

Aus der Abteilung Bioverfahrenstechnik
der Fakultät II, Hochschule Hannover und der Professur für Tiergesundheit und Tierschutz der Agrar-
und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

**Anwendung molekularbiologischer Stammvergleichstechniken in der
klinischen Mastitisepidemiologie**

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Nicole Wente, M. Eng.
aus Hannover

Rostock, 2021

Gutachter:

Prof. Dr. Elmar Mohr, Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät,
Tiergesundheit und Tierschutz

Prof. Dr. Volker Krömker, University of Copenhagen, Department of Veterinary and Animal
Sciences, Production, Nutrition and Health

Dr. Anke Römer, Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-
Vorpommern, Institut für Tierproduktion, Milchviehmanagement

Dr. Ulrike Falkenberg, Rindergesundheitsdienst Tierseuchenkasse Mecklenburg-Vorpommern

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2021

„We are only seeking Man. We have no need of other worlds. We need mirrors. We don't know what to do with other worlds. A single world, our own, suffices us; but we can't accept it for what it is. We are searching for an ideal image of our own world: we go in quest of a planet, of a civilisation superior to our own but developed on the basis of a prototype of our primeval past. At the same time, there is something inside us which we don't like to face up to, from which we try to protect ourselves, but which nevertheless remains, since we don't leave Earth in a state of primal innocence. We arrive here as we are in reality, and when the page is turned and that reality is revealed to us — that part of our reality which we would prefer to pass over in silence — then we don't like it any more.“

Stanisław Lem, Solaris (1961)

Der Forschungsgruppe Mikrobiologie

Vorwort

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung molekularbiologischer Stammvergleichstechniken in der klinischen Mastitisepidemiologie. Die Anwendung der molekularbiologischen Stammvergleichstechniken ermöglicht ein verbessertes Verständnis der Epidemiologie von Mastitiserreger auf Herdenebene und damit eine zielgerichtete Bekämpfung von Mastitiden auf Betriebsebene.

Dieser Arbeit liegen drei Publikationen in begutachteten deutsch- und englischsprachigen Fachzeitschriften zugrunde.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	iv
Inhaltsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung und Zielstellung	1
2. Publikationen	4
2.1 Publikation 1: Associations between <i>Streptococcus uberis</i> strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases	4
2.2 Publikation 2: Recurrent mastitis – persistent or new infections?	15
2.3 Publikation 3: Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass [Microbiological mastitis diagnostics for every occasion].....	20
3. Gemeinsame Zusammenfassung	30
3.1 Zusammenfassende Darstellung der durchgeführten Arbeiten und erzielten Ergebnisse	30
3.1.1 <i>Publikation 1: Associations between Streptococcus uberis strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases.</i>	30
3.1.2 <i>Publikation 2: Recurrent mastitis – persistent or new infections?</i>	38
3.1.3 <i>Publikation 3: Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass [Microbiological mastitis diagnostics for every occasion]</i>	43
3.2 Zusammenfassende Diskussion und Einordnung der Ergebnisse	46
3.2.1 <i>Studienablauf und Studiendesign</i>	46
3.2.2 <i>These I: Streptococcus uberis ist ein umweltassozierter Mastitiserreger</i>	46
3.2.3 <i>These II: Bei wiederkehrenden klinischen Mastitiden handelt es sich häufig um Neuinfektionen</i>	51
3.2.4 <i>These III: Stammvergleichstechniken können bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen erheblich zur Lösung beitragen</i>	54
3.3 Schlussfolgerungen	55
4. Zusammenfassung	57

5.	Summary	59
6.	Literaturverzeichnis.....	61
7.	Anhang	76
7.1	Danksagung	76
7.2	Eidesstattliche Erklärung	77
7.3	<i>Curriculum vitae</i>	78
7.4	Zielstellung und Thesen der Arbeit	80
7.5	Hauptaussagen der Arbeit	81
7.6	Wissenschaftliche Wertung der Ergebnisse	82
7.7	Allgemeine Bedeutung der Ergebnisse.....	83
7.8	Anteilserklärung.....	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufteilung der wiederkehrenden klinischen Mastitisfälle 41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenahmepunkte aus dem Umfeld der Tiere und angewandte Techniken	32
Tabelle 2: Fundorte der Umweltisolate und Übereinstimmungen mit den Mastitisisolaten.....	35
Tabelle 3: Übereinstimmende <i>S. uberis</i> -Stämme aus den Umweltproben	37
Tabelle 4: Auflistung eingesetzter RAPD-Primer.....	40
Tabelle 5: Verteilung der Fälle nach Spezies	42

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CHEFDR	Clamped Homogeneous Electric Fields Dynamic Regulation
cm	Centimeter
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EMCO	Edwards Modified Medium, supplemented with colistin sulfate
et al.	<i>et alii</i>
e.V.	eingetragener Verein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
Ly20	Borsäurehaltiges Konservierungsmittel für Milchproben
MALDI TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung Time Of Flight
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NAS	nicht- <i>aureus</i> -Staphylokokken
n. u.	nicht untersucht
P	Signifikanzwert
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
Proc.	Proceedings, Tagungsband
r	Korrelationskoeffizient
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
s.	siehe
spp.	<i>species</i> (Plural)
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat- Ethyldiamintetraessigsäure
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

Tab.	Tabelle
V	Volt
z. B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
pmol	Picomol
χ^2	Chi-quadrat, statistischer Test

1. Einleitung und Zielstellung

Mikroorganismen, die Mastitiden beim Rind verursachen, weisen unterschiedliche Habitate und Pathogenitätsmechanismen auf. Einige dieser Erreger sind in der Umwelt der Tiere zu finden (wie z. B. in der Einstreu), andere haben ihr Reservoir im Euter infizierter Tiere und werden hauptsächlich durch den Melkvorgang übertragen (KRÖMKER 2007). Somit erfordern unterschiedliche Erregergruppen unterschiedliche Bekämpfungsstrategien. Die mikrobiologische Mastitisdiagnostik ist demnach ein grundlegender Baustein der Mastitisbekämpfung. Die Methoden der mikrobiologischen Diagnostik sind sehr vielfältig und liefern nur dann brauchbare Informationen bei adäquaten Kosten, wenn die Methode zielgerichtet gewählt wird (WENTE et al. 2019b). Grundlegende Unterschiede zwischen den Methoden ergeben sich bereits auf der Ebene der Probenahme (z. B. Viertelgemelksprobe, Tankmilchprobe) und setzen sich bis hin zu der diagnostischen Tiefe fort (z. B. Erregergruppe, Spezies, Stamm). Die Standarddiagnostik, die in den Mastitislaboren praktiziert wird, führt maximal bis zur Speziesebene (DVG 2018) und liefert lediglich eine Aussage über das Vorhandensein eines Erregers, dem bestimmte epidemiologische und pathogene Eigenschaften zugesprochen werden. Diese Eigenschaften sind innerhalb einiger Spezies (wie z. B. *Streptococcus uberis*) jedoch nicht immer beständig und können variieren. Dementsprechend ist die Maßnahmenfindung zu deren Bekämpfung schwierig.

Die Mastitisprävalenz in einem Milchviehbetrieb ist das Produkt aus Dauer der Infektionen und Neuerkrankungsrate (DODD et al. 1969). Während man die Dauer der Infektionen durch Therapie oder Entfernung infizierter Tiere aus dem Betrieb verkürzt, senkt man die Neuerkrankungsrate vor allem durch bessere (hygienische) Standards der täglichen Arbeit im Bereich Haltung, Fütterung und Melken. Üblicherweise geht man davon aus, dass wiederkehrende Mastitiden die Folge von persistierenden Infektionen sind. Daten, die auf der Basis von Speziesnachweisen erstellt wurden, können dabei zu Fehlinterpretationen führen, da eine Neuinfektion mit derselben Spezies zwangsläufig als eine persistierende Infektion ausgelegt wird. Deshalb sind die Fragen zur Persistenz von Infektionen sowie zum Übertragungsverhalten und zur Rolle einzelner betrieblicher Bereiche von entscheidender Bedeutung für die Prävention und die Maßnahmenfindung. Zusätzlich kann der Anteil der persistierenden Infektionen aus der Gesamtheit aller wiederkehrenden Infektionen erregerspezifisch sein und somit weitere Informationen über die epidemiologische Bedeutung eines Erregers innerhalb der Herde geben. Diese für die Mastitisbekämpfung entscheidenden Fragen zur Persistenz von Infektionen sowie zum Übertragungsverhalten, können nur beantwortet werden, wenn über die herkömmliche Mastitisdiagnostik hinausgehende diagnostische Methoden wie molekularbiologische Stammvergleichsmethoden Anwendung finden.

Molekularbiologische Stammvergleichsmethoden sind in der Standarddiagnostik aufgrund zusätzlicher Ausstattung seitens des Labors, fehlender Erfahrung in der Ergebnisinterpretation und verhältnismäßig hoher Kosten nicht etabliert. Sie können aber, durch die Untersuchung der genetischen Vielfalt der vorliegenden Spezies, Informationen zu den gegenwärtigen epidemiologischen Eigenschaften des vorherrschenden Erregers innerhalb einer Herde liefern (ZADOKS und SCHUKKEN 2006). Weiterhin können diese Methoden angewandt werden um Reinfektionen derselben Spezies von persistierenden Infektionen abgrenzen zu können und um die Verbreitungswege der Mikroorganismen besser zu verstehen (SCHUKKEN 2012). Zusätzlich können die Methoden gegebenenfalls dabei helfen den Therapieerfolg und somit gleichermaßen die Notwendigkeit der Verbesserung der Prävention von Neuinfektionen besser einschätzen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Anwendung der Stammvergleichstechniken zur Beantwortung einiger Fragestellungen zur Infektionsdynamik boviner Mastitiserreger auf Herdenebene. Dabei sollen folgende, für die Mastitisbekämpfung maßgebende, Thesen geprüft werden:

- These I:

Streptococcus (S.) uberis ist ein umweltassozierter Mastitiserreger, verbesserte Hygiene im Liege- und Laufbereich der Tiere kann helfen die durch den Erreger verursachten Mastitiden zu reduzieren. Für diese Untersuchung sollen *S. uberis* Isolate klinischer Mastitiden mit solchen aus der Umwelt der Tiere verglichen werden. *S. uberis* ist einer der bedeutendsten Erreger boviner Mastitiden, dessen epidemiologische Eigenschaften als inkonsistent gelten und der deshalb bislang nicht immer eindeutig einem Ursprung aus der Umwelt der Tiere oder einer Übertragung von Tier zu Tier zugesprochen werden konnte (BASEGGIO et al. 1997, PHUEKTES et al. 2001, ZADOKS et al., 2001, DAVIES et al. 2016).

- These II:

Bei wiederkehrenden klinischen Mastitiden handelt es sich häufig um Neuinfektionen. Bei dieser Untersuchung soll unter Anwendung molekularbiologischer Stammvergleichstechniken ermittelt werden, wie häufig klinische Folgeerkrankungen von Mastitiden auf persistierende Infektionen von Drüsenvierteln zurückzuführen sind. Dafür sollen Isolate aus aufeinanderfolgenden klinischen Mastitiden gesammelt und bei Folgenachweis derselben Spezies auf Stammebene verglichen werden. Wenn die These angenommen wird, dann ist eine Reduzierung der antibiotischen Therapie möglich, da der Erreger weder persistierend noch resistent ist. Demzufolge sollte der Fokus auf die Umfeld-Hygiene gerichtet werden um Neuinfektionen zu vermeiden, oder auch auf das Immunsystem der Kuh, um Neuinfektionen anderweitig zu verhindern.

