

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung des Betriebes

Die Untersuchungen wurden in einer Milchviehanlage in Brandenburg mit etwa 2.700 Rindern der Rasse Deutsche Schwarzbunte durchgeführt.

Die Tiere wurden in 60er Gruppen in einstreulosen Boxenlaufställen mit Spaltenböden gehalten. Die Kühe wurden etwa 45 Tage vor dem errechneten Abkalbetermin gruppenweise trockengestellt. Bei Auftreten äußerer Anzeichen einer nahenden Abkalbung wurden jeweils fünf Tiere in Strohboxen umgestellt. Die ersten Tage post partum wurden sie in Anbindehaltung (Halsfangrahmen, Gitterrostkurzstand) gehalten, bevor sie wieder in die Herde integriert wurden.

Die in dem Betrieb geborenen weiblichen Kälber verblieben eine Woche nach der Geburt auf dem Betrieb und kamen dann in eine etwa 7 km entfernte betriebseigene Aufzuchtanlage. Dort standen sie bis zur zwölften Lebenswoche auf Stroh. Später erfolgte eine Haltung in Gruppen zu 10 Tieren auf Vollspaltenböden. Ab einem Körpergewicht von etwa 350 kg wurden sie besamt und kamen als tragende Färsen auf den milcherzeugenden Betrieb zurück. Sie wurden in Gruppen zu 70 Tieren in einstreulosen Boxenlaufställen mit Spaltenböden aufgestellt, bis sie ebenfalls kurz vor der Abkalbung in mit Stroh eingestreute Abkalbeboxen umgestellt wurden.

Die Fütterung erfolgte als Grundfuttermischung.

Die Kühe wurden je nach Milchleistung zweimal (Altmelker) bzw. dreimal (Frischmelker) auf einem 60er Melkkarussell (Fa. Impulsa[®], Elsterwerda) gemolken.

Die Melkhygiene beinhaltete das Reinigen der Zitzen mit einem tierindividuellen Euterlappen, das Vormelken und die grobsinnliche Überprüfung des Vorgemelks und das Dippen der Zitzen mit einem jodhaltigen Dippmittel nach dem Melken. Die Euterlappen wurden bei 90°C in einer Waschmaschine gewaschen.

Frisch abgekalbte und erkrankte Tiere wurden gesondert im Abkalbe- bzw. im Krankenabteil mittels einer Rohrmelkanlage (Fa. Impulsa[®], Elsterwerda) gemolken.

Für die tierärztliche Betreuung waren zwei niedergelassene Tierärzte zuständig.

Die Milchkontrolle erfolgte durch den Landeskontrollverband Brandenburg.

3.2 Versuchsanordnung/ Probennahmeschema

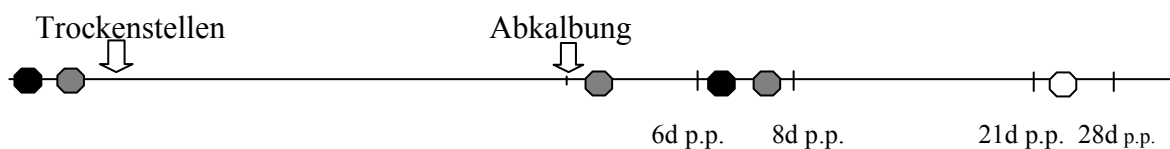
3.2.1 Kühe

Es wurden 359 Kühe mittels zwei steril entnommenen Viertelgemelksproben bakteriologisch und zytologisch untersucht und anschließend trockengestellt. Die Probennahme erfolgte nach den Richtlinien der IDF mit einer Doppelprobe an zwei aufeinanderfolgenden Melkzeiten. Die Milchprobennahme und das Trockenstellen erfolgte im Melkkarussell. Verwendeter Trockensteller war Orbenin[®] extra (Wirkstoff: Cloxacillin 1000mg, Fa. Pfizer). Vor dem ersten Melken nach der Abkalbung sowie in der ersten Woche post partum wurden erneut sterile Viertelgemelksproben entnommen. Tiere, bei denen *S. aureus* bakteriologisch nachgewiesen werden konnte, wurden zusätzlich in der vierten Woche post partum geprobt.

