

Abschlussbericht Projekt „MastiScreen“

Entwicklung eines Verfahrens zur Überwachung des Vorkommens von kuhassoziierten Mastitiserregern in Milchviehherden mit AMS

A Kurzdarstellung

Ausgangssituation und Bedarf, Zielstellung

Euterinfektionen sind immer noch eine der größten Herausforderungen in der Milchviehhaltung – sowohl ökonomisch als auch in ihrer Häufigkeit und das Tierwohl betreffend. Infektionen mit kuhassoziierten Mastitiserregern, dazu zählen *Streptococcus (Sc.) agalactiae* (Gelber Galt), *Streptococcus dysgalactiae* sowie *Staphylococcus (S.) aureus*, sind in den letzten Jahrzehnten durch verschiedenste Maßnahmen zurückgedrängt worden. Neben dem Engagement der Landwirte und ihrer betreuenden Tierärzte haben auch die Beratungen durch den Thüringer Tiergesundheitsdienst (TGD) und den Thüringer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V. (TVL, neu: Qnetics GmbH) zu diesem Status beigetragen.

Mit zunehmender Verbreitung automatischer Melksysteme (AMS) steigt jedoch das Risiko, dass sich die kuhassoziierten Mastitiserreger in den Beständen wieder ausbreiten, wie verschiedene Studien (Ruf et al., 2015, Piepers et al. (2014) als auch Beobachtungen des Thüringer Tiergesundheitsdienstes zeigten. Daneben wird die Probennahme zur bakteriologischen Untersuchung aufgrund des AMS häufig erschwert und somit möglicherweise die Diagnostik verzögert.

In einer Schweizer Studie (Ruf et al., 2015) konnte gezeigt werden, dass auch in AMS-Betrieben die bewährten, oben bereits aufgeführten Maßnahmen der Mastitisbekämpfung die Mastitisproblematik und damit die Zellzahl positiv beeinflussen können. Jedoch ist es dazu erforderlich, chronisch infizierte Kühe durch gezielte Untersuchungen zu erkennen. Ziel des Projekts war es deshalb, durch eine gezielte Kombination molekularbiologischer und kultureller Untersuchungsverfahren ein System zu entwickeln, mit dem auch in Herden mit AMS eine am Erregernachweis orientierte Untersuchungsroutine etabliert werden kann und dem Landwirt ermöglicht, eine Zunahme von Infektionen mit kuhassoziierten Mastitiserregern in der Herde frühzeitig erkennen zu können und geeignete Gegenmaßnahmen ergreifen zu können.

Allgemeine Daten zum Projekt

Mitglieder der Operationellen Gruppe:

- **Agrarprodukte Ludwigshof eG**
Milchproduktion ohne AMS, Bereitstellung der Tiere und dazugehöriger Daten zur Auswertung (nachfolgend abgekürzt als **ROC**)
- **Agrarproduktion GmbH & Co. KG Frauenprießnitz**
Milchproduktion ohne AMS, Bereitstellung der Tiere und dazugehöriger Daten zur Auswertung (nachfolgend abgekürzt als **FPN**)
- **Agrargenossenschaft Graitschen eG**
Milchproduktion mit AMS, Bereitstellung der Tiere und dazugehöriger Daten zur Auswertung, Probeneinsendung (nachfolgend abgekürzt als **GRA**)
- **Agrargesellschaft Griesheim mbH**
Milchproduktion mit AMS, Bereitstellung der Tiere und dazugehöriger Daten zur Auswertung, Probeneinsendung (nachfolgend abgekürzt als **GRI**)
- **Agrargenossenschaft Linda eG**
Milchproduktion mit AMS, Bereitstellung der Tiere und dazugehöriger Daten zur Auswertung, Probeneinsendung (nachfolgend abgekürzt als **LIN**)
- **Thüringer Tierseuchenkasse, AdöR**
Tiergesundheitsdienst (TGD) + TGD-Labor; Durchführung der Bestandsuntersuchungen mit Milchprobenentnahme, Evaluierung der Probenaufbereitung (Poolung) für PCR-Untersuchungen, Implementierung des neu entwickelten Diagnostik- und Behandlungssystems in den Betrieben mit AMS, Bakteriologische und molekularbiologische Laboruntersuchungen, Datenauswertung, statistische Datenanalyse, Publikation

Die Bereitstellung der MLP-Proben im Rahmen der AP 1 und 3 vergab die Kooperation im Unterauftrag an den Thüringer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V. (TVL). Diese Einrichtung war mit der Durchführung der Milchleistungsprüfung in Thüringen beauftragt und verfügte über Entnahmesysteme für kuhindividuelle Gesamtmelkproben, wie sie für die Untersuchung auf Milchinhaltsstoffe im Rahmen der Milchleistungsprüfung benötigt werden. Aus diesen Proben wurden individuelle Einzelmilchproben entnommen, die für die molekularbiologischen Untersuchungen weiter aufbereitet wurden. Mit der Gründung der Qnetics GmbH im Jahr 2018 ging das operative

Projekt MastiScreen – 2017 LFE 0003

Geschäft des TVL auf dieses Unternehmen über. In Thüringen waren keine anderen Organisationen mit der Durchführung der Milchleistungsprüfung befasst.

Projektlaufzeit

01/2018 – 12/2020

Budget

Es wurde ein Zuschuss in Höhe von 213.238,44 € bereitgestellt, von welchem 183.941,69 € abgerufen wurden.

	Zuwendungsfähige Ausgaben gemäß Bewilligungsbescheid vom 11.06.2018	Förder- satz	gemäß Festsetzungsbescheid vom 29.03.2021
Personalausgaben	181.347,00	80 %	180.405,42
Gemeinkostenpauschale	27.202,05	80 %	27.060,81
Reisekosten	3.255,00	80 %	0
Externe Dienst- und Lieferleistungen	2.520,00	80 %	0
Ausgaben für Veröffentlichung	3.000,00	80 %	0
Ausgaben für projektbezogene Leistungen der Operationellen Gruppen agierenden Wissenschaftler, die in einem direkten Zusammenhang mit der Tätigkeit der Operationellen Gruppen stehen	49.244,00	80 %	22.460,89
Gesamt	266.548,05		229.927,12
Zuschuss	213.238,44		183.941,69
Eigenanteil	53.309,61		45.985,43

Ablauf des Vorhabens und Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Arbeitspakete (AP) des Projektes, deren zeitliche Abarbeitung und die Beteiligung der verschiedenen Kooperationspartner der operationellen Gruppe.

Tabelle 1

Zeitplan	Kooperationspartner	Arbeitspaket
Januar 2018 bis Juni 2018	Agrarprodukte Ludwigshof eG, und Agrarproduktion GmbH & Co.KG Frauenprießnitz	AP 1a Datenbereitstellung und Hilfestellung bei der klinischen Untersuchung und Probennahme
Januar 2018 bis Juni 2018	Thüringer Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst	AP 1b: Literaturrecherche, Bestandsuntersuchungen mit Milchprobenentnahme und bakteriologischer Untersuchung, Evaluierung der Probenaufbereitung für molekularbiologische Untersuchungen
Januar 2018 bis Juni 2018	Thüringer Tierseuchenkasse, TGD-Labor	AP 1c: Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen
Februar bis Juni 2019 Januar bis März 2020	Thüringer Tierseuchenkasse, TGD-Labor	AP1d: Durchführung der PCR-Untersuchungen an Milch-und MLP-Poolproben AP 1d: Nachuntersuchung mittels 2. PCR-Kit
Juli 2018 bis Dezember 2018	Agrarprodukte Ludwigshof eG, und Agrarproduktion GmbH & Co.KG Frauenprießnitz	AP 2a: Entnahme von Milchproben (Kolostralmilch, reife Milch), Datenbereitstellung
Juli 2018 bis Dezember 2018 August 2019	Thüringer Tierseuchenkasse, TGD-Labor	AP 2b: Literaturrecherche, Durchführung der Laboruntersuchungen im TGD-Labor (bakteriologische Untersuchung sowie Resistenztestung mittels MHK-Methode) Nachuntersuchung MHK

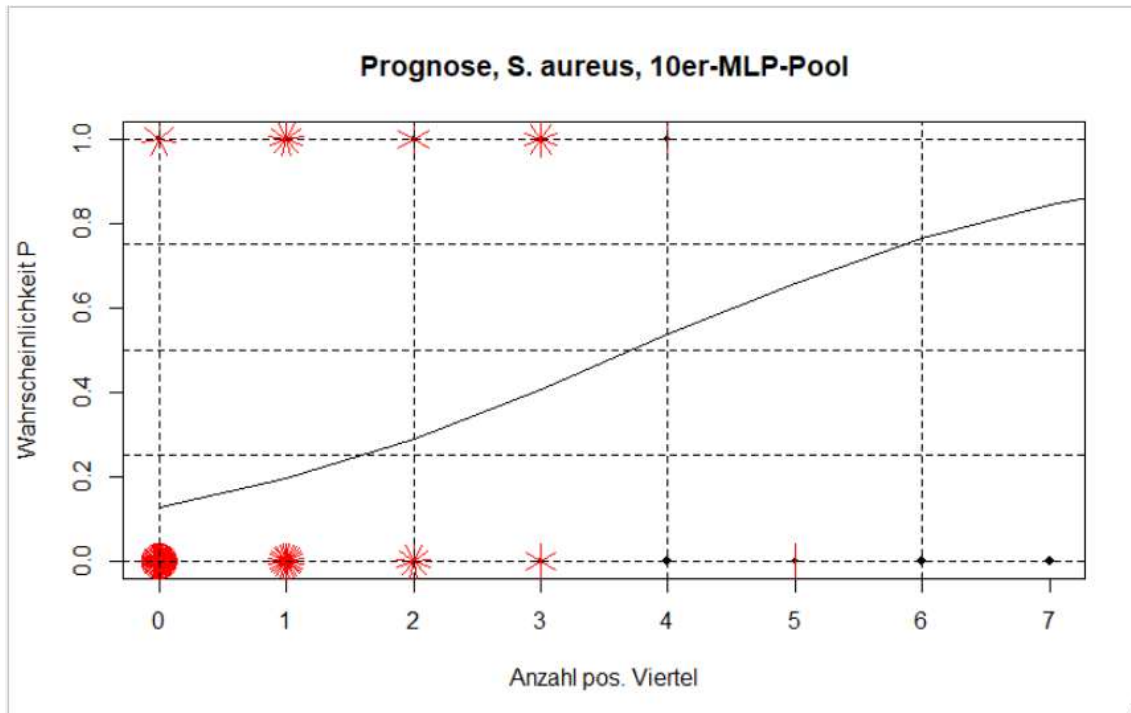
Projekt MastiScreen – 2017 LFE 0003

September 2019 bis Februar 2020	Agrargenossenschaft Graitschen eG, Agrargesellschaft Griesheim mbH, Agrargenossenschaft Linda eG	AP 3a: Implementierung des neu entwickelten Monitoringsystems, Datenbereitstellung, Probenahme
September 2019 bis Februar 2020	Thüringer Tierseuchenkasse, TGD-Labor	AP 3b: Durchführung der Laboruntersuchungen
September 2019 bis Februar 2020	Thüringer Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst	AP 3c: Implementierung und Überwachung des neu eingeführten Monitoringsystems in den Betrieben mit AMS sowie Beurteilung der Eutergesundheit
Juli 2018 bis Januar 2021	Thüringer Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst	AP 4: Datenerfassung, Datenauswertung, statistische Datenanalyse, Auswertung der Ergebnisse in den AMS-Betrieben, wissenschaftliche Publikationen

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die PCR-Untersuchung von gepoolten MLP-Proben erscheint wenig geeignet. Zwar ist der Nachweis des Genoms kuhassoziierter Erreger möglich, jedoch müssen dafür in 20er und 50er Pools eine größere Menge an positiven Milchproben enthalten sein. Eine akzeptable Detektionswahrscheinlichkeit wurde nur in den 10er MLP-Pools erreicht. Dies zeigt Abb. 1 beispielhaft für *S. aureus*: Um eine Detektionswahrscheinlichkeit von 80 % zu erreichen, müssen im Pool 6 bis 7 *S. aureus*-positive Proben (Euterviertel) enthalten sein.
- Die PCR an gepoolten aseptischen Viertelgemelksproben erzielte im Vergleich zu den MLP-Proben bessere Ergebnisse hinsichtlich der Detektionswahrscheinlichkeiten für alle kuhassozierten Erreger und kann in bestimmten Situationen für ein Bestandsmonitoring eingesetzt werden.
- Der Einsatz eines zweiten PCR-Kits eines anderen Herstellers führte zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Nachweisraten der kuhassozierten Mastitiserreger.

