



DOI 10.2376/0032-681X-1925

Hochschule Hannover, Fakultät II – Bioverfahrenstechnik, Mikrobiologie<sup>1</sup>

Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Tiergesundheit und Tierschutz<sup>2</sup>

Peer-reviewed | Eingegangen: 12.07.2019 | Angenommen: 22.08.2019

# Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass

**Nicole Wente<sup>1,2</sup>, Doris Klocke<sup>1</sup>, Elmar Mohr<sup>2</sup>, Volker Krömker<sup>1</sup>**

Korrespondenzadresse: nicole.wente@hs-hannover.de

**Zusammenfassung** Die mikrobiologische Mastitisdiagnostik ist ein wesentlicher Bestandteil der Mastitisbekämpfung. Unterschiedliche Mikroorganismen haben unterschiedliche Habitate und erfordern unterschiedliche Vorgehensweisen in der Bekämpfung im Rahmen der Neuinfektionsminderung und der Verkürzung bestehender Infektionen. Die Neu- und Weiterentwicklung mikrobiologischer Methoden hat die diagnostischen Möglichkeiten in den letzten Jahren erheblich vergrößert. Schnelltestverfahren und molekularbiologische Techniken erweitern die Möglichkeiten, Mastitiden in Milchviehbetrieben sachgerecht zu erkennen und zu bekämpfen. Der Beitrag gibt Anwendungsempfehlungen zur jeweiligen mikrobiologischen Methode im Rahmen der epidemiologischen und therapeutischen Beschreibung der für die Eutergesundheit relevanten Mikroorganismen.

**Schlüsselwörter** Kulturelle Mikrobiologie, Milchproben, PCR, Stammvergleiche

## Einleitung

In den letzten Jahren haben sich die diagnostischen Möglichkeiten im Bereich der Mastitisdiagnostik deutlich erweitert. Verschiedene Testverfahren stehen für verschiedene Probenahmeebenen zur Verfügung. Die richtige diagnostische Vorgehensweise stellt sicher, dass die jeweilige Fragestellung entsprechend beantwortet werden kann. Der vorliegende Beitrag beschreibt gebräuchliche Methoden und erläutert für verschiedene Fragestellungen und Anwendungsbereiche geeignete und ungeeignete Vorgehensweisen. Im Vordergrund steht dabei die Ableitung praktischer Empfehlungen.

## Kulturelle Diagnostik

Die meisten Milchproben werden in Deutschland mit einer klassischen kulturellen Diagnostik auf mesophile aerobe Mikroorganismen untersucht. Hierzu werden nicht-selektive Medien (zumeist Blutagar mit 5–10 % Blutzusatz) eingesetzt. Das Wachstum von mehr als zwei verschiedenen Kolonietypen wird dabei üblicherweise als Hinweis auf Kontamination der Milchprobe gewertet. Mit Ausnahme der

## Microbiological mastitis diagnostics for every occasion

**Summary** The microbiological diagnosis of mastitis is an essential part of mastitis control. Different microorganisms have different habitats and require different methods of control to reduce new infections and shorten existing infections. The increase in microbiological methods has considerably increased the diagnostic possibilities in recent years. Rapid test methods and molecular biological techniques extend the possibilities of dairy farms to properly detect and control mastitis. The article gives recommendations for the respective microbiological method for application purposes within the scope of epidemiological and therapeutic characterisation of microorganisms relevant for udder health.

**Keywords** Cultural Microbiology, Milk samples, PCR, Strain Comparisons

anspruchsvollen Mykoplasmen und der langsam wachsenden atypischen Mykobakterien wachsen die üblichen aerob anzüchtbaren Mastitiserreger auf diesem nicht-selektiven Nährboden innerhalb von 72 Stunden.