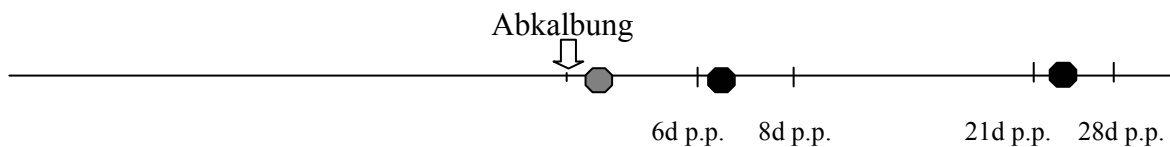
3.2.2 Erstkalbinnen

Es wurden von 332 Erstkalbinnen vor dem ersten Melken nach der Abkalbung sowie in der ersten und vierten Woche post partum sterile Viertelgemelksproben gewonnen.

Kühe



Erstkalbinnen



- Viertelgemelksprobe mit bakteriologischer Untersuchung und Zellzahlbestimmung, zusätzlich klinische Untersuchung der Milchdrüse
 - Viertelgemelksprobe mit bakteriologischer Untersuchung
 - Viertelgemelksprobe mit bakteriologischer Untersuchung und Zellzahlbestimmung bei *S. aureus*- positiven Tieren, zusätzlich klinische Untersuchung der Milchdrüse
- d p.p. days post partum/ Tage nach der Geburt

Abbildung 1: Probenentnahmeschema

3.2.3 Akut an Mastitis erkrankte Tiere

Bei grobsinnlichen Veränderungen der Milch wurden im Melkkarussell von den Melkern eine Milchprobe des erkrankten Viertels zwecks bakteriologischer Untersuchung entnommen. Die im Untersuchungszeitraum durch *S. aureus* verursachten Mastitiden wurden ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen.

3.3 Begleitende Untersuchungen

Bei den Milchprobenentnahmen zum Zeitpunkt des Trockenstellens und in der ersten und vierten Woche post partum wurden zusätzliche Befunde aufgenommen: Adspektorisch wurden die Form des Euters und der Zitzen sowie die Ausbildung einer Hyperkeratose an der Stichkanalöffnung festgehalten. Palpatorisch wurde die Konsistenz des Eutergewebes beurteilt. Dazu wurde der Schlüssel nach Grunert (1990) verwendet (s. Anhang).

3.4 Dokumentation

Die Datenerfassung in dem Betrieb erfolgte mit dem Computerprogramm Herde (DSP-Agrosoft, Paretz). Die Daten der monatlichen Milchleistungsprüfung wurden durch den Landeskontrollverband Brandenburg erhoben. Diese wurden im Computerprogramm Herde gespeichert und standen zur Auswertung zur Verfügung. Die Dokumentation von pathologischen Befunden, auftretenden Erkrankungen und Ergebnissen mikrobiologischer Untersuchungen erfolgte auf Krankenkarten der Tierärzte.

3.5 Diagnostik der Milchproben

3.5.1 Mikrobiologische Untersuchung und Zellgehaltsbestimmung

Die Milchproben wurden im Milchlabor des Landesamtes für Verbraucherschutz und Landwirtschaft des Landes Brandenburg unter der Leitung von Dr. Baumgärtner untersucht. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Fossomatic, Foss-Elektrik, Hamburg.

Die Milchprobenröhrchen enthielten Borsäure zur Konservierung.

Sämtliche Milchproben wurden auf hemmstofffreiem 6% Blutagar (Normalblutagar, NBA) und Neomycin-Staphylokokkentoxin – Aesculin – Blutagar (NTBA) angelegt.

Erster ist Basismedium für die Anzuchtung von Staphylokokken. Der NTBA wurde für 18-24 Stunden und der NBA für 36-48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Die diagnostischen Methoden im Labor beinhalteten das Wachstums-, Hämolyse-, und Gram-Verhalten, Camp-Phänomen, Reaktion auf Katalase, Oxidase und CF-Test, sowie die Serogruppen-Bestimmung der Streptokokken.

