

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117,  
XXX–XXX (2004)

© 2004 Schlütersche  
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG  
ISSN 0005-9366

Korrespondierender Autor:  
walter.glawischnig@vmibk.ages.at

Eingegangen: 27. 11. 2003  
Angenommen: 20. 1. 2004

## Zusammenfassung

<sup>1</sup>Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck,  
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Österreich  
<sup>2</sup>II. Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere, Veterinärmedizinischen  
Universität Wien, Österreich

## Fallbericht

### Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* im Hoden eines klinisch erkrankten Zuchtstiers

#### *Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from the testicles of a clinically infected breed*

Walter Glawischnig<sup>1</sup>, Mohammed Awad-Masalmeh<sup>2</sup>, Daryusch Khaschabi<sup>1</sup>,  
Michael Schönbauer<sup>1</sup>

Im Zuge der Sektion eines 6 Jahre alten, im fortgeschrittenem Stadium an Paratuberkulose erkrankten Zuchtstiers der Rasse Fleckvieh wurden die Hoden des Tieres pathomorphologisch und mikrobiologisch untersucht. Sowohl makroskopisch als auch histologisch waren keine Hinweise auf abnorme Veränderungen oder Entzündungen erkennbar. In Abklatschpräparaten aus steril entnommenem Hodengewebe fanden sich jedoch vereinzelt Ziehl-Neelsen positive Stäbchen. In Folge wurde Hodenmaterial auf mycobactinhaltigen Nährboden beimpft und nach 8 Wochen Bebrütung ein Wachstum von Kolonien säurefester Stäbchen festgestellt. In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wiesen die DNA-Extrakte aus den isolierten Bakterienkulturen die für *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* spezifischen Amplifikate auf. Mittels PCR gelang auch der direkte Erregernachweis aus nativem Hodengewebe.

Der positive Nachweis von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* im Hoden zeigt, dass beim männlichen Tier im Endstadium der Krankheit eine Ausbreitung der Bakterien auch in die Gonaden erfolgt. Die Möglichkeit einer Übertragung der Paratuberkulose durch kontaminierten Samen sowie die Bedeutung für die künstliche Besamung wird in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

#### Schlüsselwörter:

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Kultur, PCR, Hoden, Stier.

## Summary

During a post mortem of a six year old simental bull with severe paratuberculosis infection the testicles were further examined by pathological, histological and microbiological methods. No gross or histological lesions could be observed. Single acid fast organisms were detected in smears taken from steril testicle tissue. Tissue material was additionally cultured in mycostatin culture media and after 8 weeks of incubation acid fast colonies were demonstrated. Polymerase chain reaction with DNA extracted from cultured bacteria and testicle tissue material resulted in *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-specific amplicons. The detection of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in the testicle of the bull demonstrates the possibility of bacteriemia in the final stage of clinical paratuberculosis infection. The evidence of transmitting paratuberculosis through contaminated semen and its relevance for arteficial insemination is being discussed in the presented paper.

#### Keywords:

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, culture, PCR, testicles, bull.

Die Paratuberkulose ist eine ansteckende, chronische Darmerkrankung vorwiegend domestizierter und wildlebender Wiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*) verursacht wird. In Österreich ist die Krankheit selten. Serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen *M. paratuberculosis* ergaben bei österreichischen Rindern eine durchschnittliche Prävalenz von 1,99 % (Gasteiner et al., 1999). Neben zahlreichen klinischen Fällen bei Rindern, bei welchen häufig ein Zusammenhang mit dem Import von infizierten Tieren besteht (Deutz et al., 1995), konnte die Krankheit erstmalig in Österreich auch bei einem Rothirsch aus freier Wildbahn festgestellt werden (Glawischig und Khaschabi, 2001). Wie aktuelle Untersuchungsergebnisse bei einzelnen Wildtierarten zeigen, ist die Paratuberkulose in unserer heimischen Wildpopulation sogar stärker verbreitet als bis dato angenommen (Deutz et al., 2003).

