

2 Literaturübersicht

In den folgenden Abschnitten wird die Bedeutung von Staphylokokken, insbesondere von *Staphylococcus aureus* für das Rindereuter dargelegt. Nach einer allgemeinen Einführung wird auf Mastitiden verursacht durch *S. aureus* hinsichtlich ihrer Epidemiologie, Prophylaxe, Therapie und Diagnostik genauer eingegangen. Besondere Beachtung erhalten jeweils Unterschiede zwischen Kühen und Erstkalbinnen. Zum Schluß wird auf die Methoden der Genotypisierung von *S. aureus* Isolaten eingegangen.

2.1 *Staphylococcus* spp.

Staphylokokken werden den Bakterien mit grampositiver Zellwand zugeordnet. Die Gattung *Staphylococcus* umfaßt Katalase positive, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende kugelförmige Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm, die sich in charakteristischer Weise zu Haufen zusammenlagern.

Staphylokokken besiedeln die Haut, Hautdrüsen und Schleimhäute von Menschen und Tieren und sind medizinisch als Eitererreger und Lebensmittelvergifter bedeutsam (Selbitz 1992). Sie sind ubiquitär vorhanden, meist schwach kontagiös, aber hoch tenazit.

Es wurde festgestellt, dass Staphylokokken eine Vielzahl von virulenzassoziierten Toxinen und Enzymen produzieren. Man unterschied dabei zellgebundene und sezernierte Substanzen.

Zu den zellgebundenen Virulenzfaktoren gehören die Kapsel, Fibronectin-Rezeptoren, Protein A und der Clumping-Factor. Die Kapsel wirkt durch Abdecken der Zellwandrezeptoren antiphagozytär und wird gelegentlich von *S. aureus* produziert. Fibronectin-Rezeptoren vereinfachen das Haften an Wundgewebe und Endothelzellen. Protein A führt durch Bindung an Fc-Fragmenten von Immunoglobulinen zu einer Aggregation. Dieses blockiert vermutlich die Immunoglobuline und schützt somit vor einer Phagozytose. Der Clumping-Factor (auch: gebundene Koagulase) stellt ein Protein dar, welches für gewöhnlich bei *S. aureus* und *S. intermedius* vorhanden ist. Es interagiert mit Fibrinogen und führt zu einer Agglutinations-ähnlichen Reaktion. Es entsteht ein den Keim umgebender Fibrinmantel, der die Erkennung und Wirtsabwehr erschwert (Biberstein und Hirsh 1999).

Zu den sezernierten Substanzen gehören Koagulase, Staphylokinase (Fibrinolysin), Hyaluronidase, Thermonuclease, DNase Lipase, Esterase, Phospholipase, Exotoxine

(TSST-1, Exfoliatin, Leukozidin), Enterotoxine (SET A-F) und Hämolsine (α , β , δ und γ). Die Koagulase verursacht eine Koagulation des Blutplasmas. Sie ist bei den pathogenen Staphylokokken-Spezies, die Infektionskrankheiten hervorrufen können, immer vorhanden. Zu den veterinärmedizinisch bedeutsamen Koagulase positiven Staphylokokken, wurden in erster Linie *S. aureus*, *S. intermedius* und *S. hyicus ssp. hyicus* zugeordnet. Eine geringere Bedeutung haben Koagulase negative Arten (KNS), wie *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*. Die Enzyme Staphylokinase, Hyaluronidase, Thermo-nuclease, DNase Lipase, Esterase und Phospholipase wurden als Wegbereiter zur Verbreitung der Keime im Körper bezeichnet. Exfoliatin wird von *S. aureus* und *S. hyicus* produziert und wirkt epidermolytisch. So wurde das Eindringen über die Haut erleichtert. Leukozidin zerstört neutrophile Granulozyten und Makrophagen durch Veränderung deren Zellwandpermeabilität. Die Hämolsine sind einzeln, in Kombination oder gar nicht vorhanden. Hämolsin α wirkt auf Membranlipide und bewirkt eine vollständige Hämolyse in vitro. Hämolsin β zeigt sich ähnlich der Phospholipase C und bewirkt in vitro bei 37°C eine unvollständige Hämolyse. Hämolsin δ wirkt ähnlich wie ein Detergenz, wird aber von Serum inhibiert. Die Bedeutung von Hämolsin γ ist noch unklar (Biberstein und Hirsh 1999).

2.2 Krankheitsbilder durch *S. aureus*

Neben der großen Bedeutung, der *S. aureus* bei Wiederkäuern zugewiesen wird, spielt der Keim auch bei anderen Tierarten eine Rolle.

Bei allen Arten des Wirtschaftsgeflügels, am häufigsten aber bei Hühnern und Puten, wurden sowohl lokale als auch systemische Erkrankungen durch *S. aureus* beschrieben. Sie äußern sich besonders in einem Komplex aus Osteomyelitis, Arthritis, Tendovaginitis und Synovitis. Bei Küken bis zur 4.-8. Lebenswoche wurde gezeigt, daß eine septikämisch verlaufende Form Verluste (Selbitz 1992) bringt. Die Botryomykose wird als eine durch *S. aureus* hervorgerufene granulomatöse Entzündung beschrieben, bei der die in zähem Eiter eingeschlossenen Erregeransammlungen von Bindegewebe umgeben sind. Diese Erkrankung tritt besonders beim Pferd auf Dabei sind die Eintrittspforten der Erreger Verletzungen, Kastrationswunden, Scheuerstellen durch Geschirr und Sattel (sog. Satteldruck) und ähnliche. Seltener wird die Botryomykose auch bei Schwein und Rind beobachtet (Selbitz 1992).