Abb. 1: Detektionswahrscheinlichkeit positiver MLP-Proben im 10er Pool mittels PCR am Beispiel des kuhassozierten Erregers *Staphylococcus aureus*. Ein Blütenblatt (Strich) stellt entweder ein negatives PCR-Ergebnis (untere Linie) oder ein positives PCR-Ergebnis (obere Linie) eines Pools dar.



- Kolostrum lässt sich im Labor trotz seiner teils recht hohen Viskosität gut verarbeiten und die bakteriologische Untersuchung ist problemlos möglich.
- Die kuhassozierten Mastitiserreger sowie andere Mastitiserreger konnten aus Kolostrum von Kühen aus beiden teilnehmenden Betrieben mittels bakteriologischer Untersuchung isoliert werden.
- Die Nachweisraten im Kolostrum waren bei *Sc. agalactiae* und *Sc. dysgalactiae* in beiden Betrieben höher im Vergleich zu Übergangsmilch und reifer Milch. Für *S. aureus* waren Nachweisraten in Kolostrum und reifer Milch vergleichbar.
- Bei der Kombination mehrerer Probenahmezeitpunkte (z. B. Kolostrum und reife Milch vom 5. Tag postpartum) sind die Nachweisraten für die kuhassozierten Mastitiserreger weiter zu steigern.
- Die Bestimmung der Resistenzlage der entsprechend isolierten Mastitis Erreger ist ebenfalls möglich, was Vergleiche des Resistenzspektrum jeweils zweier Isolate (aus Kolostrum und aus reifer Milch) der gleichen Tiere zeigen. Es wurden insgesamt 36 *S. aureus*-Isolate und *Sc. agalactiae*-Isolate verglichen (jeweils 2 Isolate von einer

Kuh). Eine Beeinträchtigung der Resistenzdiagnostik durch bakterizide Bestandteile des Kolostrums war nicht festzustellen. Für *Sc. dysgalactiae* war ein Vergleich der Resistenzlage aufgrund der geringeren Nachweisrate nicht möglich.

- Ein Monitoringsystem muss betriebsindividuell gestaltet werden. Entnahme von Kolostrumproben war in allen Betrieben möglich, zusätzliche Probenahmen unterschieden sich je nach den Gegebenheiten und Möglichkeiten in den Betrieben.
- Auch im Zuge des in drei AMS-Betrieben implementierten Monitoringsystems basierend auf den Ergebnissen der ersten beiden Arbeitspakete wurden betriebsabhängig ein bis alle drei kuhassoziierten Mastitiserreger im Kolostrum bzw. den Proben 3-5 Tage nach Kalbung nachgewiesen
- Auch wenn ein solches Monitoringprogramm betriebsindividuell gestaltet werden muss, ist die Untersuchung von Kolostrumproben ein Baustein mit beträchtlicher diagnostischer Aussagekraft in der Mastitisüberwachung und daher sowohl für Bestriebe mit konventionellem Melksystem als auch mit AMS uneingeschränkt zu empfehlen. Die bisherige Auffassung, dass Kolostrumproben für die bakteriologische Untersuchung auf Grund bakterizider Bestandteile des Kolostrums weniger geeignet seien, ist damit widerlegt.

B Eingehende Darstellung

Ausgangssituation und Projektaufgabenstellung

Infektionen des Euters mit kuhassoziierten Mastitiserregern wie *S. aureus*, *Sc. agalactiae* (Erreger des Gelben Galts) und *Sc. dysgalactiae* haben in den letzten Jahren deutlich abgenommen. Dies zeigen Zahlen der Thüringer Tierseuchenkasse von Proben, die im TGD-Labor untersucht wurden. So sank die Nachweisrate von *Sc. agalactiae* von 6,2 % in 1996 auf 3,7 % im Jahr 2007. Bei *S. aureus* ist dies noch deutlicher mit einer Reduktion von über 31 % von einer Nachweisrate von 68,6 % im Jahr 1996 auf 19,1 % im Jahr 2015. Bei *Sc. dysgalactiae* betrug die Nachweisrate im Jahr 2013 7,5 %, wohingegen sie im Jahr 2017 bei 6,3 % lag. Dieser positive Rückgang der Nachweisraten ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Auf der einen Seite ist hier eine Verbesserung der Melkhygiene zu nennen, die unter anderem durch verbesserte Euterreinigung, Zitzendesinfektion (Post-Dipping) und Melkzeugzwischeninfektion erreicht wurde. Ein weiterer Baustein in der Bekämpfung kuhassoziiertter Mastitiserreger sind strategische Sanierungsprogramme auf der Basis bakteriologischer Untersuchungen (BU), die Separierung, Therapie und Selektion entsprechender Tiere zur Folge haben. Zudem sorgt eine verbesserte Melktechnik (z.B. Zitzengummis, Vakuumstabilität) und deren Wartung für eine bessere Melkhygiene und damit weniger Infektionen mit den genannten Mastitiserregern. Als weitere Gründe für diese positive Entwicklung sind auch das Engagement der Thüringer Landwirte und ihrer betreuenden Tierärzte sowie das umfassende Beratungsangebot durch den Thüringer Tiergesundheitsdienst und die Qnetics GmbH (ehemals TVL) zu benennen.

Demgegenüber steht nun ein erhöhtes Risiko der Wiederverbreitung kuhassoziiertter Erreger in den Beständen durch eine zunehmende Verbreitung automatischer Melksysteme. Eine Schweizer Studie von Ruf et al. aus dem Jahr 2015 zeigte eine rasche Verbreitung von *S. aureus* in einem Milchviehbetrieb nach der Einführung eines automatischen Melksystems. Auch die Tatsache, dass in Herden mit AMS eine substantiell höhere Bakterienzahl in der Tankmilch gezählt wurde als in Herden mit herkömmlichen Melkständen spricht dafür, ein AMS als grundsätzliche Risikoquelle für bakterielle intramammäre Infektionen anzusehen (Piepers et al., 2014). Eine Untersuchung von Jørgensen et al. (2016) konnte zeigen, dass für *Sc. agalactiae* nicht nur das Euter, sondern auch der Gastrointestinaltrakt von Rindern ein Reservoir darstellen. Dabei sind die wichtigsten Übertragungswege die Melkmaschine und orofäkale Infektionen, vermutlich über das Trinkwasser. Man kann schlussfolgern, dass solche Erregerreservoir

durch die bakteriologische Untersuchung von Milch bisher geringer erfasst worden sind als möglicherweise in der Realität, und sich somit Infektionen rasch wieder ausbreiten können.

Bei Nutzung eines AMS gibt es ebenfalls mehrere Risikofaktoren, die die Ausbreitung einer vorhandenen Infektion mit kuhassoziierten Mastitiserregern ihrerseits fördern können:

- Eine hohe Anzahl Kühe wird einem Melkbecher gemolken.
- Sensorische Veränderungen des Milchsekrets werden verzögert detektiert, da die visuelle Kontrolle des Vorgemelks wegfällt.
- Wegfall oder Reduktion routinemäßiger bakteriologischer Untersuchungen durch erschwerte Milchprobenentnahme
- Möglicher Ausfall der Melkbecherzwischeninfektion

Es konnte in der oben bereits genannten Studie von Ruf et al. (2015) allerdings auch gezeigt werden, dass die bewährten Mastitis-Bekämpfungsmaßnahmen hier ebenfalls greifen. Genannt seien hier Selektion chronisch infizierter Tiere, Separierung und Melkzeugzwischeninfektion. Dafür ist es essenziell, die chronisch infizierten Kühe bzw. Risikotiere zu erkennen.

An dieser Stelle setzt das Projektvorhaben an. Es sollte molekularbiologische und kulturelle Untersuchungsverfahren gezielt in einem Monitoringsystem vereinigen, welches in Herden mit AMS ein rechtzeitiges Erkennen von Problemsituationen ermöglicht und Landwirte und ihre behandelnden Tierärzte in die Lage versetzen

- eine Zunahme von Infektionen mit kuhassoziierten Mastitiserregern in der Herde zu erkennen,
- geeignete Gegenmaßnahmen wie Separierung, Therapie oder Selektion infizierter Kühe zum richtigen Zeitpunkt einzuleiten und
- gezielte metaphylaktische Maßnahmen durchzuführen und die Mastitisproblematik einzudämmen.

Jüngste Forschung in Hessischen und Thüringer Milchviehbetrieben haben gezeigt, dass man bei der Untersuchung von Tankmilchproben mittels PCR in der Lage ist, neue Infektionen mit kuhassoziierten Erregern nachzuweisen. Hierfür ist ein bestimmter Anteil infizierter Tiere für einen positiven PCR-Nachweis nötig (Soltau et al., 2017). Ein ähnliches Prinzip sollte mit dem vorliegenden Projekt an MLP-Proben evaluiert werden (Arbeitspaket 1). MLP-Proben werden in der Regel monatlich in jedem Milchviehbetrieb gewonnen, und würden so keine zusätzliche

Arbeitsbelastung für die Mastitisdiagnostik nach sich ziehen. Sie sind allerdings nicht aseptisch entnommen und deshalb nicht für eine kulturelle Erregeranzüchtung geeignet.