- These III:

Anhand der aus den Untersuchungen erworbenen Daten soll schließlich eine dritte These, dass Stammvergleichsmethoden bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen einen Beitrag zur Entscheidungsfindung in deren Bekämpfungsstrategie leisten können (DAVIES 2016), geprüft werden.

2. Publikationen

2.1 Publikation 1: Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases.

Nicole Wente, Doris Klocke, Jan-Hendrik Paduch, Yanchao Zhang, Martin tho Seeth, Veit Zoche-Golob, Friederike Reinecke, Elmar Mohr, Volker Krömker

Journal of Dairy Science (2019), (102) 9360-9369

DOI: 10.3168/jds.2019-16669

Vortrag:

Streptococcus uberis im Haltungsumfeld, Mastitisnachmittag 2019, Hannover, Deutschland. 01.03.2019



J. Dairy Sci. 102:9360–9369
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16669>
 © American Dairy Science Association®, 2019.

Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases

N. Wente,^{1,2} D. Klocke,¹ J.-H. Paduch,¹ Y. Zhang,¹ M. tho Seeth,³ V. Zoche-Golob,⁴ F. Reinecke,⁵ E. Mohr,² and V. Krömker^{1*}

¹University of Applied Sciences and Arts, Faculty 2, Department of Bioprocess Engineering, Microbiology, 30453 Hannover, Germany

²Animal Health and Animal Welfare, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, 18059 Rostock, Germany

³Chamber of Agriculture Lower Saxony, Udder Health Service, 26121 Oldenburg, Germany

⁴Animal Health Service, Thuringian Animal Diseases Fund, 07745 Jena, Germany

⁵Department 51.2, Quality assurance for organic products, vegetable products and milk, 35578 Wetzlar, Germany

ABSTRACT

Bovine clinical mastitis quarter foremilk samples were collected from 15 German dairy farms for the isolation of *Streptococcus uberis* strains. Samples were also collected from the 8 spots where *Streptococcus uberis* was most expected in the dairy environment to investigate the transmission behavior of *Streptococcus uberis* within the farm. The selected environmental spots for sampling were the inner surface of the milking liner, drinking troughs (on pasture and in the barn), exit area of milking parlor, bedding material from the lying area in the barn, passageway to pasture, lying area of soil or vegetation on pasture, and the barn area in front of the milking parlor. We performed pulsed-field gel electrophoresis on 237 *Streptococcus uberis* isolates to identify environmental strains that matched those from mastitis milk. The same strains were detected on the passageway to the pasture, milking parlor waiting area, in one of the liners, and a drinking trough. *Streptococcus uberis* strains showed high variability within farms and because identical strains (in mastitis milk and environment) were found in different environmental localizations, its transmission appears to be farm specific. Thus, to establish a farm-specific mastitis control strategy, the main environmental sources of *Streptococcus uberis* must be analyzed for matching strains. A molecular method such as pulsed-field gel electrophoresis is an important tool that can be used to obtain the necessary information.

Key words: *Streptococcus uberis*, mastitis, environmental, strain typing, epidemiology

INTRODUCTION

Bovine mastitis causes huge financial losses and is spread by cow-associated and environmental pathogens. Studies conducted over several decades have shown the value of preventive methods, which have led to a reduction in the mastitis prevalence caused by cow-associated pathogens (e.g., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) and that are transferred primarily during milking (Bramley and Dodd, 1984; Hillerton et al., 1995; Leigh, 1999; Hillerton and Booth, 2018). In contrast, the environmental pathogens (e.g., *Strep. uberis*, coliform bacteria) have come into focus as the most frequently found mastitis-causing pathogens (Smith and Hogan, 1993; Bey et al., 2004; Klaas and Zadoks, 2018). Mastitis caused by these pathogens is, unfortunately, less manageable despite the implementation of a 5-point plan developed in 1984 by Bramley and Dodd (Leigh, 1999) because infection of the mammary gland takes place mainly outside the milking procedure. Habitat is the source of infection in the dairy environment (e.g., bedding material, feces). However, some of these strains may behave like cow-associated pathogens and appear to be transmitted mainly during milking (Leigh, 1999; Zadoks et al., 2003; McDougall et al., 2004).

Streptococcus uberis, the most frequently found and difficult-to-handle environmental pathogen, causes acute clinical and recurrent mastitis (Bramley and Dodd, 1984; Todhunter et al., 1995) and colonizes within cows and their environment (Kruze and Bramley, 1982; Wendt et al., 1994; Krömker, 2007). This bacterium can lead to a spectrum of mastitis cases, ranging from mild to severe. Its infection rate is influenced not only by environmental exposure but also by the efficiency of the host response to the bacterial challenge. Moreover, it is misleading to classify *Strep. uberis* as an environmental pathogen because it also has cow-associated transmission characteristics. The latter

Received March 23, 2019.

Accepted June 16, 2019.

*Corresponding author: volker.kroemker@hs-hannover.de

makes it necessary to analyze the type of transmission (environmental/cow-associated) for an appropriate control strategy.

Streptococcus uberis has previously been isolated from cows' skin, lips, tonsils, respiratory tract, rumen, teat skin and canal, udder, rectum, and feces. Transmission via mucosae of the digestive tract and feces appears to be the most frequent route of distribution within the dairy environment. This bacterium has also been isolated from pasture and the indoor environment (Bramley, 1982; Hejlicek, 1994; Wendt et al., 1994; Krömker, 2007; Paduch et al., 2013). *Streptococcus uberis* is shown to produce biofilms (Crowley et al., 2011; Schönborn et al., 2017) and capsules (Matthews and Oliver, 1993; Coffey et al., 2006) and invade mammary gland cells (Matthews et al., 1994). Its persistence within the udder, which can lead to a chronic infection of the mammary gland, is due to its ability to resist phagocytosis (Thomas et al., 1994) and withstand intracellular destruction by leukocytes (Leigh et al., 1990). This special condition can transform environment-associated *Strep. uberis* into a cow-associated pathogen (Baseggio et al., 1997; Phuektes et al., 2001). All of these characteristics make *Strep. uberis* mastitis difficult to control, even when only a few strains are detected within a farm. Although the presence of a small variety of *Strep. uberis* strains in one farm raises suspicion of its cow-associated contagious nature, it could also result from some predominant strains being prevalent in environmental places (hotspots). Therefore, in this study, we sampled the most-frequented areas in the cows' environment within a farm, which potentially harbor a high number of *Strep. uberis* strains (Lopez-Benavides et al., 2005), to search for strains matching those previously found in mastitis milk samples. Pryor et al. (2009) infected cows with a mixture of environmental and mastitis strains to observe the predominant constellation of strains that remained in the mammary quarter. They found that selection may take place within the mammary gland, resulting in a single strain that is identified in the diagnosis of mastitis. To our knowledge, this study is the first to compare mastitis and environmental *Strep. uberis* isolates within a farm. An understanding of *Strep. uberis* sources in the cow's environment would help in discerning its mode of transmission and finding the appropriate tactics to control *Strep. uberis* mastitis.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

Sixty-two farms in Lower Saxony (northern Germany) participated in the present study, which was conducted

between June 2014 and December 2015. The sample collection time for each farm was 12 mo, and farmers collected quarter foremilk samples for microbiological analysis from cases of clinical mastitis. All isolates of *Strep. uberis* obtained from these samples were collected and stored. Only one case of mastitis caused by *Strep. uberis* per cow, during the study, was taken into account so that no isolates of persistent mastitis were used repeatedly. All farms having at least 5 identified *Strep. uberis* clinical mastitis cases within a year were chosen and visited by trained researchers for collection of environmental samples at specified locations. We sampled the environment close to the time when we identified the fifth *Strep. uberis* mastitis case on a farm but continued collecting mastitis isolates until the end of the year. Then, *Strep. uberis* isolates from environmental samples taken at 8 locations were compared, using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), with those previously isolated from clinical mastitis cases. Additionally, all bacteriologically identified *Strep. uberis* strains were confirmed as *Strep. uberis* by using PCR.

Selection of Farms

The present study on the epidemiology of *Strep. uberis* was a part of a project that focused on the comparison between pasture and indoor farming. Farms with diverse access to pasture were chosen, with the categorization of the pasture during the main cycle (1), half-day pasture (2), year-round stable keeping and running or grazing (3), or all-year stable keeping (4). The farms were selected based on their willingness to participate in this project. The mean herd size was 143 lactating cows (range: 62–620 cows; median: 117). At the start of the study, the average milk yield at farm level ranged from 7,500 to 11,750 L/cow per year (arithmetic mean: 9,437.4; median: 9,500.0). There were no further specifications regarding udder health parameters such as the incidence of clinical mastitis or the spectrum of mastitis pathogens.

Collection of Milk Samples

In the case of clinical mastitis, quarter foremilk samples were taken by the farmers, who were trained by study staff veterinarian, according to the guidelines of GVA (2009). The udder quarter was dry-cleaned to remove particles and teat ends were disinfected for about 15 s with disposable wipes saturated with ethanol (70%). The first 3 milk streams were discarded followed by milking into a sterile 13-mL sampling tube containing a boric acid-based preserving agent (Ly-20; Heesch et al., 1969). The quarter foremilk samples

Table 1. Sampling spots and techniques

Spot ¹ (described by)	Applied sampling technique
Liner (Zadoks et al., 2003)	Inner liner surface was sampled by swabbing the wall in 2 rounds in the upper barrel near the mouthpiece lip.
Drinking troughs (barn/pasture) (Döpfer et al., 2005; Zadoks et al., 2005)	One template area of 20 cm ² was treated by double-swab technique at the upper and outer edge of the drinking trough.
Exit area milking parlor (Lopez-Benavides et al., 2007) Lying area pasture (Cullen and Little, 1969; Döpfer et al., 2005; Zadoks et al., 2005)	The surface layer of soil, ground vegetation, or mud was sampled from the most by cows frequented ground area.
Passageway to pasture (Lopez-Benavides et al., 2007)	
Barn bedding material (Bramley, 1982; Döpfer et al., 2005)	One cubicle was sampled at a distance of one-third of cubicle length from the hind edge.

¹One sample at each spot was taken; one liner for each farm was swabbed.

were sent, within 2 d, to the microbiology laboratory of the University of Applied Sciences and Arts Hannover (Germany) for microbiological analysis.

Collection of Environmental Samples

Based on a literature search, we selected locations in the cows' environment that show a high presence of *Strep. uberis*. High cow traffic seems to be especially associated with the presence of *Strep. uberis*. The environmental samples were collected from different places or possible hotspots within the animals' environment. These sites included the inner surface of the milking liner, drinking troughs (inside), the exit area of the milking parlor, bedding material from the lying area in the barn, the passageway to the pasture, soil or vegetation from the pasture lying area, and drinking troughs on pasture (outside) on those farms where cows had access to pasture (Cullen and Little, 1969; Bramley, 1982; Zadoks et al., 2003, 2005; Döpfer et al., 2005; Lopez-Benavides et al., 2005, 2007). The barn area in front of the milking parlor was also sampled because it had high cow traffic and because bacterial transmission to the teat skin immediately before milking, as well as milk leakage from individual animals, is considered a possible route of infection. In every farm, each spot was sampled once, although in farms with no pasture access, samples from the passageway to the pasture, lying area on pasture, and outside drinking trough were not available. Different techniques were used to sample the spots of interest (Table 1). The double-swab technique was performed according to DIN10113-1 (Deutsches Institut für Normung, 1997) to collect environmental samples from the surfaces of the liners and drinking troughs. The inner surfaces of the liners were sampled by swabbing the walls in 2 rounds. For drinking troughs, a sterile swab moistened with buffered peptone water (pH 7.0) was rolled over the surface (template area of

20 cm²) using moderate pressure in circular motions, followed by rolling of a dry cotton swab in the same manner. Both swabs were immersed in a sterile tube with 2 mL of buffered peptone water; then, the sticks of the swabs were broken off and discarded and the tube was immediately closed. A sample of the ground (minimum of 11 g) was collected from the barn area in front of the milking parlor, the exit of the milking parlor, passageway to the pasture, and lying areas using the hand in an inside-out sterile plastic bag. Further specifications for the sampling procedures are listed in Table 1. All environmental samples were transported at 5 to 8°C within 8 h to the laboratory (University of Applied Sciences and Arts Hannover, Germany) for microbiological analyses.