Auch beim Menschen zählt *S. aureus* zu den wichtigsten Erregern eitriger Infektionen wie Wundinfektionen, Osteomyelitiden und Septikämien. Bei Frauen spielt das Toxic Shock Syndrom verursacht durch das Exotoxin Toxic Shock Syndrom Toxin 1 (TSST-1) eine große Rolle. TSST-1 konnte sowohl bei *S. aureus* Isolaten in der Milch klinisch erkrankter Tiere (58,1% der Isolate) und subklinisch infizierter Tiere (76,7%) als auch in der Tankmilch (67,5%) entdeckt werden (Takeuchi et al. 1998).

Ebenso spielen die von *S. aureus* sezernierten Enterotoxine eine große Rolle in der Lebensmittelhygiene. Staphylokokken-Enterotoxine (SET) zeigen sich extrem hitzestabil, d.h. sie werden auch durch Prozesse wie Kochen, Pasteurisieren etc. nicht zerstört. Sie wirken über Vagus- und Sympathicus- Fasern auf das Brechzentrum und führen zu Erbrechen, Durchfall und Kreislaufbeschwerden. Die Toxine gelangen sowohl primär z.B. durch infizierte Milch, Abszesse im Fleisch in die Lebensmittel als auch sekundär durch den Menschen (Nasensekret, Hustenaerosole, Partikel aus infizierten Wunden).

Die Häufigkeit der Enterotoxigenität von *S. aureus* Isolaten wurde in diversen Studien variabel beschrieben (Kenny et al. 1993, Mossel und van Netten 1990, Ruzickova 1994). Die Kontamination von Lebensmitteln durch *S. aureus* resultiert hauptsächlich aus dessen Präsenz im Rohmaterial (De Buyser et al. 2001, Tondo et al. 2000). Das tierische Produkt, durch das *S. aureus* vornehmlich übertragen wird, ist die Milch (De Buyser et al. 2001). Enterotoxische *S. aureus* Stämme wurden für eine Reihe von Lebensmittelvergiftungen verantwortlich gemacht. Der Auslöser war jedes Mal der Verzehr kontaminierter Kuhmilch oder Milchprodukte (Adesiyun et al. 1998).

2.3 Mastitiden durch *S. aureus*

2.3.1 Epidemiologie der *S. aureus* Mastitiden

S. aureus gehört zu den häufigsten Erregern intramammärer Infektionen. In einer Studie in Brandenburg machte *S. aureus* 30,1% aller pathogenen Keime aus (Köster 2004). Die durchschnittliche Prävalenz² von *S. aureus* in Herden Brandenburgs betrug 5,0% bei Kühen zu Beginn der Laktation und 8,5% gegen Ende der Laktation (Köster 2004). Der Anteil von *S. aureus* an euterpathogenen Erregern aus bakteriologisch positiven Milchproben in Deutschland betrug 17,3% (Kirst et al. 2001).

² Anteil positiver Tiere/ Viertel zum Zeitpunkt der Untersuchung

Der Anteil von *S. aureus* an den vorkommenden kontagiösen Erregern betrug in Brandenburg zwischen 25,9% und 47,4%. Dabei ist dieser Anteil am Ende der Laktation höher als zu Beginn und bei Kühen generell höher als bei Erstkalbinnen (Köster 2004).

Als Hauptreservoir wurden infizierte Euter, Zitzenkanäle und Zitzenverletzungen beschrieben (Jones et al. 1998). Das Bakterium persistiert in der Milchdrüse, im Zitzenkanal und in Zitzenverletzungen infizierter Kühe (Jones et al. 1998).

S. aureus kann in die Epithelzellen der bovinen Milchdrüse und in Phagozyten eindringen und dort überleben (Almeida et al. 1996).

S. aureus wurde von verschiedenen Körperstellen (Zitzenhaut, Nasenlöcher, Vagina, Perineum, Haarkleid), aus Futterproben, Einstreu und Nase und Händen des Melkpersonals isoliert (Matos et al. 1991, Roberson et al. 1994, Roberson et al. 1998).

Als Hauptübertragungsweg von *S. aureus* gilt nach derzeitigem Kenntnisstand der Melkvorgang (Hoedemaker 2001, Roberson 1999). Träger sind hier Milch infizierter Tiere, verunreinigte Zitzenbecher, die Hände des Melkpersonals und Euterlappen (Fox et al. 1991, Jones et al. 1998).

Es treten jedoch bereits bei 3-4% der Erstkalbinnen zum Zeitpunkt der Abkalbung Infektionen der Milchdrüse durch *S. aureus* auf (Kelton et al. 1999). Pankey berichtet von einer Prävalenz von 0,8% (Pankey et al. 1991). In Brandenburg wiesen durchschnittlich 3,8% der Euterviertel von Erstkalbinnen in den ersten 50 Tagen der Laktation eine Infektion mit *S. aureus* auf (Köster 2004).

Bereits vor der Geburt wurde *S. aureus* im Euter von Färsen festgestellt. Eine Studie berichtet dabei von einer Viertelprävalenz von 9% (Fox et al. 1994).

Als Übertragungsweg kommen die kleine Weidestechfliege (*Haematobia irritans*) in Betracht (Owens et al. 1998) sowie Milch, andere Körperstellen der Färsen (Zitzen, Enddarm, Scheide) und Kontakt untereinander (Roberson et al. 1998).

Infizierte Färsen werden bei der Abkalbung zu dem bedeutendsten Erregerreservoir (Jones et al. 1998).

