

## 5 Diskussion

### 5.1 Zielsetzung

In dieser Untersuchung sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Gibt es *S. aureus* Stämme, die Eigenschaften umweltassoziierte Erreger zeigen?  
Klassisch zählt *S. aureus* zu den kontagiösen Erregern. Deren epidemiologische Eigenschaften unterscheiden sich stark von denen umweltassoziiierter Erreger.
2. Unterscheidet sich die Variabilität der *S. aureus* Stämme, die intramammäre Infektionen verursachen
  - zum Zeitpunkt des Trockenstellens
  - bei Kühen zum Zeitpunkt der Abkalbung
  - bei Färsen zum Zeitpunkt der Abkalbung
  - in der ersten Woche post partum
  - in der vierten Woche post partum
3. Gibt es Faktoren, die die Epidemiologie von *S. aureus* im Euter beeinflussen?

### 5.2 Eutergesundheitssituation im Betrieb im Hinblick auf *S. aureus*

#### 5.2.1 *S. aureus* im Bestand

Es handelte sich bei dem Versuchsbetrieb um einen Bestand mit niedriger *S. aureus* Prävalenz. Die Viertelprävalenz von *S. aureus* lag zu jedem Probennahmezeitpunkt sowohl bei den Eutervierteln der Kühe als auch bei den Eutervierteln der Erstkalbinnen unter 5 %.

Die Erstkalbinnen wiesen sowohl auf Viertel- als auch auf Tierebene eine höhere *S. aureus* Prävalenz auf als die Kühe. Zum Zeitpunkt der Abkalbung erwies sich der Unterschied zwischen Erstkalbinnen (4,7 %/ 13,3 %) und Kühen (1,7 %/ 5,6 %) als statistisch signifikant auf Viertel- und auf Tierebene ( $p < 0,001$ ).

Eine andere Untersuchung in den Niederlanden kamen in dieser Hinsicht zu vergleichbaren Ergebnissen (Poelarends et al. 2001). Eine in Brandenburg durchgeführte Studie ermittelte jedoch bei Kühen (5,0 % bei Tieren <50 Tage in Laktation, 8,5 % bei Tieren >250 Tage in Laktation) höhere Prävalenzen von *S. aureus* als bei Erstkalbinnen (3,8 % bei Tieren <50 Tage in Laktation, 6,9 % bei Tieren >250

Tage in Laktation) (Köster 2004). Es ist anzunehmen, dass dieser Unterschied im jeweiligen Umfeld der Tiere begründet liegt. Die Daten stammen von einer Vielzahl von Betrieben aus Brandenburg, deren Haltungsformen besonders im Hinblick auf die Färsenhaltung und –aufzucht variabel sind.

Der Versuchsbetrieb hat eine eigene, räumlich getrennte Aufzuchtanlage. Die weiblichen Tiere kommen erst als tragende Färsen in den Teil des Betriebs, in dem die Untersuchung stattfand. Sie gelangten also kurz vor ihrer Abkalbung in ein neues Umfeld mit einem neuen Erregerspektrum. Die Kühe sind an das stallspezifische Erregerspektrum angepasst und ihr Abwehrsystem ist darauf eingestellt. Die Exposition gegenüber einem veränderten Erregerspektrum könnte eine Erklärung dafür sein, warum sich die Erstkalbinnen leichter mit *S. aureus* infizieren konnten. Ein Einfluß der Abwehrlage auf eine *S. aureus* Infektion wurde bereits beschrieben (Anderson 1982).

Im Hinblick auf die Infektionsraten gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kühen und Erstkalbinnen. Eine andere Studie hingegen ermittelte bei Altkühen höhere Neuinfektionsraten von *S. aureus* als bei Erstlaktierenden (Sommerhäuser 2001). Die Neuinfektionsrate wird als wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Bekämpfung von *S. aureus* angesehen (Sommerhäuser 2001). Es wird leider nicht deutlich, ob die Bekämpfungsmaßnahmen in jener Studie bei Erstkalbinnen und Altkühen identisch oder unterschiedlich waren. Ebenso kann man nicht erschließen, ob es Unterschiede in der Haltung und Fütterung zwischen Erstkalbinnen und Altkühen gab, die einen Einfluss auf die Heilung haben könnten. Diese andere Studie umfasst mehrere Betriebe, die jeweils unterschiedliche Aufstallungsformen und Melktechnik aufwiesen. Mögliche Einflüsse dieses sogenannten „Herdeneffekts“ sind ebenfalls schwer einschätzbar.