Eine erste grobe Einordnung anhand der Koloniemorphologie, der Äskulinspaltung und der Hämolyse muss durch weitergehende Tests (z. B. Gram-Färbung, serologische, biochemische und enzymatische Tests) ergänzt werden. Für die weitergehende oder gezielte Diagnostik werden auch selektive Kulturmedien wie z. B. der Furazolidon-Agar (zur Unterscheidung zwischen Mikrokokken und Staphylokokken) oder der Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC, für Hefen und Schimmelpilze) verwendet (Claessens et al. 1996, DVG 2018). Eine Übersicht der in Deutschland aus Milchproben isolierten Mastitiserreger ist unter [https://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/19-03-18\\_220327\\_DVG\\_Fachgruppe\\_korrigiert\\_002\\_.pdf](https://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/19-03-18_220327_DVG_Fachgruppe_korrigiert_002_.pdf) zu finden.

Diese Diagnostik kann in spezialisierten Laboren oder in der tierärztlichen Praxis durchgeführt werden. Allerdings hängt die



Qualität der Untersuchungsergebnisse vom Probendurchsatz, der Anzahl durchgeführter Bestätigungstests und der Erfahrung der Untersuchenden ab. Die Mitführung von Referenzstämmen – im Sinne einer Positivkontrolle – ist unverzichtbar. Um den Aufwand zu verringern, kann die diagnostische Tiefe beschränkt werden. So kann z. B. anstatt bis zu *S. uberis*, Enterokokken und Laktokokken nur bis zu Äskulin-positiven Streptokokken differenziert werden. Da der Nachweis der drei Gattungen allerdings unterschiedliche Maßnahmen zur Verbesserung der Eutergesundheit im Milchviehbetrieb erfordert, ist die Beschränkung der diagnostischen Tiefe nicht sinnvoll. Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Epidemiologie einzelner Mastitiserreger führen zu einem erhöhten Bedarf an differenzierteren diagnostischen Techniken. Andererseits steht die Erhöhung der Untersuchungskosten einer größeren diagnostischen Tiefe entgegen.

Die bei kulturellen Verfahren isolierten Mikroorganismen können für eine weiterführende Diagnostik (z. B. Resistenzbestimmung, PCR, MALDI-TOF) eingesetzt werden. Einige Labore in Deutschland verfügen inzwischen über ein Gerät, das Massenanalyse von chemischen Verbindungen (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung, MALDI) mit einer Flugzeitanalyse (Time Of Flight, TOF) verbindet und so sehr spezifisch Mikroorganismen identifizieren kann (Barreiro et al. 2017). Allerdings werden aufgrund der hochspezifischen Analyse häufig bakterielle Spezies ausgewiesen, deren Bedeutung für die Eutergesundheit aufgrund fehlender epidemiologischer Einschätzungen nicht bewertet werden kann.

## Kulturelle „On-farm-Diagnostik“ zur therapeutischen Entscheidungsfindung

Eine kulturelle „On-farm-Diagnostik“ ersetzt nicht die konventionelle zytomikrobiologische Diagnostik und Resistenzprüfung in einem spezialisierten Untersuchungslabor, sondern gibt dem Behandelnden lediglich eine schnelle Hilfe bei der Auswahl therapeutischer Maßnahmen. Da hier nur eine Sterilitätsprüfung der Milch durchgeführt wird, können diese Tests unter tierärztlicher Aufsicht in landwirtschaftlichen Betrieben unter Einhaltung der erforderlichen Hygiene durchgeführt werden. Vorteile der für diesen Zweck konzipierten Testverfahren sind das schnelle Ergebnis und der geringe Aufwand. Die Testdurchführung findet vor Ort statt, somit entfällt die Probentransportzeit, ebenfalls zeitsparend ist die kurze Inkubationszeit bis zur Auswertung. Die Tests sind simpel in der Anwendung und liefern nach zwölf oder mehr Stunden valide Ergebnisse. Derzeit sind zwei schnelle Testsysteme auf dem deutschen Markt erhältlich. Eine Kombination von Petrifilmen® (3M, Rapid Coliform und Rapid Aerobic Count) erlaubt dem Anwender eine quantitative Identifikation von Keimgruppen (mesophile aerobe Gesamtkeimzahl und coliforme Mikroorganismen). So kann ermittelt werden, ob „kein Wachstum“, „gramnegatives Wachstum“ oder mittels Ausschlussprinzip „grampositives Wachstum“ vorliegt (Kock et al. 2018). Das zweite Testsystem ist MastDecide® (QuIdee GmbH); das qualitative