Ein weiteres Probenmaterial, das bis dato für die Mastitisdiagnostik nicht empfohlen, aber bei jeder Kuh ermolken wird, ist das Kolostrum. Es dient der Versorgung der neugeborenen Kälber u.a. mit Immunglobulinen und wird auch am AMS in der Regel im Beisein von Betreuungspersonal ermolken. In einigen Beständen ist die Kuh für die Kalbung abgesondert, und Kolostrum wird über ein anderes Melkverfahren gemolken. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Diagnostik an Kolostrum grundsätzlich möglich ist (Andrew, 2001, Houser et al., 2008, Stalder et al., 2014). Es sollte also geprüft werden, ob sich Kolostrum für den kulturellen Nachweis von kuhassoziierten Mastitiserregern und damit für die Identifizierung von Risikotieren eignet, welche ein Erregerreservoir für die Herde darstellen (Arbeitspaket 2). Zudem ermöglicht die direkte Erregeranzüchtung auch nachfolgend die Prüfung dessen Resistenzverhalten gegenüber Antibiotika. Hiermit wäre zum einen den gesetzlichen Vorschriften Rechnung getragen. Durch die Tierärztliche Hausapothekenverordnung (TÄHAV) ist unter bestimmten Bedingungen vorgeschrieben, dass die Verabreichung von Antibiotika nach Antibiogramm zu erfolgen hat, beispielsweise bei einem Einsatz von Fluorchinolonen oder Cephalosporinen der 3. und 4. Generation oder bei Wechsel eines Antibiotikums im Behandlungsverlauf. Zum anderen wird der fachgerechte Einsatz von Antibiotika gefördert, da beispielsweise die Resistenzsituation im Bestand regelmäßig überprüft wird und mehr Wirkstoffe mit schmalem Spektrum (z.B. Penicillin G) anstatt der sogenannten Reserveantibiotika eingesetzt werden. Außerdem werden abweichende Resistenzlagen erkannt, wie beispielsweise das Vorkommen von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Sämlingen (MRSA).

Bei *Sc. agalactiae* und *S. aureus* handelt es sich zudem um Zoonosen, was ihre Beobachtung und Bekämpfung auch im Sinne des Verbraucherschutzes bedeutsam macht.

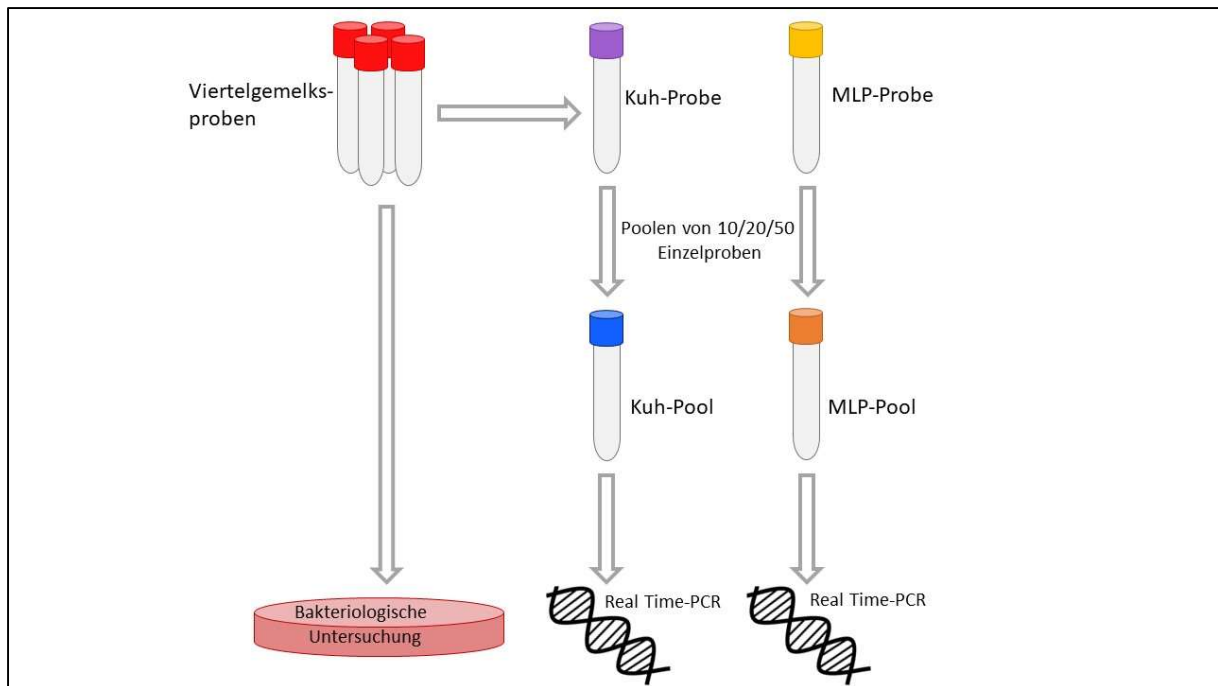
Letztendlich dient jede erkannte Mastitis oder Infektion bzw. jede verhinderte Mastitis oder Infektion dem Tierwohl, Tierschutz sowie auch der Herstellung eines qualitativ hochwertigen und sicheren Lebensmittels.

Projektverlauf und Ergebnisse

Schwerpunkt 1: Eignung der PCR-Methode zum Nachweis einer Ausbreitung kuhassoziierter Erreger in gepoolten MLP-Proben (Arbeitspaket 1)

Die Grundlage zur Bearbeitung der Fragestellung des Arbeitspakets waren Bestandsuntersuchungen zur Feststellung der Eutergesundheit bzw. Erkenntnisgewinn über die in den Beständen vorkommenden Mastitiserreger, mit Hauptaugenmerk auf die kuhassozierten Mastitiserreger. Es nahmen zwei Milchviehbetriebe der operationellen Gruppe an diesem Arbeitspaket teil. Die erste Bestandsuntersuchung wurde in der Agrarprodukte Ludwigshof eG im Februar 2018 an 984 Kühen durchgeführt. Dabei erfolgte die sterile Entnahme von Viertelanfangsgemelksproben jeder Kuh entsprechend der Leitlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) durch Tierärzte des Tiergesundheitsdienstes. Die Proben wurden unverzüglich zum TGD-Labor transportiert und bakteriologisch untersucht. Dabei wurde neben dem Direktausstrich von Milchproben auch deren Voranreicherung mittels Nährbouillon eingesetzt. Die bakteriologische Untersuchung erfolgte nach „Leitlinien zur Labordiagnostik der Mastitis - Probenahme und mikrobiologische Untersuchung“ der DVG (2018). Die Bestandsuntersuchung erfolgte zeitnah zur Milchleistungsprüfung (< 2 Tage). Die Proben der Milchleistungsprüfung des Betriebs wurden nach Bearbeitung durch die Qnetics GmbH zur Verfügung gestellt. Nach demselben Schema erfolgte eine Bestandsuntersuchung der MVA Frauenprießnitz im Juni 2018 an 928 Kühen und die Bereitstellung der MLP-Proben. Beide Betriebe stellten alle notwendigen Daten zur Tiererfassung bereit und gewährleisteten Hilfestellung bei der Probenentnahme. Anhand dieser beiden Bestandsuntersuchungen konnte die Prävalenz der kuhassozierten Mastitiserreger ermittelt werden. Dies stellte wiederum eine Referenzmethode dar anhand derer die PCR-Methode evaluiert wurde. Einen Überblick über den Ablauf des Arbeitspakets 1 gibt Abbildung 3.

Abb. 3: Ablaufschema für das Arbeitspaket 1



Es konnten insgesamt 7336 Viertelgemelksproben von 1912 Kühen untersucht werden. Alle kuhassoziierten Mastitiserreger waren in den beiden untersuchten Betrieben mit unterschiedlichen Prävalenzen endemisch verbreitet (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Prävalenz der kuhassoziierten Mastitiserreger und Anzahl positiver Kühe nach bakteriologischer Untersuchung

	FPN (n=928)		ROC (n=984)		Σ (n=1912)	
<i>S. aureus</i>	45	4,8%	113	11,5%	156	8,3%
<i>Sc. agalactiae</i>	13	1,4%	18	1,8%	31	1,6%
<i>Sc. dysgalactiae</i>	12	1,3%	20	2,0%	32	1,7%

Nach Abschluss der bakteriologischen Untersuchung wurden die Viertelgemelksproben jeder Kuh zu einer „Kuh-Probe“ vereint. Darauf erfolgte sowohl aus den MLP-Proben als auch aus den Kuh-Proben die Erstellung von Poolproben, die jeweils aus 10, 20 oder 50 Einzelproben (MLP- oder Kuh-Proben) zusammengesetzt waren. So war schlussendlich die Milch einer jeden Kuh in einem 10er, 20er und 50er MLP-Pool und auch Kuh-Pool enthalten. Ein Kuh-Pool enthielt dieselben Kühe wie ein MLP-Pool. So wurde eine direkte Vergleichbarkeit der beiden Poolarten gewährleistet. Es konnten 192 Pools zu 10 Proben, 95 Poole zu 20 Proben und 39 Poole zu 50 Proben erstellt werden (Abb. 4). Ein Pool wurde als positiv angesehen, wenn

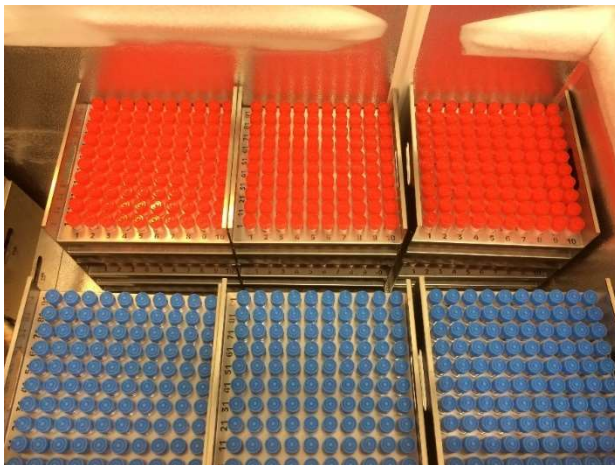
mindestens eine positive Kuh im Pool enthalten war. Eine Kuh war positiv, wenn mindestens ein Euterviertel in der bakteriologischen Untersuchung positiv für *S. aureus*, *Sc. agalactiae* oder *Sc. dysgalactiae* war. So ergaben sich letztlich 201 *S. aureus*-positive Kuh-Poole, 75 *Sc. agalactiae*-positive Kuh-Poole und 84 *Sc. dysgalactiae*-positive Kuh-Poole auf Grundlage der kulturellen Untersuchung und als Basis für den Vergleich mit der PCR-Methode.

Alle so erstellten Milchpoole (Kuh-Poole, MLP-Poole) wurden mittels real time-PCR auf das Genom der kuhassoziierten Mastitiserreger untersucht.

Abb. 4a: Erstellung der Kuh-Probe aus den Viertelgemelksproben und anschließend der Kuh-Poole (blauer Verschluss)



Abb. 4b: Poolproben (blauer Verschluss=Kuh-Poole, roter Verschluss=MLP-Poole) tiefgekühlt zur weiteren Analyse mittels Real Time-PCR



Um Einflüsse des verwendeten PCR-Kits bewerten zu können, wurden die Poole mit einem real time-PCR Kit eines zweiten Herstellers untersucht. Dazu wurde zu beiden Kits die Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der kuhassoziierten Mastitiserreger bestimmt und verglichen. Unter Einbeziehung der cut off-Angaben beider Hersteller, haben Sensitivität und Spezifität beider PCR-Kits vergleichbare Werte.

