

2 Literaturübersicht

2.1 Mastitiden

Mastitiden (entzündliche Erkrankungen der Milchdrüse) gehören zu den wirtschaftlich besonders verlustreichen Erkrankungen der Milchkuh (Schultz et al., 1978; Fetrow et al., 2000). Sie schädigen den Betrieb nicht nur durch Leistungsminderung (den direkten Milchverlust), sondern sie verursachen auch erhebliche Kosten durch Therapieaufwand, Minderbezahlung der Milch aufgrund Nichterreichen der gesetzlich vorgeschriebenen Qualitätsanforderungen an Milch und durch frühzeitigen Abgang leistungsschwacher oder therapieresistenter Tiere.

2.1.1 Kategorien der Eutergesundheit

Verschiedene Kategorien der Eutergesundheit wurden von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG, 2002) in Anlehnung an die Vorgaben der International Dairy Federation (IDF, 1967; IDF, 1971) definiert:

Normale Sekretion

Normale Sekretion erfolgt durch gesunde Euterviertel ohne sichtbare pathologische Veränderungen, deren Milch einen Zellgehalt im Normbereich aufweist und in der keine pathogenen Keime nachweisbar sind.

Der physiologische Zellgehalt der Milch beträgt im geometrischen Mittel 100.000 Zellen/ml Milch, er schwankt etwa zwischen 50.000/ml und 150.000/ml. In der Milch sind 100.000 Zellen/ml nach derzeitigem Kenntnisstand als physiologischer Normalwert zu definieren (Doggweiler und Hess, 1983; Hamann und Reichmuth, 1990; Harmon, 1994; Hamann, 2001).

Latente Infektion

In der Milch von Vierteln mit latenter Infektion sind pathogene Keime nachweisbar. Der Zellgehalt ist jedoch nicht erhöht. Eine Unterscheidung latenter Infektionen des Eutergewebes von einer auf den Zitzenkanal begrenzten Besiedlung oder Infektion kann aufgrund der Probenahme nicht zuverlässig geschehen.

Unspezifische Mastitis

Es sind keine Mastitiserreger in der Milch betroffener Viertel nachweisbar. Es liegen aber subklinische oder klinische Symptome einer Entzündung des Euters vor. Der Zellgehalt der Milch liegt bei Werten über 100.000 Zellen/ml.

Mastitis

Sowohl erhöhte Zellzahlen (>100.000 Zellen) als auch pathogene Mikroorganismen können nachgewiesen werden.

Bei der so kategorisierten Mastitis treten unterschiedliche Verlaufsformen und verschiedenartige klinische Symptome auf:

Subklinische Mastitis

Entsprechende Euterviertel zeigen keine äußerlich erkennbaren Symptome. Die Milch weist einen erhöhten Zellgehalt und eine veränderte chemische Zusammensetzung auf. In mindestens zwei von drei Milchproben, die im Abstand von je einer Woche genommen werden, werden pathogene Erreger nachgewiesen.

Klinische Mastitis

Die klinische Mastitis kann geringgradig, mittel- bis hochgradig oder chronisch verlaufen. Kennzeichen einer mittel- bis hochgradigen Mastitis sind das Auftreten äußerlich erkennbarer Entzündungssymptome, wie z.B. erhöhte Temperatur, Schwellung, Schmerzhaftigkeit des Euters, und unter Umständen zeigen die Tiere ein gestörtes Allgemeinbefinden und Fieber. Die Milch betroffener Euterviertel ist grobsinnlich verändert.

Die Symptome einer geringgradigen klinischen Mastitis beschränken sich auf das Auftreten makroskopisch veränderter Milch. In manchen Fällen ist das Auftreten von Flocken im Vormelk das einzige feststellbare Krankheitsanzeichen.

Eine chronische Mastitis ist gekennzeichnet durch ein spontan oder trotz Behandlung nicht zur Ausheilung gekommenes langfristiges Erkrankungsgeschehen. Betroffene Viertel können im Verlauf der Entzündung atrophieren oder bleibende, klinisch erkennbare Veränderungen aufweisen.

2.1.2 Weitere Möglichkeiten der Einteilung von Euterentzündungen

Nach dem beteiligten Gewebe findet eine Unterscheidung in Mastitis (Erkrankung des eigentlichen Drüsenparenchyms), Thelitis (Erkrankung der Zitze) und Galaktophoritis (Erkrankung der Milchsammelgänge) statt. Es ist jedoch selten, dass eine der Formen allein auftritt, oft bedingt eine Form auch die Entstehung der anderen.

Pathologisch-anatomisch werden des weiteren katarrhalische, hämorrhagisch-nekrotisierende, eitrig-abszedierende, granulomatöse oder interstitielle, nicht eitrig Mastitiden unterschieden (Schulz, 1994; Weiss, 1999).

2.1.3 Entstehung von Euterentzündungen

An der Entstehung einer Mastitis sind in der Regel verschiedene prädisponierende Faktoren beteiligt. Vorrangig zählen hierzu ungünstige Haltungs- und Ernährungsbedingungen, fehlerhaftes Melken oder Anomalien des Euters, der Zitzen und des Strichkanals (Multifaktorielles Geschehen).

Das ursächliche Agens dieser entzündlichen Erkrankung der Milchdrüse können Erreger (Bakterien, Pilze/Hefen, Algen, Viren) oder unbelebte Noxen (nicht infektiös) sein. Als nicht infektiöse Ursachen kommen traumatische, thermische, toxische und chemische Noxen in Frage. Insgesamt spielen sie jedoch eine eher untergeordnete Rolle.

Als Erreger von Euterentzündungen kommen in erster Linie Bakterien in Betracht, wobei *Staphylococcus aureus* den häufigsten und mit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten einhergehenden Keim darstellt (Guidry et al., 1998). Die Erreger können über verschiedene Wege in das Euter gelangen. Erreichen sie über Strichkanal, Zisterne und Milchgänge das Euter, spricht man von einer galaktogenen Infektion. Bei der Wundinfektion oder lymphogenen Infektion gelangen sie über Wunden der Haut und Zitzen in das Euter. Ein weiterer Weg führt über den Blutstrom ins Euter (hämatogene Infektion). Der galaktogenen Infektion kommt die größte Bedeutung zu (Weiss, 1999).

2.1.4 Erkennung von Euterentzündungen

Zur Erkennung von Mastitiden kann der Zellgehalt der Milch als ein wichtiges Kriterium herangezogen werden. Diese Zellen setzen sich aus polymorphkernigen Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen zusammen, wobei die polymorphkernigen Leukozyten den größten Anteil einnehmen. Darüber hinaus befinden sich nicht-differenzierte Zellen und Zelltrümmer in der Milch. Die Zellen treten als Reaktion des Immunsystems auf eine Noxe aus dem Blut durch das Alveolarepithel in den Alveolarraum und gelangen somit in die Milch (Lee et al., 1980; Mielke und Michel, 1994).

Neben infektiösen Faktoren beeinflussen jedoch auch andere den Zellgehalt der Milch. Von Bedeutung sind das Alter der Kuh bzw. die Laktationsnummer, das Laktationsstadium, die Rasse, die Jahreszeit, evtl. Brunst, Futterumstellung, "verschiedener Stress". Hierbei war der Einfluss der verschiedenen nicht infektiösen Faktoren kleiner, wenn die Milchdrüse nicht durch eine Infektion zusätzlich belastet wurde (Harmon, 1994). Der Infektionsstatus des Euterviertels war jedoch der wichtigste den Zellgehalt beeinflussende Faktor (Harmon, 1994). Tiere, die eutergesund und nachweislich über drei Jahre nicht infiziert waren, zeigten auch mit ansteigender Laktationsnummer und im Verlauf einer Laktation keine Zunahme des Zellgehalts der Milch. Lediglich innerhalb der ersten zwei Wochen postpartum war ein erhöhter Zellgehalt zu verzeichnen (Natzke et al., 1972; Sheldrake et al., 1983; Harmon, 1994).

Das alleinige Beobachten des somatischen Zellgehalts ist jedoch nicht ausreichend zur Überwachung von Mastitiden. Es konnten dabei anhaltend hohe Prävalenzen kontagiöser Mastitiserreger mit möglichen schweren zukünftigen Folgen unbemerkt bleiben (Hoblet et al., 1988).

Die auf einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen beruhende Entzündung des Euters ist eine komplexe Serie von Ereignissen, die zu reduzierter Syntheseaktivität der Milchdrüse, zu Veränderungen in der Zusammensetzung und zu erhöhtem Gehalt somatischer Zellen der Milch führt (Harmon, 1994). So sind Mastitiden oder Erhöhungen der Zellzahl verbunden mit einem gegenüber "gesunder Milch" erniedrigten Gehalt an Laktose, alpha-Lactalbumin und Fett, was sich aus einer verminderten Syntheseaktivität erklärt (Kitchen, 1981).

In einer Studie, in der die Betriebe nach Tankmilchzellzahl (BMSCC) in drei Gruppen eingeteilt wurden, bestand kein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens klinischer Mastitiden (incidence rate) zwischen den Gruppen. Klinische Mastitiden durch gram-negative Pathogene, wie *E. coli*, *Klebsiella* spp oder *Pseudomonas* spp, und systemische Krankheits-symptome durch klinische Mastitiden traten häufiger in Herden mit niedriger BMSCC auf. Klinische Mastitiden ausgelöst durch *S. aureus*, *Sc. dysgalactiae* und *Sc. agalactiae* kamen häufiger in Herden mit hohem BMSCC vor. Die gesamte Merzungsrate und die Merzungsrate durch klinische Mastitiden wurden nicht durch die BMSCC Gruppe beeinflusst (Barkema et al., 1998).

2.2 Mastitiserreger

Die Mastitiserreger werden entsprechend ihrer epidemiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen eingeteilt. Nach pathophysiologischen Gesichtspunkten unterscheidet man „major“ und „minor pathogens“. Zu den „minor pathogens“ gehören z.B. *Corynebacterium bovis* und Koagulase negative Staphylokokken (KNS) (Smith und Hogan, 1995). Sie rufen meist subklinische Mastitiden begleitet von einer mäßigen Erhöhung der Zellzahlen hervor. Die durch „major pathogens“ verursachten Mastitiden führen zu stärkeren Veränderungen der Milchezusammensetzung, einschließlich einer deutlicheren Erhöhung der Zellzahl. Die ökonomischen Verluste sind besonders hoch (Harmon, 1994). Innerhalb der Gruppe der „major pathogens“ unterscheidet man nach ihrem epidemiologischen Verhalten kontagiöse (kuhassozierte) von umweltassozierten Erregern (Bramley, 1985; Döpfer et al., 1993; Smith und Hogan, 1993; Smith und Hogan, 1995).

2.2.1 Major pathogens

Zu den kontagiösen Mastitiserregern zählen *Streptococcus (Sc.) agalactiae*, *Staphylococcus (S.) aureus* und verschiedene Mykoplasmaspezies (Klastrup, 1963; Bramley und Dodd, 1984; Fox und Gay, 1993).

Die wichtigsten umweltassoziierten Mastitiserreger sind coliforme Keime, umweltassoziierte Streptokokken und Enterokokken. Die Coliformen schließen *Escherichia (E.) coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. und *Citrobacter* spp. ein. Zu den umweltassoziierten Streptokokken zählen unter anderem *Sc. uberis*, *Sc. parauberis* und *Sc. bovis*, zu den Enterokokken *E. faecium* und *E. faecalis* (Smith et al., 1985a; Watts, 1988; Todhunter et al., 1995).

Die Einordnung von *Sc. dysgalactiae* in diese Gruppen ist umstritten, da sich dieser Erreger epidemiologisch unterschiedlich verhalten kann (Smith and Hogan, 1995).