Analysis of Milk Samples

About 10 µL of well-mixed quarter foremilk sample was plated, using a sterile inoculation loop, on one quadrant of an esculin blood agar plate (Oxoid, Wesel, Germany) and incubated under aerobic conditions at 37°C for 48 h. The colonies that grew on esculin blood agar were primarily differentiated based on hemolysis patterns, esculin hydrolysis, Gram status, and cell morphology. The catalase reaction was also analyzed and gram-positive, catalase-negative cocci were differentiated by esculin hydrolysis. Esculin-positive colonies were further examined using modified Rambach agar, according to Watts et al. (1993), and phenol red agar medium supplemented with 1% D-sorbitol (Odierno et al., 2006). Gram-positive, esculin-positive, catalase-negative, β-D-galactosidase-positive, and D-sorbitol-positive cocci were identified as *Strep. uberis*.

Analysis of Environmental Samples

Surface samples were analyzed by mixing the tubes containing swabs for 1 min using a Vortex Genie 2 (Sci-

entific Industries, Bohemia, NY) and performing decimal dilutions with Ringer's solution (Merck, Darmstadt, Germany). Around 11 g of a solid or pasty sample was diluted with Ringer's solution and mixed by Stomacher (easyMIX, AES Chemunex/bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for 1 min. To determine the amount of streptococci and streptococci-like microorganisms, we used the spatula method according to DIN10192-5 (Deutsches Institut für Normung, 1995) to plate the diluted suspensions on Edwards modified medium supplemented with colistin sulfate and oxolinic acid (EMCO; Sawant et al., 2002). A maximum of 20 esculin-hydrolyzing colonies, if available, were isolated and checked for catalase-negative, gram-positive cocci, in accordance with Döpfer et al. (2005). The resulting colonies were subsequently cultured in parallel on modified Rambach agar medium to check for β -D-galactosidase activity (Watts et al., 1993) and on D-sorbitol agar to investigate D-sorbitol reduction ability (Odierno et al., 2006). The resulting presumptive *Strep. uberis* isolates were gram-positive, esculin-positive, catalase-negative, β -D-galactosidase-positive, and D-sorbitol-positive.

Storage of Isolates

The isolated microorganisms were cultured in brain heart infusion broth at 37°C for 24 h, mixed with 20% glycerin, and stored at -80°C until further investigation.

Molecular Analysis

The microbiologically identified *Strep. uberis* strains were further confirmed by PCR. The PFGE strain typing method was used to compare *Strep. uberis* strains of the environment with those from the mastitis milk samples.

PCR. DNA was extracted using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands), and PCR for detection of *Strep. uberis* was performed using the primer and temperature profile described by Riffon et al. (2001). The reaction was carried out in a 25- μ L reaction mix, which consisted of 12.5 μ L of ReadyMix Taq PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), 20 pmol of primer mix, 5 μ L of template, and 5 μ L of pure H₂O (AppliChem, Darmstadt, Germany). Amplification reactions were carried out in an Mx3005P qPCR System thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The PCR products were stained directly with Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany) and separated in a 2% agarose gel at 100 V for 2.5 h.

PFGE. DNA was extracted with Bio-Rad CHEF Genomic DNA Plug Kit (BioRad, Munich, Germany),

according to the manufacturer's instructions, and digested with 20 U of *Sma*I (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) at 25°C for 2 h. Finally, the plugs were washed with 1 mL of 0.5× Tris-borate-EDTA (TBE) buffer (Roth, Karlsruhe, Germany) for 30 min at room temperature before being loaded on a 1% agarose gel. The fragments were separated using a Clamped Homogeneous Electric Fields Dynamic Regulation System, with a performing angle of 120° (CHEF-DR II System, Bio-Rad), filled with 0.5× TBE buffer continuously chilled to a temperature of 14°C. Pulse timings of 1 to 15 s for 11.5 h and 15 to 45 s for 13.5 h at 5 V/cm (210 V), were applied. The PFGE gel was stained with Midori Green Advanced solution (Nippon Genetics Europe GmbH) according to the manufacturer's instruction and visualized by using the InGenius gel documentation system (Syngene, Cambridge, UK). Isolates that generated identical restriction patterns were identified as identical strains.

RESULTS

Four of the original 62 farms could not be used for evaluation because they either prematurely ceased to participate (3) or could not provide milk samples for examination (1). Seventeen farms had access to pasture during the main cycle of vegetation, 17 farms had access to half-day pasture (6 to 10 h), 13 farms used year-round indoor housing with short-time access to pasture (<6 h), and 15 farms used all-year indoor housing. A total of 1,895 mastitis milk samples were analyzed, out of which a minimum of 5 cows with clinical mastitis caused by *Strep. uberis* were found in each of 15 farms (farms A to O; Figure 1). A total of 134 mastitis isolates from the 15 farms were used for the comparisons. Six (farms B, D, K, L, M, and N) out of the 15 chosen farms had access to pasture during the main cycle of vegetation, 3 (farms A, G and O) were half-day pasture farms, 4 (farms C, H, I and J) used year-round indoor housing with short-time access to pasture, and 2 farms (farm E and F) had no access to pasture.

All of the isolates used for PFGE analysis were previously confirmed as *Strep. uberis* by PCR. Analysis of 103 environmental *Strep. uberis* isolates from 15 farms showed the following (Table 2). *Streptococcus uberis* isolates were detected in the barn area in front of the milking parlor in 8 farms (number of isolates): A (2), D (8), E (4), G (3), J (1), K (1), N (10) and O (4), and on the passageway to the pasture in 8 farms: B (1), D (4), G (4), H (1), K (4), L (1), M (2) and N (4). On 5 farms, *Strep. uberis* could be observed in the barn drinking troughs: C (1), D (2), F (1), G (1) and K (1); and 3 farms each had *Strep. uberis* isolates in the inner surface of liners: C (11), E (4), F (1); the exit area of

9364

WENTE ET AL.

the milking parlor A (5), E (4), G (1); and the barn bedding material: E (6); G (1), N (6). In 2 farms, A (1), K (1), the isolates of *Strep. uberis* were found on pasture drinking troughs, and in 1 farm (farm I), *Strep. uberis* isolates were not detected in the cows' environment (Table 2). Overall, we collected 33 *Strep. uberis* isolates from 8 farms in front of the milking parlor, and PFGE results (Figure 2) indicated that 1 of the isolates was identical to a strain isolated from a clinical mastitis milk sample, both of them from the same farm. On the passageway to pasture, we found 19 isolates in 8 farms, where 2 isolates from 2 farms matched the mastitis milk isolates. On 1 of the farms (farm K), we observed that 1 isolate matched with 3 mastitis milk isolates from 3 cows. In another farm (farm B), 1 environmental isolate matched with 2 mastitis milk isolates from 2 cows. We compared 16 isolates from the liners on 3 farms and found 1 isolate that matched 1 mastitis case in 1 farm. One isolate from the drinking trough in the barn was identical to 1 mastitis case within the same farm (farm C). No matching strains were detected from other areas (e.g., pasture drinking troughs, exit area of the milking parlor, bedding material in the barn, and soil or ground vegetation of the grazing area). Identical strains within different environmental spots were also identified (Table 3). Strains from the waiting area in front of the milking parlor matched the strains found at the exit of the milking parlor (farms A and E), from the bedding material in the barn strain (farm N), and from the passageway to pasture (farms E and N). Strains from the passageway to pasture also matched those strains present in the exit of the milking parlor

(farm G) and in barn's bedding material (farm N). Two different strains isolated from the barn's bedding material matched with the strains from the passageway to pasture (farm N). We did not detect any matching isolates between the farms.

DISCUSSION

The aim of the present investigation was to describe the predominant transmission model of *Strep. uberis* infection at the farm level by comparing *Strep. uberis* strains from clinical mastitis samples and those from typical environmental sources. Our study was based on different sampling and diagnostic methods, which induces multiple methodical susceptibilities having an influence on the results. We only examined samples of clinical mastitis cases to improve the chances of finding relevant matching strains in the environment; a previous study by Jayarao et al. (1993) found less variety in strains from clinical mastitis than in those from subclinical mastitis. Clinical mastitis milk samples were collected over a period of 12 mo, resulting in a maximum of 1 yr between the first mastitis milk isolate and the first environmental isolate. Nevertheless, Todhunter et al. (1995) and Zadoks et al. (2003) previously reported the duration of infections to be as long as 370 and 309 d, respectively. We adopted 2 different techniques for the isolation of *Strep. uberis* from environmental samples and milk samples. The variety of different species in the environmental samples required the use of selective media to prevent contamination that could obscure essential colonies.

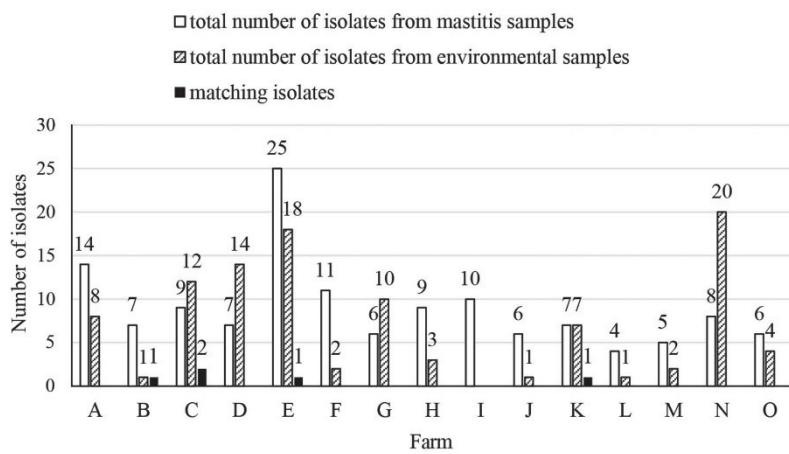


Figure 1. Distribution of *Streptococcus uberis* isolates from 15 farms for strain typing.

Journal of Dairy Science Vol. 102 No. 10, 2019

However, noncontaminated milk samples that usually harbor up to 2 different colony types were cultured on a nonselective medium. We chose the PFGE method for strain typing because it has higher discriminatory ability and can differentiate *Strep. uberis* strains better than other typing methods (Gillespie and Oliver, 2004). For the PFGE analysis, 1 cfu was taken out of one milk sample, because isolates from a single milk sample usually belong to the same strain (Oliver et al., 1998). Pryor et al. (2009) infected cows with a mixture of 5 *Strep. uberis* strains, and 1 strain predominated in 7 out of 10 quarters. The sampling spots in the dairy environment were selected based on some previous studies that found high numbers of *Strep. uberis* in the chosen spots (Table 1). In addition, the barn area in front of the milking parlor (i.e., the waiting area) was sampled. This spot was selected because it had high cow traffic but also that is could be involved in development of infection because of its spatial and temporal proximity to the zone of milking and potential for milk leakage

from animals passing by. Liners were sampled to prove the hypothesis of bacterial transmission during milking, indicating the cow-associated contagious mode of the pathogen (Smith and Hogan, 1993).