Zweiröhrchensystem erlaubt nach zwölf Stunden entsprechende Aussagen, sodass beim Vorliegen eines grampositiven Ergebnisses eine lokale antibiotische Therapie eingeleitet werden kann. Hierbei sind die besonders einfache und sichere Anwendung sowie Auswertung vorteilhaft (Leimbach und Krömker 2018). Weitere kulturbasierte Testverfahren sind verfügbar. Sie ermöglichen eine erleichterte kulturbasierte Diagnostik bis zur Gattungsebene, sind damit aber auf das tierärztliche Praxislabor beschränkt. Hierzu zählen z. B. der Speed® Mam Color Test (Virbac) und der Vêto-Rapid Test (Vetoquinol). Aufgrund des größeren Arbeitsaufwandes und einer initialen Inkubation von mindestens 24 Stunden (bis zu sieben Tagen, Speed® Mam Color, Mykoplasmen) sind sie langsamer und aufwendiger in der Handhabung als die vorher erwähnten Tests. Speed® Mam Color basiert auf dem Prinzip einer bunten Reihe und erlaubt die Charakterisierung der Erreger nach Gattung (Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken, Enterobacteriaceae, Mykoplasmen, Pseudomonaden und *E. coli*) sowie die Bestimmung der Resistenzen gegenüber 14 Antibiotikakombinationen. Bei VêtoRapid handelt es sich um eine in drei Sektoren unterteilte Petrischale, versehen mit drei unterschiedlichen selektiven Nährmedien; dieser Test erlaubt eine Kategorisierung in *E. coli*, sonstige Coliforme, *S. aureus*, NAS (Nicht-Aureus-Staphylokokken), Äskulin-positiv Streptokokken, Äskulin-negative Streptokokken mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Hämolyse.

Gegenüber der Laboruntersuchung haben die Schnelltestsysteme für den direkten Einsatz im landwirtschaftlichen Betrieb sowohl ihre Stärken als auch konzeptbedingte Schwächen. Die Tests können aufgrund von erhöhtem Inokulationsvolumen (z. B. 100  $\mu$ l anstatt von 10  $\mu$ l) tendenziell geringere Erregerausscheidungen nachweisen und sind somit gegebenenfalls sensibler als die Untersuchungsverfahren im Routinelabor. Dafür können sie keine langsam wachsenden (z. B. Eukaryonten wie Hefen und Prototheken oder Corynebakterien) oder anspruchsvollen Mikroorganismen (z. B. Mykoplasmen) anzeigen. Diese Detektionslücken sind für das diagnostische Ziel nicht entscheidend, weil Infektionen mit Eukaryonten und Mykoplasmen nicht antibiotisch therapierbar sind und Infektionen mit Corynebakterien keine antibiotische Therapie erfordern. Ohne Anwendung dieser Systeme würden klinische Mastitiden nahezu immer antibiotisch behandelt werden (Krömker et al. 2018). Solche Schnelltestsysteme ermöglichen unter strukturierter Anwendung eine Implementierung und Etablierung evidenzbasierter Mastitistherapiekonzepte (Kock et al. 2018, Mansion-de Vries et al. 2014, 2015) und somit eine erhebliche Einsparung von antibiotischen Dosen ohne Verlust von bakteriologischer Heilung (Kock et al. 2018, Mansion-de Vries et al. 2016).

Bei der Anwendung ist dennoch zu beachten, dass eine saubere Probenahme und Beimpfung der Schnelltestmedien essenziell sind, da nur so zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können. In beiden Testsystemen werden mitunter pathogene Mikroorganismen kultiviert, weswegen diese erst nach dem ordnungsgemäßen Autoklavieren über den Hausmüll entsorgt werden dürfen.