2.2.1.1 Reservoir

Das Hauptreservoir der kontagiösen Erreger sind die infizierte bovine Milchdrüse und Verletzungen der Zitzen- und Euterhaut (Klastrup 1963; Tolle 1982, Bramley und Dodd 1984; DVG, 2002). Es existieren andere Reservoir, die aber im Infektionsgeschehen keine bedeutende Rolle spielen (Philpot, 1979; Tolle, 1982; Fox und Gay 1993, Roberson et al. 1994b). Kontagiöse Erreger werden mit der Milch ausgeschieden und in der Umgebung verbreitet. Zwischen der Prävalenz von *S. aureus* in einer Herde und dem Umfang seiner Verbreitung in der Umgebung der Herde konnte eine deutliche Korrelation nachgewiesen werden (Roberson et al., 1994b). Da Einstreu und Futtermittel keine Reservoir für *S. aureus* sind, erscheint es auch unwahrscheinlich, dass ein positiver kultureller Befund dieses Erregers die Folge einer Kontamination der Milchprobe ist (Smith et al., 1985a; Matos et al., 1991).

Besonders während der Melkzeit besteht ein erhöhtes Risiko der Übertragung des Erregers von Tier zu Tier und von Viertel zu Viertel (Bramley, 1985; Smith and Hogan, 1995; Hoesdemaker, 2001). Beim Melken werden die Hand des Melkers, Vormelkbecher, Reinigungstücher und Melkbecher mit kontagiösen Erregern kontaminiert. Eine Übertragung von infizierten zu gesunden Vierteln kann über verschiedene Vektoren stattfinden. Auch der Rückfluss von Milch innerhalb des Melkzeugs oder der abführenden Leitungen nach Lufteinbrüchen kann zu einer Verbreitung der Erreger führen.

Das primäre Reservoir der umweltassoziierten Erreger ist die Umgebung der Kühe. Am Tier sind sie auf der äußeren Haut, den Tonsillen und in Vagina und Darm zu finden. (Tolle et al., 1977; DVG, 2002). Auch Zitzenverletzungen werden besiedelt. Anders als bei kontagiösen

Erregern stellt die infizierte Milchdrüse zwar eine Infektionsquelle dar, sie ist aber von untergeordneter Bedeutung (Tolle et al., 1977; Bramley, 1981; DVG, 2002).

Vom Tier aus können die Bakterien in die Umgebung gelangen, wo vor allem Einstreumaterial ein günstiges Substrat zum Überleben und zur Vermehrung darstellt. Die Kühe sind diesen Erregern vermehrt zwischen den Melkzeiten ausgesetzt (Harmon, 1994). Wichtige Reservoire für umweltassoziierte Erreger in der Umgebung der Kühe sind organische Einstreumaterialien, mit Mist bedeckte Triebwege und nasse oder feuchte Bereiche im Stall (Smith und Hogan, 1993). In einer Untersuchung konnte die Exposition mit diesen Erregern minimiert werden, wenn alle Bereiche im Umfeld der Tiere sauber, kühl und trocken waren. Zusätzlich konnte die Resistenz der Tiere gegenüber diesen Erregern durch eine stressfreie Umgebung, Minimierung der Zitzenverletzungen und durch eine ausgewogene Fütterung mit ausreichendem Anteil Vitamin E und Selen maximiert werden (Smith und Hogan, 1993). Umweltassoziierte Erreger wurden in organischen Einstreumaterialien in signifikant höheren Mengen nachgewiesen als in Einstreu aus anorganischem Material, wie Sand, oder auf einstreulosen Liegeflächen aus Lehm (Zehner et al., 1986; Hogan et al., 1989b; Hogan et al., 1990; Bartlett et al., 1992). Wegen der ubiquitären Verbreitung ist ein Kontakt der Zitzen mit umweltassoziierten Erregern jederzeit und überall möglich, wobei jeder Faktor, der die Keimzahl im Bereich der Strichkanalöffnung erhöht, die Neuinfektionsrate steigert (Philpot, 1979; Smith, 1983; Bartlett et al., 1992).

2.2.1.2 Verlauf und Dauer

Die Infektionen mit kontagiösen Erregern neigen dazu, chronisch und subklinisch, aber mit periodisch auftretenden klinischen Phasen zu verlaufen (Harmon, 1994). In verschiedenen Untersuchungen wurde in Herden mit erhöhter Tankmilchzellzahl ein hoher Anteil kontagiöser Keime nachgewiesen (Erskine et al., 1987; Hutton et al., 1990). So wurden Prävalenzen von *S. aureus* und *Sc. agalactiae* in Herden mit niedrigen und hohen somatischen Zellzahlen verglichen. Von den Herden mit niedrigem Zellgehalt konnte nur in 12,5 % der Herden *Sc. agalactiae* und in 44% *S. aureus* isoliert werden, während in allen Herden mit erhöhten Zellzahlen beide Keime isoliert werden konnten. In Herden mit niedriger Zellzahl lag die mittlere

Prävalenz von *S. aureus* und *Sc. agalactiae* bei 0,7 % bzw. 0,1 %, in Herden mit erhöhtem Zellgehalt hingegen bei 7,6 % bzw. 25,7% (Erskine et al., 1987).

Von den kontagiösen Keimen persistiert vor allem *S. aureus* über Monate in infizierten Vierteln und wird auch über die Trockenstehphase hinweg nicht zwingend durch das Immunsystem des Wirtes eliminiert (Bramley and Dodd, 1984).

Der Verlauf von intramammären Infektionen mit umweltassoziierten Erregern kann klinisch, subklinisch oder latent sein. Vor allem in gut geführten Betrieben mit niedrigen Zellzahlen stellen durch umweltassoziierte Erreger verursachte klinische Mastitiden ein Problem dar (Hogan et al., 1989a; Schukken et al., 1989a; Gonzalez et al., 1990; Smith and Hogan, 1993). In einer Untersuchung zeigte sich, dass in der Laktation 81% der coliformen Infektionen und 53% der Infektionen mit Streptokokken klinisch waren (Smith et al., 1985a). Klinische Mastitiden durch umweltassoziierte Erreger traten vor allem in den ersten 76 Tagen der Laktation und während des Sommers auf (Smith et al., 1985a). Vor allem zwischen dem Trockenstellen und dem Kalben traten hohe Neuinfektionsraten mit Umweltkeimen auf (Bartlett et al., 1992; Bradley and Green, 2000).

Der Verbreitungsgrad umweltassoziiertes Erreger ist jedoch in infizierten Herden nicht so groß wie derjenige kontagiöser Keime. Die Viertelprävalenz intramammärer Infektionen in einer Herde erreicht bei Umweltstreptokokken selten mehr als 10 bis 15 % (Hogan et al., 1989a).

Mastitiden, die durch umweltassoziierte Erreger verursacht werden, zeichneten sich durch eine relativ kurze Krankheitsdauer und Persistenz der Erreger im Euter aus. Bei coliformen Keimen lag die Krankheitsdauer im geometrischen Mittel bei 9,1 Tagen, bei Streptokokken bei 17,0 Tagen. Hierbei waren zwei Drittel der Streptokokkenmastitiden bereits nach maximal 9 Tagen beendet, und nur 13 bzw. 18% nahmen einen chronischen Verlauf und dauerten über 100 Tage. Annähernd 59% der Streptokokkeninfektionen und 69% der Infektionen mit coliformen Keimen dauerten 30 Laktationstage oder weniger (Smith et al., 1985a; Smith et al., 1985b). Allein durch die Infektabwehr des Euters wurden 55,2% aller coliformen Keime und 38,5% der Streptokokken eliminiert (Smith et al., 1985a). Weitere Untersuchungen ergaben, dass etwa 41% der durch gramnegative Keime verursachten Mastitiden nach weniger als 8 Tagen ausgeheilt waren (Smith et al., 1985a; Todhunter et al., 1991) und Umweltstreptokokken in der Laktation eine mittlere Infektionsdauer von 12 Tagen hatten (Todhunter et al.,

1991; Todhunter et al., 1995). Andere Untersuchungen ergaben für Umweltstreptokokken eine durchschnittliche Persistenz von 30 Tagen im Euter (Hogan et al., 1989a).

Es konnte jedoch auch die Persistenz von Streptokokkeninfektionen während einer Laktation und über die Trockenstehphase hinweg nachgewiesen werden (Oliver et al., 1998; Wang et al., 1999). Auch *E. coli* konnte persistierende intramammäre Infektionen in Untersuchungen hervorrufen und chronisch werden (Todhunter et al., 1991; Bradley und Green, 1998; Döpfer et al., 1999).

2.2.1.3 Bekämpfungsmaßnahmen

Die Bekämpfungsmaßnahmen sind entsprechend der unterschiedlichen Reservoirs und Übertragungswege von kontagiösen und umweltassoziierten Erregern ausgerichtet. Kontrollmaßnahmen, die effektiv gegen kontagiöse Mastitiserreger schützen, sind bei der Bekämpfung umweltassoziiertter Keime von geringem Wert (Smith and Hogan, 1993; Bradley and Green, 2000).

Hygiene und Behandlung sind zwei wichtige Komponenten zur Kontrolle von Mastitiden. Beide Komponenten arbeiten unabhängig voneinander, bewirken aber am meisten, wenn sie kombiniert angewandt werden. Hygienemaßnahmen wirken durch Verminderung der Neuinfektionsrate. Der primäre Effekt von Behandlungen besteht darin, die Eliminierungsrate bereits bestehender Infektionen zu erhöhen (Philpot, 1979).

Klassische Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen gegen kuhassoziierte Erreger zielen darauf ab, das Infektionsrisiko während der Melkzeiten zu reduzieren. Zum einen sollte die Exposition gesunder Viertel mit kontagiösen Erregern reduziert, zum anderen der Umfang der infizierten Euterviertel als Erregerreservoir verringert werden.

Von besonderer Bedeutung sind hierbei eine angemessene Melkhygiene (u.a. Reinigung der Euter mit Einmaltüchern, Zitzendippen nach dem Melken, Zwischendesinfektion der Melkzeuge) und eine fehlerfreie Melktechnik. Das Zitzendippen nach dem Melken kann hierbei jedoch ausschließlich Neuinfektionen verhindern, es ergibt sich eine Reduktion der Bakterienpopulation auf der Zitzenspitze und an der Strichkanalöffnung (Heeschen und Hamann, 1987). Bestehende Infektionen können durch Zitzendippen nach dem Melken nicht eliminiert werden (Sischo et al., 1993).

Zusätzlich konnten durch Trockenstellen unter antibiotischem Schutz und konsequentes Aus-sortieren chronisch infizierter Tiere gute Erfolge erzielt werden (Jones und Shannon, 1972; Anderson, 1982; Philpot, 1984; Smith und Hogan, 1993; Hillerton et al., 1995). Es wird ebenfalls empfohlen, die Herde beim Melken in eutergesunde und infizierte Tiere zu trennen und die gesunden Tiere zuerst zu melken (Neave et al., 1969; Philpot, 1979).

Durch die genannten Maßnahmen konnte die Anzahl subklinischer und klinischer Mastitiden, die durch Koagulase positive Staphylokokken ausgelöst wurden, in einer über 5 Jahre laufenden Studie drastisch reduziert werden. Insgesamt änderte sich das Auftreten klinischer Mastitiden jedoch nicht wesentlich, was darauf zurückgeführt wurde, dass für 65% der klinischen Mastitiden umweltassoziierte Erreger verantwortlich waren (Hillerton et al., 1995).

Die Bekämpfung von umweltassoziierten Keimen beruht auf einer möglichst geringen Exposition der Zitzen Spitze mit Erregern und der gleichzeitigen Optimierung der körpereigenen Abwehr (Smith, 1983; Hogan et al., 1989a; Todhunter et al., 1991; Smith und Hogan, 1993). Die Eliminierung von Feuchtigkeit schien ein effektiver Weg zu sein, Umweltmastitiden in einer Herde zu reduzieren (Hogan et al., 1989b). Eine stressfreie Umgebung und Minimierung von Zitzenverletzungen spielten ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Prävention von Umweltmastitiden (Smith and Hogan, 1993).