Streptococcus uberis isolates were detected in each of the 8 environmental sampling spots, and strains matching mastitis isolates were found in 4 spots (Table 2). This result supports the hypothesis that sources of *Strep. uberis* are areas with high cow traffic but also highlights the environmental character of *Strep. uberis*. It is possible that these spots are the source of the pathogens or, vice versa, were contaminated by mastitic milk. Nevertheless, some isolates were detected in liners, with one matching a mastitis milk strain (Table 3; farm C). This finding is in accordance with the results of Zadoks et al. (2003), where *Strep. uberis* was found in liners after *Strep. uberis*-infected animals had been milked. A high bacterial load on the inner surface of the liners increases the risk of transmission of *Strep. uberis* strains during milking, which suggests a host-adapted

Table 2. Origin of *Streptococcus uberis* environmental isolates and matches to mastitis strains

Farm	No. of mastitis isolates (matching environmental isolates)/ No. of strains isolated from milk samples ¹	No. of environmental isolates (matching isolate to milk isolate)	Sample origin
A	14/13	1 2 5	Drinking trough pasture Waiting area milking parlor Exit milking parlor
B	7 (2)/5	1 (1)	Passageway to pasture
C	9 (1)/7	11 (1) 1 (1)	Liner Drinking trough barn
D	7/4	2 8 4	Drinking trough barn Waiting area milking parlor Passageway to pasture
E	25 (1)/13	4 4 (1) 4 6	Liner Waiting area milking parlor Exit milking parlor Bedding material barn
F	11/6	1 1	Liner Drinking trough barn
G	6/4	1 3 1 4 1	Drinking trough barn Waiting area milking parlor Exit milking parlor Passageway to pasture Bedding material barn
H	9/5	1 2	Passageway to pasture Lying area pasture
I	10/7	0 ²	
J	6/3	1	Waiting area milking parlor
K	7 (3)/4	1 1 1 4 (1)	Drinking trough barn Drinking trough pasture Waiting area milking parlor Passageway to pasture
L	4/4	1	Passageway to pasture
M	5/4	2	Passageway to pasture
N	8/6	10 4 6	Waiting area milking parlor Passageway to pasture Bedding material barn
O	6/2	4	Waiting area milking parlor

¹Some isolates belong to the same strain.

²No environmental *Strep. uberis* isolates found.

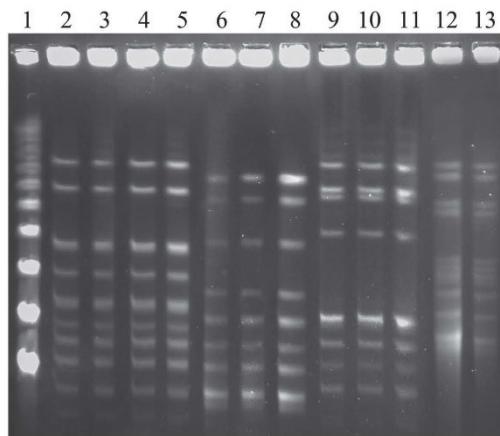


Figure 2. Pulsed-field gel electrophoresis results. Lane 1: Lambda PFG Ladder (48.5–1,018 kb; New England Biolabs, Ipswich, MA); lanes 2–4: farm K, strains from mastitis milk; lane 5: farm K, strain from passageway to pasture; lanes 6, 7: farm B, strains from mastitis milk; lane 8: farm B, strain from passageway to pasture; lane 9: farm C, strain from mastitis milk; lanes 10, 11: farm C, strain from a liner and from a drinking trough; lane 12: farm E, strain from mastitis milk; lane 13: farm E, strain from the barn area in front of the milking parlor.

contagious mode of the strain. The limited variety of *Strep. uberis* mastitis strains within one farm could also indicate the contagious behavior of this pathogen. In our study, we found one farm (farm O) that showed a low variety of *Strep. uberis* strains in mastitis milk; 4 out of 6 isolates found on this farm were identical by PFGE. Davies et al. (2016) found a small subset of *Strep. uberis* sequence types, which is thought to be important for cow-to-cow transmission because they were found disproportionately frequently in clinical mastitis cases. Zadoks et al. (2001) analyzed an outbreak of *Strep. uberis* mastitis and suggested that contagious transmission played a role in the outbreak. A predominant strain could be contagious as well as environmentally transmitted from one hotspot in the environment. On farm O, *Strep. uberis* isolates were found in only one environmental spot (barn area in front of the milking parlor), and none of them matched the mastitis strains. This finding does not exclude the possibility of other spots harboring *Strep. uberis* within this farm. It can be deduced that single random sampling of each spot is not sufficient to find a matching strain. Oliver et al. (1998) reported *Strep. uberis* mastitis with identical strains in non-outbreak situations, and Zadoks et al. (2003) described *Strep. uberis* mastitis cases that were caused not by a variety of environmental strains but by

a predominant strain. Additionally, Pryor et al. (2009) showed the ability of a mastitis strain with pathogenic attributes to predominate within the mammary gland.

In 5 out of 14 farms, similar strains could be found in different environmental spots (Table 3). This confirmed that *Strep. uberis* has the ability to transmit between various spots and harbor different reservoirs of infection. Zadoks et al. (2005) hypothesized that fecal shedding plays a role in the maintenance of *Strep. uberis* in the farm ecosystem. Passageways and waiting areas are rich in manure and slurry, which may splatter onto the udder immediately before or directly after milking (while cows wait in front of the parlor or exit the parlor, respectively). Because the teat canals might be open during this time, fecal contamination of the udder and teat skin surface increases the possibility of *Strep. uberis* invading the udder through the teat canal (Krömker et al., 2014). We were able to find an isolate on the passageway to pasture that matched mastitis milk isolates on 2 farms of our study (B and K); on one of those farms (farm K), a matching isolate was found in 3 out of 7 mastitis cases.

In general, the highest number of *Strep. uberis* environmental isolates was detected in the waiting area in front of the milking parlor (Table 3). This might be due to milk leakage before milking and the presence of large amounts of feces that might contain mastitis strains and can splatter onto the udder from the ground or floor. Liquids such as waste milk and cleaning water, which are sometimes discharged from the parlor floor or pit via the waiting area, could also represent a mode of transmission of this pathogen. *Streptococcus uberis* strains were found in the milking parlor's waiting area and exit (farm A and E), the passageway to pasture (farm N), and the bedding material (farm E and N). This indicates the possible relevance of the milking parlor's waiting area at the front as a source of mastitis *Strep. uberis* strains and of the milking parlor for transmission of *Strep. uberis*. Moreover, the area in front of the milking parlor appeared to be the link between these spots. Another possible connection between the spots could be the passageway to pasture, which had matching isolates in the barn bedding material, milking parlor waiting area, and exit. We found no strains matching between the farms, which means each farm harbored its own unique strains, in agreement with the study by Douglas et al. (2000).

In summary, it is important to note that the constellation of *Strep. uberis*-positive spots, the number of matching strains in mastitis milk, and the variety of the *Strep. uberis* strains varied among farms, indicating that it might be useful to compare *Strep. uberis* mastitis strains at the farm level to obtain a better understanding of transmission pathways. For example, farm A (with a

Table 3. Identical strains of *Streptococcus uberis* within the environmental samples; some strains were found in different locations in the environment and some isolates originating from the same location were found to belong to the same strain

Farm	Isolates/strains (no.)	Locations of identical strains ¹
A	8/6	Waiting area milking parlor (a, a) Exit milking parlor (a)
B	1/1 ²	NP ³
C	12/7	Liner ⁴ (b) Drinking trough barn ⁴ (b) Liner (c, c) Liner (d, d, d, d)
D	14/11	Waiting area milking parlor (e, e) Waiting area milking parlor (f, f) Passageway to the pasture (g, g)
E	18/13 ⁵	Waiting area milking parlor (h, h) Waiting area milking parlor (i) Exit milking parlor (i) Waiting area milking parlor (j) Bedding material barn (j) Bedding material barn (k, k, k)
F	2/2	NP
G	10/9	Exit milking parlor (l) Passageway to the pasture (l)
H	3/2	Bedding material pasture (m, m)
I		No environmental isolates
J	1/1	NP
K	7/6 ⁶	Passageway to the pasture (n, n)
L	1/1	NP
M	2/2	NP
N	20/12	Waiting area milking parlor (o, o, o, o) Waiting area milking parlor (p, p) Waiting area milking parlor (q) Passageway to the pasture (q) Bedding material barn (q) Waiting area milking parlor (r) Bedding material barn (r) Passageway to the pasture (s) Bedding material barn (s)
O	4/(4)	NP

¹Each strain is named with a different lowercase letter.

²Matching with 2 milk isolates.

³Not performed.

⁴Matching with 1 milk isolate.

⁵One isolate from barn area in front of the milking parlor matches with a milk isolate.

⁶One isolate from the passageway to the parlor matches with 3 milk sample isolates.

high variety of mastitis strains) and farm O (with a low variety of mastitis strains) presented clearly different transmission of *Strep. uberis* infections. Farm O kept a more contagious and more adaptable strain than farm A. Furthermore, the data show that *Strep. uberis* could be found in each sampled spot but not in each farm at the same constellation. That means, that in addition to hygienic requirements for the farms, a more detailed investigation might be necessary for mastitis control. The importance of individual environmental locations for the origin of *Strep. uberis* infections of dairy cows also differs from farm to farm.

However, because of the high effort required, molecular biological investigations by strain typing in the context of mastitis control, except for research purposes, will probably remain an exception. In practice, based

on our frequent identifications of *Strep. uberis* mastitis strains, the hygiene of waiting areas in front of the milking parlor, drinking troughs, and passageway to the pasture should be the focus during udder health work.

CONCLUSIONS

Streptococcus uberis was frequently detected, along with some mastitis strains, in the dairy environment. We verified that both environmental *Strep. uberis* strains and mastitis strains could be transmitted to various spots in the environment of cows. This led to the conclusion that the modes of transmission of *Strep. uberis* include environmental sources in a contagious pattern, indicating that *Strep. uberis* control strategies

require approaches that address environmental as well as contagious pathogens. Moreover, an individualized *Strep. uberis* control strategy is needed for each farm. Molecular methods such as PFGE are useful to screen different *Strep. uberis* strains within a farm, thereby supporting the development of an appropriate control strategy.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Ministry for Science and Culture of Lower Saxony (MWK) within the collaborative research project SAM, Analysis of Dairy Production: Grazing versus Indoor Housing of Dairy Cows, Support Code: ZN 2864.