Beim Rind wird die Infektion ausschließlich im jugendlichen Alter vermutet. Nach oraler Aufnahme der Bakterien erfolgt eine Vermehrung in den Makrophagen der Darmmukosa und in Darm-assoziiertem lymphatisches Gewebe des Jejunums und Ileums (Dahme und Weiss, 1999). In weiterer Folge kommt es zu einer lympho- und hämatogenen Verschleppung der Keime in Mesenteriallymphknoten und verschiedene Organe (Pavlik et al., 2000), wobei die Verbreitung der phagozytierten Keime durch Monozyten und Makrophagen erfolgt (Clarke, 1997). Bei erkrankten Tieren werden die Erreger regelmäßig in Darm- bzw. Darmlymphknoten nachgewiesen. Sie wurden aber, wenn auch selten, in Mammallymphknoten (Awad-Masalmeh et al., 1999; Merkal et al., 1982) bzw. Milch und Kolostrum (Bech-Nielsen et al., 1995; Schaaf und Beerwerth, 1960; Streeter et al., 1995; Sweeney et al., 1992b; Taylor et al., 1981), in Uterusgewebe (Doyle, 1958; Kopecky et al., 1967; Lawrence, 1956; McQueen und Russell, 1979; Pearson und McClelland, 1955; Rohde und Shulaw, 1990) sowie in Innenorganen (Alexeff-Goleff, 1929; Choidini et al., 1984; Pavlik et al., 2000) ohne feststellbare pathologische Veränderungen gefunden. Eine kongenitale Übertragung der Keime auf den Fötus infizierter Rinder wurde von verschiedenen Untersuchern (Doyle, 1958; Lawrence, 1956; McQueen und Russell, 1979; Pearson und McClelland, 1955; Rohde und Shulaw, 1990; Seitz et al., 1989; Sweeney et al., 1992a) festgestellt. Der Nachweis von *M. paratuberculosis* gelang auch aus Samenflüssigkeit und männlichen Geschlechtsdrüsen (Eppleston und Whittington, 2001; Larsen und Kopecky, 1970; Larsen et al., 1981; Tunkl und Aleraj, 1965). Widersprüchlich sind jedoch die Untersuchungsergebnisse über einen Erregernachweis aus Hodengewebe erkrankter männlicher Tiere. Während einige Autoren von negativen Kultivierungsversuchen bei Stieren und Schafböcken berichten (Eppleston und Whittington, 2001; Larsen und Kopecky, 1970; Larsen et al., 1981), finden sich in der älteren Literatur zwei kurze Hinweise über eine positive bakteriologische Isolierung von *M. paratuberculosis* bei einem Stier (Lawrence, 1956; Tunkl und Aleraj, 1965).

In der vorliegenden Arbeit wird über die erstmalige Isolierung und Identifizierung von *M. paratuberculosis* aus dem Hoden eines an Paratuberkulose erkrankten Stieres in Österreich berichtet. Zur Untersuchung gelangte ein 6 Jahre alter, ca. 600 kg schwerer Fleckviehzuchstier, der über einen Zeitraum von drei Jahren als Besamungstier in verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben zum