Eine Reihe von Studien belegt, dass sorgfältige Reinigung von Euter und Zitzen vor dem maschinellen Melken Umweltmastitiden verhindern konnte. Euter und Zitzen sollten vor dem Melken sauber und trocken sein; eine Euterdusche kann sich nachteilig auswirken (Schukken et al., 1991; Bartlett et al., 1992). Das Zitzendippen nach dem Melken kann Infektionen mit umweltassoziierten Erregern nicht ausreichend verhindern (Heeschen und Hamann, 1987; DVG, 2002).

2.2.2 Minor pathogens

Minor pathogens können zwar zu intramammären Infektionen führen und Entzündungen auslösen, diese verlaufen jedoch meist subklinisch und mit einer nur milden Zellzahlerhöhung (Röder, 1985).

Von größerer Bedeutung ist der mögliche protektive Effekt gegenüber den major pathogens. In verschiedenen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Besiedlung mit KNS oder *C. bovis* vor Infektionen mit major pathogens schützt. Es traten in bereits mit minor pathogens besiedelten Vierteln weniger Infektionen mit major pathogens auf als in nicht besiedelten Vierteln. Auch die Anzahl klinischer Mastitiden war in Herden mit einer hohen Prävalenz von minor pathogens niedriger (Poutrel and Lerondelle, 1980; Rainard and Poutrel, 1988; Schukken et al., 1989a; Matthews et al., 1991; Lam et al., 1997a; Schukken et al., 1999).

Die Neuinfektionsrate mit major pathogens wurde in einer Untersuchung durch vorbestehende Infektionen mit minor pathogens (KNS oder *C. bovis*) fast halbiert. Hierbei war der Schutz durch KNS höher als durch *C. bovis* (Rainard und Poutrel, 1988). In einer weiteren Studie konnten nur 24,5 % derjenigen Viertel, die mit zuvor mit KNS besiedelt waren, experimentell mit *S. aureus* infiziert werden, jedoch 95% der zuvor nicht mit KNS infizierten Kontrollviertel. Dieser protektive Effekt durch eine Besiedlung mit KNS konnte in der gleichen Untersuchung für *Sc. agalactiae* nicht beobachtet werden (Nickerson und Boddie, 1994).

Andere Untersuchungen kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen und konnten den Infektionsschutz durch minor pathogens nicht bestätigen (Pankey et al., 1985; Hogan et al., 1988b). Eine bestehende Infektion mit minor pathogens schien die Infektion mit Umweltstreptokokken sogar zu begünstigen (Hogan et al., 1988b).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Wettkampf oder Antagonismus zwischen intramammären Infektionen ein generelles Phänomen ist (Rainard und Poutrel, 1988).

Erklären ließ sich dieser Infektionsschutz auch mit dem leicht erhöhten Zellgehalt. Dieser bewirkte, dass im Fall einer Superinfektion mit anderen Mastitiserregern diese schneller und stärker eliminiert werden konnten (Poutrel und Lerondelle, 1980; Matthews et al., 1991).

In einer weiteren Untersuchung standen Zellzahlen von unter 100.000 Zellen/ml in keinem Zusammenhang mit dem Auftreten klinischer Mastitiden, Zellzahlen über 400.000 Zellen/ml bedeuteten sogar ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer klinischen Mastitis (Beaudeau et al., 1998).

2.2.2.1 Koagulase negative Staphylokokken

Der Begriff Koagulase negative Staphylokokken (KNS) beschreibt eine Anzahl Staphylokokken spp., die häufig aus Milch laktierender Kühe und aus Sekreten der Milchdrüse nichtlaktierender Kühe und Färsen isoliert werden können. Hierzu zählen unter anderem *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. epidermidis* und *S. xylosus* (Harmon und Langlois, 1989; Watts und Owens, 1989; Matthews et al., 1992a; Oliver und Jayarao, 1997).

KNS werden nach ihrem epidemiologischen Verhalten den umweltassoziierten Mastitiserregern zugeordnet (Bramley und Dodd, 1984; Schukken et al., 1988). Sie gehören zur normalen Mikroflora von Euter- und Zitzenhaut (Hoedemaker, 1995; Smith and Hogan, 1995). Als fakultativ pathogene Keime sind sie in der Lage, Entzündungserscheinungen mit Gewebsalterationen hervorzurufen. Durch KNS hervorgerufene Mastitiden bleiben oft subklinisch und die durch eine Infektion mit KNS verursachte Zellzahlerhöhungen vergleichsweise gering (Ruloff, 1997; Klaas, 2000). Die Zellgehalte mit KNS infizierter Euterviertel waren signifikant höher als Zellgehalte nicht infizierter Viertel. In einer mehrere Studien zusammenfassenden Arbeit wurde von einer mittleren Zellzahl von 138.000 Zellen/ml bei mit KNS infizierten Eutervierteln berichtet (Djabri et al., 2002).

In verschiedenen Studien konnten KNS bei 22,8% bis 74% der untersuchten Tiere aus dem Euter isoliert werden (Pankey et al., 1991, Ruloff, 1997). Sie stellen somit die am häufigsten nachgewiesenen Erreger aus bakteriologisch positiven Milchproben dar (Köster, 2004). Vor allem bei Färsen und Erstkalbinnen wurden aus Milchproben subklinischer Mastitiden vorwiegend KNS isoliert (Matthews et al., 1992a; Aarestrup und Jensen, 1997; Fox et al., 1995; Myllys, 1995; Oliver und Jayarao, 1997; Martin et al., 2002; Köster, 2004).

Durch lange Persistenz und gehäuftes Auftreten führten Infektionen mit KNS trotz geringer Pathogenität zu wirtschaftlichen Verlusten (Timms und Schultz, 1987).

2.2.2.2 *C. bovis*

C. bovis ist ein Bewohner des Zitzenkanals und der Zitzenzisterne (Blobel und Schließer, 1994; Pankey et al., 1985) und gehört aufgrund seines epidemiologischen Verhaltens zu den

kontagiösen Mastitiserregern (Bramley und Dodd, 1984; Schukken et al., 1988). Der Erreger wurde als lange persistierend beschrieben (Pankey et al., 1985).

C. bovis konnte vor allem aus Milchproben von multiparen Kühen und in der späten Laktation isoliert werden (Tenhagen et al., 2006). Dies kann mit der vermehrten Bildung von Keratin durch die tägliche Belastung des Zitzenepithels beim Melken erklärt werden (Martin et al., 2002), da *C. bovis* bevorzugt Keratingewebe besiedelt (Black et al., 1972).

In verschiedenen Untersuchungen konnte in mit *C. bovis* infizierten Vierteln ein signifikant höherer Zellgehalt nachgewiesen werden als in nicht infizierten Vierteln. Der geometrische Mittelwert schwankte hierbei zwischen 145.000 und 240.000 Zellen/ml (Brooks und Barnum, 1984; Pankey et al., 1985; Erskine et al., 1987; Hogan et al., 1988b). In einer weiteren Untersuchung konnten Ergebnisse zu dieser Fragestellung aus verschiedenen Studien zusammengetragen und ein durchschnittlicher Zellgehalt von 105.000 Zellen/ml in mit *C. bovis* infizierten Vierteln errechnet werden (Djabri et al., 2002).

In Betrieben, in denen Zitzendippen nach dem Melken und antibiotisches Trockenstellen routinemäßig durchgeführt wurden, konnten niedrigere Prävalenzen von intramammären Infektionen mit *C. bovis* nachgewiesen werden als in Betrieben, die diese Maßnahmen nicht ergriffen (Honkanen-Buzalski et al., 1984). In einer weiteren Studie wurde die Anwesenheit von *C. bovis* als Indikator für ein kontinuierliches und gewissenhaftes Zitzendippen genannt (Bramley et al., 1976).

2.3 *Staphylococcus aureus*

Die Gattung *Staphylococcus* umfasst Katalase positive, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende kugelförmige Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Sie sind im mikroskopischen Präparat einzeln, paarweise oder unregelmäßig gelagert. Bedingt durch ihre Teilung in mehreren Ebenen entstehen Haufenformen. Die traubenförmige Anordnung der Zellen, die der Gattung ihren Namen gegeben hat, wird dagegen nicht so regelmäßig beobachtet, dass sie ein sicheres diagnostisches Kriterium wäre. Eine Anzüchtung unter aeroben Bedingungen auf Rinder- oder Schafblutagar, lässt nach etwa 18 Stunden Bebrütung bei 37°C pigmentierte, meist glatte, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1-3 mm erkennen.

Staphylococcus (S.) aureus produziert eine Vielzahl von virulenzassoziierten Toxinen und Enzymen. So bilden sie z.B. vier verschiedene Hämolsine, die mit „alpha“, „beta“, „gamma“ und „delta“ bezeichnet werden und sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Erythrozyten bestimmter Spezies unterscheiden (Selbitz, 2002).

S. aureus ist in der Lage, in die Epithelzellen der bovinen Milchdrüse und in Phagozyten einzudringen und dort zu überleben (Almeida et al., 1996).

S. aureus besiedelt die Haut, Hautdrüsen und Schleimhäute von Menschen und Tieren und ist medizinisch als Eitererreger und Lebensmittelvergifter bedeutsam (Selbitz, 2002). Die vegetativen Formen, jedoch nicht die von den Staphylokokken gebildeten Enterotoxine, werden durch die Pasteurisierung der Milch weitgehend ausgeschaltet (Seffner und Bergmann, 1994). Zu den veterinärmedizinisch bedeutsamen Staphylokokken-Arten, die Infektionskrankheiten hervorrufen können, gehören in erster Linie die Koagulase positiven Staphylokokken (KPS) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* und *Staphylococcus hyicus ssp. hyicus*. Aus der Milch von Kühen isolierte KPS konnten nicht ausschließlich *S. aureus* zugeordnet werden, sondern auch *S. intermedius* und *S. hyicus* (Rampone et al., 1993; Roberson et al., 1996; Capurro et al., 1999).

In einigen Studien aus unterschiedlichen Regionen und Ländern konnten Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung von *S. aureus*, *S. intermedius* und *S. hyicus* unter den KPS in boviner Milch herausgestellt werden. In allen Studien ergab sich jedoch eine hohe Dominanz von *S. aureus* gegenüber den anderen KPS (Rampone et al., 1993; Roberson et al., 1996; Capurro et al., 1999). Darüber hinaus konnte bei Erstkalbinnen gegenüber multiparen Tieren eine höhere Prävalenz von *S. hyicus* beobachtet werden (Nickerson et al., 1995). Dies erklärt auch die deutlich unterschiedlichen Prävalenzen von *S. hyicus* in den verschiedenen Studien (s. Tabelle 1), da in der Untersuchung von Roberson und Mitarbeitern (1996) 41% der untersuchten Tiere Erstkalbinnen waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von *S. hyicus* in Herden mit einem hohen Aufkommen intramammärer Infektionen mit 9% deutlich unter der von Herden mit niedrigem Anteil intramammärer Infektionen (34%) lag (Roberson et al., 1996).

Koagulase positive *S. hyicus* sind in der Lage, chronische, milde intramammäre Infektionen zu verursachen, *S. intermedius* trat hingegen nicht als wichtiger Mastitiserreger in Erscheinung (Roberson et al., 1996).

Tabelle 1: Vorkommen Koagulase positiver Staphylokokken in Milchproben

	<i>S. aureus</i> (%)	<i>S. intermedius</i> (%)	<i>S. hyicus</i> (%)
Capurro et al., 1999	97	2	1
Roberson et al., 1996	82,1	0,2	17,7

Innerhalb der Familie der Micrococcaceae wird *S. aureus* als wichtigstes Pathogen der bovinen Milchdrüse betrachtet, während *S. epidermidis* und *Micrococcus* spp. als nicht-pathogen angesehen werden (Bramley, 1978; Devriese, 1979; Warn et al., 1981). Andere Untersuchungen (Oliver und Mitchell, 1983a; Oliver und Mitchell, 1983b) haben gezeigt, dass auch andere Staphylokokken als *S. aureus* mögliche wichtige intramammäre Pathogene sein können, und betonen die Notwendigkeit eindeutiger und schneller Identifikationsmethoden.