REFERENCES

- Baseggio, N., P. D. Mansell, J. W. Browning, and G. F. Browning. 1997. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. *Mol. Cell. Probes* 11:349–354. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1997.0126>.
- Bey, R., R. Farnsworth, and S. Stewart. 2004. Environmental mastitis. National Mastitis Council Regional Meeting Proceedings, Bloomington, MN. National Mastitis Council, Madison, WI.
- Bramley, A. J. 1982. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. Isolation from bovine faeces and from straw bedding of cattle. *J. Dairy Res.* 49:369–373. <https://doi.org/10.1017/S0022029900022500>.
- Bramley, A. J., and F. H. Dodd. 1984. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control—progress and prospects. *J. Dairy Res.* 51:481–512. <https://doi.org/10.1017/S0022029900023797>.
- Coffey, T. J., G. D. Pullinger, R. Urwin, K. A. Jolley, S. M. Wilson, M. C. Maiden, and J. A. Leigh. 2006. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: A multilocus sequence scheme that enables investigation of its population biology. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1420–1428. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1420-1428.2006>.
- Crowley, R. C., J. A. Leigh, P. N. Ward, H. M. Lappin-Scott, and L. D. Bowler. 2011. Differential protein expression in *Streptococcus uberis* under planktonic and biofilm growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:382–384. <https://doi.org/10.1128/AEM.01099-10>.
- Cullen, G. A., and T. W. A. Little. 1969. Isolation of *Streptococcus uberis* from the rumen of cows and from soil. *Vet. Rec.* 85:115–118. <https://doi.org/10.1136/vr.85.5.115>.
- Davies, P. L., J. A. Leigh, A. J. Bradley, S. C. Archer, R. D. Emes, and M. J. Green. 2016. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 54:68–74. <https://doi.org/10.1128/JCM.01583-15>.
- Deutsches Institut für Normung. 1995. DIN 10192-5:1995-05. Mikrobiologische Milchuntersuchung - Bestimmung der Keimzahl - Teil 5: Spatelverfahren. Beuth, Berlin, Germany. <https://doi.org/10.31030/2778921>.
- Deutsches Institut für Normung. 1997. DIN10113-1:1997-07 .Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich - Teil 1: Quantitatives Tupferverfahren. Beuth, Berlin, Germany. <https://doi.org/10.31030/7306517>.
- Döpfer, D., R. N. Zadoks, W. Buist, and B. Engel. 2005. Optimised sample sizes for analysing the genetic heterogeneity of mammary pathogen isolates from environmental samples. Pages 434–438 in *Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-550-5>.
- Douglas, V. L., S. G. Fenwick, D. U. Pfeiffer, N. B. Williamson, and C. W. Holmes. 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 75:27–41. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00184-X).
- Gillespie, B. E., and S. P. Oliver. 2004. Comparison of an automated ribotyping system, pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for differentiation of *Streptococcus uberis* strains. *Biotechnology (Faisalabad)* 3:165–172. <https://doi.org/10.3923/biotech.2004.165.172>.
- GVA (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.). 2009. Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisregen. [Guidelines for antisepctic milk sampling and guidelines to isolate and identify mastitis pathogens.] GVA, Giessen, Germany.
- Heeschens, W., J. Reichmuth, A. Tolle, and H. Zeidler. 1969. Die Konserverierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemostofflichen Untersuchung. *Milchwissenschaft* 24:729–734.
- Hejlicek, K. 1994. Mastitis durch *Streptococcus agalactiae* (Gelber Galt). In *Euter- und Gesäugerkrankheiten*. K. Wendt, H. Bostedt, H. Mielke, and H. W. Fuchs, ed. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Germany.
- Hillerton, E., and J. M. Booth. 2018. The five-point mastitis control plan—A revision tutorial! *Proc. 57th Annu. Mtg. National Mastitis Council*, Tucson, AZ. National Mastitis Council, Madison, WI.
- Hillerton, J. E., A. J. Bramley, R. T. Staker, and C. H. McKinnon. 1995. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a five year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. *J. Dairy Res.* 62:39–50. <https://doi.org/10.1017/S0022029900033653>.
- Jayarao, B. M., E. E. Schilling, and S. P. Oliver. 1993. Genomic deoxyribonucleic acid restriction fragment length polymorphism of *Streptococcus uberis*: Evidence of clonal diversity. *J. Dairy Sci.* 76:468–474. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77367-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77367-1).
- Klaas, I. C., and R. N. Zadoks. 2018. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transbound. Emerg. Dis.* 65:166–185. <https://doi.org/10.1111/tbed.12704>.
- Krömker, V. 2007. Euterkrankheiten. Pages 47–74 in *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. V. Krömker, ed. Parey, Stuttgart, Germany.
- Krömker, V., F. Reinecke, J. H. Paduch, and N. Grabowski. 2014. Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis. *Clin. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000157>.
- Kruze, J., and A. J. Bramley. 1982. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. II. Evidence of colonization of the bovine intestine by *Str. uberis*. *J. Dairy Res.* 49:375–379. <https://doi.org/10.1017/S0022029900022512>.
- Leigh, J. A. 1999. *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet. J.* 157:225–238. <https://doi.org/10.1053/tvjl.1998.0298>.
- Leigh, J. A., T. R. Field, and M. R. Williams. 1990. Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defence factors. *Res. Vet. Sci.* 49:85–87. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31052-X](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31052-X).
- Lopez-Benavides, M. G., J. H. Williamson, and R. T. Cursons. 2005. Association between *Streptococcus uberis* populations on farm races and climatic changes during a twelve-month period. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 65:153–156.
- Lopez-Benavides, M. G., J. H. Williamson, G. D. Pullinger, S. J. Lacy-Hulbert, R. T. Cursons, and A. A. Leigh. 2007. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *J. Dairy Sci.* 90:5558–5566. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0194>.
- Matthews, K. R., R. A. Almeida, and S. P. Oliver. 1994. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* 62:5641–5646.
- Matthews, K. R., and S. P. Oliver. 1993. Encapsulation of streptococci isolated from bovine milk. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 40:597–602. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1993.tb00181.x>.

ENVIRONMENTAL SOURCES OF *STREPTOCOCCUS UBERIS*

9369

- McDougall, S., T. J. Parkinson, M. Leyland, F. M. Anmiss, and S. G. Fenwick. 2004. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. *J. Dairy Sci.* 87:2062–2072. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70024-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70024-7).
- Odierro, L., L. Calvinho, P. Traversa, M. Lasagno, C. Bogni, and E. Reinoso. 2006. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. *J. Dairy Sci.* 89:3886–3890. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72431-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72431-6).
- Oliver, S. P., B. E. Gillespie, and B. M. Jayarao. 1998. Detection of new *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA finger printing. *FEMS Microbiol. Lett.* 160:69–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12892.x>.
- Paduch, J. H., E. Mohr, and V. Krömker. 2013. The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. *J. Dairy Res.* 80:159–164. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000046>.
- Phuuket, P., P. D. Mansell, R. S. Dyson, N. D. Hooper, J. S. Dick, and G. F. Browning. 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolated from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 39:1460–1466. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1460-1466.2001>.
- Pryor, S. M., R. T. Cursons, J. H. Williamson, and S. J. Lacy-Hulbert. 2009. Experimentally induced intramammary infection with multiple strains of *Streptococcus uberis*. *J. Dairy Sci.* 92:5467–5475. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2223>.
- Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, and J. Lagacé. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39:2584–2589. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2584-2589.2001>.
- Sawant, A. A., S. R. Pillai, and B. M. Jayarao. 2002. Evaluation of five selective media for isolation of catalase-negative gram-positive cocci from bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 85:1127–1132. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74174-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74174-X).
- Schönborn, S., N. Wente, J. H. Paduch, and V. Krömker. 2017. In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. *J. Dairy Res.* 84:198–201. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000218>.
- Smith, K. L., and J. S. Hogan. 1993. Environmental mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9:489–498. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30616-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30616-2).
- Thomas, L. H., W. Haider, A. W. Hill, and R. S. Cook. 1994. Pathological findings of experimentally-induced *Streptococcus uberis* infection in mammary gland of cows. *Am. J. Vet. Res.* 55:1723–1728.
- Todhunter, D. A., K. L. Smith, and J. S. Hogan. 1995. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 78:2366–2374. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76864-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76864-3).
- Watts, J. L., S. A. Salmon, and J. R. Yancey Jr. 1993. Use of modified Rambach agar to differentiate *Streptococcus uberis* from other mastitis streptococci. *J. Dairy Sci.* 76:1740–1743. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)7506-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)7506-2).
- Wendt, K., H. Hostedt, H. Mielke, and H. W. Fuchs. 1994. *Euter und Gesäugerkrankheiten*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Zadoks, R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, Y. T. Gröhn, and Y. H. Schukken. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J. Dairy Sci.* 84:590–599. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74512-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74512-2).
- Zadoks, R. N., B. E. Gellespie, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, S. P. Oliver, and Y. H. Schukken. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 130:335–349. <https://doi.org/10.1017/s0950268802008221>.
- Zadoks, R. N., L. L. Tkofsky, and K. J. Boor. 2005. Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. *Vet. Microbiol.* 109:257–265. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.05.008>.

2.2 Publikation 2: Recurrent mastitis – persistent or new infections?

Nicole Wente, Anne-Sophie Grieger, Doris Klocke, Jan-Hendrik Paduch, Yanchao Zhang, Stefanie Leimbach, Martin tho Seeth, Ellen Maria Mansion de Vries, Elmar Mohr, Volker Krömker
Veterinary Microbiology (2020), (224) 108682
DOI:10.1016/j.vetmic.2020.108682

Vorträge:

Recurrent mastitis – persistent or new infections? 30th World Buiatrics Congress, Sapporo, Japan.
29.08.2018

Rezidivierende Mastitiden - Neue oder persistierende Infektionen? Mastitisnachmittag, Hannover,
Deutschland. 02.03.2018



Contents lists available at ScienceDirect



Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Recurrent mastitis—persistent or new infections?

N. Wente^{a,b}, A.S. Griege^a, D. Klocke^a, J.-H. Paduch^c, Y. Zhang^a, S. Leimbach^a, M. tho Seeth^{a,d}, E.M. Mansion-De Vries^a, E. Mohr^b, V. Krömker^{c,*}^a University of Applied Sciences and Arts Hanover, Faculty 2, Department of Bioprocess Engineering, Microbiology, 30453 Hanover, Germany^b Animal Health and Animal Welfare, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, 18051 Rostock, Germany^c University of Cooperative Education, Food Safety and Food Quality, 08523 Plauen, Germany^d Chamber of Agriculture Lower Saxony, Udder Health Service, 26121 Oldenburg, Germany^c University of Copenhagen, Faculty of Health and Medical Sciences, Department of Veterinary and Animal Sciences, Section Production, Nutrition and Health, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:
 Mastitis
 New infection
 Unsuccessful therapy
 Random amplified polymorphic DNA

Recurrent clinical mastitis contributes to around half of all infections having an economic impact in the dairy industry. It leads to milk yield reduction, increased risk of mortality, and culling, and may be caused by new infections or a persistent infection after previous treatment. Disease management is dependent on the infecting species, necessitating accurate identification of the pathogen in the range of persistent and reinfection cases among recurrent infections using culture and molecular biological analysis. Milk samples from diagnosed clinical mastitis cases were collected from three Northern German dairy farms between 2011 and 2015. Totally, 2043 diagnosed mastitis cases were examined at quarter level (1598 (78.2 %) first and 445 (21.8 %) recurrent mastitis cases in lactation). Among the recurrent cases, 145 (32.6 %) cases were confirmed to harbor the same pathogenic species as previous infections. RAPD PCR confirmed the same species strain in 49 (11 %) of the recurrent infections. The contribution of new infections as compared to persistent infections in cases of clinical mastitis is clear from the data. Future studies in recurrent clinical mastitis control should be focused on influencing factors to prevent new infections in addition to therapeutic intervention and bacteriological cure.

1. Introduction

Udder health in subclinical mastitis has increased in the modern era, bringing more focus to clinical mastitis. Scrutiny is warranted in these cases in contexts of animal welfare, reduction of antimicrobial usage and interrupting the farm routine. German dairy herds report an almost 50 % rate of recurrent clinical mastitis (Picker, 2012; Zoché-Golob and Spilke, 2013), leading to a reductive influence on the herd life of animals (Bar et al., 2008). Preestablished risk factors include parity, higher milk production, known pathogenic species (Jamali et al., 2018), a previous infection, and infection pressure (Griege et al., 2014). Persistent or novel infections leading to recurrent mastitis cannot be clearly distinguished by standard diagnostic methods, although disease management strategies differ considerably based on the nature of the infection. Unsuccessful therapy is one of the causes of persistent infection, e.g., low concentration of antimicrobial agent at a site of action also favored by biofilms (Oliveira et al., 2006; Hoiby et al., 2011). Intracellular occurrence or growth of the pathogen (Shinji et al., 2011) and protection by connective tissue are other risk factors. Responses

may include resistance testing, follow-up treatment or increased dosage, additional therapy or even culling. New infections, in comparison, may stem from a different or same strain or species of the causative agent of the pathogenic microorganism after achieving a bacteriological cure of the previous mastitis. Hygienic animal husbandry should be implemented in order to avoid new infections in these cases since pathogenic elimination has been achieved. This discrimination is useful in understanding recurrent mastitis. In order to expand the scarce knowledge on this issue, this study aimed to analyze the distribution of pathogens in persistent and new infection cases. The rates of these microorganisms occurring in recurrent cases were assessed to identify the frequency of pathogens persisting in the udder quarter and causing recurrent mastitis. Microbial isolates were collected from the first and all following mastitis cases on both host and quarter level. If the bacterial species was found to be the same in the first and subsequent infections, a molecular biological typing method was applied to compare the genetic fingerprint of the strains.