In dieser Untersuchung war der Anteil nicht mehr nachgewiesener Infektionen bei Kühen im Zeitraum vom Zeitpunkt des Trockenstellens bis zur Abkalbung (78,8 % auf Viertelebene, 73,3 % auf Tierebene) und bis 6-8 Tage nach der Abkalbung (66,7 % auf Viertelebene, 63,3 % auf Tierebene) am größten. Da alle Kühe mit Orbenin extra<sup>®</sup> (Wirkstoff: Cloxacillin 1000 mg, Fa. Pfizer) trockengestellt wurden, ergeben sich diese Infektionsraten aus der Wirkung von Cloxacillin und der Selbstheilung. In der Literatur beschriebenen Raten nicht mehr nachgewiesener Infektionen bei antibiotischem Trockenstellen liegen bei 60-70 % (Dingwell et al. 2003). Generell ist die Spanne der Raten nicht mehr nachgewiesener Infektionen von *S. aureus*, die in der

Literatur beschrieben wurden, mit 4-92 % sehr weit (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). Diese Spanne wurde darauf zurückgeführt, dass sowohl die Wahl der Antibiotika, von der Kuh ausgehende Faktoren (Anzahl infizierter Viertel, Dauer der Infektion, Milchleistung) sowie das jeweilige Studiendesign die Rate nicht mehr nachgewiesener Infektionen stark beeinflussten (Barkema et al. 2004).

Die Raten nicht mehr nachgewiesener Infektionen bei Kühen vom Zeitpunkt der Abkalbung bis 6-8 Tage danach und diejenigen bei Erstkalbinnen sind nicht durch Antibiotika beeinflusst und könnten somit als Selbstheilungsraten bezeichnet werden. Sie lagen zwischen 46,8 % und 66,7 % auf Viertel und zwischen 45,2 % und 70,3 % auf Tierebene. Die in der Literatur für diesen Zeitraum beschriebene Selbstheilungsrate von etwa 25 % liegt unter den Werten dieser Studie (Craven 1987, Gregory 1999). Es wurde bereits beschrieben, dass Infektionen mit umweltassoziierten Mastitiserregern wie Umweltstreptokokken und coliformen Keimen oft nur von kurzer Dauer sind (Todhunter et al. 1991, Smith und Hogan 1993). *S. aureus* liess im Versuchsbetrieb bereits epidemiologische Eigenschaften umweltassoziiertes Erreger hinsichtlich der Verbreitung vermuten. Es ist möglich, dass sich *S. aureus* auch hinsichtlich der Dauer der Infektion und der Selbstheilung wie ein umweltassoziiertes Erreger präsentiert.

### **5.2.2 *S. aureus* bei Erstkalbinnen zum Zeitpunkt der Abkalbung**

Zum Zeitpunkt der Abkalbung lag die Viertelprävalenz von *S. aureus* bei den Erstkalbinnen bei 4,7 %, auf Tierebene bei 13,3 %. Die Milchprobe zum Zeitpunkt der Abkalbung wurde in dieser Studie vor dem ersten Kontakt mit dem Melkzeug entnommen. Es kommen also tatsächlich Euterinfektionen mit *S. aureus* vor, die nicht beim Melkvorgang übertragen worden sein können. Das deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen, die ebenfalls von *S. aureus* Infektionen bei Erstkalbinnen zum Zeitpunkt der Abkalbung (Hoedemaker 1995, Kelton et al. 1999) und sogar ante partum (Fox et al. 1994) berichteten. Die von Kelton (1999) ermittelte Prävalenz von etwa 4 % war in dieser Studie mit 4,7 % vergleichbar.

Die Ursache der intramammären Infektion durch *S. aureus* bei Erstkalbinnen wird in der internationalen Literatur kontrovers diskutiert.