**Tab. 1: Milchproben für die mikrobiologische Diagnostik von Mastitiden**

| Ebene                               | Diagnostik  |
|-------------------------------------|---|
| Viertelgemelk                       | Kulturelle und molekularbiologische Mastitisdiagnostik  |
| Gesamtgemelk                        | Einzeltierselektion aufgrund von Infektionen mit eradikierbaren Mikroorganismen, z. B. <i>S. agalactiae</i> , <i>S. canis</i> oder Mykoplasmen  |
| Gruppenpoolproben/Herdensammelmilch | Untersuchung auf eradikierbare Mikroorganismen (z. B. <i>S. agalactiae</i> , <i>Mycoplasma bovis</i> oder spp.) oder quantitative kulturelle Untersuchung zur Beurteilung des aktuellen Infektionsrisikos (z. B. <i>S. aureus</i> ) |

## PCR-Diagnostik

Das PCR (Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion)-Verfahren ist im Gegensatz zur kulturellen Diagnostik eine gezielte Suche nach der DNS ausgewählter Erreger. Somit können nur Mikroorganismen gefunden werden, nach denen auch gesucht wird. Diese Methode basiert auf der hochspezifischen Detektion, Vielfältigung und Visualisierung der Erreger-DNS aus der Milchprobe. Dabei kann die DNS sowohl aus vitalen als auch bereits abgestorbenen Erregern (z. B. nach antibiotischer Vorbehandlung) innerhalb weniger Stunden nachgewiesen werden. Dieses Verfahren eignet sich sehr gut, um langsam wachsende und anspruchsvolle Erreger zu detektieren, damit schnelle Entscheidungen getroffen werden können, um z. B. Tiere nicht zu kaufen oder zu merzen. Die PCR eignet sich wegen ihrer hohen Spezifität bei akzeptabler Sensitivität gut, um Poolproben bzw. Tankmilchproben auf kuhassoziierte Mikroorganismen wie *S. agalactiae* oder Mykoplasmen zu untersuchen (► Tab. 1). Grundsätzlich können auch Resistenzgene von Mastitisserregern detektiert werden, wie z. B. das *blaZ*-Gen, das für die Produktion von  $\beta$ -Lactamase verantwortlich ist. Dabei ist zu beachten, dass nicht jedes detektierte Gen immer exprimiert wird, d. h. ein Erreger, der das *blaZ*-Gen trägt, muss nicht zwangsläufig  $\beta$ -Lactamase bilden und somit phänotypisch Penicillin-resistent sein. Die Untersuchung von Gesamtgemelkproben oder Herdensammelmilchproben mit PCR-Mastitiskits ist zur Einschätzung eines Bestandsproblems mit umweltassoziierten Mikroorganismen ungeeignet, da eine kontaminationsfreie Entnahme dieser Proben nicht möglich ist und diese Mikroorganismen ubiquitär vorhanden sind (► Tab. 1).

Zur molekularbiologischen Untersuchung von Milchproben stehen verschiedene kommerzielle Untersuchungskits und „in-house“ PCR-Methoden verschiedener Labore mit unterschiedlichen Erregernachweisspektren zur Verfügung. Im Gegensatz zur kulturellen Diagnostik bietet dieses Verfahren eine Option der Prozessautomatisierung im Labor. Allerdings sind die Reagenzien sowie die benötigte Geräteausstattung für die PCR-Untersuchung kostenintensiv. Auch die PCR-Methode erfordert eine sorgfältige Probennahme, um ein kontaminationsbedingtes falsch positives Ergebnis ausschließen zu können. Falsch negative Befunde sind durch störende Faktoren im PCR-Ansatz, DNS-zersetzende Enzyme in der Milchprobe und Mutationen in der Zielsequenz der Erreger-DNS ebenfalls möglich (DVG 2010).

## Stammvergleiche zur Identifikation von kuhassoziierten Stämmen oder zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge

An die Gattungs- und Speziesbestimmung kann eine weiterführende Diagnostik angeschlossen werden. Diese basiert auf einem Vergleich des genetischen Materials der vorliegenden Speziesisolate untereinander und hilft, eine Aussage über deren Diversität bzw. Stammvielfalt innerhalb eines Betriebes zu treffen (Zadoks und Schukken 2006). So kann z. B. identifiziert werden, ob wenige Stämme von *Sc. uberis* oder viele unterschiedliche im Falle eines Ausbruchs in einem Betrieb vorliegen (Zadoks et al. 2003). Eine geringe Stammvielfalt würde in diesem Fall auf ein kontagiöses Verhalten des Erregers hinweisen. Des Weiteren ist es möglich, die Stämme aus dem Umfeld der Tiere mit denen aus Milch an Mastitis erkrankten Tieren zu vergleichen, um mögliche Übertragungswege zu identifizieren und eine geeignete Strategie zur Bekämpfung der Erreger aufzustellen (Schukken et al. 2012, Wentz et al. 2019). Stammvergleiche können weiterhin zur Identifizierung von persistierenden Infektionen bei wiederkehrenden Mastitiden beitragen sowie die Bestimmung von Heilungsraten durch die Detektion von Neuinfektionen präzisieren (Wentz et al. 2018). Denn eine Reinfektion mit einem anderen Stamm der gleichen Erregerspezies kann in der Routinediagnostik nicht erfasst werden. In der Routineuntersuchung sind Stammvergleichsuntersuchungen aufgrund des hohen Aufwandes bislang eine Ausnahme.

Stammvergleichsuntersuchungen werden mithilfe molekularbiologischer Methoden durchgeführt. Die Methoden (z. B. REA, PFGE, RAPD-PCR, MLST) variieren im Preis, der Präzision und der Untersuchungsdauer. Im Rahmen der REA (Restriction Endonuclease Analysis) erfolgt ein enzymatischer Zuschnitt der DNS in unterschiedlich lange Fragmente, die anschließend mithilfe einer Elektrophorese nach ihrer Länge sortiert werden. Die Anzahl und die Länge der entstandenen DNS-Abschnitte hängen von der Spezies, deren Stamm und dem dafür eingesetzten Restriktionsenzym ab. Sind die Abschnitte, die dabei entstehen sollen, groß gewählt, so wird eine leistungsstärkere Elektrophorese mit einem pulsierenden elektrischen Feld eingesetzt (PFGE); als Ergebnis ergeben sich Bandenmuster für einzelne Isolate, die dann untereinander verglichen werden (Birren und Lai 1993). Beim MLST (Multilocus Sequence Typing) werden definierte Genabschnitte





aus dem bakteriologischen Genom mithilfe der PCR vervielfältigt und anschließend die Abfolge der Nukleotide in diesen Abschnitten bestimmt; dabei ergeben sich Profile, die mit den Profilen anderer Mikroorganismen aus speziellen Datenbanken abgeglichen werden können. Sind die Profile identisch, so geht man von einem Klon aus (Maiden et al. 1998). Die RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ist eine PCR-Methode mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe. Bei der RAPD-PCR muss der DNS-Abschnitt, im Gegensatz zu anderen Methoden, nicht bekannt sein. Es werden kurze Primer (ca. zehn Nukleotide) eingesetzt, diese haben durch ihre geringe Größe die Möglichkeit, an viele Stellen der vorliegenden DNS zu binden und somit viele Startpunkte für die replizierende Polymerase zu markieren. Dabei entstehen unterschiedlich lange DNS-Abschnitte, die nach einer Auftrennung mit der Gelelektrophorese Bandenmuster ergeben. Die entstandenen Profile einzelner Mikroorganismen werden untereinander verglichen (Williams et al. 1990). Bei ungleichen Stämmen sind die Bandenmuster aufgrund von Sequenzvariationen im Genom unterschiedlich. Für die RAPD-PCR ist keine kostenintensive Sonderausstattung der PCR anwendenden Labore notwendig, sie ist weniger aufwendig als die anderen Stammvergleichstechniken und somit besonders gut für die Routinediagnostik geeignet.

## Probenahmeebene

Da das einzelne Drüsenviertel das infizierbare Kompartiment ist, ist eine Viertelgemelksprobe immer richtig. Soll mit der Untersuchung nur die Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen ausgeschlossen werden (Einzeltier bei Ankauf oder Herde nach Sanierung), können auch andere Proben (Einzelgemelk, Tankmilch) Verwendung finden (► Tab. 1 und ► Tab. 2).