Die Wahrscheinlichkeit, einen der Mastitiserreger mittels PCR zu detektieren, ist in Tab. 3 für beide Probenarten und beide PCR-Kits aufgezeigt. Für einige dieser Kombinationen war im statistischen Modell keine Berechnung möglich, da die Nachweisraten der PCR limitiert waren und die verfügbaren Daten eine Kalkulation nicht zuließen. Generell lässt sich feststellen, dass für ein auswertbares PCR-Signal in gepoolten MLP-Proben mehr positive Kühe enthalten sein müssen als in den gepoolten Kuh-Proben. Dies gilt für alle kuhassoziierten Mastitiserreger, für jedes PCR-Kit und für jede der untersuchten Poolgrößen (Ausnahme: nicht kalkulierbare Detektionswahrscheinlichkeit). Beispielsweise müssen in einem 10er MLP-Pool rechnerisch 6,9 *S. aureus*-positive Kühe enthalten sein im Vergleich zu 4,1 *S. aureus*-positiven Kühen im 10er Kuh-Pool, um diesen Erreger mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,9 mit PCR-Kit I nachzuweisen. Für das PCR-Kit II sind entsprechend 5,3 positiven Kühe im MLP-Pool bzw. 2,8 positive Kühe im Kuh-Pool für eine Detektion nötig.

Für eine hohe Detektionswahrscheinlichkeit sind folglich vergleichsweise viele positive Kühe im MLP-Pool und auch Kuh-Pool notwendig. Für eine routinemäßige Anwendung zur Erregerdiagnostik in gepoolten MLP-Proben kann die PCR-Methode, unabhängig vom verwendeten Kit, daher nicht empfohlen werden. Hier stößt die an sich sehr sensitive PCR-Methode an ihre Grenzen. Durch die nicht aseptische Probengewinnung bei MLP-Proben sind mehr Störfaktoren enthalten, welche die Sensitivität des Nachweises senken. Zudem ist anzumerken, dass Milch an sich für einen PCR-Nachweis keine einfache Matrix darstellt, da diese Stoffe enthält, welche die Polymerasekettenreaktion behindern können.

Tab. 3: Schätzung der benötigten Anzahl positiver Kühe pro Pool zum Erreichen der gewünschten Detektionswahrscheinlichkeit

Erreger	Art des Pools	Poolgröße	PCR-Kit I				PCR-Kit II			
			0,5	0,75	0,9	0,95	0,5	0,75	0,9	0,95
<i>S. aureus</i>	MLP-Poole	10	3,1	5,0	6,9	8,2	2,6	4,0	5,3	6,2
		20	10,5	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
		50	8,8	23,7	38,5	48,6	2,7	nk	nk	nk
	Kuh-Poole	10	2,0	3,1	4,1	4,8	1,4	2,1	2,8	3,2
		20	3,0	4,6	6,3	7,4	4,9	7,8	10,8	12,8
		50	6,5	17,9	29,2	36,9	nk	6,1	12,9	17,6
<i>Sc. agalactiae</i>	MLP-Poole	10	1,3	1,6	1,9	2,2	1,1	1,5	1,8	2,0
		20	2,2	2,8	3,5	3,9	10,9	17,5	nk	nk
		50	9,0	13,7	18,3	21,5	4,9	7,5	10,1	11,8
	Kuh-Poole	10	0,9	1,2	1,5	1,7	0,8	1,1	1,4	1,6
		20	1,7	2,4	3,0	3,5	6,1	8,9	11,7	13,6
		50	2,8	4,8	6,8	8,2	0,9	1,8	2,8	3,4
<i>Sc. dysgalactiae</i>	MLP-Poole	10	1,1	1,5	2,0	2,3	1,2	1,6	2,0	2,3
		20	1,3	1,9	2,5	2,9	1,8	3,0	4,3	5,1
		50	2,1	3,6	5,0	6,0	2,6	3,3	4,0	4,5
	Kuh-Poole	10	0,6	0,9	1,3	1,5	0,7	1,0	1,2	1,4
		20	1,2	1,6	2,1	2,5	2,3	3,3	4,2	4,9
		50	1,0	1,9	2,7	3,3	0,7	1,2	1,7	2,0

nk – nicht kalkulierbar

In engen Grenzen kann die PCR für gepoolte aseptische Viertelgemelksproben zum Einsatz kommen. Ein Beispiel hierfür könnte eine Herdensanierung bezüglich *Sc. agalactiae* sein. Aus der bisherigen Entwicklung am Markt lässt sich ableiten, dass zukünftig die PCR-Methode preisgünstiger werden könnte, womit sich etwas mehr Einsatzmöglichkeiten in der Praxis eröffnen. Für die Identifikation von Risikotieren ist die PCR methodenbedingt nicht geeignet, da sie Erregergenom nachweist und man keinen Erreger anzüchtet. Somit ist nachfolgend keine Resistenztestung möglich, es sei denn sie basiert ebenfalls auf molekularbiologischen Methoden (beispielsweise Nachweis des *blaZ*-Gens von *S. aureus*). Dabei können jedoch nur bestimmte Resistenzgene nachgewiesen werden und es fehlen Informationen über die Expression dieser Gene und das weitere Resistenzspektrum. Eine PCR-Untersuchung gibt zudem keine Antwort auf die Frage, ob der nachgewiesene Erreger noch vermehrungsfähig ist.

Fazit:

Die PCR-Untersuchung von gepoolten MLP-Proben erscheint wenig geeignet. Zwar ist der Nachweis des Genoms kuhassoziierter Erreger möglich, jedoch müssen dafür in 20er und 50er Pools eine größere Menge an positiven Milchproben enthalten sein. Eine akzeptable Detektionswahrscheinlichkeit wurde nur in den 10er MLP-Pools erreicht.

In engen Grenzen kann die PCR für gepoolte aseptisch entnommene Viertelgemelksproben zum Einsatz kommen, beispielsweise im Rahmen eines Bestandsmonitorings.

Schwerpunkt 2: Eignung von Kolostrumproben zum Nachweis kuhassoziierter Mastitiserreger mittels bakteriologischer Untersuchung

Auch an der Durchführung dieses Arbeitspakets waren die beiden Milchviehbetriebe Agrarproduktion GmbH & Co. KG Frauenprießnitz (FPN) und Agrarprodukte Ludwigshof eG (MVA Rockendorf, ROC) beteiligt. Von Juli (Start in FPN) bzw. August (Start in ROC) bis November 2018 wurden von den abkalbenden Kühen Viertelgemelksproben durch die Mitarbeiter der Betriebe entnommen und per Kurier zum TGD-Labor geschickt. Das Ziel war, die Eignung von Kolostrumproben zur bakteriologischen Untersuchung auf Mastitiserreger zu testen. Dazu sollten von ein- und derselben Kuh Kolostrumproben (Tag der Kalbung/Tag 1) und daneben eine Viertelgemelksprobe vom zweiten Tag post partum (Übergangsmilch) sowie eine Probe vom 5. Tag p. p. (reife Milch) eingeschickt werden. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine Evaluierung der Kolostrumdiagnostik und auch die Nachverfolgbarkeit eines im Kolostrum nachgewiesenen Mastitiserregers. Die eingeschickten Proben waren entsprechend dem Entnahmezeitpunkt kodiert mit der Ohrmarke der Kuh und einem Buchstaben: a=Kolostrum, b=Tag 2 p. p., c=Tag 5 p. p. Die Proben wurden entsprechend der DVG-Leitlinien (siehe auch Arbeitspaket 1) bakteriologisch untersucht. Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Viertelgemelksproben eines Zeitpunkts zu einer Kuh-Probe gepoolt und zu jeder Kuh Pool a, b und c bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren (Abb. 5).

Abb. 5: Kolostrumproben, Übergangsmilch und reife Milch von Kühen zur weiteren Verarbeitung. Deutlich zu sehen ist die Gelbfärbung der Kolostrumproben (von links nach rechts handelt es sich bei der 1., 4., 7. und 10. Probe um Kolostrum)



Jede im Projektzeitraum kalbende Kuh durfte in die Studie eingeschlossen werden. Es kam aber vor, dass von einer Kuh nicht alle Proben zur Untersuchung gelangten. Gründe dafür waren beispielsweise antibiotische Behandlungen oder der Abgang der Kuh aus dem Betrieb. Insgesamt konnten von 568 Kühen Proben zu allen drei geforderten Zeitpunkten untersucht werden (274 aus Frauenprießnitz und 294 aus Rockendorf). Unter diesen Kühen waren insgesamt 171 Erstkalbinnen. Es konnten 2205 Euterviertel untersucht werden, darunter auch von Kühen mit drei oder weniger funktionierenden Eutervierteln. Da das Ausstreichen der Probe mit einem Glasstäbchen erfolgt und kein Pipettieren notwendig ist, funktionierte die Untersuchung im Labor trotz der hohen Viskosität des Kolostrums sehr gut. Neben den kuhassoziierten Erregern, die in den Kolostrumproben beider Betriebe nachgewiesen werden konnten, wurden auch andere Mastitiserreger aus Kolostrum isoliert. Im Folgenden wird ein Überblick gegeben: *S. aureus*/Koagulase-positive Staphylokokken (nachfolgend wird *S. aureus* synonym verwendet), Koagulase-negative Staphylokokken, *Sc. agalactiae* (Erreger des Gelben Galts), *Sc. dysgalactiae*, *Sc. uberis*, *Trueperella pyogenes*, *E. coli*, Aesculin-positive Streptokokken, koliforme Bakterien, Corynebakterien und *Enterococcus spp.*

Für die Auswertung der kuhassoziierten Mastitiserreger wurden die Ergebnisse zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten A, B und C jeweils mit einer Zahl codiert: 1=nicht nachgewiesen, 2=nachgewiesen. Dies führt für jedes Viertel bzw. jede Kuh zu einer dreistelligen Ergebnisnummer, wie in Tab 4 dargestellt.