* Corresponding author.
 E-mail address: volker.kroemker@sund.ku.dk (V. Krömker).

2. Material and methods

Trained researchers aseptically collected quarter foremilk samples from confirmed clinical mastitis cases from three Northern German dairy farms as per the German Veterinary Association protocol (2009) during a period from 2011 to 2015. Symptoms like milk clots, swelling of the udder tissue, pain, and increased temperature were used to diagnose clinical mastitis cases. The samples were transported in a boracic acid-based preservative to the laboratory of the University of Applied Sciences and Arts Hannover (Hanover, Germany) for microbiological analysis within two days. Microbiological analysis was performed as per the GVA (German Veterinary Association) (2009). 10 µL of each milk sample were streaked on one quadrant of an esculin blood agar plate (Oxoid, Wesel, Germany). The plates were examined after 24 h and 48 h of incubation at 37 °C. The grown colonies were initially differentiated by their hemolysis patterns, ability to hydrolyze esculin, cell morphology and Gram status. Non-hemolytic Gram-positive catalase positive cocci (3 % H₂O₂, Merck, Darmstadt, Germany) were defined as non-aureus staphylococci (NAS), such with β hemolysis were further differentiated applying clumping factor test (DiaMondial Staph Plus Kit, Sekisui Virotech, Russelsheim, Germany). *Staphylococcus (Staph.) aureus* was clumping factor positive and NAS negative. Catalase negative Gram-positive cocci which hydrolyzed esculin were subcultivated on modified Rambach agar according to Watts et al. (1993) to differentiate between *Streptococcus (Strep.) uberis* and Enterococcus species. Esculin non-hydrolyzing Gram-positive, catalase negative cocci were further differentiated via Lancefield serotyping (DiaMondial Streptococcal Extraction Kit, Sekisui Virotech, Russelsheim, Germany) and referred as *Streptococcus (Strep.) agalactiae*, *Streptococcus (Strep.) dysgalactiae* and *Streptococcus (Strep.) canis*. Gram-positive irregular rods with Y-shaped cell configuration were identified as *Trueperella (T.) pyogenes*, if they were β-hemolytic and catalase and esculin negative. Conversely, Gram-positive, non-hemolytic catalase positive irregular rods were specified as coryneforms. Gram-negative rods were distinguished by their ability to catabolize glucose under aerobic and anaerobic conditions (glucose supplemented oxidation-fermentation test medium, Merck, Darmstadt, Germany) and cytochrome C oxidase production (Bactident Oxidase, Merck, Darmstadt, Germany). Cytochrome C oxidase negative rods fermenting glucose were subcultured on Chromocult® Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) to distinguish *Escherichia (E.) coli* and other coliforms. Non-motile other coliforms were reported as *Klebsiella* spp. Gram-negative, cytochrome C oxidase positive bacteria which metabolized glucose oxidatively, were defined as *Pseudomonas* spp. Yeasts and Protothecha were differentiated through microscopy according to their specific cell morphology.

The samples were contaminated if more than two different colonies were identified per plate, although *Staph. aureus*, *Strep. dysgalactiae*, and *T. pyogenes* isolates were taken into account. One isolate from each identified species per sample was stored at -80 °C in a medium comprising 80 % Brain Heart Infusion Broth (Merck, Darmstadt) and 20 % glycerol until molecular analysis.

Recurrent mastitis was classified as repeated infection within one lactation cycle at a minimum interval of 14 days, in the same host and quarter, after a previous mastitis diagnosis (Barkema et al., 1998; Döpfer et al., 1999; Schukken et al., 2010). If the same pathogen was confirmed in the subsequent mastitis case as in the previous infection, a Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD PCR) was carried out for the further discrimination of these selected isolates.

Bacterial DNA was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) as per the manufacturer's instructions. RAPD PCR was carried out in a 25 µL reaction volume containing 12.5 µL ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), 20 pmol of primer (listed in Table 1), 5 µL of the template, and water to make up the volume. Amplification was performed in an Mx3005 P qPCR System (Agilent, Santa Clara,

California, USA), using previously published methods as described in Table 1. RAPD PCR products were stained with MIDORI^{Green} Direct (NISSON Genetics Europe GmbH, Düren, Germany) and separated on a 2 % agarose gel. Identical RAPD patterns of PCR products were defined as the same strain.

A Chi-square (χ^2) test was performed for statistical analyses, using SPSS 25.0 (IBM SPSS 25.0.0.0, Armonk, USA). The results were defined to be statistically significant below a p-value of 0.05.

3. Results and discussion

Of the 2043 mastitis cases recorded on a quarter level, 1598 were first cases and 445 were recurrent cases within the same lactation cycle. Among the recurrent cases, 145 had the same pathogenic species compared to previous infections. RAPD PCR was utilized to confirm 49 (11 %) of all 445 recurrent cases to be the same pathogen strain as in previous infection (Fig. 1). Since reinfection with the same strain is possible, the number of identified persistent cases (same strain as previous case) can be generally lower than 11 %.

Table 2 describes the frequencies of different pathogens isolated from mastitis milk samples; *Strep. uberis* was the most frequently isolated pathogen, followed by *E. coli*, *Staph. aureus*, NAS, *Strep. dysgalactiae*, coliform bacteria other than *E. coli*, and *T. pyogenes* as the least frequently isolated pathogen. The highest frequency of persistent infections was recorded for *T. pyogenes* (37.5 %), although this is subjected to bias owing to the small number of cases (two animals), followed by *Staph. aureus* (29.0 %), *E. coli* (28.9 %), *Strep. dysgalactiae* (25.0 %), while *Strep. uberis* had the lowest frequency of persistent infections at 14.8 %. The contaminated samples were 10.9 % while 23.4 % did not show any growth.

The distribution of recurrent and persistent infections was statistically significant between all species, as revealed by chi-square (χ^2) test ($p < 0.05$). Some species showed more recurrence at the species level compared to others, while some were more likely to cause persistent infections. Similar to previous reports, *Strep. uberis* (Swinkels et al., 2013) and *Staph. aureus* recorded the highest frequencies causing recurrent infections. The contagious *Staph. aureus*, as expected, showed high persistence (29 % of recurrent *Staph. aureus* cases) and also the highest recurrence (27 % out of all *Staph. aureus* cases). *Strep. uberis* infections accounted for 14.8 % of persistent cases, and a high recurrence rate similar to *Staph. aureus* (24 % of all *Strep. uberis* cases). Persistent infection was recorded for each third recurrent case with *Staph. aureus* (same species as the previous case), while it was the seventh case for *Strep. uberis* (persistent). This indicates that the study farms harbor a high number of different *Strep. uberis* strains showing low persistence in the hosts' udders but causing high recurrence, probably due to their environmental origin (Wente et al., 2019). Infection with these pathogens may increase the hosts' susceptibility to novel infections with other pathogens. Additionally, of note is the fact that some persistent cases belonged to the same host; for instance, five *Strep. uberis* infected cows (two in their second, two in third, and one in fourth lactation cycle) harbored a persistent infection with several clinical episodes, and one *E. coli* infected cow (in the third lactation) suffered from five persistent infections. Few animals in this study were found with successive infections with the same strain (Table 2), with most in a higher lactation cycle. Higher lactation cycles have been previously correlated with higher susceptibility to mastitis (Pinzón-Sánchez and Ruegg, 2011). In light of this fact, it may be necessary to scrutinize the mastitis history of these animals to decide whether this therapy is worthy or not. Bar et al. (2008) found nearly the half of all recurrent cases to be caused by the same pathogen as in the previous infection, while the current study puts this proportion closer to one-third. Several factors influence this proportion and may possibly increase if the herd suffers from contagious mastitis. Microbial growth was absent in 23.4 % of clinical mastitis cases. This may be due to insufficient sample volume. Although 10 µL of the milk sample—as

Table 1
Applied RAPD PCR –Primer.

	RAPD-Primer	Primer sequence 5'-3'	Source
<i>Staph. aureus</i>	Primer C	CGGGGGACTGTGGGCGCCATCT	Damiani et al., 1996
NAS	Primer C	CGGGGGACTGTGGGCGCCATCT	Damiani et al., 1996
Coliform bacteria	256	AACGGCGAAC	Pachéo et al., 1996
<i>E. coli</i>	256	AACGGCGAAC	Pachéo et al., 1996
<i>Strep. uberis</i>	OPE 04	GTGACATGCC	Gillespie et al., 1998
<i>Strep. dysgalactiae</i>	OPE 04	GTGACATGCC	Gillespie et al., 1998
<i>T. pyogenes</i>	Primer A	CTGGCGGCTTG	Hijazin et al., 2013

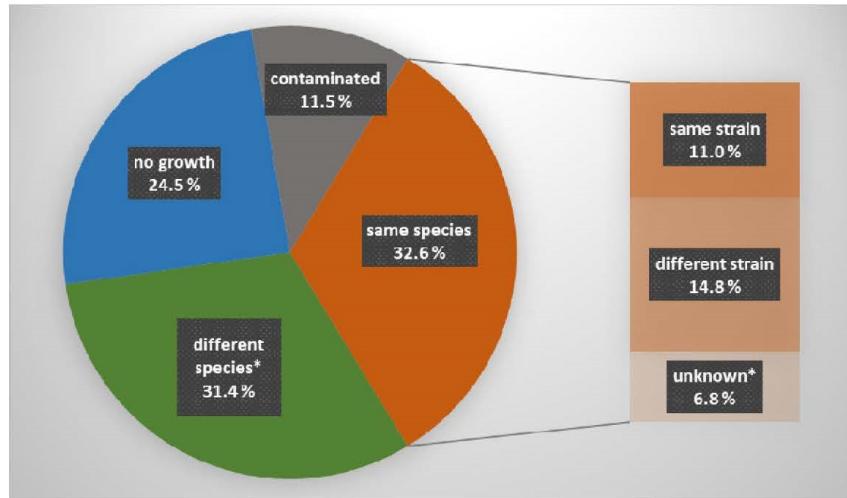


Fig. 1. Occurrence of 445 (100 %) recurrent clinical mastitis cases.

*strain typing not performed.

Table 2
Distribution of the cases by species.