Tabelle 1: Prävalenzen von *S. aureus* bei Erstkalbinnen

Zeitraum	Viertelprävalenzen	
ante partum	9,00%	(Fox et al. 1994)
<50 Melktage	2,9%	(Fox et al. 1994)
	3-4%	(Kelton et al. 1999)
	0,80%	(Pankey et al. 1991)
	3,80%	(Köster 2004)
>250 Melktage	6,90%	(Köster 2004)

2.3.2. Mastitis durch *S. aureus*

Nach erfolgreicher Infektion verteilen sich die Bakterien nicht homogen im Euter. Sie besiedeln hauptsächlich das Gangepithel (Anderson 1982). Zu Beginn wird das Gewebe der Zitze und der Zisterne zerstört, dann erfolgt der Aufstieg der Bakterien in das Gangsystem (Jones et al. 1998). Die Bakterien werden phagozytiert, können aber in den weißen Blutkörperchen überleben (Jones et al. 1998). Staphylokokkenhaltige neutrophile Granulozyten werden abgekapselt. Daraus entstehen Abszesse, die die Gänge verlegen und den Milchabfluss blockieren. So können Teile der Milchdrüse nicht mehr zur Milchproduktion beitragen (Anderson 1982).

In Abhängigkeit von den pathogenen Eigenschaften des Staphylokokkenstammes, seiner Stärke des Auftretens und prädisponierender Faktoren können sich nach der Infektion verschiedene Krankheitsbilder entwickeln. Der entscheidende Faktor, ob eine perakute oder eine chronische Mastitis entsteht, ist die Wirtsabwehr im Euter selbst in Form der neutrophilen Granulozyten (Anderson 1982). *S. aureus* war an weniger als 10% aller klinischen Mastitiden ursächlich beteiligt (Hogan et al. 1989, Schukken et al. 1989). Dagegen wurden 27,4% aller subklinischen Mastitiden durch *S. aureus* verursacht (Poelarends et al. 2001).

Häufig tritt die *S. aureus* Mastitis in der chronischen Verlaufsform auf. Sie beginnt meist mit einer akuten Episode, die durch erhöhte Körpertemperatur und Anorexie gekennzeichnet ist. Danach beschränken sich die Mastitissymptome nur auf das Euter. Es zeigen sich Wärme, Verhärtung, Veränderungen in der Milch wie Flockenbildung und erhöhte somatische Zellzahl. Die chronische und die subklinische Verlaufsform gehen oft ineinander über (Anderson 1982, Jones et al. 1998).

In einer Studie wiesen 60% der mit *S. aureus* infizierten Kühe eine erhöhte Zellzahl auf (Jones et al. 1998). Aus 27,0% der Euterviertel mit erhöhter Zellzahl konnte *S. aureus* isoliert werden (Sommerhäuser et al. 2003).

Die durchschnittliche Zellzahl von *S. aureus* tragenden Eutervierteln betrug 357×10^3 Zellen/ml (Djabri et al. 2002). Gesunde Euterviertel wiesen hingegen eine durchschnittliche Zellzahl von 68×10^3 Zellen/ml auf.

Herden mit hoher Tankmilch- Zellzahl hatten eine höhere Prävalenz an *S. aureus* Mastitis (Barkema et al. 1998).

Im Falle der chronischen Verlaufsform ist mit einem Milchverlust von etwa 35% zu rechnen (Seffner und Bergmann 1994). Des weiteren geht die *S. aureus* Mastitis mit lang anhaltend hohen Zellzahl einher (de Haas et al. 2004). Dadurch kommt es zu einer Qualitätseinbuße und Minderbezahlung der Milch.

Neben der latenten Infektion und der Ausbildung einer subklinischen Mastitis entwickeln sich auch akute katarrhalische Mastitiden oder chronisch-abszedierende und granulomatöse Euterentzündungen. Besonders bei jungen Kühen entstehen schwere akute nekrotisierende Mastitiden.

Die perakute Mastitis wird charakterisiert durch systemische Krankheitserscheinungen wie erhöhte Körpertemperatur ($41-42^\circ\text{C}$), erhöhte Herzfrequenz, Anorexie, Apathie, fehlende Pansentätigkeit und Muskelschwäche. Das betroffene Euterviertel ist stark geschwollen, hart, schmerzhaft und blau verfärbt. Stirbt die Kuh nicht durch die Toxämie, geht zumindest das betroffene Viertel für die Milchproduktion verloren (Anderson 1982). Die perakute *S. aureus* Mastitis tritt selten auf.

Histopathologisch zeigt sich die perakute Mastitis mit Nekrosen und Ödem des Epithels und des Bindegewebes. Die Nekrose wird induziert durch Toxine des Bakteriums (Anderson 1982). Jones (1998) beschrieb, dass sich die akute *S. aureus* Infektion üblicherweise zum Ende der Laktation oder kurz vor dem Kalben entwickelte. Die klinischen Symptome traten aber erst zur Abkalbung oder in der frühen Laktation auf.

2.3.3 Risikofaktoren für eine Infektion des Euters mit *S. aureus*

Als Risikofaktoren für das Auftreten von Mastitiden gelten die Form der Zitze und besonders ihrer Kuppe sowie Zitzenverletzungen, unregelmäßige Desinfektion des Stalls, mangelhafte Beseitigung des Stallmists und eine Tankmilchzellzahl >150000 Zellen/ml (Elbers et al. 1998). Zadoks (2001) stellte fest, dass BHV-4 seropositive

Kühe signifikant häufiger eine *S. aureus* Mastitis aufwiesen. Ebenso infizierten sich rechte Euterviertel und zuvor bereits schon einmal mit *S. aureus* oder *Sc. uberis* infizierte Euterviertel häufiger. Eine Infektion mit KNS hatte keine signifikante Auswirkung auf die Wahrscheinlichkeit einer *S. aureus* Mastitis. Im Gegensatz zu einer mäßigen Hyperkeratose der Zitzenschleimhaut bewirkt eine starke Hyperkeratose eine höhere Inzidenz³ an *S. aureus* Mastitiden (Zadoks et al. 2001).