Tab. 4: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung kuhassoziierter Mastitiserreger in Kolostrum- bzw. Viertelgemelksproben auf beiden Betrieben (Chiffrierung des Nachweiscodes:

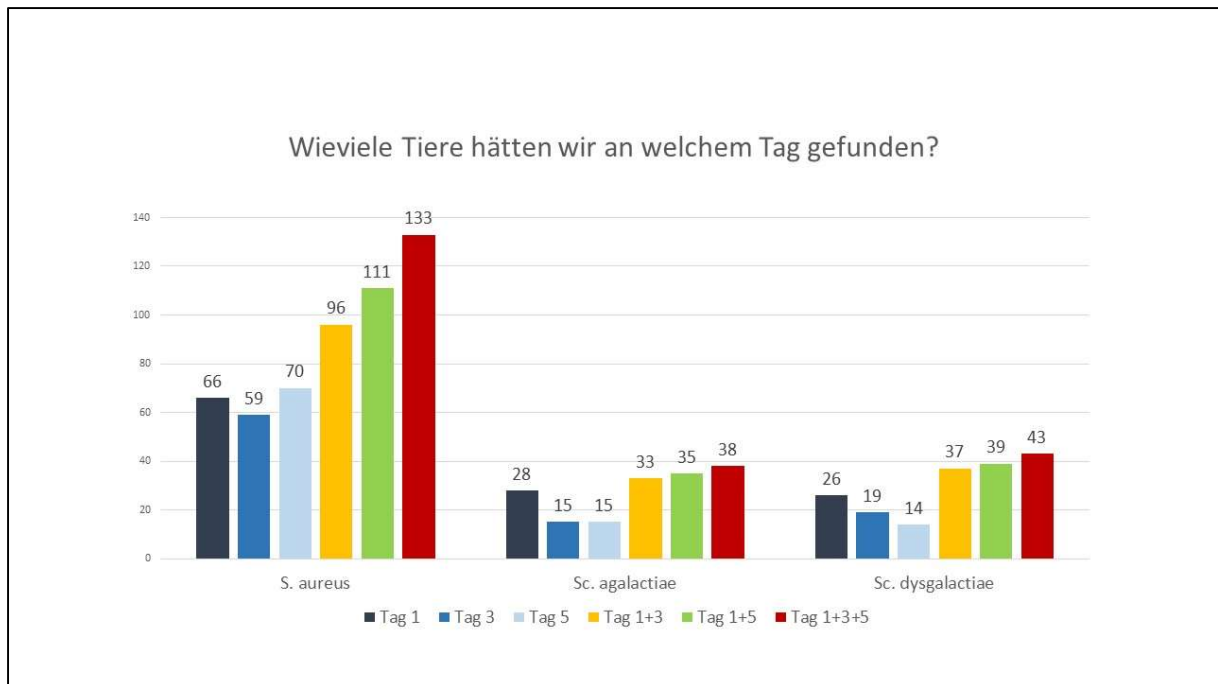
A = Kolostrumprobe, B = Probe der Übergangsmilch, C = Probe der reifen Milch, 1 = Erreger nicht nachgewiesen, 2 = Erreger nachgewiesen)

Nachweis- code	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
	FPN	ROC	FPN	ROC	FPN	ROC
111	965	1057	1016	1140	1020	1136
121	20	20	3	1	2	3
112	19	33	3	6	3	5
122	3	8	2	0	4	3
211	21	24	11	11	9	11
212	0	2	1	2	0	0
221	6	8	2	2	3	5
222	7	12	3	2	0	1
∑ Viertel	1041	1164	1041	1164	1041	1164

Mit der Ausnahme von *S. aureus* gilt, dass die höchste Anzahl positiver Nachweise im Kolostrum erreicht wurden. Dies wird hier mit der Chiffre 211 kodiert, also nur Nachweis des Erregers im Kolostrum und nicht in einer der beiden Folgeproben. Für *S. aureus* in ROC war die höchste Nachweisrate in reifer Milch mit 33 positiven Eutervierteln erreicht. Dennoch waren auch hier 24 Euterviertel nur im Kolostrum positiv, was der zweithöchsten Nachweisrate entspricht. Es lässt sich also schlussfolgern, dass in den teilnehmenden Betrieben kuhassozierte Mastitiserreger in Kolostrumproben sehr gut identifiziert werden konnten.

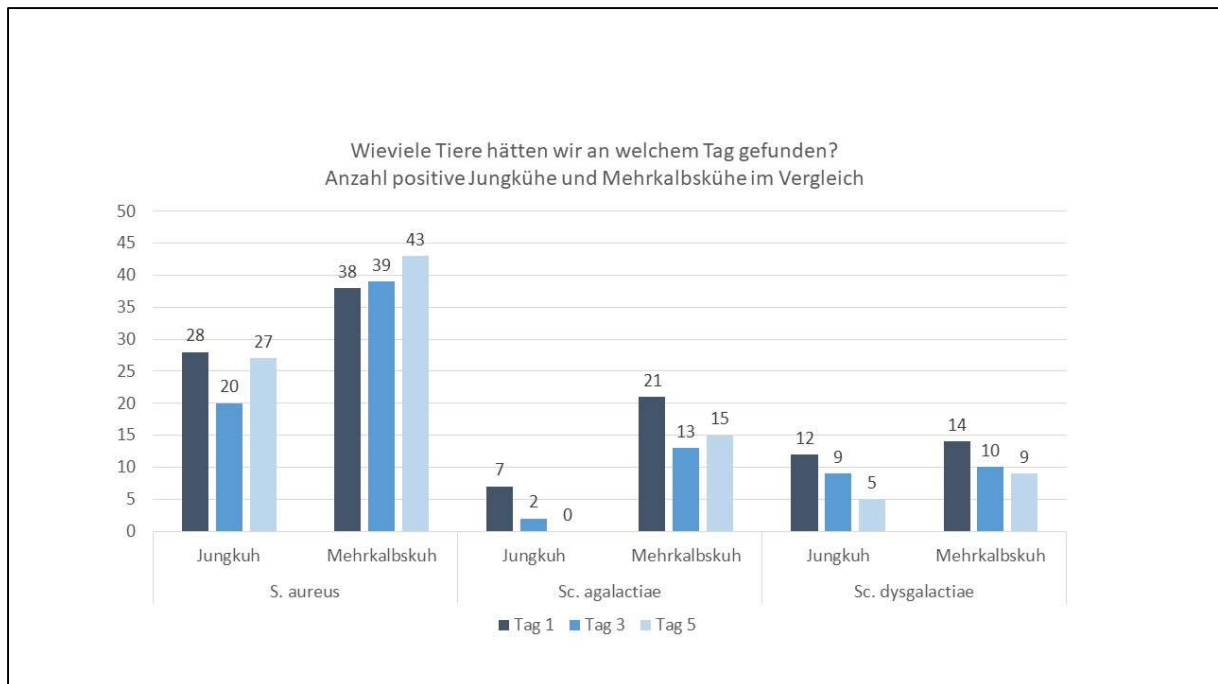
Dies zeigt auch Abbildung 6, wo die Nachweisrate auf Kuhebene dargestellt ist und auch die Kombination von Probenahmezeitpunkten dargestellt ist. Erwartungsgemäß lassen sich die Nachweisraten der einzelnen Mastitiserreger durch eine mehrmalige Probenahme deutlich steigern. Falls dies in einem Betrieb mit AMS möglich und praktikabel ist, ist es uneingeschränkt zu empfehlen und floss auch in die Empfehlungen zum Mastitismonitoring für das 3. Arbeitspaket ein.

Abb. 6: Nachweisraten der verschiedenen Probenahmezeitpunkte auf Kuhebene (Tag 1 = Kolostrum, Tag 3 = Übergangsmilch, Tag 5 = reife Milch)



Es stellte sich außerdem die Frage, ob die Ergebnisse von der Art des Trockenstellen beeinflusst sind, beispielsweise ob antibiotisches Trockenstellen einen Einfluss hat. Da die Angaben zum antibiotischen Trockenstellen nicht vollständig bzw. zu erfassen und auszuwerten waren, wurden zur Beantwortung der Fragestellung die Proben von Erstkalbinnen herangezogen. Diese haben in den Projektbetrieben keine antibiotische Trockenstellung ante partum erhalten. Die Ergebnisse von Erst- und Mehrkalbskühen sind vergleichend in Abbildung 7 dargestellt. Hier zeigt sich ein ähnliches Bild mit höchsten Nachweisraten im Kolostrum für den Erreger des Gelben Galts und für *Sc. dysgalactiae*. Bemerkenswert ist, dass auch für *S. aureus* bei den Jungkühen die höchsten Nachweisraten im Kolostrum zu finden sind. Aufgrund der im Vergleich zu den Mehrkalbskühen ähnlichen Verteilung der Nachweisraten ist zu schließen, dass die Verwendung eines antibiotischen Trockenstellers keinen oder nur geringen Einfluss auf Nachweisraten kuhassoziierter Mastitiserreger im Kolostrum im Vergleich zu Übergangsmilch oder reifer Milch hat.

Abb. 7: Nachweisraten kuhassoziierter Mastitiserreger bei Jungkühen und Mehrkalbskühen im Vergleich



Für die Bekämpfung der Mastitis im Bestand ist es bedeutsam, Kenntnis über das Resistenzverhalten des Erregers zu erlangen. Dies ist für die Therapie von entscheidender Bedeutung und wird auch gesetzlich gefordert. Würde man über die Untersuchung von Kolostrumproben nur Kenntnis der vorhandenen Erreger erlangen, aber nicht über deren Resistenzverhalten, wäre eine solche Diagnostik in der Praxis nicht zielführend.

Für die Frage, ob nach Anzüchtung eines Mastitiserregers aus Kolostrum die Bestimmung des Resistenzverhalten dieses Erregers ebenfalls möglich ist, wurden umfangreiche Untersuchungen vorgenommen. Prinzipiell ist die Anfertigung eines Antibiogramms von einem Erregerisolat möglich, unabhängig aus welcher Probenquelle. Um zu vergleichen, ob es sich um denselben Erregerstamm aus dem Kolostrum handelt und ob dessen Resistenzverhalten gleich ist, wurden Isolate getestet, die aus Kolostrum und reifer Milch derselben Kühe stammten. Nach dieser Bedingung konnten 36 *S. aureus*-Isolate von 18 Kühen und 10 *Sc. agalactiae*-Isolate von 5 Kühen verglichen werden. Für Isolate von *Sc. dysgalactiae* trafen die Vorbedingungen leider nicht zu, sodass dieser Erreger nicht getestet werden konnte. Die Isolate wurden mittels MHK-Methode, die im TGD-Labor etabliert ist, untersucht. Die Antibiotogramme zeigten für die beiden Isolate, die von jeweils einer Kuh stammen, jeweils identisches Resistenzverhalten im Hinblick auf die Einschätzung sensibel, resistent oder intermediär (siehe Abb. 8). Zudem war das Resistenzverhalten sowohl der *S. aureus*- also auch der *Sc. agalactiae*-Isolate als typisch für die Erreger einzuschätzen. Von einer Kuh wurde ein

phänotypischer MRSA isoliert, wobei dieser übereinstimmend aus Kolostrum und der reifen Milch stammte. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Erstellung eines AntibioGRAMMs aus Kolostrum möglich ist und dass es sich um dieselben Erregerstämme im Kolostrum und in der reifen Milch einer Kuh handelt. Dieses Ergebnis komplettiert die Eignung des Kolostrums als alternatives Probenmaterial in einem Mastitismonitoringprogramm.