## Die richtige Diagnostik für jeden Anlass

Ein gezielter Antibiotikaeinsatz ist in Milchviehbetrieben nur durch Anwendung evidenzbasierter therapeutischer Konzepte möglich. Diese setzen die Anwendung von kulturellen Schnelltests bei den meisten klinischen Mastitiden voraus – lediglich bei Mastitisfällen von Tieren, die von vorneherein aufgrund ihrer Mastitishistorie von einer antibiotischen Therapie nicht profitieren werden, kann auf die Anwendung des Tests verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil der Implementierung mikrobiologischer Schnelltestsysteme ist die mit ihnen einhergehende systematische Entnahme von Viertelgemelksproben klinischer Mastitiden. In Milchviehbetrieben ohne besondere Eutergesundheitsstörungen genügt dann die differenzierte kulturelle Untersuchung einer repräsentativen Stichprobe (in Milchviehbetrieben mit bis zu 20 klinischen Mastitiden pro Jahr: alle klinischen Fälle, darüber > 20 Fälle und mindestens 30 % der klinischen Fälle). Diese Stichprobe genügt, um die Erregerverteilung im Betrieb beschreiben zu können und Hinweise auf die kritische Verbreitung von *S. aureus* in der Herde (> oder < 5 % Herdenprävalenz *S. aureus*) zu erhalten (Krömker 2012). Zur Diagnostik gehört die angemessene Durchführung von Resistenzprüfungen. Da die lokale antibiotische Therapie

## Fazit für die Praxis

Die verfügbaren diagnostischen Methoden erlauben Tierärzten und Landwirten eine gezielte Beurteilung der mikrobiologischen Eutergesundheitssituation. Die Vermeidung nicht geeigneter Methoden und überflüssiger Proben sowie die systematische Diskussion und Berücksichtigung der Befunde im Betrieb sind für eine Verbesserung der Eutergesundheit und eine gezielte antibiotische Mastitistherapie erforderlich.

bei modernen Therapiekonzepten auf grampositive Mikroorganismen beschränkt bleibt und Streptokokken nahezu vollständig Penicillin-empfindlich sind, ist die Resistenzprüfung von Staphylokokken besonders relevant.

Werden Tiere zugekauft (oder sollen positive Tiere direkt aus der Herde entnommen werden), empfiehlt sich die Untersuchung der Einzelgemelke dieser Tiere mithilfe der PCR-Diagnostik, um Tiere mit *S. agalactiae* und Mykoplasmen sowie evtl. *S. aureus* schnell zu identifizieren und vom Kauf abzusehen oder den Kauf rückgängig zu machen.

Im Rahmen der Begleitung von Sanierungsprozessen auf Herdenebene zur Bekämpfung von *S. agalactiae* und Mykoplasmen hat die Kontrolle der Herdensammelmilch oder von Einzeltanks zur Einschätzung des Herden- bzw. Gruppenstatus ihre Berechtigung (Krömker und Moroni 2018). Die Sanierung von Herden in Bezug auf *S. agalactiae* oder *S. canis* erfordert die wiederholte kulturelle Untersuchung von Viertelgemelksproben aller Kühe der Herde. Die Untersuchung von Poolproben oder Einzelgemelken ist aufgrund der mit dieser Untersuchungsebene einhergehenden Abnahme an Sensitivität für eine sichere Eradikation dieser Mikroorganismen auf Herdenebene nicht geeignet (► Tab. 1 und ► Tab. 2).

Die Untersuchung bestimmter Subgruppen (Frischabkalber [Färsen/Kühe], hochzellige Tiere, Tiere zum Trockenstellen) kann für bestimmte Fragestellungen sinnvoll sein, beispielsweise bei hohen geburtsnahen Infektions- oder Erkrankungsraten, bei vielen chronisch euterkranken Tieren oder bei der Auswahl von Tieren und Vierteln für gezielte antibiotische Therapien zu Beginn der Trockenperiode.