Als *S. aureus* wurden Kolonien mit typischer β -Hämolysin-Bildung von weißlich-grauer bis gelblich-goldener Farbe mit einem Durchmesser bis zu 5mm angesprochen.

Die Untersuchungsmethoden orientieren sich an den Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern, DVG, Gießen, März 2000 und dem Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis, National Mastitis Council, 1987, USA.

Das gesamte Untersuchungslabor ist EU akkreditiert (Aks-P-11202-EU).

3.5.2 Weiterführende bakteriologische Diagnostik

Die im Landesamt für Verbraucherschutz und Landwirtschaft als *S. aureus* identifizierten Keime wurden im Milchlabor der Tierklinik für Fortpflanzung und der Diagnostikabteilung des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin weiterführenden Untersuchungen unterzogen:

Koagulase: In einem Röhrchen wurde eine Öse Bakterienmaterial in 50 μ l Kaninchenplasma suspendiert und bei 37°C für 18-24 Stunden bebrütet. Erfolgte keine Koagulation des Plasmas wurde der Keim als Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) aussortiert.

Anaerobe Mannitverwertung: Ein Röhrchen mit 1% Mannit-haltigem Agar wurde mit einer Öse Bakterienmaterial stichförmig beimpft und mit einer etwa 5mm hohen Paraffinschicht überschichtet.

Im positiven Fall erfolgte nach einer Bebrütung von 2-3 Tagen bei 37°C ein Farbumschlag von rot nach gelb.

Latexagglutinationstest: Verwendet wurde der kommerzielle Latexagglutinationstest SlidexStaphPlus (SSP, Fa. BioMerieux). Es wurde eine Öse Bakterienmaterial mit dem Testreagenz und einem Kontrollreagenz auf einem Testblättchen verrieben. Der Test galt als positiv, wenn das Bakterienmaterial in dem Testreagenz zur Verklumpung führte und die Kontrolle ohne Agglutinate blieb.

3.5.3 Aufbewahrung der *S. aureus*-Isolate

Von jedem Isolat wurde eine Öse Bakterienmaterial in einer Nährbouillon (Brain-Heart-Infusion/ BHI) suspendiert und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Je 1,5 ml der keimhaltigen Bouillons wurde in ein Cryoröhrchen überführt und nach Zugabe von 0,3 ml sterilem Glycerin bei -70°C eingefroren.

3.6 Auswahl der zur Genotypisierung bestimmten Isolate

Insgesamt wurden 234 Isolate von *S. aureus* im Zeitraum der Untersuchung ermittelt, davon 86 bei Kühen und 148 bei Erstkalbinnen.

Aus allen gesammelten Isolaten von *S. aureus* wurden 140, die zur Genotypisierung herangezogen werden sollten, wie folgt ausgewählt: Es sollten je 20 Isolate aus jeder Probengruppe (Kühe zum Trockenstellen, zur Abkalbung, in der ersten Woche nach der Abkalbung, Erstkalbinnen zur Abkalbung, in der ersten und in der vierten Woche nach der Abkalbung und klinische Mastitiden) mit einbezogen werden. Wurde im Verlauf der Untersuchung bei einem Viertel mehrere Male ein *S. aureus* isoliert, wurden diese bevorzugt ausgewählt. Standen in einer Gruppe mehr als 20 Isolate zur Verfügung, erfolgte die Auswahl zufällig.

Es wurden nur Koagulase-positive Isolate ausgewählt. Mit Ausnahme von 7 Isolaten waren diese ebenfalls zur anaeroben Mannitverwertung fähig. Das Ergebnis des SSP spielte für die Auswahl keine Rolle.

3.7 Nachweis des Vorliegens eines Isolates von *S. aureus* mittels nuc-PCR

Um vor der Genotypisierung endgültig sicher sein zu können, dass ein *S. aureus* Isolat vorlag, wurde mit den 140 ausgewählten Isolaten eine speziesspezifische Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei wurde das *S. aureus*-eigene nuc-Gen nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Isolate auf das Vorliegen des für die Methicillinresistenz verantwortlichen mecA-Gen untersucht.