Abb. 8: Ergebnisse der MHK-Untersuchungen beispielhaft für *S. aureus*-Isolate: S=sensibel, R=resistent (der rote Kasten zeigt den phänotypischen MRSA)

			401	402	403	405	406	407	409	410	411	412	413	419	420	421	422	424	426	432
			Amoxicillin	Amoxicillin/Clavulansä	Ampicillin	Cloxacillin	Oxacillin	Penicillin	Cefalexin	Cefazolin	Cefepim	Cefoperazon	Cefquinom	Danofloxacin	Enrofloxacin	Meropenem	Erythromycin	Tylosin	Pirlimycin	Cefalexin/Kanamycin
			A10	30. Aug	AMP1C	CX5	OX5	P10	CL30	KZ30	CPR30C	FP30C	EQ30C	DFX5	ENR5		E15	TY30	PIR2	X15/K30
Eingangs-Nr	Kennzeichen	Erreger	401	402	403	405	406	407	409	410	411	412	413	419	420	421	422	424	426	432
2019-04295	1603489537a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489537c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489683a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489683c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489856a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489856c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603600696a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603600696c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603600807a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603600807c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603661211a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603661211c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603664167a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603664167c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489696a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489696c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489699a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603489699c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04295	1603301660a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S
2019-04295	1603301660c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S
2019-04296	1603266672a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603266672c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603724027a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603724027c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603724097a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603724097c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603793521a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603793521c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603793642a mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019-04296	1603793642c mix	Staph. aureus/koag. pos Staph.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Fazit: Aufgrund der Ergebnisse wird die bakteriologische Untersuchung von Kolostrum zur Identifizierung von Infektionen mit kuhassoziierten Mastitiserregern uneingeschränkt empfohlen. Dies gilt auch für Betriebe ohne AMS. Die Ergebnisse belegen auch, dass andere Mastitiserreger mit der bakteriologischen Untersuchung im Kolostrum zu erfassen sind. Dies sollte in anderen Studien weiter erforscht werden. Für das Arbeitspaket 3 wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Einsendung einer Kolostrumprobe und zusätzlich – je nach dem betriebspezifischen Gegebenheiten - die Einsendung von einer Milchprobe im Zeitraum 3-5 Tage p. p. empfohlen.

Schwerpunkt 3: Implementierung eines Monitoringsystems in Betrieben mit AMS auf Basis der gewonnenen Ergebnisse zur Verbesserung der Eutergesundheit

Ziel des Projekts war, aufgrund der Ergebnisse aus den ersten beiden Arbeitspaketen ein Monitoringsystem zu entwickeln, dass zur Mastitisüberwachung in Betrieben mit AMS erprobt werden sollte. Aus Arbeitspaket 1 ergab sich, dass die Anwendung der PCR-Methode bei MLP-Proben nicht empfohlen werden konnte. Aus diesem Grund wurden im Arbeitspaket 3 keine Proben mehr mittels PCR untersucht.

Die Ergebnisse aus Arbeitspaket 2 waren vielversprechend. Die Betriebe sollten eine Kolostrumprobe einschicken. Zusätzlich konnten/sollten die Betriebe je nach ihren Möglichkeiten eine Milchprobe vom Zeitraum 3-5 Tage p. p. (im Folgenden als PP-Proben bezeichnet) einsenden. Dabei sollten auch Proben von trockenzustellenden Kühen eingesandt werden (TS), um das im Bestand etablierte Untersuchungsregime beizubehalten und um TS Proben mit PP Proben vergleichen zu können. Zusätzlich sollten auch klinisch an Mastitis erkrankte Kühe oder Kühe mit Sekretveränderungen der Milch bzw. Zellzallerhöhung (nachfolgend zusammengefasst als Laktationsproben) mit untersucht werden. Die korrekte Therapie sollte durch regelmäßige Erstellung von Antibiogrammen gewährleistet werden.

Die Proben wurden im Betrieb genommen und per Kurier zum TGD-Labor verbracht. Die bakteriologische Untersuchung schloss auch hier neben einem Standardansatz die Anreicherung mittels Nährbouillon ein. Für zwei Mastitiserreger je Betrieb und Monat wurde ein Antibiogramm mittels MHK-Methode angefertigt. Dabei wurden neben kuhassoziierten Mastitiserregern auch andere Euterpathogene berücksichtigt, beispielsweise *Streptococcus uberis*. Die Betriebe waren dabei angehalten, die antibiotische Behandlung strikt nach Antibiogramm durchzuführen.

Tab 5: Übersicht über die Anzahl Kühe, deren Proben durch die Kooperationspartner eingesandt wurden

Betrieb	Trockenstellerproben (TS)	Kolostrumproben (PP1)	PP 3-5	Laktiererproben	Anzahl untersuchte Viertel
GRI	207	415	387	119	4486
GRA	83	115	-	36	831
LIN	-	556	554	4	3763

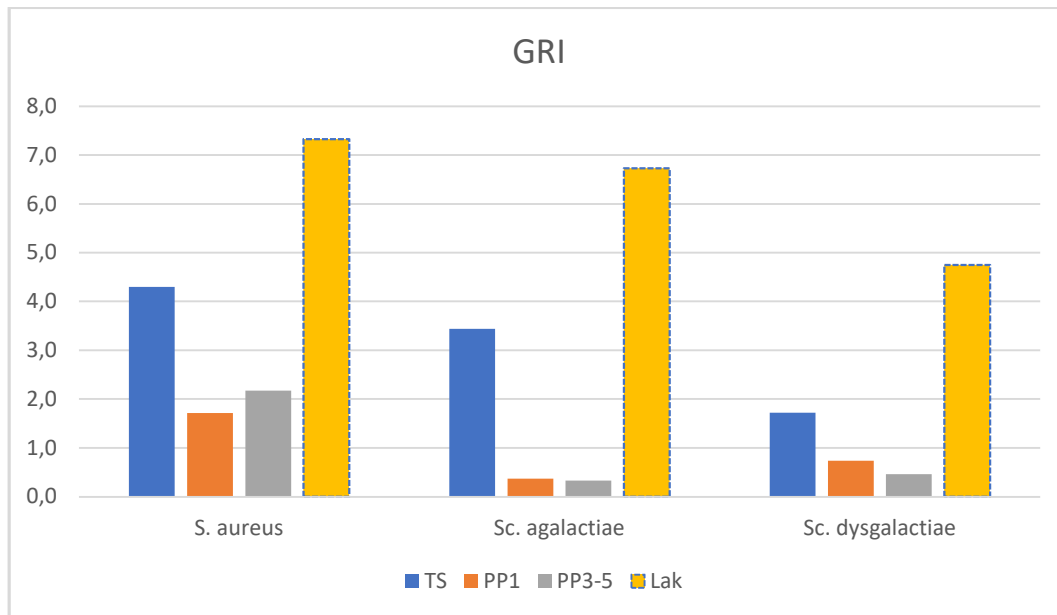
Wie Tabelle 5 zeigt, kommen durch die betrieblichen Abläufe oder Möglichkeiten unterschiedliche Kombinationen von Probenahmezeitpunkten zustande. Die Kolostrumproben wurden von allen Kooperationspartnern in großer Zahl eingeschickt. Dies verdeutlicht, dass ein Monitoringsystem von Betrieb zu Betrieb variiert und an die Gegebenheiten im Betrieb angepasst werden muss, um die Praxistauglichkeit und konsequente Anwendung zu gewährleisten. Aufgrund der bereits unterschiedlichen Probenahmezeitpunkte werden die Ergebnisse der Betriebe nicht zusammengefasst, sondern im Folgenden für jeden Einzelbetrieb besprochen. Um die Kommunikation der Ergebnisse während des Projekts kontinuierlich fortzuführen, erhielten die Betriebe auf Wunsch eine monatliche Ergebnisauswertung, die durch die verantwortliche Tierärztin des TGD erstellt wurde.

Insgesamt wurden im Rahmen des dritten Arbeitspakets 261 Antibiogramme angefertigt, davon 67 für kuhassoziierte Mastitiserreger.

Betrieb 1 (GRI, Abb. 9)

Die drei kuhassoziierten Mastitiserreger wurden in allen Probenarten auf dem Betrieb nachgewiesen, wie in Abbildung 10 dargestellt. Dabei ist die Nachweisrate bei den von Laktierern stammenden Proben gesondert zu betrachten. Diese Proben wurden aufgrund einer Sekretveränderung bzw. klinischer Symptome ausgewählt und erbringen deshalb naturgemäß höhere Nachweisraten. Die höchsten Nachweisraten bei Proben von asymptomatischen Tieren sind bei den Trockenstellproben festzustellen. Jedoch auch im Kolostrum konnte ein Anteil der kuhassoziierten Erreger gefunden werden. Wie bereits im Arbeitspaket 2 bezüglich *S. aureus* festgestellt, wurde dieser Erreger bei den PP3-5 Proben häufiger nachgewiesen als im Kolostrum.

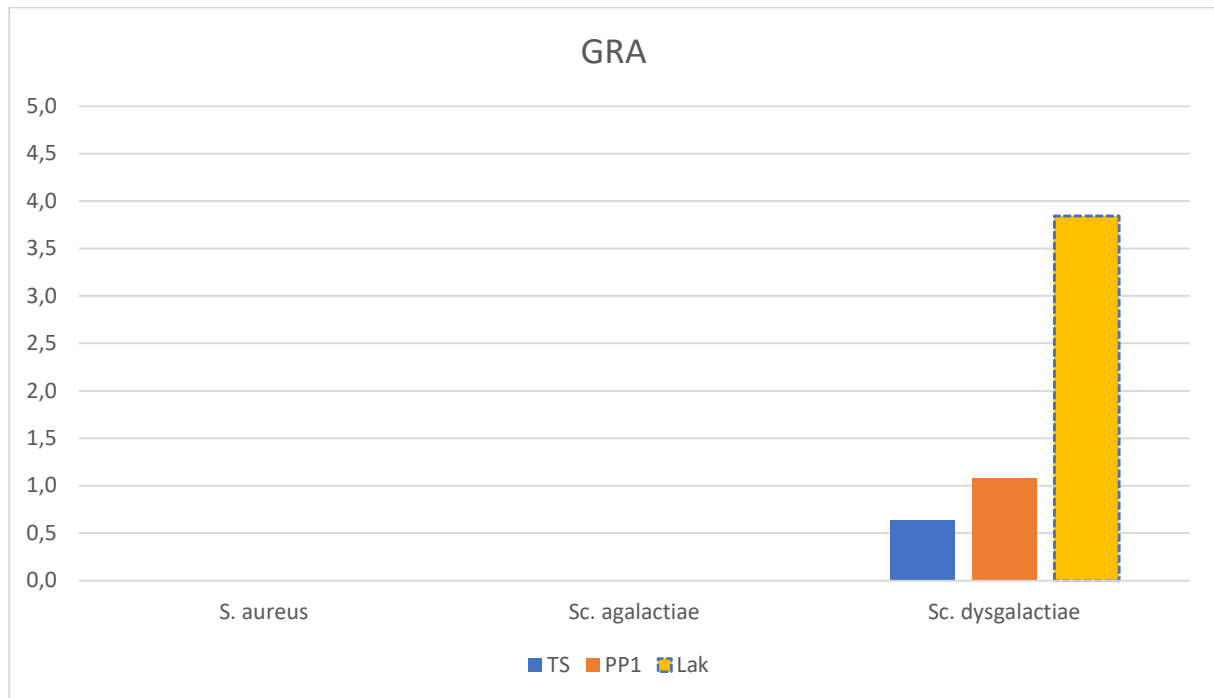
Abb. 9: Prozentuale Nachweise der kuhassozierten Mastitiserreger, Agrargesellschaft Griesheim mbH



Betrieb 2 (GRA, Abb. 10)

In diesem Betrieb wurden *S. aureus* und der Galterreger (*Sc. agalactiae*) nicht nachgewiesen. Offenbar spielte hier nur *Sc. dysgalactiae* als kuhassoziierter Mastitiserreger eine Rolle. Auch hier müssen die Laktiererproben aufgrund ihrer Stellvertreterrolle für kranke Tiere extra betrachtet werden. Generell lag die Prävalenz selbst für *Sc. dysgalactiae* niedrig (0,63 % bei den TS Proben bzw. 1,08 % in Kolostrum Proben). Ausgehend von den Ergebnissen der anderen beiden Betriebe ist anzunehmen, dass man einen Neueintrag von *S. aureus* und Galtgut mittels Kolostrumproben hätte erkennen können.