Einige dieser Studien untersuchten die Umwelt der Tiere und fanden *S. aureus* an diversen Körperstellen der Färsen (Zitzenhaut, Nasenlöcher, Vagina, Perineum und

Haarkleid), aber auch in Futterproben und in der Einstreu (Matos et al. 1991, Roberson et al. 1994, Roberson et al. 1998). Der Kontakt der Färsen untereinander wurde als wichtiger Übertragungsweg der *S. aureus* Infektion angesehen (Roberson et al. 1998). Da die Milchprobennahme dieser Studien streng nach den Regeln des National Mastitis Council erfolgte, ist eine mögliche sekundäre Kontamination durch umweltassoziierte *S. aureus* Keime unwahrscheinlich.

Eine Studie konnte *S. aureus* in der kleinen Weidestechfliege (*Haematobia irritans*) nachweisen. Dieses Insekt wurde somit als möglichen Überträger in Betracht gezogen (Owens et al. 1998).

Der mögliche Einfluß der Fütterung infizierter Milch an Kälber auf den späteren Eutergesundheitsstatus wird immer wieder diskutiert (Barto et al. 1982, Hoedemaker 2001). Es gibt bislang jedoch keine gesicherten Ergebnisse, die diese Vermutung eindeutig belegen oder widerlegen könnte.

### 5.2.3 Zellzahlen

Die Zellzahlen der Viertelgemelksproben sind sowohl bei den Kühen als auch bei den Erstkalbinnen jeweils in drei Untergruppen unterteilt worden:

4. Zellzahlen von Eutervierteln mit negativem bakteriologischen Befund
5. Zellzahlen von Eutervierteln mit einer intramammären Infektion durch *S. aureus*
6. Zellzahlen von Eutervierteln mit einer intramammären Infektion durch einen anderen Erreger

Es lassen sich also einmal die drei Untergruppen bei Kühen und bei Erstkalbinnen vergleichen und auch die jeweils gleichen Untergruppen miteinander.

Es stellte sich heraus, dass alle drei Untergruppen sowohl innerhalb der Erstkalbinnen als auch innerhalb der Kühe signifikant unterschiedlich hinsichtlich der Zellzahl waren ( $p=0,000$ ). Die Euterviertel mit negativem bakteriologischen Befund zeigten dabei jeweils die niedrigste Zellzahl. Die Euterviertel mit einer intramammären Infektion durch *S. aureus* zeigten die höchste Zellzahl. Es ist eine mehrfach beschriebene Beobachtung, dass eine Infektion des Euters mit *S. aureus* mit einer erhöhten Zellzahl einhergeht (de Haas et al. 2004, Jones et al. 1998, Sommerhäuser et al. 2003). Diese Tatsache konnte mit unseren Untersuchungen erneut bestätigt werden.

Auch bei dem Vergleich der jeweils gleichen Untergruppen treten statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kühen und Erstkalbinnen auf.

Bei Eutervierteln mit intramammärer Infektion durch *S. aureus* lag die Zellzahl bei den Erstkalbinnen signifikant höher als bei den Kühen ( $p=0,009$ ). Vermutlich reagieren Erstkalbinnen wesentlich stärker auf eine *S. aureus* Infektion des Euters, was sich dann in einem stärkeren Anstieg der Zellzahl zeigt. Auch hier könnte wieder die schlechtere Abwehrlage der Erstkalbinnen verantwortlich sein. Das Keimspektrum ist noch fremd und das Immunsystem reagiert stärker als auf schon bekannte Keime. Die Zellen der körpereigenen Abwehr tragen im Euter maßgeblich zum Zellgehalt der Milch bei (Radostitis et al. 2000). Der Stress durch die Umstallung vor der Abkalbung begünstigt zusätzlich den Anstieg der Zellzahl.