Humane und bovine Stämme unterscheiden sich voneinander. Es gibt zwar *S. aureus* Stämme, die sowohl bei Rindern als auch bei Menschen auftreten, es liegt jedoch immer ein Übergewicht auf einer der Seiten Mensch oder Rind vor (Kapur et al., 1995; Larsen et al., 2000; Zadoks et al., 2002; Smith et al., 2005).

2.3.1 Speziesdiagnostik von *Staphylococcus aureus*

Im Falle von Staphylokokken ist der klinisch wichtigste Aspekt eine eindeutige Unterscheidung zwischen kontagiösen *S. aureus* und anderen Staphylokokken (Boerlin et al. 2003).

Hierzu müssen gram-positive, Katalase positive Kokken weiter differenziert werden.

Zur Speziesdiagnostik sind unter anderem die Koagulasereaktion und der Nachweis des Clumping Factors von Bedeutung. Die Koagulase, ein extrazelluläres Enzym, wandelt bei Anwesenheit von Plasmafaktoren Fibrinogen zu Fibrin um und verursacht dadurch eine Gerinnung des Blutplasmas von Mensch und Tier. Der Clumping Factor ist zellgebunden, in der Bakterienwand lokalisiert und reagiert ohne Vermittlung eines Plasmafaktors direkt mit Fibrinogen, was zur sofortigen Verklumpung der Bakterienzellen führt.

Weitere Methoden zur Abgrenzung von *S. aureus* gegenüber anderen Staphylokokken, wie kulturell-biochemische Eigenschaften (Hämolyseverhalten, Mannitolfermentation unter anaer-

roben Bedingungen, Acetoin-Test) und Selektivmedien (z.B. acriflavine disk assay, modifizierter Baird-Parker Agar supplementiert mit Eidotter-Tellurit und Acriflavin) wurden in unterschiedlichen Untersuchungen für geeignet gehalten (Watts et al., 1991; Roberson et al., 1992; Ollis et al., 1995; Wallace et al., 1998; Capurro et al., 1999). Darüber hinaus wurden inzwischen spezielle Schnell-Agglutinationstests evaluiert (Hogan et al., 1986; Hogan et al., 1988a; Watts und Owens, 1988; Boerlin et al., 2003). Auch die Antikörperbestimmung in Milchproben und genetische Methoden zur Identifizierung von *S. aureus* sind inzwischen entwickelt und getestet worden (Adams et al., 1988; El-Rashidy et al., 1992; Patel, 2001; Boerlin et al., 2003).

2.3.1.1 Kulturell-biochemische Methoden

2.3.1.1.1 Koagulasereaktion

S. aureus wird in die Gruppe der koagulase positiven Staphylokokken eingeordnet.

Beim Röhrenkoagulasetest wird die Fähigkeit des extrazellulären Enzyms Koagulase nachgewiesen, bei Anwesenheit von Plasmafaktoren Fibrinogen zu Fibrin umzuwandeln und dadurch eine Gerinnung von Kaninchenblutplasma zu bewirken. Dieser Test hat eine recht hohe Sensitivität und Spezifität, was ihn zu einer Standard-Methode für die Identifikation von *S. aureus* in Milch gemacht hat (Blobel und Schliesser, 1994; Boerlin et al. 2003).

In anderen Untersuchungen war zwar die Sensitivität des Röhrenkoagulase-Test mit 97% hoch, die Spezifität war aber mit 33% für den Nachweis von *S. aureus* sehr niedrig (Roberson et al., 1996).

Das Ablesen der Reaktion sollte erst nach 24 Stunden Inkubation erfolgen, da nach 4 Stunden viele *S. aureus* Stämme noch keine positiven Ergebnisse erkennen ließen. Der Anteil der nach 24 Stunden, nicht aber nach 4 Stunden zu einer Gerinnung des Kaninchenplasmas führenden Stämme lag in Untersuchungen zwischen 5,6 % und 50 % (Hogan et al., 1986; Boerlin et al., 2003).

Zu bedenken ist, dass auch weitere Koagulase-positive Staphylokokken, wie *S. intermedius* und *S. hyicus* aus Milchproben isoliert werden können (Tabelle 3). Hierbei verhält sich *S.*

hyicus subsp. hyicus in seiner Koagulase-Reaktion variabel (Devriese et al., 1978; Watts et al., 1984).

Es hat sich allerdings gezeigt, dass es vereinzelt auch *S. aureus* Stämme gibt, die negative Koagulase-Reaktionen haben (Watts et al., 1984; Fox et al., 1996). Hierbei wiesen in einer Studie 2,7% der als *S. aureus* identifizierten Isolate eine negative Koagulasereaktion auf (Watts et al., 1984). In der anderen Studie konnte bei 10% der untersuchten Tiere (n=250) ein Koagulase negativer *S. aureus* Stamm nachgewiesen werden (Fox et al., 1996). So konnte gezeigt werden, dass auch koagulase negative *S. aureus* Stämme intramammäre Infektionen (IMI) verursachen und zu einer Erhöhung des SCC in der Milch führen können. Eine Missklassifikation Koagulase negativer Staphylokokken als generell klinisch unrelevante Organismen sollte demnach vermieden werden (Fox et al., 1996).

2.3.1.1.2 Hämolyseverhalten

Die Testung nach dem Auftreten und der Art einer Hämolyse ist einfach und schnell (Lam et al., 1995). Die beta-hämolytische Aktivität ist ein sehr spezifisches (98-100,0%), aber leider nicht sehr sensitives (71,6-83%) Kriterium für die Identifikation von *S. aureus* (Lam et al., 1995; Aarestrup et al., 1999; Boerlin et al., 2003). Innerhalb der KPS ist *S. aureus* der einzige mit hämolytischer Aktivität angetroffene Keim in klinischen Milchproben, deshalb scheint eine Kombination aus Koagulase und Hämolyse-Aktivität ein optimales Kriterium für die Identifizierung von *S. aureus* aus Milchproben zu sein (Lam et al., 1995). Für die Kombination dieser beiden Untersuchungen (Hämolyse und 4 Stunden Koagulase) wurde eine Sensitivität von 99,4% und eine Spezifität von 100% errechnet, sie stellt somit eine sehr sensitive und auch schnelle Identifikationsmethode dar (Boerlin et al., 2003).

Eine weitere Studie zeigte, dass zwar ein größerer Anteil *S. aureus* bovinen Ursprungs das β -hemolysin Gen trug (96%) als Isolate humanen Ursprungs (56-57%). Dieses Gen wurde aber nur in 76 % der Fälle exprimiert und somit bei Kultivierung auf Blutagar sichtbar (bei Isolaten humanen Ursprungs nur 11-13%) (Aarestrup et al., 1999).

Zu beachten ist außerdem, dass bei *S. aureus* Stämmen, die aus Mastitis Milchproben von Kühen in einer weiteren Studie isoliert wurden, der Anteil der Stämme mit Hämolyse und auch die Art der Hämolyse von Region zu Region variierte (Larsen et al., 2002).

2.3.1.1.3 Mannitolfermentation

Von den Koagulase positiven Staphylokokken ist nur *S. aureus* in der Lage, unter anaeroben Bedingungen Mannitol zu vergären. Hierzu waren 100 % der *S. hyicus* und *S. intermedius* Stämme nicht in der Lage (Roberson et al., 1992; Capurro et al., 1999). *S. intermedius* fermentiert Mannitol jedoch unter aeroben Bedingungen, wozu koagulasepositive *S. hyicus* Isolate nicht in der Lage sind (Watts et al., 1984).

In verschiedenen Studien wurde *S. aureus* identifiziert als Katalase positive, Gram positive Kokke mit positiver Koagulase-Reaktion und anaerober Mannitolvergärung sowie Hämolyseverhalten (Makovec and Ruegg, 2003) bzw. nur mit positiver Koagulase-Reaktion und β -Hämolyisin-Produktion (Lam et al., 1995).

2.3.1.1.4 Acetoin Produktion

Der Acetoin Test wurde in verschiedenen Studien für geeignet gehalten, *S. aureus* von anderen KPS zu unterscheiden (Roberson et al., 1992; Capurro et al., 1999). Ein hoher Anteil der *S. aureus* Stämme ist in der Lage, aus Glucose anaerob Acetoin zu bilden (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu kann dies nur ein sehr geringer Teil der *S. intermedius* Stämme, und *S. hyicus* ist dazu nie in der Lage (Roberson et al., 1992; Capurro et al., 1999).

Tabelle 2: Positive Testergebnisse in % (Roberson et al., 1992)

	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>
Baird-Parker Agar	100	0	0
Acriflavin Agar	100	0	0
Acetoin-Produktion	94	1	0
Anaerobe Mannitolfermentation	99	0	0
beta-Galaktosidase	0	100	0

2.3.1.1.5 Weitere kulturell-biochemische Methoden

Das Vorhandensein einer DNase-Aktivität wird oft als Ersatzmarker für die Identifikation von KPS und insbesondere von *S. aureus* in Milchproben genutzt. Aber die Spezifität dieses Kriteriums und auch das des arbeitsaufwändigeren Thermanukleasetest ist nicht gänzlich zufriedenstellend (Blobel und Schliesser, 1994)

Die Interpretation von DNase-Tests bleibt teilweise subjektiv und setzt eine gewisse Erfahrung voraus, außerdem haben oft auch andere Spezies als *S. aureus* (v.a. *S. chromogenes*) eine deutliche DNase-Aktivität (Boerlin et al., 2003)

Um *S. intermedius* und *S. hyicus* voneinander abzugrenzen, kann die β -Galaktosidase und die aerobe Mannitolfermentation herangezogen werden (Tabelle 3). Hierbei reagiert *S. intermedius* jeweils positiv und *S. hyicus* negativ (Capurro et al., 1999).

In einer anderen Untersuchung wurden jene Stämme als *S. intermedius* angesehen, die Koagulase positiv waren, keine oder eine schwache Säurebildung aus Maltose und Säurebildung bei aerober Mannitolfermentation, aber keine anaerobe Mannitolfermentation zeigten (Watts et al., 1984).

Tabelle 3: Abgrenzung von *S. aureus* gegenüber *S. intermedius* und *S. hyicus* (Watts et al., 1984)

	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>	<i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Koagulase	+	v	-	+
Maltoseabbau	+	-		
Aerobe Mannitol-fermentation	+	-	+	+
Anaerobe Mannitol-fermentation	-	-	+	+

+ = positive Reaktion; - = negative Reaktion; v = variable Reaktion

2.3.1.2 Selektivmedien

Selektivagar, wie z.B. der modifizierte Baird-Parker Agar konnten erfolgreich für Nachweis und Identifizierung von *S. aureus* und anderen KPS genutzt werden (Roberson et al., 1992). Solche Agar sind aber nicht in der Lage, andere Mikroorganismen erkennen zu lassen, und können nur für die gezielte Suche nach *S. aureus* eingesetzt werden.

Als eine sehr sichere Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen KPS erwies sich der mit 7 µg/ml Acriflavin supplementierte P-Agar. *S. aureus* wuchs auf diesem Agar in jedem Fall, während *S. intermedius* und *S. hyicus* in keinem Fall Wachstum zeigten (Harmon et al., 1991; Roberson et al., 1992; Capurro et al., 1999). Die Resistenz von *S. aureus* gegenüber Acriflavin konnte auch in Form eines Plättchentests genutzt werden. Hierbei wurden die zu untersuchenden Staphylokokken in einer Suspension auf Agarplatten aufgetragen und Papierplättchen, die 10 µg Acriflavin enthielten, auf diese Platten gebracht. Die Staphylokokken galten als resistent gegenüber Acriflavin und somit als *S. aureus*, wenn der Hemmhofdurchmesser nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C weniger als 8 mm betrug (Wallace et al., 1998).