2.4 Therapie der *S. aureus* Mastitis

Aufgrund seiner schlechten Therapierbarkeit gehört *S. aureus* zu den Problemkeimen unter den Mastitiserregern (Hoedemaker 2001). Ein großer Teil der Stämme ist aufgrund der Bildung von Penicillinase unempfindlich gegenüber Penicillin (Jones et al. 1998). Koagulase positive Staphylokokken bildeten zu 63,5% Penicillinase (Klaas 2000). Der Therapieerfolg einer *S. aureus* Mastitis zeigte sich signifikant höher, wenn die Infektion von einer beta-Lactamase-negativen Erreger ausging (Sol et al. 2000). Bei subklinischen *S. aureus* Mastitiden wies der Therapieerfolg keine signifikanten Unterschiede zwischen Penicillin-sensitiven und –resistenten Stämmen auf (Sol et al. 1997).

In Brandenburg wiesen die *S. aureus* Isolate hohe Resistenzen gegen Penicillin (55,3%), Ampicillin (56,9%) und Neomycin (54,5%) auf (Köster 2004).

Halbsynthetische Penicilline, wie z.B. Oxacillin oder Cloxacillin zeigten jedoch eine relativ gute Wirksamkeit (Seffner und Bergmann 1994). In der Brandenburger Studie wurde mittels Agardiffusionstest eine Sensibilität von 98,4% gegenüber Cloxacillin und von 93,5% gegenüber Cefquinom ermittelt. Mittels Bouillonmikrodilutionsmethode wurde eine Sensibilität von 100% gegenüber Oxacillin und Cefquinom ermittelt (Köster 2004).

2.4.1 Therapie während der Laktation

Eine Behandlung subklinischer Mastitiden in der Laktation ist aus wirtschaftlichen Gründen nur selten sinnvoll. Die zu erwartenden bakteriologischen Heilungsraten rangieren in der Literatur von 4 bis 92% (Nickerson et al. 1999, Owens et al. 1997, Owens et al. 1988, Remmen et al. 1982, Schukken et al. 1999, Timms 1995, Ziv und Storper 1985). In den meisten Studien lag die bakteriologische Heilungsrate nicht höher als die Selbstheilungsrate von etwa 25% (Craven 1987, Gregory 1999).

³ Anteil an Neuinfektionen in einem bestimmten Zeitraum

Die schlechte bakteriologische Heilungsrate wurde auf die Eigenschaft des Keims zurückgeführt, in neutrophilen Granulozyten zu überleben und Mikroabszesse zu bilden (Erskine et al. 2003, Erskine et al. 1993). Auch für Belschner spielte die Abkapselung und Abszeßbildung eine große Rolle (Belschner et al. 1996). Trotz ihres häufigen und zulässigen Einsatzes in der Mastitistherapie zeigten einige Antibiotikapräparate eine mangelhafte Verteilung in der Milchdrüse (Erskine 2000). Eine Behandlung während der Laktation ist erfolgreicher, je früher die Infektion entdeckt und behandelt wird (Sol et al. 1997). Vor allem bei Erstkalbinnen können dadurch die Gewebeschädigung verringert werden.

Der Erfolg ist bei ausgedehnter Therapie größer. Sol (2000) empfahl, die dreimalige Standardtherapie im Abstand von 12 h um weitere zwei Tage zu verlängern. In weiteren Studien wurde die zweitägige Standardtherapie auf 5 bzw. 8 Tage verlängert. Pirlimycin zeigte eine signifikant höhere Heilungsrate für *S. aureus* nach achttägiger Therapie (Gillespie et al. 2002). Auch Ceftiofur wies bei achttägiger Therapiedauer eine signifikant höhere Heilungsrate für subklinische Infektionen mit *S. aureus* auf (Oliver et al. 2004).

Milde Fälle klinischer Mastitiden sollten besonders gründlich ausgemolken werden, wenn nötig auch mit Oxytozin (Erskine et al. 1993).

Obwohl der Einfluss einer hohen Milchleistung und der damit verbundenen negativen Energiebilanz auf klinische Mastitiden beschrieben wurde (Suriyasathaporn et al. 2000), wurde nirgends in der Literatur auf deren möglichen Effekt auf die Heilungsrate eingegangen.

Diverse Studien vergleichen eine Kombinationstherapie von intramammärer und systemischer Behandlung, alleinige intramammäre und parenterale Behandlung. Es trat eine Verbesserung der bakteriologischen Heilungsrate von 56,1% bei alleiniger parenteraler Behandlung mit Procain Penicillin G auf 75,6% bei kombinierter parenteraler und intramammärer Gabe des gleichen Medikaments auf, wenn der Stamm penicillinsensitiv war. Penicillin-resistente Stämme wiesen bei alleiniger parenteraler Behandlung (Spiramycin) einen signifikant schlechteren Therapieerfolg auf, ebenso deren Kombinationstherapie (Amoxicillin-Clavulansäure) (Taponen et al. 2003). Eine weitere Studie hingegen ermittelte keine signifikanten Unterschiede zwischen parenteraler (Penethamat hydriodid) und intramammärer (Kombination aus Ampicillin und Cloxacillin) Behandlung (Serieys et al. 2005). Durch die parenterale Behandlung sank jedoch die somatische Zellzahl auch in nicht klinisch erkrankten

Vierteln, so dass diese Behandlungsform bei subklinischen Mastitiden empfohlen wurde.

Mit einer auf alle vier Viertel erweiterten antibiotischen Therapie mit Pirlimycin konnte die Heilungsrate von 36,6% (nur das betroffene Viertel therapiert) auf 50% erhöht werden (Belschner et al. 1996).

2.4.2 Therapie zum Zeitpunkt des Trockenstellens

Die Therapie von *S. aureus* während der Trockenstehphase hat den Vorteil, daß keine Milchverluste durch Wartezeiten entstehen (Erskine et al. 1993).