Stammvergleichsmethoden sind immer dann von Wert, wenn die Verbreitungswege von Mikroorganismen innerhalb einer Herde ermittelt werden sollen. Sie erlauben die Unterscheidung zwischen kontagiösen und nichtkontagiösen Infektionsverläufen. Bei kontagiöser Infektion werden einzelne Mikroorganismenstämmen aus infizierten Tieren oder aus Umwelthotspots an andere Tiere übertragen. Gelegentlich treten kontagiöse Verläufe bei „Umwelterregern“, z. B. bei *Sc. uberis*, auf (Zadoks et al. 2003). Die alleinige Kenntnis der relevanten Bakterienspezies führt hier nicht zu den richtigen Entscheidungen in der Bekämpfung. Bei nichtkontagiöser Infektion nehmen Tiere Mikroorganismen aus der Umwelt auf, geben diese



**Tab. 2: Mikrobiologische Diagnostik bei Mastitiden und Keimzahlproblemen**

| Diagnostische Methode   | Kosten     | Probe                                 | Ziel   |
|---|------------|---------------------------------------|--|
| Kultur im spezialisierten Labor   | +          | Viertelanfängsgemelk                  | Herdenepidemiologie und Basis für Behandlungspläne, Resistenzprüfung                                 |
| Kultur tierärztl. Praxis  | ++         | Viertelanfängsgemelk                  | Gattungsdiagnose und therapeutische Entscheidungsfindung   |
| Kultur on-farm*   | +          | Viertelanfängsgemelk                  | Therapeutische Entscheidungsfindung  |
| PCR (kommerzielles Kit)   | ++         | Einzelgemelk oder VAG                 | Haupterregerbestimmung für Merzungs- und Therapiemaßnahmen, Ankaufuntersuchung                       |
| Stammvergleich  | +++        | Isolate einer Art                     | Ermittlung von Infektionsmodalitäten, Bewertung des Therapieerfolgs                                  |
| Mischuntersuchung aus PCR und kultureller Diagnostik  | ++ bis +++ | Herdensammelmilch                     | Einschätzung des Herdenstatus  |
| Kulturelle quantitative Keimgruppenuntersuchung von Einstreumaterial oder der Herdensammelmilch | ++ bis +++ | Einstreumaterial<br>Herdensammelmilch | Beurteilung des mikrobiologischen Risikos frischer Einstreu<br>Stufenkontrolle bei Keimzahlproblemen |

+: < 10 €, ++: < 20 €, +++: > 20 €; \* die Kultur „on-farm“ hat als Teil eines therapeutischen Entscheidungsprozesses einen positiven „Return on Invest“ zur Folge (Mansion-de Vries et al. 2016)

aber nicht oder nur geringfügig an andere Tiere weiter. In Betrieben mit solch einem Infektionsmuster sind zumeist viele verschiedene Stämme einer Art im Betrieb vorhanden. In diesen Fällen sind zur Verbesserung der Herdengesundheit die Überprüfung und Optimierung der Hygiene zumeist zielführend.

Die kulturelle quantitative Untersuchung von Keimgruppen (Gesamtkeimzahl, coliforme Mikroorganismen, äskulinspaltende Streptokokken, Staphylokokken) in Proben frischer Einstreu kann die Kenntnisse zum einstreubedingten Mastitisrisiko verbessern. Insbesondere wenn organisches Einstreumaterial zugekauft wird oder fragwürdiges Material benutzt werden muss, kann das Risiko

für die Eutergesundheit der Herde anhand der Untersuchung eingeschätzt werden.

Eine Untersuchung entsprechender Keimgruppen in der Herdensammelmilch – ergänzt um thermotrophe Mikroorganismen – kann als Stufenkontrolle (1. Probe: erste Ausschleusung der Melkanlage, 2. Probe: Tank vor der Einschleusung, 3. Probe: Tank nach der Einschleusung, 4. Probe: Tankanschluss) bei der Eingrenzung von Keimzahlproblemen helfen.

### Ethische Anerkennung

Die Autoren versichern, während des Entstehens der vorliegenden Arbeit die allgemeingültigen Regeln Guter Wissenschaftlicher Praxis befolgt zu haben.

### Conflict of interest

VK ist Mitinhaber des Patents zum Schnelltest, der als MastDecide erhältlich ist. Die anderen Autoren versichern, dass keine geschützten, beruflichen oder anderweitigen persönlichen Interessen an einem Produkt oder einer Firma bestehen, welche die in dieser Veröffentlichung genannten Inhalte oder Meinungen beeinflussen können.

### Funding

Diese Arbeit wurde nicht finanziell unterstützt.