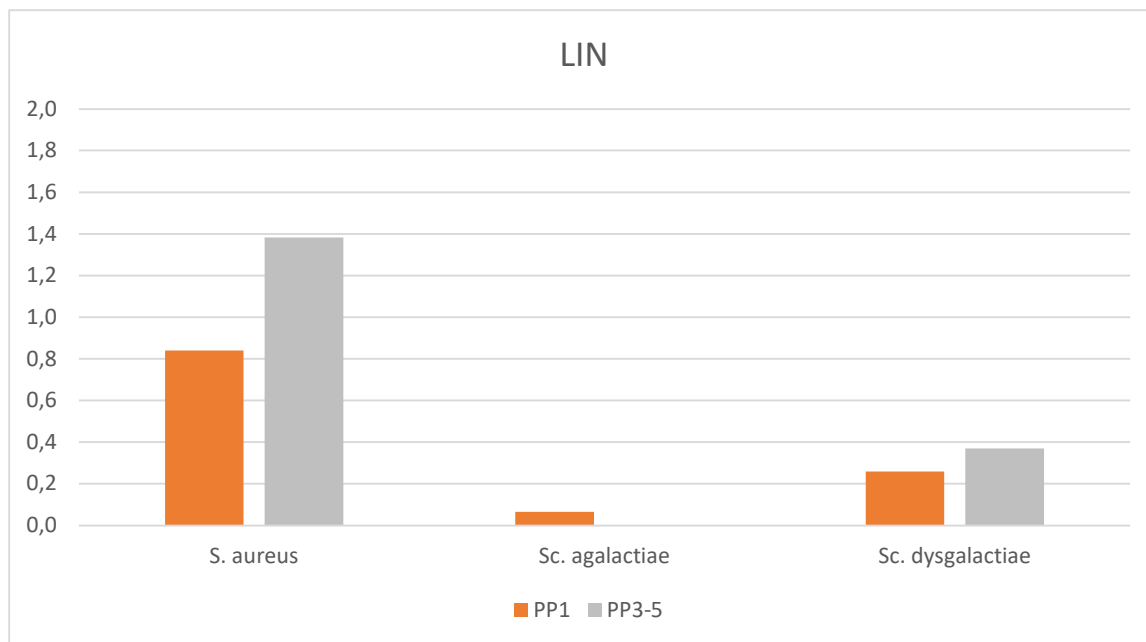
Abb. 10: Prozentuale Nachweise der kuhassoziierten Mastitiserreger, Agrargenossenschaft Graitschen e.G.



Betrieb 3 (LIN, Abb. 11)

Hier wurden alle drei kuhassoziierten Mastitiserreger im Kolostrum nachgewiesen, insgesamt lagen die Nachweishäufigkeiten relativ niedrig. Wie im Arbeitspaket 2 bereits zu beobachten war, waren die Nachweisraten von *S. aureus* in den PP3-5 Proben höher als im Kolostrum. Dasselbe gilt für *Sc. dysgalactiae*, hier war der Unterschied zwischen Kolostrum und PP3-5 aber nicht so hoch. Galt wurde ausschließlich im Kolostrum nachgewiesen. Für diesen Betrieb kann jede der genannten Probenarten empfohlen werden, optimalerweise sollte eine Kombination aus beiden erfolgen. Im Hinblick auf den Galtnachweis sollte Kolostrum gewählt werden.

Abb. 11: Prozentuale Nachweise der kuhassoziierten Mastitiserreger, Agrargenossenschaft Linda e.G.



Für die Analyse der Eutergesundheit wurden die Zellzahlen aus der Milchleistungsprüfung der teilnehmenden Betriebe in drei Kategorien unterteilt:

Kategorie 1 – gesund – Zellzahl < 200.000 Zellen,

Kategorie 2 – erhöht – Zellzahl > 200.000 bis < 1.000.000 Zellen,

Kategorie 3 – „Millionäre“ – Zellzahl > 1.000.000 Zellen, jeweils pro ml Milch.

Der prozentuale Anteil der genannten Kategorien pro Betrieb und Monat ist in den Grafiken 13a bis c dargestellt. Die Darstellungen bilden den Zeitraum von März 2019 bis Juli 2020 ab, welcher 6 Monate vor Beginn des AP 3, den Zeitraum der Durchführung von AP 3 (September 2019 bis Februar 2020) und 5 - 6 Monate nach Ende des AP 3 umfasst. Insgesamt stellte sich die Verteilung der einzelnen Kategorien sehr konstant dar. Im Betrieb Griesheim stieg der Anteil von Tieren, die der Kategorie 1 zugeordnet werden konnten, von ca. 70 % auf knapp 80 % an. Der Anteil der „Millionäre“ schwankte in allen drei Betrieben leicht.

Abb. 12a-c: Verteilung der Zellzahlkategorien in den Betrieben

Abb. 12a

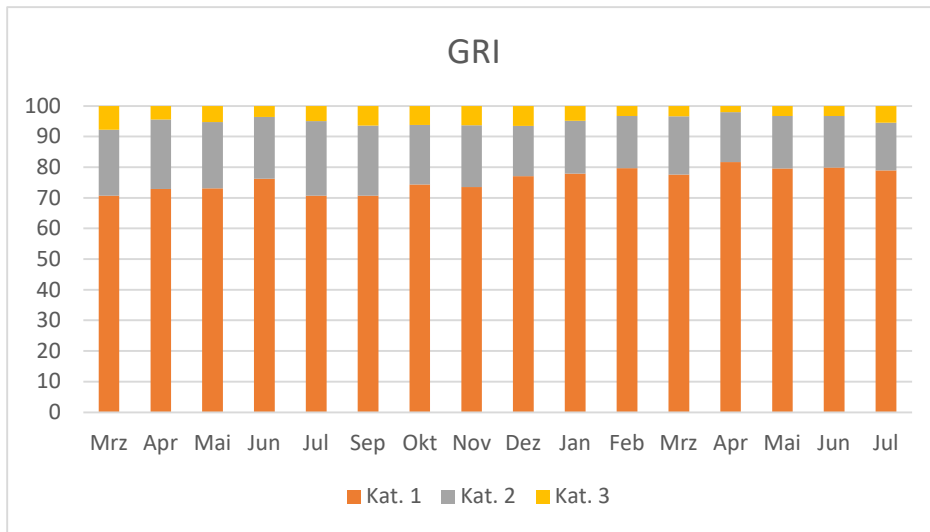


Abb. 12b

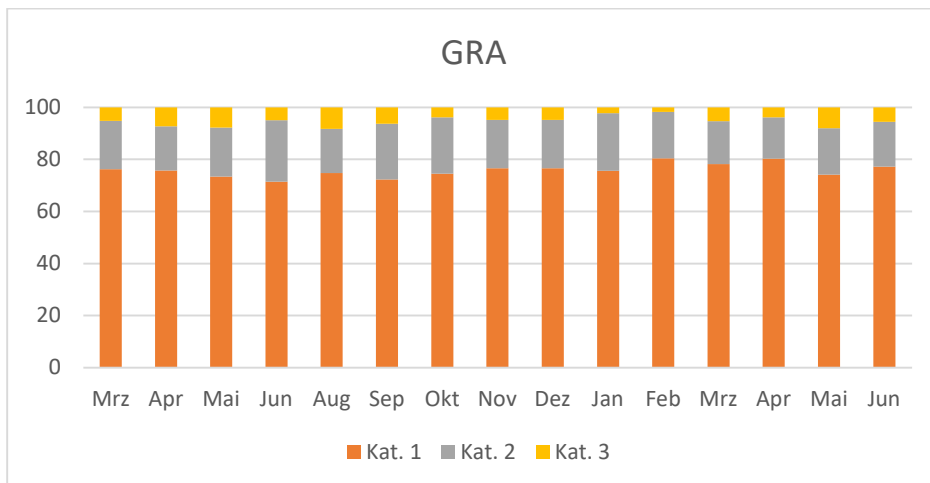
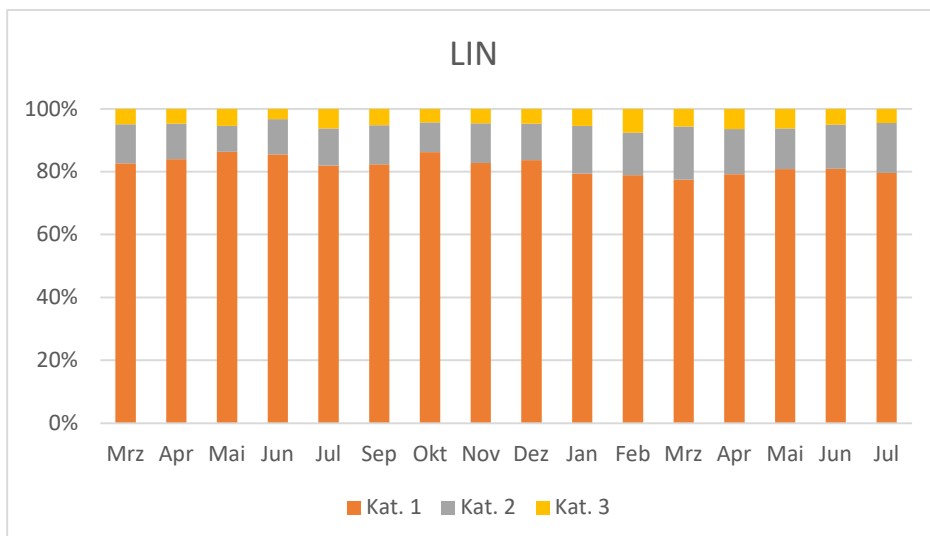


Abb. 12c



Die unmittelbare Wirkung des dritten Arbeitspakets auf die Eutergesundheit kann mittels der Zellzahlergebnisse allein nicht abschließend beurteilt werden. Im Verlauf der Durchführung von AP 3 zeigte sich in den Betrieben GRI und GRA, dass sich der Anteil der Kühe in Kategorie 1 (gesund – Zellzahl < 200.000 Zellen) von September 2019 bis Februar 2020 kontinuierlich erhöhte und der Anteil der Kühe in den anderen Klassen zurückging. Im Betrieb LIN war dieser Effekt nicht beobachten. Die Eutergesundheit ist nicht nur von dem Nachweis eines oder mehrerer kuhassoziiertes Erreger, sondern noch von sehr vielen weiteren Faktoren abhängig. Dies können beispielsweise andere Mastitiserreger, der generelle Gesundheitsstatus der Herde bzw. von Einzeltieren, die Fütterung, das betriebliche Management sowie Merzungs- und Therapiekonzepte sein. Zudem hatten die Betriebe schon vor dem Start des Projekts einen guten Status der Eutergesundheit erreicht, so dass sich eine weitere Optimierung, wenn, dann nur in Nuancen abbilden lässt. In allen Betrieben waren bereits Probenahme- und Untersuchungsschemata etabliert. Außerdem waren die genannten kuhassoziierten Erreger bereits als Pathogene in den untersuchten Herden manifest, es kam also nicht während des Projektzeitraums zu einem Neueintrag, der sich unter Umständen stärker auf die Zellzahl ausgewirkt hätte. Positiv zu beurteilen ist die Tatsache, dass sich die Eutergesundheit – gemessen der Zellzahl – in zumindest zwei Beständen positiv entwickelt hat.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich bei der Mastitisbekämpfung um ein komplexes Problemfeld handelt und jedes Bekämpfungsprogramm auch betriebsabhängig ist. So ist das Vorkommen der Mastitiserreger in jedem Betrieb anders. Beispielsweise erfolgte in GRA kein Nachweis von *S. aureus* und *Sc. agalactiae*. Umso wichtiger ist es, einen Neueintrag dieser Erreger zu verhindern bzw. ihre Wiederausbreitung im Bestand zu verhindern. Mit dem konsequenten Einsenden von Kolostrum oder PP3-5 Proben könnte dies gewährleistet werden. Zudem bietet eine kontinuierliche Überwachung den Vorteil, dass der Betrieb Kenntnis von der Erregerprävalenz hat und bei vermehrten Nachweisen entsprechend reagieren kann.

