.; Whitlock, R.H.; Sweeney, R.W.; Anderson, R.J.; Jiang, J.; Schukken, Y.H.; Hovingh, E.; Wolfgang, D.; van Kessel, J.A.S.; et al. Correlation between Herrold egg yolk medium culture and real-time quantitative polymerase chain reaction results for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pooled fecal and environmental samples. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2010**, *22*, 677–683. [CrossRef]
16. Hahn, N.; Failing, K.; Eisenberg, T.; Schlez, K.; Zschöck, P.-M.; Donat, K.; Einax, E.; Köhler, H. Evaluation of different diagnostic methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in boot swabs and liquid manure samples. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 259. [CrossRef]
17. Pillars, R.B.; Grooms, D.L.; Kaneene, J.B. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Can. Vet. J.* **2009**, *50*, 1039–1046.
18. Raizman, E.A.; Wells, S.J.; Godden, S.M.; Bey, R.F.; Oakes, M.J.; Bentley, D.C.; Olsen, K.E. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 2959–2966. [CrossRef]
19. Wichert, A.; Kasbohm, E.; Einax, E.; Wehrend, A.; Donat, K. Detection of Low MAP Shedder Prevalence in Large Free-Stall Dairy Herds by Repeated Testing of Environmental Samples and Pooled Milk Samples. *Animals* **2022**, *12*, 1343. [CrossRef]
20. Zoche-Golob, V.; Donat, K.; Barkema, H.W.; de Buck, J.; Kastelic, J.; Wolf, R. Predicting sensitivity of repeated environmental sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds using a Bayesian latent class model. *Vet. J.* **2021**, *275*, 105728. [CrossRef]
21. Field, N.L.; Mee, J.F.; McAloon, C.G. Evaluation of Environmental Sampling for Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the Pre-Weaned Calf Area and Calving Area of Infected Dairy Farms Enrolled in a Voluntary Johne's Disease Control Programme. *Animals* **2023**, *13*, 669. [CrossRef]
22. Mortier, R.A.R.; Barkema, H.W.; Orsel, K.; Wolf, R.; de Buck, J. Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Res.* **2014**, *45*, 71. [CrossRef] [PubMed]
23. Groenendaal, H.; Nielen, M.; Jalvingh, A.W.; Horst, S.H.; Galligan, D.T.; Hesselink, J.W. A simulation of Johne's disease control. *Prev. Vet. Med.* **2002**, *54*, 225–245. [CrossRef] [PubMed]
24. Friedrich-Loeffler-Institut. Paratuberkulose: Amtliche Methode und Falldefinition. Available online: https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00058039 (accessed on 5 May 2020).
25. Englund, S.; Ballagi-Pordány, A.; Bölske, G.; Johansson, K.-E. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1999**, *33*, 163–171. [CrossRef] [PubMed]
26. Köhler, H.; Soschinka, A.; Meyer, M.; Kather, A.; Reinhold, P.; Liebler-Tenorio, E. Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 74. [CrossRef]
27. Landis, J.R.; Koch, G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159. [CrossRef]
28. Carpenter, G.A. Dust in livestock buildings—Review of some aspects. *J. Agric. Eng. Res.* **1986**, *33*, 227–241. [CrossRef]

29. Nagel-Alne, G.E.; Asheim, L.J.; Hardaker, J.B.; Sølverød, L.; Lindheim, D.; Valle, P.S. The Norwegian Healthier Goats programme—A financial cost-benefit analysis. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *114*, 96–105. [[CrossRef](#)]
30. Pickrodt, C.; Donat, K.; Moog, U.; Köhler, H. Analysis of Colostrum and Udder Skin Swabs from a Dairy Goat Herd in Germany regarding the Occurrence of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. *Animals* **2022**, *12*, 1779. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Auszug aus der Arbeitsfassung



Kontaminierung von Tränkwasser/Futter

Gelangt erregerhaltiger Kot oder kontaminierter Staub in Futter und Tränkwasser, kann der Erreger auch über diese Materialien von den Tieren aufgenommen werden. In diesem Zusammenhang stellt auch die gemeinsame Weidenutzung mit Tieren aus anderen Beständen mit unbekanntem Paratuberkulosestatus sowie eine nur kurze Ruhezeit vor der erneuten Beweidung einer Fläche ein Risiko dar.

Risiko: erhöht



Gegenmaßnahmen

- Tränk- und Futtervorrichtungen baulich so gestalten, dass Eintrag von Kot und anderen Verschmutzungen (Einstreu, Staub) weitgehend unterbunden wird.
- Vorgelegtes Futter regelmäßig erneuern - sofort bei sichtbarer Verunreinigung mit Kot.
- Tränkwasser regelmäßig erneuern - sofort bei sichtbarer Verunreinigung mit Kot, Tränken regelmäßig reinigen.
- Keine gemeinsame Weidenutzung von Alt- und Jungtieren – Jungtiere sollten Weide nur vor Alttieren nutzen.
- Keine gemeinsame/nachfolgende Weidenutzung mit Herden mit unbekanntem Paratuberkulosestatus.
- Ausreichend lange Zwischenweidezeit (bestmöglich 1 Jahr).
- Keine Futtergewinnung von Weiden welche von Herden mit unbekanntem Paratuberkulosestatus genutzt wurden.

Gruppenablammung

Die Haltung mehrerer Ziegen in einem abgegrenzten Bereich über einen längeren Zeitraum (z. B. Gruppenhaltung in der Trockenstehphase) erhöht die Wahrscheinlichkeit und das Ausmaß einer Kontamination des Stallbereiches mit MAP durch die Ausscheidung des Erregers mit dem Kot infizierter Tiere. Werden Lämmer in dieser Umgebung geboren, besteht die Gefahr eines sehr frühen Erregerkontaktes, der zu einer Infektion führen kann.

Risiko: hoch



Gegenmaßnahmen

Getrennte Haltung/Aufstallung von bekannt infizierten Tieren.

Regelmäßige Zwischen-Reinigung und -desinfektion von Trockensteher- und Ablambbereich.

Schnellstmögliche Entfernung neugeborener Lämmer aus Ablambbereich – erfordert erhöhte Kontrollfrequenz.

Kontaktmöglichkeiten zwischen Adulten und Jungtieren

Mit dem Fortschreiten der Paratuberkulose nimmt die Wahrscheinlichkeit und Intensität der Erregerausscheidung bei infizierten Tieren zu. Deshalb geht von adulten Tieren ein höheres Risiko aus als von Jungtieren. Umgekehrt sind Jungtiere empfänglicher für eine Infektion als adulte Tiere, was sich unter anderem in einer geringeren Erregerdosis zur Auslösung einer Infektion äußert. Werden Tiere unterschiedlichen Alters gemeinsam gehalten, erhöht sich das Infektionsrisiko.

Risiko: sehr hoch



Gegenmaßnahmen

Strikte, wenn möglich bauliche, Trennung von Jung- und Alttieren.

Schnellstmögliche Entfernung Neugeborener aus dem Ablambbereich.

Arbeitsfolge im Betrieb „von Jung nach Alt“
Nutzung getrennter Arbeitsgeräte in jeweiligen Altersgruppen/Stallbereichen oder gründliche Reinigung nach jeder Nutzung.

Auf Personalhygiene achten: saubere Arbeitskleidung, separates Schuhwerk und Handschuhpflicht für den Lämmerbereich.