3.7.1 DNA-Extraktion

Jeweils eine über Nacht gewachsene Einzelkolonie der zu untersuchenden Isolate wurde in 0,5 ml- Eppendorf-Gefäße (Tubes) in 50 µl Lysostaphin (0,1 mg/ml) suspendiert und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Proteinase K (0,1 mg/ml) und 150 µl TBE-Puffer erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C von 20 Minuten. Im Anschluß wurde die Proteinase K- Aktivität durch verbringen der Tubes

in ein 95 °C heißes Wasserbad gestoppt. Nach 5 Minuten wurden die Tubes zum Abkühlen in ein Eisbad überführt.

3.7.2 PCR

Bei jedem Durchgang wurden maximal 10 Isolate zusammen mit einem nuc- und einem mecA- Kontrollstamm sowie einem Leerwert der Polymerase-Kettenreaktion unterzogen.

Dazu wurde jeweils ein sämtliche Zutaten enthaltender Mastermix für die entsprechende Anzahl an Stämmen (Testisolate + 2 Kontrollen + 1 Leerwert) hergestellt.

Zutaten für den Mastermix je Stamm:	Aqua bidest.	10,3 µl
	PCR-Puffer	2,5 µl
	MgCl	0,8 µl
	dNTP's	0,6 µl
	nuc-Primer foreward	1,25 µl
	nuc-Primer reward	1,25 µl
	mecA-Primer foreward	1,25 µl
	mecA-Primer reward	1,25 µl
	Taq-Polymerase	0,2 µl

Die einzelnen Zutaten wurden auf Eis kühl gehalten und nacheinander zugegeben. Gleich nach Zugabe der Taq-Polymerase wurde aus dem Mastermix je 20 µl auf eine entsprechende Anzahl von 0,2 ml-Eppendorf-Tubes verteilt. In jedes Tube wurden 5 µl der Lösung, welche die zuvor extrahierte DNA enthält, zupipetiert. Zu dem Leerwert wurde 5 µl Aqua bidest zugegeben. Die Tubes wurden in einen Block des Thermocyclers (Touchdown, Hybaid, Ltd., Teddington, Middlesex, U.K.). verbracht und durchliefen dort folgendes Programm zur Diagnostik von *S. aureus*:

Tabelle 4: Schritte der PCR zur Diagnostik von S.aureus

Schritt	Temperatur	Dauer
Prädenaturierung	94 °C	5 Minuten
Denaturierung	94 °C	60 Sekunden
Annealing	54 °C	60 Sekunden
Elongation	72 °C	30 Sekunden
Endelongation	72 °C	7 Minuten

Nach Durchlaufen dieses Programms wurden die Proben bei 4 °C aufbewahrt.

3.7.3 Auswertung der PCR-Produkte

Es wurden je 7 µl des Probenmaterials auf 1,5 %iges, Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen. Auf Position 1 wurde ein Marker aufgetragen. Nach etwa 40 Minuten Laufzeit bei 90 V konnten die DNA-Banden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden.

3.8 Genotypisierung der Isolate von *S. aureus*

Die Genotypisierung erfolgte mittels des europäischen HARMONY-Standardprotokolls zur Typisierung von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Als Standard für das Molekulargewicht wurde der Referenzstamm NCTC 8325 einbezogen.

3.8.1 Erstellen der Bakterienlösung

Eine Einzelkolonie wurde in 3 ml Müller-Hinton-Bouillon /MHB suspendiert und unter leichter Bewegung 16-18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Je Charge von 10 zu differenzierenden Proben wurden 2 Ansätze mit dem Referenzstamm parallel gefertigt.

Zum Aufreinigen der Proben wurden 150 µl der Bakteriensuspension in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes gegeben und eine Minute bei 18000 xg zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde mit 150 µl Zellsuspensionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,2, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA) resuspendiert.