### Autorenbeitrag

Konzeption oder Design der Arbeit: NW und VK. Manuskriptentwurf: NW, DK, VK. Kritische Revision des Artikels: NW, DK, EM, VK. Endgültige Zustimmung der für die Veröffentlichung vorgesehenen Version: NW, DK, EM, VK. ■





## Literatur

- Barreiro JR, Gonçalves JL, Campos Braga PA, Dibbern AG, Eberlin MN, dos Santos MV (2017): Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Dairy Sci* 100(4): 2928–2934.
- Birren B, Lai E (1993): Pulsed Field Gel Electrophoresis – A practical Guide. Academic Press, inc. San Diego, California.
- Claessens I, Krömker V, Hamann J (1996): Zur Routine-Differenzierung von Mastitisserregern – Methodische Ansätze. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Hrsg.), 37. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 246–251, ISBN 3-930511-35-5.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) (2010): Stellungnahme des Sachverständigenausschusses zur Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Mastitisiagnostik. *Dtsch Tierärztebl* 7: 914–917.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) (2018): Leitlinien zur Labordiagnostik der Mastitis – Probenahme und mikrobiologische Untersuchung. Fachgruppe „Milchhygiene“, Sachverständigenausschuss „subklinische Mastitis“. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Gießen.
- Kock J, Wente N, Zhang Y, Paduch JH, Leimbach S, Krömker V (2018): Accuracy of 12h-Petrifilm-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany. *Milchwissenschaft* 71: 10–13.
- Krömker V (2012): Strategies against mastitis due to cow-associated pathogens as a herd problem. *J Food Safety Food Qual Arch Lebensmittelhyg* 63: 61–64.
- Krömker V, Moroni P (2018): Strategische Ansätze zur Bekämpfung von Mykoplasmenmastitiden. *Prakt Tierarzt* 99(10): 1072–1079.
- Krömker V, Schmenger A, Kock J, Klocke D, Paduch JH, Leimbach S (2018): Aspekte einer modernen Mastitistherapie [Aspects of Modern Mastitis Treatment]. *Prakt Tierarzt* 99(2): 180–189.
- Leimbach S, Krömker V (2018): Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups. *J Dairy Sci* 101(7): 6357–6365.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* 95(6): 3140–3145.
- Mansion-de Vries EM, Knorr N, Paduch JH, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V (2014): A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. *Prev Vet Med* 113(4): 620–624.
- Mansion-de Vries EM, Hoedemaker M, Krömker V (2015): Aspekte einer evidenzbasierten Therapie klinischer Mastitiden. *Tierärztl Prax Großtiere* 43(5): 287–295.
- Mansion-de Vries EM, Pieper J, Knorr N, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V (2016): Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage. *Milk Sci Int* 69: 27–32.
- Schukken YH, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban, Welcome F, Zadoks R (2012): The “other” Gram-negative bacteria in mastitis *Klebsiella*, *Serratia*, and more. *Vet Clin Food Anim* 28: 239–256.
- Wente N, Zhang Y, Grieger AS, Paduch JH, Leimbach S, Kroemker V (2018): Recurrent mastitis – persistent or new infections? 30<sup>th</sup> World Buiatrics Congress, Sapporo, 2018.
- Wente N, Klocke D, Paduch JH, Zhang Y, tho Seeth M, Zoche-Golob V, Reinecke F, Mohr E, Krömker V (2019): Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. *J Dairy Sci*. pii: S0022-0302(19)30689-7.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22): 6531–6535.
- Zadoks RN, Schukken YH (2006): Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. *Vet Clin Food Anim* 22: 229–261.
- Zadoks RN, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP, Schukken YH (2003): Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol Infect* 130(2): 335–349.

## Nicole Wente



Studium der Milchwirtschaftlichen Lebensmitteltechnologie sowie der Milch und Verpackungswirtschaft an der Hochschule Hannover. Promotionsstudentin an der Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Tiergesundheit und Tierschutz, Leitung der Professur Prof. Dr. med. vet. habil. Elmar Mohr. Aktuell Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Hannover in Forschungsgruppe Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. habil. Volker Krömker.

### Korrespondenzadresse:

Nicole Wente, Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Heisterbergallee 10A, nicole.wente@hs-hannover.de