Deckeinsatz aufgestellt war. Der Stier war zuletzt über mehrere Wochen an einem therapieresistenten wässrigem Durchfall erkrankt und im Verlauf der Krankheit stark abgemagert. Bereits intra vitam konnten Parasiten, Salmonellen sowie das Bovine Virusdiarrhoe-Virus als Krankheitsursache ausgeschlossen werden. Das klinische Krankheitsbild sowie der massenhafte Nachweis von säurefesten Stäbchen in einer Kotprobe des erkrankten Tieres ergaben die Verdachtsdiagnose Paratuberkulose. Auf Wunsch des Tierbesitzers erfolgte die Tötung und Untersuchung des Stieres. Im Zuge der pathomorphologischen Untersuchung wurde steril entnommenes Hodengewebe auf einen Objektträger ausgestrichen und zum Nachweis von säurefesten Mikroorganismen mittels Ziehl-Neelsen gefärbt und mikroskopisch betrachtet. Material von Hoden bzw. Darm und Darmlymphknoten wurde homogenisiert, dekontaminiert und konzentriert und in weiterer Folge Gewebe- und Kotsedimente auf ein modifiziertes Eidottermedium nach Herrold mit und ohne Zusatz von Mycobactin J (Fa. Allid Monitor, Fayette, USA) nach den Angaben von Stachelscheid (1989) beimpft und bei 370°C Bebrütungstemperatur wöchentlich auf Wachstum überprüft. Als *M. paratuberculosis* wurden jene Kolonien identifiziert, die weißlich-graues, festes und glattes Aussehen zeigten, auch in Subkulturen nur auf mycobactinhaltigen Nährböden wuchsen und sich in der Ziehl-Neelsen-Färbung als säurefeste Stäbchen erwiesen. Samenproben des Zuchtstiers standen für eine Untersuchung leider nicht zur Verfügung. Die molekularbiologische Identifizierung der Bakterien-DNA die aus Hodengewebe, Darm- bzw. Darmlymphknoten sowie aus den isolierten Mycobakterien extrahiert wurde erfolgte mittels PCR mit den *M. paratuberculosis*-spezifischen Primern MP3 und MP4, die eine Sequenz von 314 bp amplifizieren (Awad-Masalmeh et al., 1999; Bauerfeind et al., 1996; Zimpernik et al., 1999). Für die histologische Untersuchung wurden Gewebestücke aus den Hoden sowie aus Darm bzw. Darmlymphknoten 48 Stunden in 10%igem Formalin fixiert, danach in Paraffin eingebettet, etwa 3 µm dicke Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin sowie Ziehl-Neelsen gefärbt und diese bei 40facher und 100facher Vergrößerung im Lichtmikroskop beurteilt.

In der pathomorphologischen Untersuchung waren bei beiden Hoden und Nebenhoden sowohl palpatorisch als auch in der makroskopischen Betrachtung keine Größenunterschiede oder krankhaften Veränderungen erkennbar. Histologisch fanden sich in den Gonaden keine Hinweise auf entzündliche Prozesse. Auch in den nach Ziehl-Neelsen gefärbten histologischen Schnitten konnten keine säurefesten Stäbchen, weder frei noch in Makrophagen phagozytiert, festgestellt werden. Dagegen waren in Abklatschpräparaten von Hodengewebe einzelne frei liegende säurefeste Stäbchen nachweisbar. Der Darm zeigte histopathologisch eine granulomatöse Entzündung, wobei die Epitheloidzellen, gleich den Makrophagen in den Mesenteriallymphknoten, massenhaft mit Ziehl-Neelsen-positiven Stäbchen angefüllt waren. Bakteriologisch wurde aus dem Gewebesediment von Hoden bzw. Darm und Darmlymphknoten nach Wachstum auf mycobactinhaltigem Nährboden *M. paratuberculosis* isoliert. In der PCR wiesen die DNA-Extrakte der Organe bzw. aus deren Bakterienkulturen die für *M. paratuberculosis* spezifische DNA-Sequenz IS 900 auf.

Die vorgelegten Befunde beweisen das Vorkommen von *M. paratuberculosis* im Hoden des an Paratuberkulose

erkrankten Stieres. In diesem Zusammenhang liegen in der uns zugänglichen Literatur nur zwei Hinweise aus dem Jahr 1956 (Lawrence) und 1965 (Tunkel und Aleraj) vor. Einzelne Untersucher konnten zwar den Erreger in Samenblase und Prostata erkrankter Stiere (Larsen und Kopecky, 1970; Tunkel und Aleraj, 1965) sowie bei Schafböcken und Stieren in der Samenflüssigkeit (Eppleston und Whittington, 2001; Larsen und Kopecky, 1970, Larsen et al., 1981; Tunkel und Aleraj, 1965) nachweisen, die Isolierungsversuche aus dem Hoden verliefen jedoch stets negativ.