Bei Eutervierteln mit negativem bakteriologischen Befund und Eutervierteln mit einer intramammären Infektion durch einen anderen Erreger zeigte sich, dass die Zellzahl bei den Kühen statistisch signifikant höher lag als bei den Erstkalbinnen ( $p=0,001$ ). Erstkalbinnen, deren Euterviertel in dieser Untersuchung einen bakteriologisch negativen Befund zeigten, hatten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit noch nie eine Infektion in diesen Eutervierteln. Dem gegenüber ist nicht nachzuvollziehen, ob Kühe in den während dieser Untersuchung negativen Eutervierteln nicht in einer der vorangegangenen Laktationen schon einmal eine Infektion mit einem euterpathogenen Erreger aufgewiesen hatten. Selbst wenn die eigentliche Infektion schon ausgeheilt ist, fällt die Zellzahl in der Regel nicht wieder komplett auf ihren ursprünglichen Wert ab. Die Zellzahlen des Gesamtgemelks bestätigen noch einmal die Ergebnisse der entsprechenden Viertelgemelkszellzahlen.

### **5.3 Ergebnisse der Genotypisierung**

#### **5.3.1 Auswahl der Genotypisierungsmethode**

Zur Genotypisierung standen für diese Studie zwei Typisierungsverfahren zur Auswahl, die RAPD-PCR oder die Makrorestriktionsanalyse (PFGE).

Die Makrorestriktionsanalyse ist zwar aufwendig und teuer, aber sie besitzt eine sehr gute Differenzierbarkeit und Reproduzierbarkeit (Schwarz et al. 2003). Auch Sommerhäuser (2001) erzielte mit dieser Methode die höchste Diskriminierung. Sie gilt seit Erstellung des HARMONY Protokolls durch Murchan et al. (2003) als Standardmethode zur Differenzierung von *S. aureus*.

### **5.3.2 Vorkommen klonaler Gruppen von *S. aureus* in der gesamten Herde**

Es wurden in der Herde insgesamt drei klonale Gruppen gefunden (A, B, C), von denen jeweils auch klonale Untergruppen mit nah verwandten Stämmen vorkamen. Nah verwandte Stämme wurden definiert als Stämme, die sich durch ein einziges genetisches Ereignis, z. B. eine Punktmutation, von einem Stamm unterscheiden. Diese Mutation zeigt sich dann in zwei oder drei unterschiedlichen Banden auf dem Gel (Tenover et al. 1995). Keiner der drei klonalen Gruppen zeigte ein dominantes Verhalten, d.h. keine trat signifikant häufiger auf als eine andere. (Verhältnis 1:1,6:1,6).

Sommerhäuser (2001) berichtete in seiner Studie von Herden, in denen jeweils eine klonale *S. aureus* Gruppe signifikant häufiger nachgewiesen wurde als alle übrigen Gruppen. Im Gegensatz zu diesen Herden mit dominanten Gruppen gab es ebenso Herden, in denen mehrere unterscheidbare klonale Gruppen gleichermaßen für die *S. aureus* Infektionen verantwortlich waren. In der Literatur finden sich weitere Beispiele für beide Muster. Es wurden einerseits Herden mit dominanten klonalen Gruppen ermittelt (Lipman et al. 1996, Raimundo et al. 1999). Andererseits traten auch Herden mit mehreren, gleichmäßig verteilten *S. aureus* Stämmen auf (Annemüller et al. 1999, Matthews et al. 1992, Matthews et al. 1994, Myllys et al. 1997, Rivas et al. 1997).

Die Ergebnisse dieser Studie decken sich eher mit den Ergebnissen der letztgenannten Studien. Es treten drei nahezu gleichmäßig verteilte klonale Gruppen auf, keiner dieser Gruppen zeigt Dominanzverhalten.

### **5.3.3 Vergleich der klonalen Gruppen von *S. aureus* zwischen Kühen und Erstkalbinnen**

In der internationalen Literatur ist bisher keine Untersuchungen zu möglichen Unterschieden der Variabilitäten von *S. aureus* zwischen Erstkalbinnen und Kühen beschrieben worden. Die folgenden Überlegungen basieren auf der Interpretation eigener Ergebnisse.

Kühe und Färsen hatten bis zum Zeitpunkt der Abkalbung keine Berührungspunkte in dem Betrieb. Die Färsen sind tragend auf das Stallgelände gebracht und seitdem in eigenen Gruppen gehalten worden. Auch in den Abkalbeboxen wurden Kühe und Erstkalbinnen räumlich getrennt. Man kann also davon ausgehen, dass bis zu diesem

Zeitpunkt die Entwicklung der *S. aureus* Stämme in diesen beiden Gruppen unabhängig voneinander abgelaufen ist.