Species	mastitis cases (% of all cases)	first cases (% of all cases)	recurrent cases (% of all cases)	Same species as in previous cases (% out of recurrent cases)	Same strain as in previous cases (% out of recurrent cases)	n.p.*** (% out of recurrent cases)
<i>Strep. uberis</i>	592 (100 %)	450 (76 %)	142 (24 %)	88/142 (62 %)	21/142 ^a (14.8 %)	24/142 (16.9 %)
<i>E. coli</i>	306 (100 %)	261 (85.3 %)	45 (14.7 %)	25/45 (55.6 %)	13/45 ^b (28.9 %)	2/45 (4.4 %)
<i>Staph. aureus</i>	115 (100 %)	84 (73 %)	31 (27 %)	23/31 (74.2 %)	9/31 ^c (29 %)	3/31 (9.7 %)
non - <i>Staph. aureus</i> staphylococci	69 (100 %)	61 (88.4 %)	8 (11.6 %)	1/8 (12.5 %)	0	0
<i>Strep. dysgalactiae</i>	57 (100 %)	45 (79 %)	12 (21 %)	4/12 (33.3 %)	3/12 (25 %)	0
Coliform bacteria other than <i>E. coli</i>	54 ^d (100 %)	44 ^d (81.5 %)	10 ^d (18.5 %)	3/10 ^d (30 %)	0	0
<i>T. pyogenes</i>	36 (100 %)	28 (77.8 %)	8 (22.2 %)	4/8 (50 %)	3/8 ^d (37.5 %)	1/8 (12.5 %)
no growth	479 (100 %)	370 (77.2 %)	109 (22.8 %)			
contaminated**	222 (100 %)	171 (77 %)	51 (23 %)			
others*	113 (100 %)	84 (74.3 %)	29 (25.7 %)			
Total	2043 (100 %)	1598 (78.2 %)	445 (21.8 %)			

Bacillus* spp., coryneforms, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Protopthecca*, Yeasts, strain typing not performed; **more than two pathogens were isolated; *n.p. = strain typing not performed; ^a*Klebsiella* spp. (n = 14); ^b*Klebsiella* spp. (n = 12); ^c*Klebsiella* spp. (n = 2); ^d*Klebsiella* spp. (n = 0); ^efive cows had two cases consecutively; ^fone cow had five cases consecutively, one cow had two cases; ^gtwo cows had two cases consecutively; ^hone cow had two cases consecutively.

standard—was used for the culture, this limits the pathogen detection in case of a low shedding (Krömer et al., 2010), additionally the reduction of the colony forming units during the transport is possible. Other pathogens, which do not grow under the chosen conditions (e. g. *Mycoplasma* spp.), can provide a no growth result. Since methodological choices can be important for the number of recurrent cases

encountered, this study followed the 14 day-interval between distinct infections based on the udder quarters method. Time intervals of ≥3, 5, 7, or 14 days have been previously described in the literature (Barkema et al., 1998; Döpfer et al., 1999; Bradley and Green, 2001; Gröhn et al., 2004; Schukken et al., 2010). One isolate growth from milk samples was taken for strain typing since Oliver et al. (1998) showed that *Strep.*

uberis isolates from a single milk sample usually belong to the same strain. The RAPD PCR method is frequently chosen for its suitability as a molecular diagnostic tool for high throughput of isolates (Oliver et al., 1998; Döpfer et al., 1999; Zadoks and Schukken, 2006). This method does have a propensity for false results, since different amplified regions in different bacterial genomes may have the same length that would not be distinguishable from each other by RAPD PCR, and different species/strains may appear identical. However, the above results found more different amplification patterns than identical, suggesting this bias should not have severely influenced the final conclusions. In the case of identified identical strains, reinfection with the same strain cannot be ruled out, thus lowering the number of persistent cases than reported numbers, mentioned previously in the results.

4. Conclusion

Overall, about one-third of all recurrent cases (145 of 445) were caused by same species. The RAPD PCR results confirmed the frequency of persistent recurrent infections with the same strain at 11 % (49 of 445). Persistence and recurrence vary by pathogenic agents. Pathogens, such as *Strep. uberis*, may have high recurrence frequency but low persistence frequency. In conclusion, the enforcement of preventive methods to avoid new infections along with the improvement in treatment regimens is necessary for effective disease management of recurrent clinical mastitis.

Funding

This study was financially supported by the Steinbeis Research Center Milk Science, Kirchberg, Germany.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

We would like to thank the staff of the participating dairy farms (milkers, herd managers and veterinarians) for their help in this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108682>.

References

- Bar, D., Gröhn, Y.T., Bennett, G., González, R.N., Hert, J.A., Schulte, H.F., Tauer, L.W., Welcome, F.L., Schukken, Y.H., 2008. Effects of repeated episodes of generic clinical mastitis on mortality and culling in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 2196–2204. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0460>.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J., Beijboer, M.L., Willemink, H., Benedictus, G., Brand, A., 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81, 411–419. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75591-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75591-2).
- Bradley, A.J., Green, M.J., 2001. Adaption of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1845–1849. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1845-1849.2001>.
- Damiani, G., Telecco, S., Comincini, S., Sironi, M., Carretto, E., Marone, P., 1996. Comparison of an improved RAPD fingerprinting with different typing methods for discriminating clinical isolates of *Staphylococcus* spp. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 12, 163–169. <https://doi.org/10.1007/BF00145502>.
- Döpfer, D., Barkema, H.W., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Gaasstra, W., 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 80–85. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75211-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75211-2).
- Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., Pankay, J.W., Oliver, S.P., 1998. Subtyping of *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions by DNA fingerprinting. *J. Vet. Med. A*, 585–593. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00831.x>.
- Grieger, A.-S., Zoche-Golob, V., Paduch, J.-H., Hoedemaker, M., Krömler, V., 2014. Rezidivierende klinische Mastitiden bei Milchkühen–Bedeutung und Ursachen. [Recurrent clinical mastitis in dairy cattle–importance and causes]. *Tierarztl. Prax. Augs. G Grossiere*, 42, 156–162. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623218>.
- Gröhn, Y.T., Wilson, D.J., Gonzales, R.N., Hertl, J.A., Schulte, H., Bennett, G., Schukken, Y.H., 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3358–3374. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73472-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73472-4).
- GVA (German Veterinary Association), 2009. Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserreger. Guidelines for Antiseptic Milk Sampling and Guidelines to Isolate and Identify Mastitis Pathogens., 2nd ed. GVA, Gießen, Germany, pp. 1–92.
- Hijazin, M., Sammarra, O., Ulbeg-Mohyla, H., Nagib, S., Alber, J., Lämmler, C., Kämpfer, P., Glaeser, S.P., Busse, H.J., Kassmannhauer, J., Prenger-Bennighoff, E., Weiss, R., Siebert, U., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Zschöck, M., 2013. *Arcanobacterium phocisnile* sp. nov., isolated from harbour seals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2019–2024. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045591-0>.
- Hölby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z.J., Moser, C., Jensen, P.O., Molin, S., Gluskov, M., Tolker-Nielsen, T., Bjarnsholt, T., 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 3, 55–65. <https://doi.org/10.4248/IOS11026>.
- Jamali, H., Barkema, H.W., Jacques, M., Lavallée-Bourget, E.-M., Malouin, F., Saini, V., Stryhn, H., Dufour, S., 2018. Invited review: incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 4729–4746. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13730>.
- Krömler, V., Paduch, J.H., Klocke, D., Zinke, C., 2010. Microbiological investigation of culture negative milk samples of clinical mastitis cows. *Milchwissenschaft*, 65, 123–126.
- Olivera, M., Bezerra, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela, C.L., 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 118, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.008>.
- Oliver, S.P., Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., 1998. Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 69–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12892.x>.
- Pacheco, R., Gutt, B.E.C., de Almeida, D.F., Ferreira, L.C.S., 1996. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. *Res. Microbiol.* 147, 175–182. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)80217-8](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)80217-8).
- Picker, J.C., 2012. Aspects of Recurrent Mastitis. Master thesis, University Göttingen Germany.
- Pinzón-Sánchez, C., Ruegg, P.I., 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94, 3397–3410. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3925>.
- Schukken, Y.H., Bar, D., Hertl, J., Gröhn, Y.T., 2010. Correlated time to event data: modeling repeated clinical mastitis data from dairy cattle in New York State. *Prev. Vet. Med.* 97, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.09.012>.
- Shinji, H., Yosizawa, Y., Tajima, A., Iwase, T., Sugimoto, S., Seki, K., Mizunoe, Y., 2011. Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79, 2215–2223. <https://doi.org/10.1128/IAI.00133-11>.
- Swinkels, J.M., Lam, T.J.G.M., Green, M.J., Bradley, A.J., 2013. Effect of extended cefquinome treatment on clinical persistence or recurrence of environmental clinical mastitis. *Vet. J.* 197, 682–687. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.010>.
- Watts, J.L., Salmon, S.A., Yancey Jr., J.R., 1993. Use of modified Rambach agar to differentiate *Streptococcus uberis* from other mastitis streptococci. *J. Dairy Sci.* 76, 1740–1743. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77506-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77506-2).
- Wente, N., Klocke, D., Paduch, J.-H., Zhang, Y., the Seeth, M., Zoche-Golob, V., Reinecke, F., Mohr, E., Krömler, V., 2019. Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. *J. Dairy Sci.* 102, 9360–9369. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16669>.
- Zadoks, R.N., Schukken, Y.H., 2006. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22, 229–261. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.11.005>.
- Zoche-Golob, V., Spilke, J., 2013. Herd-specific estimation of milk yield reduction due to recurrent clinical mastitis. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 126, 269–276.

2.3 Publikation 3: Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass [Microbiological mastitis diagnostics for every occasion].

Nicole Wente, Doris Klocke, Elmar Mohr, Volker Krömker

Praktischer Tierarzt (2019), (100) 1067–1075

DOI 10.2376/0032-681X-1925

Republikation:

Mastitis: Mikrobiologische Diagnostik für jeden Anlass

news4vets (2020), (9) 50-57



DOI 10.2376/0032-681X-1925

Hochschule Hannover, Fakultät II – Bioverfahrenstechnik, Mikrobiologie¹
 Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Tiergesundheit und Tierschutz²
 Peer-reviewed | Eingegangen: 12.07.2019 | Angenommen: 22.08.2019

Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass

Nicole Wente^{1,2}, Doris Klocke¹, Elmar Mohr¹, Volker Krömker¹

Korrespondenzadresse: nicole.wente@hs-hannover.de

Zusammenfassung Die mikrobiologische Mastitisdiagnostik ist ein wesentlicher Bestandteil der Mastitisbekämpfung. Unterschiedliche Mikroorganismen haben unterschiedliche Habitate und erfordern unterschiedliche Vorgehensweisen in der Bekämpfung im Rahmen der Neuinfektionsminderung und der Verkürzung bestehender Infektionen. Die Neu- und Weiterentwicklung mikrobiologischer Methoden hat die diagnostischen Möglichkeiten in den letzten Jahren erheblich vergrößert. Schnelltestsverfahren und molekulargenetische Techniken erweitern die Möglichkeiten, Mastitiden in Milchviehbetrieben sachgerecht zu erkennen und zu bekämpfen. Der Beitrag gibt Anwendungsempfehlungen zur jeweiligen mikrobiologischen Methode im Rahmen der epidemiologischen und therapeutischen Beschreibung der für die Uterusgesundheit relevanten Mikroorganismen.

Schlüsselwörter Kulturelle Mikrobiologie, Milchproben, PCR, Stammvergleiche

Microbiological mastitis diagnostics for every occasion

Summary The microbiological diagnosis of mastitis is an essential part of mastitis control. Different microorganisms have different habitats and require different methods of control to reduce new infections and shorten existing infections. The increase in microbiological methods has considerably increased the diagnostic possibilities in recent years. Rapid test methods and molecular biological techniques extend the possibilities of dairy farms to properly detect and control mastitis. The article gives recommendations for the respective microbiological method for application purposes within the scope of epidemiological and therapeutic characterisation of microorganisms relevant for udder health.

Keywords Cultural Microbiology, Milk samples, PCR, Strain Comparisons

Einleitung

In den letzten Jahren haben sich die diagnostischen Möglichkeiten im Bereich der Mastitisdiagnostik deutlich erweitert. Verschiedene Testverfahren stehen für verschiedene Probenahmeebenen zur Verfügung. Die richtige diagnostische Vorgehensweise stellt sicher, dass die jeweilige Fragestellung entsprechend beantwortet werden kann. Der vorliegende Beitrag beschreibt gebräuchliche Methoden und erläutert für verschiedene Fragestellungen und Anwendungsbereiche geeignete und ungeeignete Vorgehensweisen. Im Vordergrund steht dabei die Ableitung praktischer Empfehlungen.