Im Betrieb LIN wurde der Galterreger nur in Kolostrumproben nachgewiesen. Hier konnte eine diagnostische Lücke geschlossen werden. In der Regel werden Galt-positive Kühe aus dem Bestand gemerzt, weil der Erreger sehr ansteckend ist und schwere Mastitiden verursacht. Ein Galtsanierungskonzept kann also durch die Verwendung von Kolostrumproben erweitert bzw. komplettiert werden.

In der Agrargesellschaft Griesheim mbH wurden die meisten Infektionen in Trockenstellproben nachgewiesen. Dies ist für den Betrieb ein sehr gutes Mittel zur Mastitisüberwachung. Wenn

einem Betrieb diese Probennahme jedoch nicht möglich ist, kann auf Proben nach der Kalbung gut ausgewichen werden.

Die Ergebnisse zeigen allerdings auch, dass es während der Laufzeit des dritten Arbeitspakets keine signifikante Ausbreitung eines kuhassoziierten Erregers in den teilnehmenden Betrieben gab. Eine solche wäre mit Sicherheit im Rahmen des dritten Arbeitspaket detektiert worden. Möglicherweise wurde eine Ausbreitung von in der Herde vorhandenen Mastitiserregern auch durch die Durchführung des Projekts verhindert. Dies lässt sich allerdings im Nachhinein nicht feststellen („Präventionsparadox“).

Zusammenfassung der Ergebnisse und abschließende Auswertung

Grundsätzlich schätzen die Kooperationspartner ein, dass die Durchführung des Projektes für alle Beteiligten einen betrieblichen Nutzen erbrachte und dass dessen Ergebnisse positiv bewertet werden können. Der besondere Mehrwert der operationellen Gruppe ergab sich aus der guten Zusammenarbeit innerhalb dieser. Jeder Kooperationspartner leistete seinen Beitrag zur Durchführung des Projektes (siehe unter Punkt Kurzdarstellung, Mitglieder der Operationellen Gruppe).

Wichtigstes Ergebnis ist für alle Beteiligten der Nachweis, dass Kolostrumproben als Baustein des Mastitismonitorings auch unabhängig vom vorhandenen Melksystem gut geeignet sind. So wurde von verschiedenen Betrieben, auch bei der Vorstellung des Projekts, zurückgemeldet, diese als Probenmaterial für eine Galtsanierung einsetzen zu wollen. Für das TGD-Labor ist dies eine wertvolle Erweiterung des diagnostischen Spektrums der Mastitisuntersuchung. Viele Bestände können nun davon profitieren, dass die Untersuchung von Kolostrumproben eine diagnostische Lücke schließt bzw. eine weitere Option für verfügbares Probenmaterial für das Mastitismonitoring darstellt.

Neben den kuhassoziierten Mastitiserregern konnte das TGD-Labor auch umweltassoziierte Erreger im Kolostrum nachweisen. Diese wurden nicht weiterverfolgt. Eine umfangreichere Prüfung der Tauglichkeit des Kolostrums auch für andere als die kuhassoziierten Mastitiserreger kann Ansatzpunkt weiterer Studien sein.

Ein wichtiges Nebenergebnis ist die Eignung von PP3-5 Proben, die einzeln oder in Kombination mit Kolostrumproben, je nach Möglichkeiten des Milchviehbetriebs, ebenfalls in ein Monitoringprogramm integriert werden können. Insbesondere für *S. aureus* wurden mit diesem Probenmaterial gute Nachweisraten erzielt. Ein Einsatz von PP3-5 Proben empfiehlt

sich dementsprechend vor allem, wenn *S. aureus* ein Leitkeim des Mastitisgeschehens in einem Bestand ist.

Der Tiergesundheitsdienst wird die Untersuchung von Kolostrumproben und auch PP3-5 Proben in zukünftigen Beratungen empfehlen. Zudem sollte erprobt werden, das Mastitismonitoring unter Einsatz dieser Probenarten für einen längeren Zeitraum durchzuführen und zu begleiten.

Die Kooperationspartner profitierten im Zuge der Projektdurchführung durch Kenntnis der im Bestand vorherrschenden Erreger sowie deren Resistenzsituation. Zudem wurden im Zuge des dritten Arbeitspakets durch die Projekttierärztin monatliche Auswertungen zur Eutergesundheit vorgenommen.

Damit wird mit einem Mastitismonitoring nicht nur das Tierwohl der Thüringer Milchkühe verbessert, sondern auch der Antibiotikaeinsatz reduziert. Die wirtschaftliche Situation der Milchviehbetriebe wird durch eine Stabilisation der Tiergesundheit und damit auch der Milchleistung von langlebigen Kühen gestärkt.

Die Anwendbarkeit der PCR-Methode an gepoolten MLP-Proben mit 10, 20 oder 50 Einzelproben wurde im Projekt geprüft. Bis auf den 10er MLP-Pool wurden keine zufriedenstellenden Nachweisraten erreicht. Von der Empfehlung der PCR-Methode für MP-Pools wird deshalb für die Praxis abgesehen. Die PCR-Methode wird jedoch ständig verbessert, automatisiert und auch preisgünstiger. Möglicherweise kann sie in naher Zukunft als Tool des Mastitismonitorings nochmals geprüft werden.

Grundsätzliche Schlussfolgerungen

Aus der Sicht unserer Kooperation hat sich die Bildung einer operationellen Gruppe im Rahmen der Europäischen Innovationspartnerschaft „Landwirtschaftliche Produktivität und Nachhaltigkeit“ (EIP Agri) als geeignet erwiesen, um die Innovation in der Landwirtschaftlichen Produktion voranzubringen. Die Zusammenarbeit landwirtschaftlicher Primärproduzenten (Agrarprodukte Ludwigshof eG, und Agrarproduktion GmbH & Co. KG Frauenprießnitz, Agrargenossenschaft Graitschen eG, Agrargesellschaft Griesheim mbH, Agrargenossenschaft Linda eG) mit dem Tiergesundheitsdienst der Thüringer Tierseuchenkasse als Dienstleister und Berater für die Landwirtschaft sowie dem TGD-Labor der Thüringer Tierseuchenkasse als Wissenschaftspartner war geeignet, Innovation zu generieren. Das betrifft in unserem Projekt vor allem die Evaluierung der kulturellen

Untersuchung des Kolostrums und Bestimmung der Resistenzsituation der daraus isolierten kuhassoziierten Mastitiserreger.

Kommunikations- und Disseminationskonzept

Die Ergebnisse des Projekts sollten auf Fachtagungen für Thüringer Landwirte und auf veterinärmedizinischen Fachtagungen veröffentlicht werden.

geplant:

29. April 2020, Weimar-Legefeld

11. Gemeinsame Fortbildung für Tierärzte der Thüringer Tierseuchenkasse und der Intervet Deutschland GmbH „Mastitisfrüherkennung – Eignen sich Kolostrumproben für die Mastitis-BU?“

(Dr. Katja Dittmar)

22. 06. 2020 45. Leipziger Laborfortbildung "Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung" der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig

"Mastitisfrüherkennung – Eignen sich Kolostrumproben für die Mastitis-BU?"

(Dr. Katja Dittmar)

17. 11. 2020 Erfurt, 24. Gemeinschaftstagung für Landwirte und Tierärzte

"Neue Ansätze der Mastitisüberwachung in Betrieben mit AMS"

(Dr. Katja Dittmar)

Leider wurden die aufgeführten Veranstaltungen aufgrund der Sars-CoV2 Pandemie ersatzlos abgesagt.

Durchgeführt:

17. 11. 2020 Erfurt, Projektvorstellung beim Bundesarbeitstreffen der Rindergesundheitsdienste/RGD-Ost?

"Entwicklung eines Verfahrens zur Überwachung des Vorkommens von kuhassoziierten Mastitiserregern in Milchviehherden mit AMS"

(K. Hruschka)

15. 03. 2021 Onlineveranstaltung, Fachforum Milch Thüringen 2021

"Eignung von MLP-Proben und Kolostrum als alternative Proben zur Mastitisüberwachung"

(K. Dittmar)

Weitere Vorträge sind geplant zur 46. Leipziger Laborfortbildung am 7./8. Oktober 2021 und zum Bundesarbeitstreffen der Rindergesundheitsdienste in Mecklenburg-Vorpommern im Jahr 2022.

Vorgestellt wurde das Projekt ebenfalls in den Geschäftsberichten der Thüringer Tierseuchenkasse zu den Geschäftsjahren 2018, 2019 und 2020 mit dem jeweiligen Stand.

Das im Projekt gewonnene Datenmaterial bietet nach eingehender Auswertung die Grundlage für mehrere wissenschaftliche Publikationen. Die ersten beiden Arbeiten werden in Kürze bei internationalen wissenschaftlichen Fachzeitschriften eingereicht werden:

- Arbeitspaket 1: Arbeitstitel „*Detection of major mastitis pathogens via multiplex real-time PCR in pooled milk samples*“.
- Arbeitspaket 2: Arbeitstitel “*Colostrum samples as alternative material for bacteriological culturing in farm monitoring of cow-associated mastitis pathogens*”

Die aufgeführte Literatur sowie die noch ausstehenden Publikationen können beim **Vertreter der OG** erfragt werden:

Thüringer Tierseuchenkasse

Victor-Goerttler-Straße 4
07745 Jena

direkt@thtsk.de
03641-8855-0

Jena, den 31.03.2021



PD Dr. Karsten Donat

Vertreter der OG



Dr. Katja Dittmar

Projektleiterin