

Aus der
Tierklinik für Fortpflanzung
Arbeitsgruppe Bestandsbetreuung und Qualitätsmanagement
www.bestandsbetreuung.de
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Diagnostik und Epidemiologie von *Staphylococcus aureus* in
Milchviehbetrieben in Brandenburg**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
NICOLE SCHEIBE
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2006

Journal-Nr.:3063

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg

Erster Gutachter: PD Dr. Bernd-Alois Tenhagen

Zweiter Gutachter: PD Dr. Bert-André Zucker

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Staphylococcus aureus; mastitis; dairy cows; identification; epidemiology; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 15.02.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Literaturübersicht	8
2.1	Mastitiden	8
2.1.1	Kategorien der Eutergesundheit	8
2.1.2	Weitere Möglichkeiten der Einteilung von Euterentzündungen	10
2.1.3	Entstehung von Euterentzündungen	10
2.1.4	Erkennung von Euterentzündungen	11
2.2	Mastitiserreger	12
2.2.1	Major pathogens	12
2.2.1.1	Reservoirs	13
2.2.1.2	Verlauf und Dauer	14
2.2.1.3	Bekämpfungsmaßnahmen	16
2.2.2	Minor pathogens	17
2.2.2.1	Koagulase negative Staphylokokken	19
2.2.2.2	<i>C. bovis</i>	19
2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.3.1	Speziesdiagnostik von <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.3.1.1	Kulturell-biochemische Methoden	23
2.3.1.1.1	Koagulasereaktion	23
2.3.1.1.2	Hämolyseverhalten	24
2.3.1.1.3	Mannitolfermentation	25
2.3.1.1.4	Acetoin Produktion	25
2.3.1.1.5	Weitere kulturell-biochemische Methoden	26
2.3.1.2	Selektivmedien	27
2.3.1.3	Schnell-Agglutinations-Tests	28
2.3.1.4	Antikörperbestimmung in der Milch	30
2.3.1.5	Genetische Methoden	30
2.3.2	Probennahme	31
2.4	Mastitis durch <i>Staphylococcus aureus</i>	32
2.4.1	Prävalenz	32

2.4.2	Klinik und Verlauf	32
2.4.3	Reservoirs	33
2.4.4	Selbstheilung und Dauer der Infektion.....	34
2.4.5	Behandlung	34
2.4.5.1	Behandlung klinischer Mastitiden.....	35
2.4.5.2	Behandlung subklinischer Mastitiden in der Laktation.....	36
2.4.5.3	Behandlung subklinischer Mastitiden in der Trockenstehperiode	37
2.4.5.4	Formen der Behandlung.....	37
2.4.5.5	Ursachen für die geringen Therapieerfolge	38
2.4.6	Kontrolle der Neuinfektion.....	39
2.5	Erregertypisierung anhand genotypischer Merkmale	41
2.5.1	Kontagiöse Erreger.....	41
2.5.2	Umweltassoziierte Erreger.....	43
2.5.3	Probleme bei der Genotypisierung und epidemiologischen Einordnung.....	44
3	Material und Methoden	47
3.1	Bestandsbegehung.....	47
3.2	Bakteriologische Untersuchungen der Milchproben	47
3.3	Auswahl der Betriebe zur Typisierung	48
3.4	Untersuchungen zur Differenzierung von <i>Staphylococcus aureus</i> von anderen Staphylokokken	50
3.4.1	Hämolyseverhalten.....	50
3.4.2	Röhrchen-Koagulase	50
3.4.3	Anaerobe Mannitvergärung.....	51
3.4.4	Acriflavinhaltiger Agar	51
3.4.5	Acetoinbildung.....	51
3.4.6	Staphylase-Test	51
3.4.7	Slidex Staph Plus.....	52
3.5	Typisierung der gefundenen <i>Staphylococcus aureus</i> Isolate.....	52
3.5.1	Erstellung von Resistenzprofilen	53
3.5.2	Durchführung der RAPD-PCR.....	54
3.5.2.1	Isolierung und Reinigung der DNA	54
3.5.2.2	Bestimmung der DNA-Dichte.....	56

3.5.2.3	Amplifikation der DNA.....	56
3.5.2.4	Gel-Elektrophorese.....	57
3.5.2.5	Auswertung der RAPD-PCR Bilder.....	57
3.6	Statistische Verfahren	58
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Ergebnisse der Untersuchungen zur Diagnostik von <i>Staphylococcus aureus</i>	59
4.1.1	Testresultate im Überblick.....	59
4.1.2	Ergebnisse der einzelnen Testverfahren im Vergleich (zu jeweils einem anderem Testverfahren).....	60
4.1.3	Ergebnisse der Testverfahren im Vergleich zum Standard	63
4.1.4	Sensitivität und Spezifität der Verfahren.....	65
4.1.5	Beziehung der Testresultate zum Hämolyseverhalten	66
4.2	Ergebnisse der Typisierung	68
4.2.1	RAPD-PCR und Gelelektrophorese	68
4.2.1.1	Betrieb 1.....	68
4.2.1.2	Betrieb 2.....	70
4.2.1.3	Betrieb 3.....	74
4.2.1.4	Betrieb 4.....	75
4.2.1.5	Betrieb 5.....	78
4.2.1.6	Betrieb 6.....	80
4.2.1.7	Zusammenfassung der Typisierung mittels RAPD-PCR und Gelelektrophorese	83
4.2.2	Antibiogrammtypisierung im Agardiffusionstest	85
4.2.2.1	Betrieb 1.....	85
4.2.2.2	Betrieb 2.....	86
4.2.2.3	Betrieb 3.....	87
4.2.2.4	Betrieb 4.....	88
4.2.2.5	Betrieb 5.....	88
4.2.2.6	Betrieb 6.....	88
4.2.2.7	Übersicht über die Resistenzlage von <i>Staphylococcus aureus</i>	89
4.2.3	Zusammenfassung der Typisierungsergebnisse.....	89

5	Diskussion	91
5.1	Diagnostik.....	91
5.1.1	Koagulase, anaerobe Mannitolvergärung und Acriflavinresistenz	91
5.1.2	Beurteilung des Hämolyseverhaltens	92
5.1.3	Beurteilung der Schnell-Agglutinationstests	93
5.2	Typisierung.....	94
5.2.1	Vorkommen unterschiedlicher <i>Staphylococcus aureus</i> Stämme.....	94
5.2.2	Verbreitungstendenz unterschiedlicher <i>Staphylococcus aureus</i> Stämme	95
5.2.3	Vergleich der von Erstkalbinnen und multiparen Tieren isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> Stämme	97
5.2.4	Infektionen mit <i>Staphylococcus aureus</i> bei Färsen.....	97
5.2.5	Methode Agardiffusionstest und RAPD-PCR	98
5.2.6	Auswahl und Anzahl der Primer.....	101
6	Zusammenfassung	102
7	Summary.....	105
8	Literaturverzeichnis.....	108
9	Anhang.....	134