Der Abbau von Erregernischen, der durch den Umbau des Euters in der Trockenstehphase stattfindet, erleichtert zusätzlich die Bekämpfung der Erreger.

Die antibiotische Behandlung zum Trockenstellen wurde als kosteneffektiv beschrieben (Kirk et al. 1997).

Die Behandlung zum Zeitpunkt des Trockenstellens kann sowohl neuen *S. aureus* Infektionen vorbeugen als auch existierende Infektionen eliminieren (Jones et al. 1998). Während der ersten vierzehn sowie der letzten sieben bis zehn Tage der Trockenperiode zeigt sich die Kuh besonders empfänglich für neue Infektionen. Findet eine Therapie zu Beginn der Trockenstehperiode statt, konnten bakteriologische Heilungsraten von 60 bis 70% erzielt werden. In eine Studie in den USA wurde mit der intramammären Gabe von Tilmicosin eine Heilungsrate von 62% der Kühe und 67,5% der betroffenen Viertel erzielt (Dingwell et al. 2003).

Die Heilungsrate sank mit steigender Zellzahl und zunehmendem Alter, sowie bei Befall mehrerer Viertel einer Kuh (Sol et al. 1994). Viertel, die mehrfach bakteriologisch positiv waren, sowie die Hinterviertel wiesen eine geringere Heilungsrate auf als Vorderviertel oder Viertel, die nur einmal oder gar nicht bakteriologisch positiv auffiel (Dingwell et al. 2003).

2.4.3 Weitere Therapiemaßnahmen

Ein vielversprechender Ansatz für die Zukunft liegt in der intramammären Gabe von Interleukin-1 (Il-1) und Interleukin-2 (Il-2). Diese Substanzen erhöhen intramammär die Diapedese polymorphkerniger Leukozyten und verstärken somit die körpereigene unspezifische Abwehr. Zusätzlich aktivierte Il-2 die Superoxidproduktion und die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten. Es wurde von einer Heilungsrate von 38% künstlich infizierter Viertel berichtet (Erskine et al. 1993). Die bakteriologische

Heilungsrate stieg von 33,3% bei alleiniger antibiotischer Behandlung auf 56,6% bei einer zusätzlichen Gabe von Il-2 (Erskine et al. 1998).

In vitro zeigte eine Kombination aus Penicillin G mit bovinem Lactoferrin eine verstärkte Wirkung des Antibiotikums (Diarra et al. 2003). Es wurde daraus geschlossen, dass durch die Kombination mit Lactoferrin die antibakterielle Aktivität des Antibiotikums gegenüber dem ansonsten resistenten *S. aureus* erhöht wurde. Die Steigerung der körpereigenen Abwehr durch eine Immunprophylaxe konnte den Effekt einer antibiotischen Therapie unterstützen (Sears und Belschner 1999). Es erfolgte dabei eine zweimalige Impfung vor der Antibiotikabehandlung und eine weitere sieben Tage danach. *S. aureus* Infektionen und Tankmilchzellzahl wurden deutlich reduziert.

Die effektivste Behandlung einer *S. aureus* Mastitis ist das Merzen der betroffenen Kuh (Erskine et al. 1993). Besonders Kühe mit zusätzlichen Krankheiten oder Kühe, die drei- oder mehrmals in einer Laktation eine Mastitis aufwiesen, sollten gemerzt werden.

2.5 Prophylaxe von *S. aureus* Mastitiden

Melkhygiene und Betriebsmanagement gehören zu den wichtigsten Prophylaxemaßnahmen von *S. aureus* Mastitiden. Gründliche Reinigung des Euters, Vormelken, Zitzendippen, Sauberkeit des Melkgeschirrs, dessen Zwischendesinfektion und die richtige Melkreihenfolge sind essentiell.

Es wurden zur Melkhygiene das Tragen von Handschuhen beim Melken, Vormelken, Vordippen, das Verwenden von Einmaltüchern zur Euterreinigung und das Zitzendippen nach dem Melken empfohlen (Jones et al. 1998).

Nicht infizierte Erstkalbinnen sollten zuerst gemolken werden, Kühe mit klinischer Mastitis zuletzt (Jones et al. 1998).

Besonders gegen Erreger, die vornehmlich beim Melkvorgang übertragen werden, ist die Zwischendesinfektion des Melkgeschirrs nach jeder Kuh wichtig. Der Melkbecher gilt als wichtiger Vektor für *S. aureus* (Fox et al. 1991).

Klinische Fälle müssen separiert und behandelt werden, therapieresistente gemerzt (Anderson 1982). Es erwies sich, daß die Isolierung *S. aureus* infizierter Kühe die Prävalenz von *S. aureus* Mastitiden und die Tankmilchzellzahl signifikant reduzierte (Wilson et al. 1995).

Die Melkausrüstung muss regelmäßig gewartet werden. Vakuumschwankungen verursacht durch Risse im Melkbecher oder eine defekte Melkanlage tragen oft zur Infektion bei. Es entsteht ein Rückfluss von Milch gegen das Zitzenende, der Bakterien von kontaminierten Melkbechern oder verunreinigter Zitzenhaut tief in den Zitzenkanal einbringen kann (Fox et al. 1991, Jones et al. 1998).

Da in mehreren Studien Fliegen als mögliche Überträger in Betracht gezogen wurden, empfiehlt sich als zusätzliche prophylaktische Maßnahme eine effektive Insektenbekämpfung.

Ein Drittel aller Infektionen der Milchdrüse, die Erstkalbinnen zum Zeitpunkt der Geburt und in der Frühlaktation aufwiesen, wurden verursacht durch *S. aureus* (Jones et al. 1998). Daher sollten tragende Färsen nicht mit trockenstehenden Kühen in einer Gruppe gehalten werden.