3.8.2 Erstellen der Blöckchen

Es wurde Agarose 1,4 %ig in deionisiertem und destilliertem Wasser aufgelöst und bei 55 °C in einem Wasserbad aufbewahrt.

In die Eppendorf-Tubes mit den resuspendierten Pellets wurden je 2 µl Lysostaphin (1 mg/ml) und 150 µl der Agarose gegeben und unter Vermeiden von Blasenbildung gemischt. Je Probe wurden 2 Mulden der Blöckchen-Gießform befüllt und etwa 15 Minuten erkalten lassen.

3.8.3 Auflösen der Zellen in den Agaroseblöckchen

Neue 1,5 ml Tubes wurden mit 500 µl Lysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,2 % Deoxycholat, 0,5 % Sarkosyl) und den beiden Blöckchen einer Probe befüllt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde der Lysispuffer

abpipetiert und 500 µl PK-PK-Puffer (250 mM EDTA pH 9,0, 1 % Sarkosyl +500 µg Proteinase K/ml) hinzugegeben. Es folgten 30 Minuten Inkubation bei 50 °C.

Der PK-PK-Puffer wurde nun abgesaugt und die Blöckchen mit 1,4 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 mM EDTA) gespült. Es erfolgte ein dreimaliger 30-minütiger Waschgang mit jeweils 1,4 ml Waschpuffer bei Raumtemperatur.

3.8.4 Verdau mit dem Restriktionsenzym *sma* I

Ein Drittel eines Blöckchens jeder Probe wurde in ein neues 2,0 ml Tube gegeben und durch Zugabe von je 300 µl Restriktionsenzym-puffer (REP) 15-30 min equilibriert.

Dann wurde der Puffer abgesaugt, 100 µl REP zusammen mit 1 µl des Restriktionsenzym *sma* I (entspricht 20 Einheiten) zugegeben und die Tubes 4 Stunden bei 25 °C inkubiert.

3.8.5 Elektrophorese

Es wurden 120 ml 1 %iges Agarosegel hergestellt mit 0,5x TBE-Puffer (0,0445 M Tris-HCl pH 8,4, 0,0445 M Borsäure, 0,001 M EDTA) und in einer Form mit fünfzehn Slots ausgegossen. Ein kleiner Rest wurde zurückbehalten. Nach Erhärten des Gels wurden die Slots mit den Blöckchen befüllt. An Position 1, 8 und 15 wurden je eine dünne Scheibe Lambda-Marker geladen und an Position 6 und 11 jeweils ein Blöckchen des Referenzstammes NCTC 8325. Die übrigen 10 Slots wurden mit Proben befüllt und alle Slots mit dem Rest des Agarosegels versiegelt.

Eine CHEF DR-III Elektrophoresekammer (BioRad) wurde mit 2 Liter 0,5x TBE-Puffer befüllt und das beladene Gel in die vorgesehene Halterung eingefügt. Die Elektrophorese wurde bei 6 V/cm und 14 °C durchgeführt, mit Pulszeiten von 5-15 Sekunden für 10 Stunden und 15-60 Sekunden für 13 Stunden.

Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde das Gel nach Ende des Elektrophoreseprogramms für ca. 20 Minuten in 0,5 %ige Ethidiumbromid-Lösung verbracht und danach unter einem UV-Licht-Transluminator betrachtet, photographisch festgehalten und am PC gespeichert.

3.8.6 Auswertung der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Auswertung der bei der PFGE entstandenen Bandenmuster erfolgte mit dem Softwareprogramm „GelComparII“ (Fa. Applied-Maths, Kortrijk) im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin. Anschließend wurden

die Stämme nach Tenover (1995) typisiert. Dabei werden sie in vier Kategorien eingeteilt:

- | | |
|----------------------------|---|
| 1. nicht unterscheidbar | Bandenmuster ist identisch |
| 2. nah verwandt | bis zu drei Banden unterschiedlich, entstanden durch ein genetisches Ereignis (z.B. Mutation) |
| 3. möglicherweise verwandt | vier bis sechs Banden unterschiedlich, entstanden durch zwei unabhängige Ereignisse |
| 4. nicht verwandt | sieben oder mehr Unterschiede |

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS 12.0 in der Tierklinik für Fortpflanzung der Freien Universität Berlin.