2.3.1.3 Schnell-Agglutinations-Tests

Schnell-Agglutinations-Tests können sehr hilfreich bei der Identifikation von *S. aureus* in Kulturen von Milchproben sein, scheinen aber nicht sehr oft für diesen Zweck genutzt zu werden (Boerlin et al., 2003). Die Mehrzahl dieser Schnelltests basiert auf Plättchen-Agglutination (Boerlin et al., 2003).

Einige Schnell-Identifikations-Tests für *S. aureus* sind im Handel erhältlich und wurden für den Gebrauch in der Humanmedizin gründlich validiert (Geary und Stevens, 1991; Smole et al., 1998; Griethuysen et al., 2001). Nur selten wurden diese Schnelltests zur Identifizierung von *S. aureus* speziell für die Mastitis-Diagnostik bewertet (Hogan et al., 1986; Hogan et al. 1988a; Watts und Owens, 1988), obwohl bekannt ist, dass sich *S. aureus* Stämme von Mensch und Rind unterscheiden (Kapur et al., 1995; Tollersrud et al., 2000).

Der Slidex Staph Plus[®] (SSP) (bioMerieux, Nürtingen) zeigte in der Humanmedizin sehr zufriedenstellende Sensitivitäten und Spezifitäten von über 98% (Tabelle 4) (Personne et al., 1997; Gupta et al., 1998; Smole et al., 1998; Griethuysen et al., 2001). Nur eine Studie zeigte hierbei eine deutlich niedrigere Spezifität (82%) (Personne et al., 1997). In dieser speziellen Studie traten die falschpositiven Ergebnisse alle bei *S. schleiferi* und *S. lugdunensis* Stämmen auf. Diese kommen vor allem in Proben humanen oder caninen Ursprungs vor, sollten also kein Problem bei Proben von boviner Mastitis darstellen (Boerlin et al., 2003).

In der Studie mit Staphylokokken bovinen Ursprungs war die Spezifität des SSP recht hoch, problematisch war jedoch die nicht zufriedenstellende Sensitivität (Boerlin et al., 2003). Ein weiteres Problem von SSP war die recht hohe Anzahl nicht interpretierbarer Ergebnisse, die in dieser Studie vor allem *S. xylosus* Stämme betraf, die zwar in Milchproben von Rindern häufiger (Birgersson et al., 1992), aber sehr selten in Humanproben vorkommen, und deswegen in den Humanstudien nicht berücksichtigt wurden (Boerlin et al., 2003).

Tabelle 4: Sensitivität und Spezifität verschiedener Schnellagglutinationstests (Studien der Humanmedizin)

	Sensitivität				Spezifität			
	SSP	SP	PSP	Koag	SSP	SP	PSP	Koag
Fournier et al., 1993			98,6%				96,1%	
Smole et al., 1998	98,7%				98,0%			
Griethuysen et al., 2001	98,2%	98,2%	98,7%	99,6%	98,9%	96,2%	95,7%	99,5%

SSP = Slidex Staph Plus[®] (bioMerieux); SP = Staphaurex Plus[®] (Murex Diagnostics Ltd.); PSP = Pastorex Staph-Plus[®] (Sanofi Diagnostics Pasteur, SA) ; Koag = Röhrrchenkoagulase mit Kaninchenplasma (bioMerieux)

Die nicht zufriedenstellende Sensitivität des SSP bei *S. aureus* bovinen Ursprungs könnte daran liegen, dass sich Stämme aus Mastitis-Proben beim Rind häufig von denen in der Humanmedizin isolierten unterscheiden, zum Beispiel durch andere Oberflächenantigene oder die Ausbildung einer Polysaccharid-Kapsel (Baselga et al., 1994; Kapur et al., 1995; Tollersrud et al., 2000). Diese verbirgt möglicherweise bestimmte Oberflächenantigene, die im SSP nachgewiesen werden (Boerlin et al., 2003).

Das Problem der schlechten Sensitivität verschiedener Schnelltests zum Nachweis von *S. aureus* bestand anfangs auch in der Humanmedizin. Zusätzlich zum Nachweis von Protein A und Clumping Factor (CF) wurden dann in dritter Generation der Schnelltests auch spezielle Antikörper gegen andere Oberflächenantigene mit Erfolg eingebracht. Es handelte sich dabei um Antikörper gegen Kapselpolysaccharide (PastorexStaph-Plus[®] der Firma Sanofi Diagnostics Pasteur, SA) oder gegen gruppenspezifische Antigene auf der Zelloberfläche von *S. aureus* (Slidex Staph Plus[®] der Firma bioMerieux) (Fournier et al., 1989; Fournier et al., 1993; Personne et al., 1997; Griethuysen et al., 2001).

Der SSP basiert in der dritten Generation auf gleichzeitigem Nachweis von Protein A, CF und anderen Oberflächenantigenen, die spezifisch für *S. aureus* sind; andere Schnelltests nutzen bestimmte enzymatische Aktivitäten, die als spezifisch für *S. aureus* betrachtet werden, z.B. Aurease Aktivität im RAPIDEC Staph Test[®] (bioMerieux, Nürtingen) (Janda et al., 1994; Boerlin et al., 2003).

In einer Studie, die *S. aureus* Stämme humanen Ursprungs nutzte, konnte eine Sensitivität und Spezifität von 100% für die Erkennung von *S. aureus* durch RAPIDEC Staph Test (bio

Merieux) nachgewiesen werden (Geary und Stevens, 1991). Auch in einer Studie mit Staphylokokken Stämmen bovinen Ursprungs konnte der RAPIDEC Staph kit *S. aureus* ohne falschpositive oder falschnegative Ergebnisse identifizieren. Zudem ist der Test einfach durchzuführen, das Ergebnis erhält man nach 2 Stunden, und die Kosten sind vereinbar mit den finanziellen Beschränkungen der Mastitidsdiagnostik (Boerlin et al., 2003).

2.3.1.4 Antikörperbestimmung in der Milch

Auch mittels spezifischer *S. aureus* Antikörpertiter in der Milch konnten intamammäre Infektionen (IMI) durch *S. aureus* diagnostiziert werden (Adams et al., 1988; El-Rashidy et al., 1992). Dieser Test identifizierte erfolgreich alle Kühe ohne intramammäre *S. aureus* Infektionen, missklassifizierte aber 15 % der Proben von Kühen mit *S. aureus* Infektion (falschnegative) (El-Rashidy et al., 1992). Ein weiterer Nachteil der Antikörperbestimmung lag darin, dass nicht die einzelnen Viertel mit *S. aureus* Infektion identifiziert werden konnten, da auch benachbarte Viertel einen erhöhten Titer aufwiesen (El-Rashidy et al., 1992).

Falschpositiv erhöhte Antikörpertiter wurden vermehrt in Milchproben nicht infizierter Tiere gefunden, die entweder sehr wenig Milch produzierten oder bei denen die Proben direkt postpartum genommen wurden (Adams et al., 1988).

2.3.1.5 Genetische Methoden

Genetische Identifikationsmethoden, wie die Sequenzierung des 16S rRNA Gens (*rrs*), erlaubten die Identifikation von vielen bakteriellen Pathogenen (Patel, 2001).

So konnte die *rrs*-Sequenzierung gut für die eindeutige Identifikation von *S. aureus* und auch anderen Staphylokokkenspezies aus Milchproben von Kühen genutzt werden. Die Herangehensweise, die auf *rrs*-Sequenzierung basierende Identifikation als eine ergänzende molekulare Methode zu den phänotypischen Tests zu nutzen, ergab vielversprechende Resultate für die Brauchbarkeit dieser Identifikationsmethode für Staphylokokken aus Proben von Rindermastitiden. Die hohen Kosten und der große Arbeitsaufwand haben diese Verfahren jedoch

noch nicht Eingang finden lassen in die routinemäßige Veterinärdiagnostik und deshalb auch nicht in die Diagnostik von Mastitiden (Boerlin et al., 2003).

Die PCR Amplifikation des *aroA*- Gens ist spezifisch für *S. aureus* und kann zu dessen Identifikation genutzt werden. Sie erlaubt zusätzlich eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Stämmen und kann schnell und leicht durchgeführt werden (Marcos et al., 1999).

2.3.2 Probennahme

Die Eigenschaft von *S. aureus*, intrazellulär zu persistieren und nur intermittierend ausgeschieden zu werden, führte zu der Frage, ob Einzelproben zur Identifizierung einer Infektion genügen. Aufgrund der zyklischen Ausscheidung von *S. aureus* konnte in einer Untersuchung der einmaligen Probennahme nur eine Sensitivität von 74,5% zugeordnet werden. Die Sensitivität stieg mit zweiter bzw. dritter Probennahme auf 94%, bzw. 98% (Sears et al., 1990). In einer weiteren Untersuchung wurde aus 3000 Viertelgemelksproben, die als Doppelproben genommen wurden, eine Übereinstimmung von 96,2% zwischen diesen gefunden (Jasper et al., 1974).

Eine andere Untersuchung fand für *S. aureus* eine Übereinstimmung der Doppelproben von 94,2 % und führte zu der Folgerung, dass Einzelproben zur Identifizierung von mit *S. aureus* infizierten Vierteln genügen (Erskine und Eberhart, 1988).

In einer Studie, in der Probennahme und Handling von Milchproben untersucht wurden, konnten folgende Zusammenhänge festgestellt werden: 1. *S. aureus* konnte mit signifikant höherer Sicherheit in Proben gefunden werden, die vor dem Melken genommen wurden, als in solchen, die erst nach dem Melken genommen wurden. 2. Aus nach der Probennahme eingefrorenen Proben konnte signifikant häufiger *S. aureus* isoliert werden als aus solchen, die bei 4°C aufbewahrt wurden. 3. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden zwischen vor dem Melken genommenen und danach eingefrorenen und frischen, sowie nach dem Melken genommenen und danach eingefrorenen Proben; ein Nachteil bestand lediglich für Milchproben, die nach dem Melken genommen und nicht eingefroren wurden (Godden et al., 2002).

2.4 Mastitis durch *Staphylococcus aureus*

2.4.1 Prävalenz

S. aureus gehört zu den kontagiösen Mastitiserregern und ist einer der am häufigsten vorkommenden major pathogens in den USA und Europa (Neave et al., 1969; Schukken et al., 1989b; Hallberg et al., 1994; Barkema et al., 1998; Roberson et al., 1998; Zecconi et al., 1998; Tenhagen et al., 2006). Trotz großer Fortschritte bei der Kontrolle von Mastitiden treten durch *S. aureus* verursachte IMI in über 80% der Milchviehbetriebe auf (Roberson et al., 1998; Tenhagen et al., 2006).

Studien bei Erstkalbinnen diagnostizierten zum Zeitpunkt des Abkalbens Viertelprävalenzen zwischen 7,6 und 15,4 %, und Tierprävalenzen von 2,6% (Pankey et al., 1991; Matthews et al., 1992a; Owens et al., 2001).

In einer Studie, in die 9910 Viertelgemelksproben aus 80 verschiedenen Betrieben in Brandenburg einbezogen wurden, konnten durchschnittliche Viertelprävalenzen von *S. aureus* zwischen 3,9 und 8,5% in unterschiedlichen Tiergruppen ermittelt werden. Der Anteil der Viertelgemelksproben, aus denen *S. aureus* isoliert werden konnte, lag bei 30,1% der bakteriologisch positiven Proben (Köster, 2004).

In einer Studie konnte in 18 verschiedenen Herden zum Zeitpunkt des Abkalbens bei im Mittel 8,1% der Erstkalbinnen eine durch KPS ausgelöste IMI nachgewiesen werden, wobei die Prävalenz in den verschiedenen Herden von 0 bis 27% reichte (Roberson et al., 1994a).