Da infizierte Färsen nach der Abkalbung ein wichtiges Erregerreservoir darstellen, sollte auch hier vorgebeugt werden. Verschiedene Studien aus den USA befassten sich mit der intramammären Gabe von Antibiotika bei Färsen noch vor der Abkalbung. Es stellte sich heraus, dass behandelte Färsen zum Zeitpunkt der Geburt eine reduzierte Prävalenz an Mastitiden, eine signifikant höhere Milchproduktion in der ersten Laktation und einen niedrigeren Zellzahl aufwiesen. Es kam aber zum Teil zu Antibiotikarückständen in der Milch bis drei Tage nach der Abkalbung (Nickerson et al. 1995, Oliver und Jayarao 1997, Oliver et al. 1992, Owens et al. 2001).

Ebenso zeigte die Supplementierung mit Vitamin E-Selen- Präparaten 2 bis 3 Wochen vor der Abkalbung eine um 11.8% reduzierte Mastitisprävalenz (Weiss et al. 1997).

Dieser Effekt wurde der Wirkung von Vitamin E, die Aktivität neutrophiler Granulozyten zu steigern zugeschrieben (Smith et al. 1997).

Eine Vakzinierung mit bestandsspezifischem Impfstoff gegen *S. aureus* erwies sich in mehreren Studien als nicht wirkungsvoll. Ein positiver Einfluss auf die *S. aureus* Prävalenz, die Häufigkeit klinischer Mastitiden und den Zellgehalt im Gesamtmelk konnte nicht nachgewiesen werden (Hoedemaker und Korff 1999, Tenhagen et al. 2001). In einer neueren Studie zeigte die *S. aureus* Vakzine „MASTIVAC I“ eine Verbesserung der Eutergesundheit. Diese zeigte sich in einer höheren Milchmenge und und erniedrigten Zellzahl sowie auch einem spezifischen Schutz gegen *S. aureus* (Leitner et al. 2003a, Leitner et al. 2003b). Vakzinen, deren Impfstamm ein kapsel- oder pseudokapselbildender Stamm ist, und die andere *S. aureus* spezifischen

Antigene beigefügt haben, scheinen positive Effekte auf die klinische Ausprägung einer *S. aureus* Infektion zu haben. Die Wirkung auf bestehende Infektionen wurde unterschiedlich bewertet (Calzolari et al. 1997, Giraudo et al. 1997, Nordhaug et al. 1994).

Der Ansatz, durch das Entfernen der Haare, welche die Zitzen umgeben, die Milchqualität in Bezug auf den Milchbakteriengehalt zu verbessern, ergab keine positiven Ergebnisse (Silk et al. 2003). *S. aureus* zeigte in einigen Studien auch Eigenschaften umweltassoziierter Erreger. Die Prophylaxemaßnahmen dürfen also nicht ausschließlich auf den Melkvorgang begrenzt bleiben. Zur Bekämpfung von Umwelterregern empfohlene Maßnahmen wie regelmäßige Reinigung und Desinfektion der Räumlichkeiten, hygienisch einwandfreie Einstreu, Futter und Tränke, Vermeidung von Überbelegung, räumliche Trennung von Abkalbe- und Krankenbereich können sich auch zur Bekämpfung von *S. aureus* als sinnvoll erweisen.

Tabelle 2: Übersicht der Prophylaxemaßnahmen

	Maßnahme	Autor
Melkhygiene	- Reinigung des Euters mit Einmaltüchern - Vormelken - Zitzendippen nach dem Melken - Handschuhe	(Jones et al. 1998)
Management	- Melkreihenfolge - Isolation infizierter Tiere - Merzen therapieresistenter Fälle - Insektenbekämpfung	(Jones et al. 1998) (Wilson et al. 1995)
Melkausrüstung	- regelmäßige Wartung - Zwischendesinfektion	(Fox et al. 1991, Jones et al. 1998)
Medikamentell	- präpartale Antibiose auch bei Färsen - Vakzine - Vitamin E + Selen Supplementierung	(Nickerson et al. 1995, Oliver und Jayarao 1997, Oliver et al. 1992, Owens et al. 2001) (Calzolari et al. 1997, Giraudo et al. 1997, Leitner et al. 2003a, Nordhaug et al. 1994) (Weiss et al. 1997)
Umwelt	- Reinigung + Desinfektion - Stallhygiene	

Hoedemaker (2001) empfiehlt für größere Herden mit *S. aureus* Problematik folgendes Sanierungskonzept: Nach ihrer Identifikation bilden alle *S. aureus* positiven Tiere eine eigenständige Gruppe. In dieser bleiben sie bis zu ihrem Abgang. Neu infizierte Tiere werden sofort in diese Gruppe eingefügt. Tiere mit anderen Krankheitsursachen bilden eine eigenständige Krankengruppe, die sie nach der Heilung wieder verlassen dürfen. *S. aureus* positive Tiere haben also keine Chance, in die gesunde Herde zurückzugelangen. Nach 1-1,5 Jahren sollte sich eine deutliche Reduzierung *S. aureus* positiver Tiere einstellen.

2.6 Diagnostik der *S. aureus* Mastitis

S. aureus zeigt sich als gram positives, Katalase positives, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes kugelförmiges Bakterium mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Die einzelnen Kokken lagern sich in charakteristischer Weise zu Haufen zusammen. Zur Speziesdiagnose sind unter anderem die Koagulasereaktion und der Nachweis des Clumping Factors von Bedeutung. Weitere Methoden zur Abgrenzung von *S. aureus* von anderen Staphylokokken, wie Selektivmedien (Acriflavine Disk Assay, modifizierter Baird-Parker Agar supplementiert mit Eidotter-Tellurit und Acriflavin) und kulturell-biochemische Eigenschaften (Hämolyseverhalten, anaerobe Mannitolfermentation, Acetoin-Test) wurden in unterschiedlichen Untersuchungen für geeignet gehalten (Capurro et al. 1999, Ollis et al. 1995, Roberson et al. 1992, Wallace et al. 1998, Watts et al. 1991). Bei dem Versuch, den Nachweis der thermolabilen DNase als Routinediagnostikum zu etablieren, ergab sich, daß Kolonien mit β - oder δ -Hämolyse bei einer DNase-Reaktion von <2mm zuverlässig als *S. aureus* identifiziert werden konnten (Fantelli und Stephan 2003).