Alle drei klonalen Gruppen kamen sowohl bei Kühen als auch bei Erstkalbinnen gleichermaßen vor. Auch bei den Erstkalbinnen liessen sich alle drei Gruppen schon zum Zeitpunkt der Abkalbung nachweisen. Die eingangs gestellte Frage, ob es Unterschiede in den Variabilitäten von *S. aureus* zwischen Erstkalbinnen und Kühen gibt, lässt sich für diese Untersuchung also eindeutig verneinen.

Lediglich hinsichtlich der klonalen Untergruppen existieren Unterschiede. Während sich von der klonalen Gruppe A bei Kühen keine Untergruppen nachweisen liessen, traten bei den Erstkalbinnen Vertreter zweier klonaler Untergruppen auf. Von der klonalen Gruppe B waren im Untersuchungszeitraum sowohl bei Erstkalbinnen als auch bei Kühen jeweils klonale Untergruppen nachweisbar. Diese waren zwar voneinander verschieden, aber trotzdem alle mit der klonalen Gruppe B verwandt. Es handelt sich jedoch jeweils nur um einen Vertreter, die innerhalb der klonalen Untergruppen nachgewiesen werden konnten. Es kann daher keine Aussage über deren Durchsetzungskraft oder gar über eine mögliche Korrelation zum Status des Tieres getroffen werden.

Nur von der klonalen Gruppe C konnten sowohl bei Erstkalbinnen als auch bei Kühen mehrere Exemplare eines nah verwandten Stammes isoliert werden. Diese klonale Untergruppe C1 wies zumindest bei den Kühen eine ähnliche Prävalenz auf wie die klonale Gruppe C. Entweder sind beide Varianten irgendwann in den Betrieb eingetragen worden, oder aber die Mutation fand im Betrieb statt und die Variabilität hat sich durchsetzen können.

Über die Entwicklungsgeschichte der drei klonalen Gruppen, also deren Eintritt in den Betrieb, die Verweildauer, Eigenschaften wie Mutationsfreudigkeit und Durchsetzungskraft etc. lässt sich aufgrund des relativ kurzen Untersuchungszeitraums keine Aussage machen. Lediglich Spekulationen wären möglich, die sich durch einen über Jahre hinweg verlängerten Untersuchungszeitraum beweisen oder widerlegen lassen müssten.

#### **5.4 Risikofaktoren**

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchung war es, Risikofaktoren für das Auftreten von *S. aureus* Infektionen zu finden. Diesbezüglich untersucht wurden Euterform, Zitzen-

und Zitzenkuppenform, Keratinisierungsgrad der Zitzenschleimhaut und der Palpationsbefund des Drüsengewebes.

Hinsichtlich der Form von Euter, Zitze und Zitzenkuppe konnte in dieser Untersuchung keine signifikante Beziehung zur Häufigkeit einer *S. aureus* Infektion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis widerspricht anderen Studien, die die Form der Zitze und ihrer Kuppe als Risikofaktor werteten (Elbers et al. 1998). Allerdings wurden Risikofaktoren häufig für Mastitiden allgemein ermittelt, selten speziell für *S. aureus*.

Häufig beschrieben sind Zitzenverletzungen als Risikofaktor für das Auftreten von Mastitiden. Es kamen im Laufe dieser Untersuchung kaum Zitzenverletzungen bei den Versuchstieren vor, so dass dieser Aspekt hier nicht ausgewertet werden konnte. Zadoks (2001) ermittelte eine höhere Inzidenz an *S. aureus* Mastitiden bei starker Hyperkeratose als bei mäßiger. Unsere Untersuchung bestätigen diese Ergebnisse. Auch zwischen Palpationsbefund des Drüsengewebes und der Häufigkeit einer *S. aureus* Infektion bestand keine signifikante Beziehung. Ein Rückschluß auf den Palpationsbefund des Drüsengewebes als möglichen Risikofaktor für eine *S. aureus* Infektion ist zudem fraglich. Durch eine intramammäre Infektion wird auch das Drüsengewebe nachhaltig beeinflusst (Anderson 1982, Heald 1979). Man kann nicht mit Sicherheit sagen, ob durch ein in Mitleidenschaft gezogenes Drüsengewebe die Infektion begünstigt wurde, oder ob die Infektion erst zu einer Verhärtung des Drüsengewebes geführt hat. Letzteres ist wahrscheinlicher.