2.4.2 Klinik und Verlauf

In Abhängigkeit von pathogenen Fähigkeiten des Staphylokokkenstammes, seiner Anreicherung und prädisponierenden Faktoren können sich nach der Infektion verschiedene Krankheitsbilder entwickeln (Seffner und Bergmann, 1994). Mastitiden, die durch *S. aureus* verursacht wurden, haben meist einen subklinischen und chronischen Verlauf. *S. aureus* persistiert über Monate in infizierten Vierteln und wird auch während der Trockenstehphase nicht zwingend eliminiert (Bramley und Dodd, 1984). Im Falle der chronischen Verlaufsform ist mit einem Milchverlust von etwa 35% zu rechnen (Seffner und Bergmann, 1994).

Seltener ist der Verlauf von *S. aureus* Mastitiden akut bis perakut mit Symptomen hämorrhagisch-nekrotisierender oder chronisch-abszedierender und gangräneszrierender Mastitiden mit schweren Störungen des Allgemeinbefindens und unter Umständen tödlichem Ausgang (Anderson, 1982; Seffner und Bergmann, 1994). Besonders bei jungen Kühen können schwere akute nekrotisierende Mastitiden entstehen (Seffner und Bergmann, 1994).

2.4.3 Reservoirire

Als primäres Reservoir für intramammäre Infektionen (IMI) mit *S. aureus* bei laktierenden Tieren wird generell die infizierte Milchdrüse angenommen (Neave et al., 1969; Roberson et al., 1994b). Weitere Reservoirire, neben der infizierten Milchdrüse laktierender Kühe, scheinen aber ebenfalls eine Rolle in der Epidemiologie von *S. aureus* als Erreger intramammärer Infektionen in Milchviehherden zu spielen (Matos et al., 1991). *S. aureus* konnte von Geräten und Einrichtungen, Fliegen, Unterkünften, Wasser, Luft und Erdboden, sowie nicht-bovinen Tieren und Menschen isoliert werden (Roberson et al., 1994b; Owens et al., 1998; Larsen et al., 2000; Zadoks et al., 2002). Hierbei war eine Übertragung von *S. aureus* Stämmen von der Zitzenhaut über die Melkanlage möglich.

Als Reservoir für die Übertragung von *S. aureus* als Erreger von IMI auf Färsen spielen vor allem IMI anderer Tiere und die Besiedlung anderer Körperstellen von Färsen eine bedeutende Rolle, weniger die Umwelt (Roberson et al., 1998). Die persistierende Besiedlung der Zitzenhaut scheint ein wichtiger prädisponierender Faktor für eine *S. aureus* IMI nach der Abkalbung zu sein (Roberson et al., 1998). In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass Färsen, deren Zitzenhaut zum Zeitpunkt des Abkalbens mit *S. aureus* besiedelt war, mit 3,34-fach höherer Wahrscheinlichkeit eine IMI mit *S. aureus* entwickelten, als solche, deren Zitzenhaut nicht besiedelt war (Roberson et al., 1994a).

Es konnten die gleichen Ribo- und Phagentypen von *S. aureus* aus intramammären Infektionen und Hautverletzungen isoliert werden (Larsen et al., 2000).

Im Gegensatz dazu unterschieden sich in einer neueren Studie *S. aureus* Stämme, die von der Zitzenhaut isoliert wurden, mittels Pulsfeldgelelektrophorese von denen, die aus der Milch isoliert wurden. Man folgerte, dass Stämme der Zitzenhaut nicht als wichtige Quelle von

intramammären Infektionen mit *S. aureus* bei Milchkühen zu betrachten sind (Zadoks et al., 2002).

2.4.4 Selbstheilung und Dauer der Infektion

Die Selbstheilungsrate von durch *S. aureus* verursachten Mastitiden in der Laktation wurde in verschiedenen Quellen mit sehr unterschiedlichen Werten zwischen 0 und 43%, in einer Studie sogar mit 54% beziffert (Chamings, 1984; Craven, 1987; Grommers et al., 1985; Kirk, 1991; Wilson et al., 1999; Deluyker et al., 2005).

Spontanheilungen während der Trockenstehperiode lagen in Bereichen von 5,5 bis 41,2 % (Philpot, 1979; Pankey et al., 1982; Grommers et al., 1985; Soback et al., 1990).

In einer das Laktationsstadium nicht berücksichtigenden Studie lag der Anteil der ohne Behandlung ausgeheilten *S. aureus* Mastitiden bei nur 18%. Dabei persistierten Entzündungen, die bereits zum Abkalbzeitpunkt bestanden, zu 81% bis zum Ende der Laktation, erst während der Laktation entstandene Mastitiden bestanden zu 85% bis zum Laktationsende (Rairnard und Poutrel, 1982).

Die Erkrankungsdauer von nicht behandelten Infektionen mit *S. aureus* lag bei durchschnittlich 12,8 Wochen. Dauerten die Entzündungen bis zum Trockenstellen an, hatten sie sogar eine mittlere Dauer von 25,2 Wochen, also etwa einem halben Jahr (Grommers et al., 1985).

2.4.5 Behandlung

Feste Bestandteile der Bekämpfung von *S. aureus* sind die antibiotische Behandlung zum Zeitpunkt des Trockenstellens und die Therapie klinischer Mastitiden.

Die Behandlung von subklinischen und klinischen *S. aureus* Mastitiden ist verbunden mit geringen bakteriologischen Heilungsraten (Griffin et al., 1982; Sutra and Poutrel, 1990).

Trotzdem werden jedes Jahr große Mengen Antibiotika zur Mastitistherapie eingesetzt (Bramley und Dodd, 1984; Eberhart, 1986).

Die bakteriologische Heilung von *S. aureus* Infektionen nach antibiotischer Behandlung ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Alter der Tiere, Laktationsstadium, Anzahl der infizierten Viertel, Vorder- oder Hinterviertel, Schweregrad der Entzündung, SCC des infizierten Viertels und Dauer der Trockenstehzeit (Poutrel, 1978; Ziv und Storper, 1985; Owens et al., 1988; Sol et al., 1994; Sol et al., 1997; Sol et al., 2000; Dingwell et al., 2003; Deluyker et al., 2005). Die bakteriologische Heilungsrate war signifikant höher bei jüngeren Tieren mit einer niedrigeren Laktationszahl, in der späten Laktation gegenüber dem Anfang und der Mitte der Laktation, bei der Infektion eines Vorderviertels und bei niedrigerem somatischem Zellgehalt vor der Behandlung. Je mehr Euterviertel befallen waren, desto niedriger war die bakteriologische Heilungsrate (Sol et al., 1994; Sol et al., 1997; Sol et al., 2000; Dingwell et al., 2003; Deluyker et al., 2005).

Untersuchungen zur Verlängerung der antibiotischen Therapie kamen zu dem Ergebnis, dass eine verlängerte intramammäre antibiotische Therapie signifikant wirksamer ist, um natürliche oder experimentell ausgelöste intramammäre Infektionen mit *S. aureus* zu eliminieren, als intramammäre Standardbehandlungen (Owens et al., 1997; Sol et al., 2000; Oliver et al., 2004; Deluyker et al., 2005)

2.4.5.1 Behandlung klinischer Mastitiden

Die Aussicht auf eine bakteriologische Heilung nach der Behandlung einer klinischen Mastitis, die durch *S. aureus* verursacht ist, wurde in verschiedenen Studien unterschiedlich bewertet. Einige bezeichnen sie als schlecht (Griffin et al., 1982; Sutra und Poutrel, 1990). Andere erreichten in Studien bakteriologische Heilungsraten von 52 bis etwa 60% und stuften die Heilungsraten infolgedessen als vergleichbar mit denjenigen anderer Mastitiserreger ein (Gregory, 1999; Sol et al., 2000). Bei klinischen *S. aureus* Mastitiden ist eine Behandlung während der Laktation indiziert. Durch eine Behandlung klinischer Mastitiden wird die normale Funktion der Milchdrüse rascher wieder hergestellt, und es sind höhere Heilungsraten zu erwarten als ohne Behandlung (Hallberg et al., 1994).

2.4.5.2 Behandlung subklinischer Mastitiden in der Laktation

Die zu erwartenden bakteriologischen Heilungsraten subklinischer Mastitiden bei antibiotischer Therapie während der Laktation sind mäßig. In verschiedenen Studien übertraf die Häufigkeit von Behandlungserfolgen nicht diejenige von Spontanheilungen (Kasche, 1995; Owens et al., 1999; Wilson et al., 1999). So wurden Kühe mit subklinischen *S. aureus* Mastitiden in der Laktation im Rahmen einer Studie unterschiedlichen Behandlungsmethoden unterzogen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der bakteriologischen Heilung nach den Behandlungen und ohne Behandlung festgestellt werden. Die bakteriologische Heilungsrate ohne Behandlung lag bei 43% und mit Behandlung im Durchschnitt bei 49% (Wilson et al., 1999).

Somit erscheint eine Behandlung subklinischer Mastitiden in der Laktation aus wirtschaftlichen Gründen nicht sinnvoll.

In anderen Studien jedoch konnte die Heilungsrate subklinischer *S. aureus* Mastitiden in der Laktation durch eine intramammäre antibiotische Behandlung von 0% auf 36% (Oliver et al., 2004), bzw. von 6% auf 86% gesteigert werden (Deluyker et al., 2005). Hierbei war die bakteriologische Heilungsrate bei geringeren Koloniezahlen in der Kultur vor der Behandlung, bei längerer Behandlungsdauer und bei niedrigerer Laktationsnummer signifikant höher (Deluyker et al., 2005).

Ein weiterer Aspekt bei der Bewertung des Nutzens einer Behandlung klinischer und subklinischer Mastitiden besteht darin, dass bei klinischen Mastitiden die Milch der Tiere wegen der Erkrankung nicht vermarktet werden darf. Durch eine antibiotische Behandlung entsteht so kein bzw. nur ein geringer zusätzlicher Milchverlust. Im Gegensatz dazu darf die Milch subklinisch erkrankter Tiere vermarktet werden, wenn nicht so viele Tiere betroffen sind, dass der Zellgehalt in der Tankmilch über dem gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwert von 400.000 Zellen/ml liegt. Die Verluste durch die Wartezeit übersteigen die Kosten der Behandlung und wiegen umso schwerer, als die Behandlung häufig nicht zum gewünschten Erfolg führt (Hoedemaker, 2001).

2.4.5.3 Behandlung subklinischer Mastitiden in der Trockenstehperiode

Fand eine antibiotische Therapie zu Beginn der Trockenstehperiode statt, konnten bestehende Mastitiden geheilt und neue Infektionen verhindert werden. Die Behandlungen erfolgten fast ausschließlich intrazisternal, und der Therapieerfolg wurde innerhalb der ersten vier Wochen postpartum überprüft. Bakteriologische Heilungsraten von 60 bis 90% und höher konnten beobachtet werden (Sol et al., 1994; Kasche, 1995; Sobiraj et al., 2000; Owens et al., 2001). Auch die Neuinfektionsrate durch *S. aureus* wurde durch das Trockenstellen unter antibiotischem Schutz deutlich gesenkt (Ziv et al., 1981; Pankey et al., 1982; Storper und Ziv, 1985; Ziv et al., 1987).

Die Heilungsrate sinkt jedoch mit steigender Zellzahl und zunehmendem Alter, bei Befall mehrerer Viertel einer Kuh, sowie bei Befall eines hinteren Viertels (Sol et al., 1994; Sol et al., 1997).

2.4.5.4 Formen der Behandlung

In verschiedenen Studien konnte kein Vorteil der zusätzlichen intramuskulären Injektion von Antibiotika gegenüber der alleinigen intrazisternalen Verabreichung erkannt werden (Friton, 1998; Uehlinger, 1999). Die bakteriologische Heilungsrate durch intrazisternale bzw. kombinierte intrazisternale und parenterale Behandlung lag in einer Untersuchung bei 57% bzw. 55%. Eine alleinige parenterale Behandlung konnte *S. aureus* in keinem Fall eliminieren (Friton, 1998).

Im Gegensatz dazu konnte in anderen Untersuchungen der Therapieerfolg durch Kombinationsbehandlung gegenüber der alleinigen intrazisternalen Behandlung signifikant gesteigert werden (Owens et al., 1988; Soback et al., 1990; Erskine et al., 1994).