Kommerzielle Latexagglutinationstests wie z. B. der SlidexStaph Plus (SSP) weisen mittels Agglutination das Vorhandensein von Protein A und gebundener Koagulase (Clumping Factor) nach. Zahlreiche Studien aus der Humanmedizin ermittelten für diese Tests Sensitivitäten von 96-100% und Spezifizitäten von 88-99,3% nach (SSP: Sensitivität⁴ 98,2-100%, Spezifizität⁵ 98,9-99,3%). Im Gegensatz dazu befand eine veterinärmedizinische Studie aus Bern den SSP als nicht sensitiv genug (Sensitivität 62,7%, Spezifizität 97,6%) zur Identifikation von *S. aureus* aus bovinen

⁴ Fähigkeit eines diagnostischen Tests, alle tatsächlich positiven Ergebnisse vollständig herauszufiltern

⁵ Fähigkeit eines diagnostischen Tests, ausschließlich richtig positive herauszufiltern

Mastitisproben (Boerlin et al. 2003). Viele *S. aureus* Isolate wurden als falsch negativ erkannt. *S. hämolyticus* trat in manchen Fällen als falsch positiv auf.

2.7 Genotypisierung euterpathogener Erreger

Die Ziele epidemiologischer Untersuchungen an bakteriellen Infektionserregern sind zum einen der Nachweis des Vorkommens und der Ausbreitung bestimmter Erreger sowie die Ausbreitung bestimmter Eigenschaften, insbesondere von Resistenz- und Virulenzeigenschaften. In erster Linie dienen epidemiologische Verfahren jedoch zur Typisierung eines bestimmten bakteriellen Erregers, d.h. der Erarbeitung von Wesensmerkmalen, die es erlauben, diesen bestimmten Erregerstamm von anderen Stämmen der gleichen Bakterienspezies zu unterscheiden (Schwarz et al. 2003). Rückschlüsse auf Reservoirs und Infektionswege lassen sich auch über eine Erregertypisierung anhand geno- und phänotypischer Merkmale ziehen. Infiziert ein identischer Stamm nach und nach einen großen Teil einer Wirtspopulation, handelt es sich um einen kontagiösen Erreger. Bei umweltassoziierten Erregern hingegen kommen aufgrund der vielfältigen Reservoirs mehrere, mittels Typisierung unterscheidbare Stämme einer Erregerspezies gleichzeitig als Mastitisverursacher in einer Herde vor (Sommerhäuser 2001).

Die kontagiöse Verbreitung von Erregern konnte mittels Genotypisierung, z.B. von *Sc. agalactiae*- Isolaten in unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden. Hierbei wurde in verschiedenen Herden jeweils ein identischer *Sc. agalactiae* Stamm gefunden, der von Kuh zu Kuh übertragen worden war (Baseggio et al. 1997, Wang et al. 1999). Für *S. aureus* liegen vergleichbare Ergebnisse vor. Mittels Phagentypisierung oder Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaktion (RAPD-PCR) konnte in verschiedenen Herden jeweils ein dominierender Stamm isoliert werden (Gillespie et al. 1999, Lipman et al. 1996, Smith et al. 1998). In einer Reihe weiterer Untersuchungen wurden in den Beständen verschiedene *S. aureus* Stämme durch unterschiedliche Methoden differenziert. In den meisten Arbeiten wurden drei bis vier Stämme pro Herde als Ursache der diagnostizierten subklinischen Mastitisgeschehens ermittelt (Annemüller et al. 1999, Lam et al. 1996, Matthews et al. 1992, Matthews et al. 1994, Myllys et al. 1997, Rivas et al. 1997). In einem Teil der Studien waren wenige Stämme für die Mehrheit der Mastitisfälle verantwortlich. Diese Stämme zeigten eine weite geographische Verteilung (Fitzgerald et al. 1997). In dem anderen Teil der Studien wurde die Mehrheit der Stämme nur in einer Herde

gefunden. Mehr als 90% der Stämme traten nur in zwei oder weniger Herden auf. Vermutlich waren *S. aureus* Stämme eher an eine Herde gebunden, als dass sie in mehreren Herden gefunden wurden (Joo et al. 2001).

Für umweltassoziierte Erreger ergaben Genotypisierungen von *Sc. uberis* und *E. coli* in verschiedenen Herden regelmäßig eine sehr hohe Heterogenität der isolierten Stämme. Eine große Stammvielfalt in einer Herde kann so als Charakteristikum von umweltassoziierten Erregern angesehen werden (Jayarao et al. 1992, Jayarao et al. 1993, Lam et al. 1996b, Lipman et al. 1995).

Die Studien beschreiben für *S. aureus* sowohl das klassische Bild des kontagiösen Erregers mit den Merkmalen der kontagiösen Verbreitung als auch den Weg der Ausbreitung, der für umweltassoziierte Erreger charakteristisch ist. Die momentan gültige Lehrmeinung, *S. aureus* ausschließlich als kontagiösen Mastitiserreger anzusehen, wird dadurch zumindest angezweifelt.