In unserem Fall wurden neben dem Darmtrakt nur die Hoden auf *M. paratuberculosis* untersucht. Anzunehmen ist jedoch, dass ein Nachweis auch aus anderen Innenorganen oder Lymphknoten erfolgreich verlaufen wäre. Nach Beobachtungen von Pavlik et al. (2000) und Clarke (1997) gelangen die Bakterien aus dem Darmtrakt vermutlich durch lymphogene oder hämatogene Ausbreitung in einzelne Körperorgane. *M. paratuberculosis* konnte in Monozyten aus Blut und Gewebeflüssigkeit nachgewiesen werden, was die Makrophagen als Vehikel für die Ausbreitung dieser Bakterien ausweist (Clarke, 1997). Ungeklärt sind aber weitere Affinität bzw. Interaktion zu Darmepithel und das Überleben dieser Keime in Makrophagen (Harris und Barletta, 2001).

Trotz positiver mikrobiologischer Befunde waren histopathologisch im Hodengewebe des Stiers keine Veränderungen feststellbar. Dieser Befund ist nicht überraschend, da bakteriologisch positive Organe und Körperlymphknoten in der Histopathologie meist unauffällig sind (Awad-Masalmeh et al., 1999; Chiodini et al., 1984; Pavlik et al., 2000; Sweeney et al., 1992a,b). In einigen Fällen konnten jedoch bei Rindern und Schafen außerhalb des Darmtrakts granulomatöse Veränderungen in der Leber (Buergelt et al., 1978; Mahmoud et al., 2002) sowie bei einem Rind auch in Lunge und Niere (Hines et al., 1987) nachgewiesen werden. Histopathologisch veränderte Körperorgane und Lymphknoten finden sich jedoch häufiger bei klinisch positiven Schafen und Ziegen als bei erkrankten Rindern (Hines et al., 1987).

Der Weg der Ansteckung mit *M. paratuberculosis* erfolgt meist durch die orale Aufnahme von Kolostrum, Milch oder kontaminiertem Futter im Kälberalter (Gerlach, 2002). Durch den Nachweis von *M. paratuberculosis* im Uterus (Doyle, 1958; Lawrence, 1956; Kopecky et al., 1967; McQueen und Russell, 1979; Pearson und McClelland, 1955; Rohde und Shulaw, 1990) und in Innenorganen von Feten (Lawrence, 1956; Seitz et al., 1989; Sweeney et al., 1992a) ist auch die kongenitale Infektion durch diese Keime bewiesen. Ca. 10 % der Kälber sollen sich bereits intrauterin infizieren, wobei die Infektionsrate am höchsten bei Kälbern von Muttertieren ist, die sich in oder kurz vor Beginn der klinischen Phase der Erkrankung befinden (Gerlach und Valentin-Weigand, 1998). Eine derartige Infektion erfolgt aber erst ab dem 60. Trächtigkeitstag (Kriup et al., 2002; Seitz et al., 1989; Sweeney et al., 1992a), da die Plazenta vor dieser Zeit für den Transfer von *M. paratuberculosis* nicht durchgängig ist. Wie Untersuchungen zeigen, liegen auch keine Hinweise auf eine Übertragung des Erregers durch Embryonen von subklinisch erkrankten Spenderkühen auf paratuberkulosefreie Empfängertiere vor (Kriup et al., 2002).

Obwohl Samenproben des Fleckviehzuchtstiers nicht untersucht werden konnten, stellt der Nachweis von *M. paratuberculosis* im Hoden des Stiers zwingend die Frage