Wurden nur die infizierten Viertel zum Trockenstellen antibiotisch behandelt, waren die Neuinfektionsraten deutlich höher als bei der Behandlung aller Viertel von *S. aureus* positiven Tieren (Browning et al., 1990; Browning et al., 1994).

2.4.5.5 Ursachen für die geringen Therapieerfolge

Aufgrund seiner schlechten Therapierbarkeit gehört *S. aureus* zu den Problemkeimen unter den Mastitiserregern (Hoedemaker, 2001). Die Behandlung mit antimikrobiell wirksamen Arzneimitteln ist erstens wegen seiner Resistenz gegenüber vielen Antibiotika wenig erfolgversprechend, zweitens wegen der Besonderheit des Erregers, nach Phagozytose intrazellulär zu überleben, und drittens wegen seines Potentials, sich in Mikroabszesse und Narbengewebe zurückzuziehen (Erskine et al., 1993; Heeschen 1996; Myllys et al., 1998; Hoedemaker und Korff, 1999; Owens et al., 1999).

Viele *S. aureus* Isolate aus Mastitiden weisen Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen auf (Sobiraj et al., 1997; Friton, 1998; Krabisch et al., 1999; de Oliveira et al., 2000; Erskine et al., 2002; Schröter, 2003; Tenhagen et al., 2006). Ein großer Teil der Stämme ist aufgrund der Bildung von Penicillinase unempfindlich gegenüber Penicillin. Dieser Anteil lag in einer Studie, die aus verschiedenen Betrieben *S. aureus* Stämme isolierte und mittels MHK-Wertbestimmung auf ihre Sensibilität gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen überprüfte, bei 26,5%. Bei alleiniger Betrachtung von *S. aureus* Stämmen, die von Tieren mit Mastitisproblemen isoliert wurden, lag der Anteil der gegenüber Penicillin resistenten Stämme sogar bei 47,9%. Ähnliche Werte konnten für Ampicillin ermittelt werden. Bei allen anderen getesteten Substanzen lag die Resistenzrate deutlich unter 5% (Krabisch et al., 1999). In einer weiteren Studie waren 24% der untersuchten Staphylokokken Stämme resistent gegenüber Penicillin und 21% der *S. aureus* Stämme gegenüber Ampicillin. Gegenüber Oxacillin und Amoxicillin/Clavulansäure waren 100% der untersuchten *S. aureus* Stämme empfindlich (Schröter, 2003). Die Entwicklung der Empfindlichkeiten von *S. aureus* gegenüber verschiedenen antibiotischen Substanzen von 1994 bis 2000 zeigte einen Anstieg der Sensibilität gegenüber Ampicillin und Penicillin von 37,3% auf 61,7% bzw. von 38,4% auf 60,9%. Auch in dieser Studie waren im Jahr 2000 alle untersuchten *S. aureus* Stämme sensibel gegenüber Oxacillin (Erskine et al., 2002). Es konnten bei der Mehrzahl der getesteten antibiotischen Substanzen nur geringe Unterschiede der MIK_{90} -Werte (Minimale Inhibitorische Konzentration; Konzentration einer Substanz, die die Vermehrung von mindestens 90% der getesteten Isolate hemmt) zwischen *S. aureus* Stämmen, die aus verschiedenen Ländern in Europa und der USA isoliert wurden, festgestellt werden (de Oliveira et al., 2000).

Als Ursache für das Scheitern der antibiotischen Therapie konnte zudem ein zu niedriger Wirkstoffspiegel im Bereich des Erregers festgestellt werden, der aufgrund der Pharmakokinetik des Medikaments oder einer eingeschränkten Verteilung wegen entzündlicher Gewebsveränderungen bestand (Sandholm et al., 1990).

Des Weiteren ist ein Teil der Erreger in der Lage, sich der antimikrobiellen Wirkung der Arzneimittel durch intrazelluläres Überleben in Phagozyten zu entziehen. Nur wenige antibiotische Substanzen sind jedoch in der Lage, in Phagozyten einzudringen und die dort befindlichen Bakterien zu beeinflussen. Überleben die Staphylokokken die antibiotische Behandlung intrazellulär, können sie anschließend die Phagozyten wieder verlassen und sich erneut vermehren (Craven und Anderson, 1984; Owens et al., 1999). Vergleichbar wurde das Überleben von *S. aureus* auch in Drüsenepithelzellen des Euters beschrieben (Bayles et al., 1998).

2.4.6 Kontrolle der Neuinfektion

Zur Kontrolle von *S. aureus* und anderen kontagiösen Erregern wird die Trennung der Herde beim Melken in gesunde und infizierte Tiere empfohlen (Fox und Hancock, 1989, Zecconi et al., 2003). In verschiedenen Studien konnte die *S. aureus* Prävalenz allein durch die Unterteilung der Herde beim Melken in infizierte und nicht infizierte Tiere um fast die Hälfte auf 16% verringert werden (Wilson et al., 1995) bzw. innerhalb von 18 Monaten ein Rückgang der *S. aureus* Infektionen um 50%, zusätzlich eine niedrigere Merzungsrate und der verringerte Einsatz von Antibiotika bewirkt werden (Mellenberger und Troyer, 1994). In einer weiteren Studie konnte die Infektionsrate mit *S. aureus* von Färsen in den ersten beiden Laktationsmonaten von 60% auf 10 bis 20% reduziert werden. Dies geschah allein durch das von den älteren Kühen getrennte Melken dieser Tiere und Desinfektion der Melkanlage zwischen den Gruppen (Jones und Shannon, 1972).

Gegensätzliche Ergebnisse brachte eine Studie, in der das getrennte Melken von mit *S. aureus* infizierten und nicht infizierten Tieren im Vergleich mit einer Kontrollgruppe, in der keine Trennung stattfand, keinen bedeutenden Unterschied ergab (Fox and Hancock, 1989).

In einer Reihe von Untersuchungen konnte für *S. aureus* ein deutlicher Rückgang der Neuinfektionsrate in solchen Vierteln beobachtet werden, die unmittelbar nach dem Melken mit einem geeigneten Zitzendippmittel behandelt worden waren. Bei unbehandelten Vierteln derselben Kühe war ein signifikanter Anstieg der Infektionsrate festzustellen (s. Tabelle 5). Die Reduktion der Neuinfektionsrate lag in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Dippmitteln zwischen 41,0 und 92,9 % (Sheldrake und Hoare, 1980; Pankey, 1989; Schukken et al., 1993; Boddie et al., 1995; Boddie et al., 1997; Lam et al., 1997b; Boddie et al., 1998; Boddie et al., 2000; Boddie et al., 2002; Boddie und Nickerson, 2002; Foret et al., 2003; Boddie et al., 2004).

Tabelle 5: Reduktion der *S. aureus* Neuinfektionsrate durch verschiedene Zitzendippmittel

Studie	Reduktion der Neuinfektionsrate mit <i>S. aureus</i>
Boddie et al., 2004	87,9%
Boddie et al., 2002	70,9%
Boddie et al., 2000	92,9%
Boddie et al., 1998	41,0%
Boddie et al., 1997	75,6%

Die Vakzinierung mit unterschiedlichen Impfstoffen wurde in verschiedenen Studien untersucht. Hierbei konnte durch den Einsatz von Vakzinen in einigen Untersuchungen eine Verminderung der Inzidenz klinischer Mastitiden durch *S. aureus* nachgewiesen werden (Nordhaug et al., 1994; Watson et al., 1996; Calzolari et al., 1997; Giraudo et al., 1997). In einigen Untersuchungen war auch die Anzahl subklinischer Mastitiden durch *S. aureus* bei geimpften Tieren geringer (Watson et al., 1996; Giraudo et al. 1997).

Einige Untersuchungen konnten niedrigere Prävalenzen intramammärer Infektionen mit *S. aureus* bei geimpften gegenüber ungeimpften Tieren nachweisen (Giraudo et al., 1997; Shkreta et al., 2004). In anderen Studien konnte keinen signifikanter Unterschied der Prävalenzen intramammärer Infektionen bei geimpften und ungeimpften Tieren festgestellt werden (Nordhaug et al., 1994, Hoedemaker und Korff, 1999).

In verschiedenen Studien erwies sich eine Vakzinierung mit bestandsspezifischen Impfstoffen gegen *S. aureus* als nicht wirkungsvoll. Hier konnte kein positiver Einfluss auf die *S. aureus*

Prävalenz, die Häufigkeit klinischer Mastitiden, den Zellgehalt im Gesamtgemelk und die Abgangsrate in den ersten drei Monaten post partum beobachtet werden (Hoedemaker u. Korff, 1999; Edinger, 2001; Hoedemaker et al., 2001).

2.5 Erregertypisierung anhand genotypischer Merkmale

Eine Erregertypisierung anhand geno- oder phänotypischer Merkmale kann Rückschlüsse auf Reservoir und Infektionswege geben. 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 Mastitisursache in einer Herde vor (Sommerhäuser, 2001). Die Charakterisierung eines Mastitiserregers als kontagiöser oder umweltassoziiertes Erreger kann zusätzlich anhand klinischer Beobachtungen erfolgen. Hierbei geben Erregerprävalenzen, das gleichzeitige Auftreten einer oder mehrerer Erregerspezies, die Eutergesundheit beeinflussende Umweltfaktoren und insbesondere der Erfolg bestimmter Sanierungsmaßnahmen Hinweise auf den Verbreitungsmodus eines Erregers. Bei der epidemiologischen Einordnung eines Erregers wird man im Idealfall sowohl anhand klinischer Daten als auch anhand von Typisierungsverfahren zur selben Einschätzung kommen (Sommerhäuser, 2001).

2.5.1 Kontagiöse Erreger

Mittels Genotypisierung von *Sc. agalactiae* Isolaten konnte die kontagiöse Verbreitung dieses Erregers in unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden. Hierbei wurde in verschiedenen Herden jeweils ein zahlenmäßig dominierender *Sc. agalactiae* Stamm gefunden, der von Kuh zu Kuh übertragen worden war (Baseggio et al., 1997; Wang et al., 1999).

In einer weiteren Studie konnten bei 79 untersuchten *Sc. agalactiae* Stämmen, die von 54 Tieren mit subklinischer Mastitis auf sieben verschiedenen Betrieben isoliert wurden, mittels Makrorestriktions-Analyse und PFGE identische oder eng verwandte DNA Muster gefunden

werden. Die Studie zeigte, dass ein einziger identischer *Sc. agalactiae* Stamm oder wenigstens sehr eng verwandte Subtypen dieses Stammes für die Mastitissituation auf diesen sieben Betrieben verantwortlich waren (Merl et al., 2003).

Für *S. aureus* liegen vergleichbare Ergebnisse vor. Mittels Phagentypisierung oder Random amplified polymorphic DNA-Polymerase-Kettenreaktion (RAPD-PCR) konnte in verschiedenen Untersuchungen jeweils ein dominierender Stamm in verschiedenen Herden isoliert werden (Lipman et al., 1996; Smith et al., 1998; Gillespie et al., 1999).

So konnte in einem Betrieb über sechzehn Monate hinweg immer wieder derselbe mittels Phagentypisierung identifizierte *S. aureus* Stamm aus infizierten Vierteln von Kühen und der Melkanlage isoliert werden (Thörne und Wallmark, 1960).

In einer weiteren Untersuchung konnten von 71 *S. aureus* Isolaten mittels RAPD-PCR und Phagentypisierung 88,7% demselben Genotyp zugeordnet werden. Die Isolate wurden aus 26 infizierten Vierteln von 10 Kühen einer Herde gewonnen (Lipman et al., 1996).

Mittels RAPD-PCR konnten in einer Studie 63 *S. aureus* Isolate aus den USA (42) und Irland (21) in insgesamt 12 verschiedene Genotypen unterteilt werden (Fitzgerald et al., 1997).