Die Prävalenz von *S. aureus* zu den einzelnen Probenzeitpunkten, die Inzidenz, die bakteriologischen Heilungsraten und die einzelnen Stammprävalenzen wurden jeweils zwischen der Gruppe der Kühe und der der Erstkalbinnen verglichen. Die Stammprävalenzen wurden nur auf Tierebene ermittelt, alle übrigen genannten sowohl auf Tier- als auch auf Viertelebene. Die jeweiligen Konfidenzintervalle wurden mit SPSS 12.0 ermittelt. Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurde der Chi²-Test angewandt.

Zur Auswertung der selbst erhobenen somatischen Zellzahl der Viertelgemelksproben wurden die Kuh- und die Erstkalbinnengruppe jeweils auf Viertelbasis in drei Untergruppen aufgeteilt:

1. Euterviertel mit negativem bakteriologischen Befund
2. Euterviertel mit einer intramammären Infektion durch *S. aureus*
3. Euterviertel mit einer intramammären Infektion durch einen anderen Erreger

Ähnlich erfolgte die Aufteilung der beiden Ausgangsgruppen zur Auswertung der vom Betrieb zur Verfügung gestellten Daten der Milchleistungsprüfung. Da es sich hierbei um Angaben über das Gesamtgemelk handelt, fand deren Auswertung ebenfalls auf Tierebene statt:

1. Tiere mit durchweg negativen bakteriologischen Befunden im Untersuchungszeitraum
2. Tiere mit mindestens einer intramammären Infektion durch *S. aureus* im Untersuchungszeitraum

3. Tiere mit mindestens einer intramammären Infektion durch einen anderen Erreger im Untersuchungszeitraum

Der Vergleich der Zellzahlentwicklung in den jeweils drei Untergruppen wurde mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) auf statistische Signifikanz untersucht.

Abhängiger Faktor war jeweils die logarithmierte somatische Zellzahl, fixer Faktor die drei Untergruppen.

Da von den insgesamt 234 gefundenen Stämmen nur 140 genauer differenziert wurden (59,8 %), wurde für die Angaben der Stammprävalenzen die Anzahl der differenzierten Stämme auf 100 % hochgerechnet.

Die Angabe der Häufigkeit einer *S. aureus* Infektion unter Berücksichtigung der Euterform fand auf Tierebene statt. Als positiv gewertet wurden diejenigen Versuchstiere, deren Euter im Verlauf der Untersuchung mindestens auf einem Viertel einen positiven *S. aureus* Befund aufwies. Die Angaben zur Häufigkeit einer *S. aureus* Infektion unter Berücksichtigung von Zitzen- und Zitzenkuppenform fand auf Viertelenebene statt. Als positiv gewertet wurden diejenigen Euterviiertel, die im Verlauf der Untersuchung mindestens einen positiven *S. aureus* Befund aufwies. Zur Ermittlung der Häufigkeit einer *S. aureus* Infektion unter Berücksichtigung von Grad der Keratinisierung der Schleimhaut des Strichkanals und Palpationsbefund des Drüsengewebes wurde jeder bakteriologische Befund der Euterviiertel einzeln gewertet. Im Gegensatz zu den Faktoren Euterform, Zitzenform und Zitzenkuppenform sind Grad der Keratinisierung der Schleimhaut und Palpationsbefund des Drüsengewebes variable Größen. Die Häufigkeit einer *S. aureus* Infektion in Bezug auf Euterform, Zitzenform, Zitzenkuppenform, Keratinisierungsgrad der Zitzenschleimhaut und Palpationsbefund des Drüsengewebes wurde ebenfalls mittels Chi²-Test auf statistische Signifikanz untersucht.

3.10 Literaturverwaltung

Die Erstellung des Literaturverzeichnisses wurde mit dem Literaturverwaltungsprogramm ENDNOTE 7 durchgeführt.