2.8 Methoden der Genotypisierung von *S. aureus*

Es existieren zahlreiche Methoden zur Genotypisierung von Keimen. Zu deren Bewertung wurden Primär- und Sekundärkriterien festgelegt (Wichelhaus et al. 2000). Die Primärkriterien umfassen Typisierbarkeit der zu untersuchenden Erreger mit der jeweiligen Methode, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Differenzierungskraft der angewendeten Methode. Die Sekundärkriterien umfassen die Interpretierbarkeit der Ergebnisse, die Praktikabilität der Methode und deren Kosteneffektivität.

Neben phänotypischen Verfahren (Bio-, Sero-, Phagentypisierung, Resistenzprofile, Gesamtzell-Proteinprofile), die Erreger anhand ihres momentanen Erscheinungsbildes charakterisieren, fanden immer mehr genotypische Verfahren Anwendung. Anhand ihrer Anwendbarkeit werden diese Verfahren in zwei Gruppen unterteilt (Schwarz et al. 2003). Man unterscheidet universell und begrenzt anwendbare Verfahren. Zu den universell anwendbaren Verfahren werden die Plasmidanalyse, die Ribotypisierung, die RAPD-PCR, die Makrorestriktionsanalyse, die AFLP-Analyse und das Multilocus-Sequence-Typing gezählt. Als begrenzt anwendbare Verfahren werden z.B. der Nachweis von Restriktionsfragmenten oder von Polymorphismen in Genen beschrieben. Diese Verfahren basieren auf dem Nachweis von Zielsequenzen, die nur bei bestimmten Bakterien vorhanden sind

Für *S. aureus* wurden in der Literatur verschiedene Verfahren der Genotypisierung beschrieben. Meistens fanden die Makrorestriktionsanalyse mit anschließender

Pulsfeld-Gelelektrophorese, die RAPD-PCR, die Differenzierung anhand Polymorphismen der Gene für das Protein A und für die Koagulase Anwendung. Wie von vielen Autoren gezeigt wurde, ist die X-Region des Protein A geeignet, um *S. aureus* Stämme in kurzer Zeit zu differenzieren (sog. spa- Typisierung) (Frenay et al. 1996, Sabat et al. 2003, Toshkova et al. 1997). Diese X-Region ist charakterisiert durch eine variable Anzahl sich wiederholender Sequenzen. Die Primer werden aus den flankierenden konservierten Bereichen gewählt und dienen zur Amplifikation der dazwischenliegenden variablen Bereiche.

Ebenso wurden Polymorphismen des Koagulase-Gens regelmäßig zur Typisierung von *S. aureus* genutzt (Goh et al. 1992, Su et al. 2000). Das Koagulase-Gen beinhaltet zwei konservierte und einen variablen Bereich. Dieser variable Bereich umfasst eine Serie von sich wiederholenden, 81 Basenpaaren langen DNA-Sequenzen. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der Wiederholungen sowie in der Lokalisation der Schnittstellen des Restriktionsenzym *AluI*.

In zahlreichen Studien fand die RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction) zur Differenzierung von *S. aureus* Anwendung (Myllys et al. 1997). Hierbei wird ein einziger, an beide Stränge des DNA-Doppelstrangs bindender Primer verwendet. Dieser bindet nicht spezifisch an eine Sequenz (Zufallsprimer). Die zwischen den beiden Bindungsstellen des Primers liegenden Bereiche werden vervielfältigt. Als Vorteil dieses Verfahrens beschrieb Schwarz (2003) dessen rasche und einfache Durchführung. Demgegenüber wurden von einigen Autoren massive Nachteile beschrieben. Als das Grundproblem wurde die geringe Reproduzierbarkeit bezeichnet (Tyler et al. 1997). Selbst bei völlig übereinstimmenden Bedingungen zeigten zwei zur selben Zeit am selben Ort durchgeführte Analysen beträchtliche Variabilitäten in den Fragmentmustern (Weide-Botjes et al. 1998). Durch das Auftreten starker und schwacher Banden ist die Auswertung der Bandenmuster starken individuellen Schwankungen ausgesetzt (Schwarz et al. 2003).

Die Makrorestriktionsanalyse wurde als ein Verfahren beschrieben, bei dem die gesamte DNA eines Bakterienisolats mit einem Restriktionsenzym gespalten wird, welches nur wenige Schnittstellen in der DNA besitzt. Es entstehen wenige sehr große Fragmente (Schwarz et al. 2003). Diese Fragmente werden anschließend mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Diese Methode wurde als arbeitsaufwendig

sowie material- und kostenintensiv bewertet. Zur Typisierung von *S. aureus* wurde sie als einzige als gut geeignet befunden (Schwarz et al. 2003).

Die Makrorestriktionsanalyse gilt z.Zt. als Standardmethode zur Genotypisierung von *S. aureus*. Es wurde als sogenannter „Gold-Standard“ ein Protokoll (HARMONY) erstellt, in welchem viele Parameter standardisiert wurden (Murchan et al. 2003). So sind die Ergebnisse auch zwischen unterschiedlichen Laboratorien vergleichbar.

Tabelle 3: Molekulargenetische Verfahren zur Typisierung von S. aureus

Verfahren	verwendete DNA	Primer/ Enzym	Vorteile	Nachteile
spa-PCR	X-Region des ProteinA	Primer aus flankierenden konservierten Bereichen	schnell, einfach	mäßig-gut reproduzierbar
coa-PCR	Koagulase-Gen	Restriktionsenzym AluI	schnell, einfach	mäßig-gut reproduzierbar schwer standardisierbar, problematische Interpretation, schlecht reproduzierbar
RAPD-PCR	Gesamt-DNA	Zufallsprimer		
Makrorestriktionsanalyse	Gesamt-DNA	Restriktionsenzym <i>smaI</i>	gute Differenzierungskraft, gut reproduzierbar	aufwendig, teuer, Erfahrung erforderlich