In einem Betrieb konnten alle 10 untersuchten *S. aureus* Isolate, die aus Mastitismilchproben von 10 multiparen Tieren isoliert wurden, einem einzigen Genotyp zugeordnet werden. Auch hierbei wurde die Methode der RAPD-PCR verwandt (Gillespie et al., 1999). In dieser Studie wurden auch Milch- und Tupferproben aus dem Strichkanal von Färsen desselben Bestands und von Fliegen genommen. Aus den Proben der Färsen konnten 56 *S. aureus* Isolate gewonnen werden, die sich drei unterschiedlichen Genotypen zuordnen ließen. Hierbei dominierten zahlenmäßig zwei Stämme mit 55% und 39% (Gillespie et al., 1999).

Eine weitere Studie, die den Koagulasegen-Polymorphismus als Methode der Genotypisierung nutzte, untersuchte sieben verschiedene Herden und 151 *S. aureus* Isolate. Insgesamt konnten die 151 Isolate nur sechs verschiedenen Genotypen zugeordnet werden, wobei ein Genotyp mit 73% der Isolate dominierte. In vier der sieben Herden konnte jeweils ein *S. aureus* Stamm identifiziert werden, der 80% und mehr der typisierten Isolate ausmachte. In zwei weiteren Betrieben gehörten mehr als zwei Drittel der *S. aureus* Stämme zu dem dominierenden Isolat (Raimundo et al., 1999). Ebenfalls mittels Koagulasegen-Polymorphismus konnte in sieben von neun Herden jeweils ein dominierender *S. aureus* Stamm isoliert werden, der mindestens 85% und sogar bis zu 100% der Isolate umfasste (Su et al., 1999).

Die Dokumentation eines *S. aureus* Ausbruchs, der vorwiegend durch einen einzelnen Stamm verursacht wurde, erfolgte über eine achtzehnmonatige Beobachtungszeit. Dieser *S. aureus* Stamm hatte eine zehn bis zwanzigmal höhere Prävalenz als zwei weitere gefundene Stämme. Diese zwei Stämme waren bereits vor dem *S. aureus* Ausbruch in der Herde nachgewiesen worden, und ihre Verbreitung konnte sowohl vor als auch nach dem Ausbruch durch die im Betrieb praktizierte Melkhygiene verhindert werden. Der neuere dominierende Stamm konnte nur in infizierten Vierteln und Zitzenbechern nachgewiesen werden und wurde in der Umgebung nicht gefunden. Seine Herkunft blieb ungeklärt (Smith et al., 1998).

In einer Untersuchung, die 616 Tiere (2105 Viertel) in 28 verschiedenen Herden umfasste, wurden bei 181 Tieren IMI durch *S. aureus* diagnostiziert. Mittels PFGE konnten diese Isolate 52 verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. Keiner der 52 Stämme konnte in mehr als drei Herden gefunden werden. In 75% der Herden wurden nur ein bis drei unterschiedliche *S. aureus* Stämme isoliert, in 15% der Herden sogar nur jeweils ein einziger. In 13 von 24 Herden, bei denen mehr als ein Stamm gefunden wurde, dominierte jeweils ein Stamm, der von mehr als 66,6% der infizierten Tiere dieser Herde isoliert wurde (Joo et al., 2001).

In einer Reihe weiterer Untersuchungen wurden in den jeweiligen Beständen verschiedene *S. aureus* Stämme durch unterschiedliche Methoden differenziert. In den meisten Arbeiten wurden drei bis vier Stämme pro Herde ermittelt (Baumgartner et al., 1984; Mackie et al., 1987; Matthews et al., 1992; Matthews et al., 1994; Lam et al., 1996b; Myllys et al., 1997; Rivas et al., 1997; Annemüller et al., 1999).

2.5.2 Umweltassoziierte Erreger

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

Mittels PCR und Serotypisierung konnten 30 *E. coli* Isolate von Fällen klinischer Mastitis in 16 verschiedene Stämme unterteilt werden (Lipman et al., 1995).

Die Differenzierung von 50 *Sc. uberis* Stämmen, die in 4 Betrieben isoliert wurden, ergab 35 voneinander zu unterscheidende DNA fingerprint Muster (RFLP = restriction fragment length polymorphism), wobei maximal 2 Isolate einem identischem Subtyp zuzuordnen waren (Jayarao et al., 1993).

In einer weiteren Untersuchung zeigte die Genotypisierung der chromosomalen DNA von 69 *S. uberis* Isolaten mittels PFGE, dass die meisten Isolate nicht miteinander verwandt sind.

Hierbei wurden aus 26 Betrieben von 57 Tieren insgesamt 69 *S. uberis* Isolate gewonnen, die 55 verschiedene DNA-Muster aufwiesen (Khan et al., 2003).

Mittels PFGE wurden *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis* Isolate, die aus Milchproben von subklinischen und klinischen Mastitiden in verschiedenen Herden gewonnen wurden, verschiedenen Genotypen zugeordnet. Sowohl innerhalb einer Herde als auch zwischen den Herden konnte eine große Heterogenität der Stämme beobachtet werden. Hierbei konnte nur im Fall von *Sc. dysgalactiae* derselbe Genotyp in unterschiedlichen Herden nachgewiesen werden (Baseggio et al., 1997).

2.5.3 Probleme bei der Genotypisierung und epidemiologischen Einordnung

In neueren Untersuchungen, die mittels Genotypisierungen Rückschlüsse auf die Epidemiologie von verschiedenen Mastitiserregern ziehen wollten, konnte die eindeutige Einteilung in kontagiöse und umweltassoziierte Erreger nicht immer bestätigt werden.

So wurden in 9 Milchviehherden 625 *S. aureus* Isolate aus intramammären Infektionen, von bovinen Hautverletzungen und Melkpersonal gewonnen und mittels Phagen- und Ribotypisierung unterschieden. In allen Herden dominierten im Verlauf der eineinhalb- bis zweijährigen Untersuchung jeweils einige wenige Stämme. Andere Stämme traten nur sporadisch auf. Die Stämme, die vom Melkpersonal isoliert wurden, zählten nicht zu den zahlenmäßig vorherrschenden Stämmen. Hieraus wurde geschlossen, dass einige *S. aureus* Stämme, die Mastitiden verursachen, kontagiöser und persistierender sind als andere (Larsen et al., 2000).

Auch in einer weiteren Untersuchung konnten verschiedene *S. aureus* Isolate mit unterschiedlichen Übertragungsraten gefunden werden. Auch waren bestimmte Managementmaßnahmen

zur Kontrolle von intramammären Infektionen mit *S. aureus* bei bestimmten Stämmen wirksam, während sie bei anderen Stämmen versagten (Smith et al., 1998).

Nach einer Untersuchung von Gillespie et al. (1999) unterschieden sich *S. aureus* Stämme, die aus Färsen und Erstkalbinnen isoliert wurden, von denen, die bei pluriparen Tieren gefunden werden konnten. Hierbei waren die Stämme, die bei pluriparen Tieren gefunden wurden, alle identisch. Von Färsen und Erstkalbinnen isolierte Stämme teilten sich in drei Genotypen, von denen zwei zahlenmäßig stark dominierten (insgesamt 94%). Diese beiden aus Milch- und Tupferproben aus dem Strichkanal von Färsen gewonnenen unterschiedlichen *S. aureus* Stämme entsprachen denen, die aus im Stallbereich vorhandenen Fliegen isoliert werden konnten. Sie unterschieden sich jedoch von dem Stamm der älteren Tiere. Nur 5% der aus Färsen isolierten Stämme entsprachen dem Stamm, der aus multiparen Tieren isoliert wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Fliegen eine wichtige Rolle in der Übertragung von *S. aureus* bei Färsen und Erstkalbinnen übernehmen (Gillespie et al., 1999).

In einer weiteren Untersuchung wurden sechs verschiedene Milchviehherden über einen Zeitraum von 8-20 Monaten beobachtet und einem Hygieneprogramm zur Kontrolle von Intramammären Infektionen mit *S. aureus* unterworfen. Gefundene *S. aureus* Isolate wurden mittels Phäno-, Geno- und Antibiogrammtypisierung verschiedenen Stämmen zugeordnet. In drei Herden, die zum Studienbeginn eine hohe *S. aureus* Prävalenz aufwiesen, konnten jeweils dominierende Stämme von *S. aureus* isoliert werden. Die im Hygieneprogramm festgelegten Maßnahmen zur Kontrolle kontagiöser Erreger zeigten in diesen Herden im Laufe der Studie deutliche Erfolge in Form einer deutlichen Reduktion der Neuinfektionsrate bei Erstkalbinnen und Altkühen und fast vollständiger Verdrängung von *S. aureus* aus den Herden. In den drei anderen Betrieben war die *S. aureus* Prävalenz zu Studienbeginn eher niedrig. Die hier gefundenen *S. aureus* Isolate wiesen eine hohe Heterogenität auf, es ließ sich kein dominierender Stamm identifizieren. Die Maßnahmen des Hygieneprogramms führten in diesen Herden nicht zum gewünschten Erfolg. Die Neuinfektionsrate stieg im Verlauf der Studie sogar an. Hieraus wurde geschlossen, dass unterschiedliche Stämme sich in ihrer Tendenz zu streuen und ihrer Fähigkeit, Euterviertel zu infizieren, unterscheiden: In drei der Herden fand sich jeweils ein dominierender Stamm, der sich epidemiologisch wie ein kontagiöser Erreger verhielt, das epidemiologische Verhalten der Stämme, die aus den drei anderen Herden isoliert wurden, entsprach eher dem umweltassoziierten Erreger (Sommerhäuser, 2001; Sommerhäuser et al., 2003).

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass etwa 4 % der Färsen zum Zeitpunkt der Abkalbung mit *S. aureus* infiziert sind. Hierbei kann der Erreger nicht beim Melkprozess übertragen worden sein (Hoedemaker, 1995; Roberson, 1998)

Die Ergebnisse einer Untersuchung zur Epidemiologie von *Sc. uberis* legen nahe, dass der Ausbruch der *Sc. uberis* Mastitiden in diesem Betrieb auf kontagiöse Übertragung zurückzuführen war (Zadoks et al., 2001), obwohl *Sc. uberis* ansonsten wie *E. coli* zu den umweltassoziierten Erregern gezählt wird. In der Untersuchung hatten Viertel, die bereits zuvor eine *Sc. uberis* Infektion hatten, eine größere Neuinfektionsrate mit *Sc. uberis* als Viertel, die zuvor mit anderen Erregern infiziert waren (Zadoks et al., 2001). In sechs verschiedenen Betrieben in Neuseeland konnten 128 *Sc. uberis* Isolate gewonnen werden. Mittels REP (repetitive extragenetic palindromic) PCR und RAPD (random amplified polymorphic DNA) PCR konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der Isolate zu nur einem Genotyp gehörte, was auf eine kontagiöse Verbreitung des Erregers schließen lässt (Wieliczko et al., 2002).

Für *E. coli* sind wiederkehrende klinische Mastitiden bei einer Kuh, die eine persistierende IMI durchmacht, bekannt, werden jedoch als Ausnahme betrachtet (Hogan et al., 1989a; Lam et al., 1996b). In einer Studie konnten die gleichen *E. coli* Stämme aus Vierteln mit wiederkehrenden klinischen *E. coli* Mastitiden isoliert werden. Wegen der Heterogenität der *E. coli* Stämme in der Umwelt war eine erneute Infektion mit dem gleichen Stamm unwahrscheinlich, was nahe legt, dass die Erreger im Wirt überlebten und eine persistierende Infektion auslösten (Lipman et al., 1995). Auch Döpfer und Mitarbeiter (1999) konnten aus 4,8% aller untersuchten wiederkehrenden klinischen Mastitiden durch *E. coli* denselben Stamm isolieren, der zuvor eine klinische Mastitis ausgelöst hatte. Auch auf die Übertragung eines Stammes auf verschiedene Viertel eines Tieres wird hingewiesen (Döpfer et al., 1999).