einer Krankheitsübertragung durch infektiösen Samen. Wie in der Milchdrüse (Streeter et al., 1995) können die Bakterien auch in den männlichen Geschlechtsorganen persistieren und mit dem Ejakulat ausgeschieden werden (Eppleston und Whittington, 2001; Larsen und Kopecky, 1970; Larsen et al., 1981). Somit besteht durch den natürlichen Deckakt bzw. die künstliche Besamung die grundsätzliche Möglichkeit einer Übertragung der Krankheit auf weibliche Rinder. Beweise hierfür liegen jedoch nicht vor (Larsen und Kopecky, 1970). In experimentellen Untersuchungen konnte bei Kühen durch intrauterine Inokulation von *M. paratuberculosis* keine nachweisbare Infektion ausgelöst werden (Merkal et al., 1982). Ungeklärt bleibt aber, inwieweit infektiöser Samen einen negativen Einfluss auf die Konzeptionsrate bei Kühen besitzt, da im Tierversuch bei Meer-schweinchen eine deutliche Verminderung der Konzeptionsrate festgestellt wurde (Merkal et al., 1982). Da *M. paratuberculosis* in Hoden, Samenblase und Prostata sowie in der Samenflüssigkeit vorkommen kann, sollte bei Zuchtstieren neben der klinischen Kontrolle auch der Samen dieser Tiere gezielt auf *M. paratuberculosis* untersucht werden. Darüber hinaus hat die Gewinnung von Samen unter strengsten hygienischen Maßnahmen zu erfolgen und sollte nur bei Tieren aus nachweislich kontrollierten paratuberkulose-negativen Beständen durchgeführt werden.

## Literatur

- Alexjeff-Goleff, N. A. (1929):** Zur Frage der Pathogenese und Bazillenausscheidung bei Paratuberculose. Z. Infektionskr. **36**, 313-317.
- Awad-Masalmeh, M., I. Zimpernik, W. Baumgartner, F. Hinterdorfer, J. Flatscher (1999):** Nachweis von *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* mittels Polymerase-Kettenreaktion und Kulturversuch bei Tieren aus Österreich. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **112**, 211-215.
- Bauerfeind, R., S. Benazzi, R. Weiss, T. Schliesser, H. Willems, G. Baljer (1996):** Molecular characterisation of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS 900. J. Clin. Microbiol. **34**, 1617-1621.
- Bech-Nielsen, S., G. F. Hoffsis, D. N. M. Ringgs, W. P. Shulman, R. N. Streeter (1995):** Isolation of *M. paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Vet. Res. **53**, 1322-1324.
- Buergelt, C. D., C. Hall, K. McEntee, J. R. Duncan (1978):** Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. Vet. Pathol. **15**, 196-207.
- Chiodini, R. J., H. J. VanKruiningen, R. S. Merkal (1984):** Ruminant paratuberculosis (Johne's disease), the current status and future prospects. Cornell Vet. **74**, 218-262.