### **5.5 Rückschlüsse auf die Verbreitung von *S. aureus* im Versuchsbetrieb**

Hinweise auf den Verbreitungsmodus eines Erregers sollen unter anderem die Erregerprävalenzen und das gleichzeitige Auftreten einer oder mehrerer Erregerspezies geben (Sommerhäuser 2001).

In Herden mit einer niedrigen Gesamtprävalenz intramammärer Infektionen durch *S. aureus* sei die Stammvielfalt grösser (Sommerhäuser 2001). In unserer Studie lag eine mittlere Stammvielfalt bei einer insgesamt niedrigen Prävalenz (<5%) vor. Ebenso wurde die Unterscheidbarkeit von Stämmen von einigen Autoren als Kriterium zur Einordnung von Erregern als umweltassoziiert betrachtet (Baseggio et al. 1997, Lam et al. 1996, Lipman et al. 1995, Wang et al. 1999).



Bezieht man sich auf diese Studien, könnte man es in Betracht ziehen, dass sich *S. aureus* in unserem Versuchsbetrieb hinsichtlich der Verbreitung wie ein umweltassoziiertes Erreger verhalten hat.

Die Stammvielfalt in einer Herde würde als Charakteristikum umweltassoziiertes Erreger auf die Existenz weiterer Reservoirs in der Umwelt hinweisen. Um die Vermutungen hinsichtlich der Verbreitung von *S. aureus* in unserer Studie zu belegen, hätte man den Erreger auch in der Umwelt nachweisen müssen.

Man kann die kontagiöse Verbreitung dreier dominanter, coexistierender klonaler Gruppen mittels des vorhandenen Probenmaterials nicht ausschließen. Dazu sind neben den fehlenden Umweltproben der Untersuchungszeitraum und die Zahl der untersuchten Tiere zu klein.

## 5.6 Rückschlüsse auf Therapie- und Prophylaxemaßnahmen

Streng euterassoziierte *S. aureus* Stämme lassen sich mit beschriebenen Maßnahmen erfolgreich bekämpfen, sofern sie konsequent angewandt werden. Dazu zählen Melkhygiene (Euterreinigung, Vormelken, Zitzendippen, einwandfreie Melktechnik, Zwischendesinfektion des Melkgeschirrs), richtige Melkreihenfolge, Selektion, Separierung und Behandlung therapiewürdiger Tiere und Metzgerei therapieunwürdiger Tiere.

*S. aureus* Stämme, die Eigenschaften umweltassoziiertes Erreger aufweisen, lassen sich genauso wenig wie „klassische“ Umwelterreger mit diesen Maßnahmen einschränken (Sommerhäuser 2001). Für diese *S. aureus* Stämme gelten die gleichen Regeln wie zur Bekämpfung klassischer umweltassoziiertes Erreger. An erster Stelle steht die Stallhygiene. Mögliche Erregernischen in Einstreu, Futter und Tränke sollten durch regelmäßige Reinigung und Desinfektion minimiert werden (Smith und Hogan 1993). Der Infektionsdruck wird durch Vermeidung von Überbelegungen verringert. Bereiche, in denen besonders anfällige Tiere stehen (z. B. Krankengruppe, Abkalbebereich) sollten besonders sauber und trocken gehalten werden. Eine saubere Umwelt bedeutet gleichzeitig sauberere Tiere. Diese schleppen weniger Schmutz mit in den Melkstand, der Milchentzug wird hygienischer (Schreiner und Ruegg 2003). Wichtig ist auch die Insekten- und Schädlingbekämpfung. Owens (1998) konnte *S. aureus* in der kleinen Weidestechfliege (*Haematobia irritans*) nachweisen und zog dieses Insekt somit als möglichen Überträger in Betracht.