- Clarke, C. J. (1997):** The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Path.* **116**, 217–261.
- Dahme, E., E. Weiss (1999):** Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 5. Aufl., Enke, Stuttgart, S. 188–189.
- Deutz, A., F. Hinterdorfer, J. Köfer (1995):** Paratuberkulose in einem Fleischrinderzuchtbetrieb. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **82**, 24–28.
- Deutz, A., J. Spergser, P. Wagner, T. Steineck, J. Köfer, R. Rosengarten (2003):** Paratuberkulose bei Wildtieren – Häufung klinischer Fälle in freier Wildbahn. *Tierärztl. Umschau* **58**, 482–489.
- Doyle, T. M. (1958):** Foetal infection in Johnes disease. *Vet. Rec.* **70**, 238.
- Eppleston, J., R. J. Whittington (2001):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johnes disease. *Aust. Vet. J.* **79**, 776–777.
- Gasteiner, J., H. Wenzl, K. Fuchs, U. Jark, W. Baumgartner (1999):** Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *J. Vet. Med. Series B.* **46**, 457–466.
- Gerlach, G. F. (2002): Paratuberkulose:** Erreger und Übertragungswege. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **109**, 504–506.
- Gerlach, G. F., P. Valentin-Weigand (1998):** Die Paratuberkulose des Rindes: Ursache und Auswirkungen neuer Bemühungen um eine alte Erkrankung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **111**, 368–373.
- Glawischnig, W., D. Khaschabi (2001):** Paratuberkulose bei einem Rothirsch (*Cervus elaphus hippelaphus*) aus dem Bundesland Vorarlberg: ein Fallbericht. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **88**, 66–69.
- Harris, N. B., R. G. Barletta (2001):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Reviews* **14**, 489–512.
- Hines, S. A., C. D. Buergelt, J. H. Wilson, E. L. Bliss (1987):** Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* in a cow. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 681–683.
- Kopecky, K. E., A. B. Larsen, R. S. Merkal (1967):** Uterine infection in bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* **28**, 1043–1045.
- Kruip, T. A. M., J. Muskens, H. J. W. Van Roermund, D. Bakker, N. Stockhofe-Zurwieden (2002):** Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes embryos from moderate shedders of the pathogen. *Thriogenology* **59**, 1651–1660.
- Larsen, A. B., O. H. V. Stalheim, D. E. Hughes, L. H. Appell, W. D. Richards, E. M. Himes (1981):** *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and the genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **179**, 169–171.
- Larsen, A. B., K. E. Kopecky (1970):** *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.* **31**, 255–258.
- Lawrence, W. E. (1956):** Congenital infection with *Mycobacterium johnei* in cattle. *Vet. Rec.* **68**, 312–314.
- Mahmoud, O. M., E. M. Haroun, M. G. Elfaki, B. Abbas (2002):** Pigmented paratuberculosis granulomata in the liver of sheep. *Small Ruminant Res.* **43**, 211–217.
- Merkal, R. S., J. M. Miller, A. M. Hintz (1982):** Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 676–678.
- McQueen, D. S., E. G. Russell (1979):** Culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine foetuses. *Aust. Vet. J.* **55**, 203–204.
- Pavlik, I., L. Matlova, J. Bartl, P. Svastova, L. Dvorska, R. Whitlock (2000):** Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet. Microbiol.* **77**, 309–324.
- Pearson, J. K. L., T. G. McClelland (1955):** Uterine infection and congenital Johnes disease in cattle. *Vet. Rec.* **67**, 615–616.
- Rohde, R. F., W. P. Shulaw (1990):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **197**, 1482–1483.
- Schaaf, J., W. Beerwerth (1960):** Die Bedeutung der Generalisation der Paratuberkulose, der Ausscheidung des Erregers mit der Milch und der kongenitalen Uebertragung fuer die Bekämpfung der Seuche. *Rindertuberkulose und Brucellose* **9**, 115–124.
- Seitz, S. E., L. E. Heider, W. D. Hueston, S. Bech-Nielsen, D. M. Rings, L. Spangler (1989):** Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **194**, 1423–1426.
- Stachelscheid, H. L. (1989):** Zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Rinderkotproben. Vergleich zweier Dekontaminierungs- und Kulturverfahren. *Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen.*
- Streeter, R. N., G. F. Hoffsis, S. Bech-Nielsen, W. P. Shulaw, M. Rings (1995):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* **56**, 1322–1324.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, A. E. Rosenberger (1992a):** *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetus of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 477–480.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, A. E. Rosenberger (1992b):** *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymphnodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 166–171.
- Taylor, T. K., C. R. Wilks, D. S. McQueen (1981):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk of a cow with Johnes disease. *Vet. Rec.* **109**, 532–533.
- Tunkl, B., Z. Aleraj (1965):** Nalaz uzročnika paratuberkuloze u spermi bika s jednog centra za umjetno osemenjivanje. *Vet. glasnik* **19**, 845–849.
- Zimpfner, I., M. Awad-Masalmeh, W. Baumgartner (1999):** Zur Typisierung von *Mycobacterium-avium*-Subspecies *Paratuberculosis*-Stämmen isoliert aus Wiederkäuern in Österreich mittels RAPD. *Tierärztl. Umschau* **54**, 335–33.

#### Korrespondierender Autor:

Dr. Walter Glawischnig, Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck, Langer Weg 27, A-6020 Innsbruck. Telefon (00 43) 512-34 87 90, Fax (00 43) 5 12-39 45 18. E-Mail: walter.glawischnig@vmibk.ages.at