Kulturelle Diagnostik

Die meisten Milchproben werden in Deutschland mit einer klassischen kulturellen Diagnostik auf mesophile aerobe Mikroorganismen untersucht. Hierzu werden nicht-selektive Medien (zumeist Blutagar mit 5–10 % Blutzusatz) eingesetzt. Das Wachstum von mehr als zwei verschiedenen Kolonietypen wird dabei üblicherweise als Hinweis auf Kontamination der Milchprobe gewertet. Mit Ausnahme der

anspruchsvollen Mykoplasmen und der langsam wachsenden atypischen Mykobakterien wachsen die üblichen aerob anziehbaren Mastitiserreger auf diesem nicht-selektiven Nährboden innerhalb von 72 Stunden.

Eine erste grobe Einordnung anhand der Koloniemorphologie, der Åskulinspaltung und der Hämolyse muss durch weitergehende Tests (z. B. Gram-Färbung, serologische, biochemische und enzymatische Tests) ergänzt werden. Für die weitergehende oder gezielte Diagnostik werden auch selektive Kulturmedien wie z. B. der Furazolidon-Agar (zur Unterscheidung zwischen Mikrokokken und Staphylokokken) oder der Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC, für Hefen und Schimmelpilze) verwendet (Claessens et al. 1996, DVG 2018). Eine Übersicht der in Deutschland aus Milchproben isolierten Mastitiserreger ist unter https://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/19-03-18_220327_DVG_Fachgruppe_korrigiert_002.pdf zu finden.

Diese Diagnostik kann in spezialisierten Laboren oder in der tierärztlichen Praxis durchgeführt werden. Allerdings hängt die



Qualität der Untersuchungsergebnisse vom Probendurchsatz, der Anzahl durchgeföhrter Bestätigungstests und der Erfahrung der Untersuchenden ab. Die Mitführung von Referenzstämmen – im Sinne einer Positivkontrolle – ist unverzichtbar. Um den Aufwand zu verringern, kann die diagnostische Tiefe beschränkt werden. So kann z. B. anstatt bis zu *S. uberis*, Enterokokken und Laktokokken nur bis zu Äskulin-positiven Streptokokken differenziert werden. Da der Nachweis der drei Gattungen allerdings unterschiedliche Maßnahmen zur Verbesserung der Eutergesundheit im Milchviehbetrieb erfordert, ist die Beschränkung der diagnostischen Tiefe nicht sinnvoll. Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Epidemiologie einzelner Mastitiserreger führen zu einem erhöhten Bedarf an differenzierteren diagnostischen Techniken. Andererseits steht die Erhöhung der Untersuchungskosten einer größeren diagnostischen Tiefe entgegen.

Die bei kulturellen Verfahren isolierten Mikroorganismen können für eine weiterführende Diagnostik (z. B. Resistenzbestimmung, PCR, MALDI-TOF) eingesetzt werden. Einige Labore in Deutschland verfügen inzwischen über ein Gerät, das Massenanalyse von chemischen Verbindungen (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung, MALDI) mit einer Flugzeitanalyse (Time Of Flight, TOF) verbindet und so sehr spezifisch Mikroorganismen identifizieren kann (Barreiro et al. 2017). Allerdings werden aufgrund der hochspezifischen Analyse häufig bakterielle Spezies ausgewiesen, deren Bedeutung für die Eutergesundheit aufgrund fehlender epidemiologischer Einschätzungen nicht bewertet werden kann.

Kulturelle „On-farm-Diagnostik“ zur therapeutischen Entscheidungsfindung

Eine kulturelle „On-farm-Diagnostik“ ersetzt nicht die konventionelle zytomikrobiologische Diagnostik und Resistenzprüfung in einem spezialisierten Untersuchungslabor, sondern gibt dem Behandelnden lediglich eine schnelle Hilfe bei der Auswahl therapeutischer Maßnahmen. Da hier nur eine Sterilitätsprüfung der Milch durchgeföhr wird, können diese Tests unter tierärztlicher Aufsicht in landwirtschaftlichen Betrieben unter Einhaltung der erforderlichen Hygiene durchgeföhr werden. Vorteile der für diesen Zweck konzipierten Testverfahren sind das schnelle Ergebnis und der geringe Aufwand. Die Testdurchführung findet vor Ort statt, somit entfällt die Probentransportzeit, ebenfalls zeitsparend ist die kurze Inkubationszeit bis zur Auswertung. Die Tests sind simpel in der Anwendung und liefern nach zwölf oder mehr Stunden valide Ergebnisse. Derzeit sind zwei schnelle Testsysteme auf dem deutschen Markt erhältlich. Eine Kombination von Petrifilm® (3M, Rapid Coliform und Rapid Aerobic Count) erlaubt dem Anwender eine quantitative Identifikation von Keimgruppen (mesophile aerobe Gesamtkeimzahl und coliforme Mikroorganismen). So kann ermittelt werden, ob „kein Wachstum“, „gramnegatives Wachstum“ oder mittels Ausschlussprinzip „grampositives Wachstum“ vorliegt (Kock et al. 2018). Das zweite Testsystem ist MastDecide® (QuiDee GmbH); das qualitative

Zweiröhrchensystem erlaubt nach zwölf Stunden entsprechende Aussagen, sodass beim Vorliegen eines grampositiven Ergebnisses eine lokale antibiotische Therapie eingeleitet werden kann. Hierbei sind die besonders einfache und sichere Anwendung sowie Auswertung vorteilhaft (Leimbach und Krömer 2018). Weitere kulturbasierte Testverfahren sind verfügbar. Sie ermöglichen eine erleichterte kulturbasierte Diagnostik bis zur Gattungsebene, sind damit aber auf das tierärztliche Praxislabor beschränkt. Hierzu zählen z. B. der Speed® Mam Color Test (Virbac) und der Veto-Rapid Test (Vetoquinol). Aufgrund des größeren Arbeitsaufwandes und einer initialen Inkubation von mindestens 24 Stunden (bis zu sieben Tagen, Speed® Mam Color, Mykoplasmen) sind sie langsamer und aufwendiger in der Handhabung als die vorher erwähnten Tests. Speed® Mam Color basiert auf dem Prinzip einer bunten Reihe und erlaubt die Charakterisierung der Erreger nach Gattung (Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken, Enterobacteriaceae, Mykoplasmen, Pseudomonaden und *E. coli*) sowie die Bestimmung der Resistenzen gegenüber 14 Antibiotikakontaminationen. Bei VetoRapid handelt es sich um eine in drei Sektoren unterteilte Petrischale, versehen mit drei unterschiedlichen selektiven Nährmedien; dieser Test erlaubt eine Kategorisierung in *E. coli*, sonstige Coliforme, *S. aureus*, NAS (Nicht-Aureus-Staphylokokken), Äskulin-positive Streptokokken, Äskulin-negative Streptokokken mit α-, β- oder γ-Hämolyse.

Gegenüber der Laboruntersuchung haben die Schnelltestsysteme für den direkten Einsatz im landwirtschaftlichen Betrieb sowohl ihre Stärken als auch konzeptbedingte Schwächen. Die Tests können aufgrund von erhöhtem Inokulationsvolumen (z. B. 100 µl anstatt von 10 µl) tendenziell geringere Erregerauscheidungen nachweisen und sind somit gegebenenfalls sensibler als die Untersuchungsverfahren im Routine-labor. Dafür können sie keine langsam wachsenden (z. B. Eukaryonten wie Hefen und Protozoen oder Corynebakterien) oder anspruchsvollen Mikroorganismen (z. B. Mykoplasmen) anzeigen. Diese Detektionslücken sind für das diagnostische Ziel nicht entscheidend, weil Infektionen mit Eukaryonten und Mykoplasmen nicht antibiotisch therapierbar sind und Infektionen mit Corynebakterien keine antibiotische Therapie erfordern. Ohne Anwendung dieser Systeme würden klinische Mastitiden nahezu immer antibiotisch behandelt werden (Krömer et al. 2018). Solche Schnelltestsysteme ermöglichen unter strukturierter Anwendung eine Implementierung und Etablierung evidenzbasierter Mastitistherapiekonzepte (Kock et al. 2018, Mansion-de Vries et al. 2014, 2015) und somit eine erhebliche Einsparung von antibiotischen Dosen ohne Verlust von bakteriologischer Heilung (Kock et al. 2018, Mansion-de Vries et al. 2016).

Bei der Anwendung ist dennoch zu beachten, dass eine saubere Probenahme und Beimpfung der Schnelltestmedien essenziell sind, da nur so zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können. In beiden Testsystemen werden mitunter pathogene Mikroorganismen kultiviert, weswegen diese erst nach dem ordnungsgemäßen Autoklavieren über den Hausmüll entsorgt werden dürfen.

**Tab. 1: Milchproben für die mikrobiologische Diagnostik von Mastitiden**

Ebene	Diagnostik
Viertelgemek	Kulturelle und molekularbiologische Mastitisdiagnostik
Gesamtgemek	Einzeltierselektion aufgrund von Infektionen mit eradicierbaren Mikroorganismen, z. B. <i>S. agalactiae</i> , <i>S. canis</i> oder Mykoplasmen
Gruppenpoolproben/Herdensammelmilch	Untersuchung auf eradicierbare Mikroorganismen (z. B. <i>S. agalactiae</i> , <i>Mycoplasma bovis</i> oder spp.) oder quantitative kulturelle Untersuchung zur Beurteilung des aktuellen Infektionsrisikos (z. B. <i>S. aureus</i>)

PCR-Diagnostik

Das PCR (Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion)-Verfahren ist im Gegensatz zur kulturellen Diagnostik eine gezielte Suche nach der DNS ausgewählter Erreger. Somit können nur Mikroorganismen gefunden werden, nach denen auch gesucht wird. Diese Methode basiert auf der hochspezifischen Detektion, Vervielfältigung und Visualisierung der Erreger-DNS aus der Milchprobe. Dabei kann die DNS sowohl aus vitalen als auch bereits abgestorbenen Erregern (z. B. nach antibiotischer Vorbehandlung) innerhalb weniger Stunden nachgewiesen werden. Dieses Verfahren eignet sich sehr gut, um langsam wachsende und anspruchsvolle Erreger zu detektieren, damit schnelle Entscheidungen getroffen werden können, um z. B. Tiere nicht zu kaufen oder zu merzen. Die PCR eignet sich wegen ihrer hohen Spezifität bei akzeptabler Sensitivität gut, um Poolproben bzw. Tankmilchproben auf kuhassoziierte Mikroorganismen wie *S. agalactiae* oder Mykoplasmen zu untersuchen (► Tab. 1). Grundsätzlich können auch Resistenzgene von Mastitiserregern detektiert werden, wie z. B. das *blaZ*-Gen, das für die Produktion von β-Lactamase verantwortlich ist. Dabei ist zu beachten, dass nicht jedes detektierte Gen immer exprimiert wird, d. h. ein Erreger, der das *blaZ*-Gen trägt, muss nicht zwangsläufig β-Lactamase bilden und somit phänotypisch Penicillin-resistent sein. Die Untersuchung von Gesamtgemelkproben oder Herdensammelmilchproben mit PCR-Mastitiskits ist zur Einschätzung eines Bestandsproblems mit umweltassoziierten Mikroorganismen ungeeignet, da eine kontaminationsfreie Entnahme dieser Proben nicht möglich ist und diese Mikroorganismen ubiquitär vorhanden sind (► Tab. 1).

Zur molekularbiologischen Untersuchung von Milchproben stehen verschiedene kommerzielle Untersuchungskits und „in-house“ PCR-Methoden verschiedener Labore mit unterschiedlichen Erreger-nachweisspektrien zur Verfügung. Im Gegensatz zur kulturellen Diagnostik bietet dieses Verfahren eine Option der Prozessautomatisierung im Labor. Allerdings sind die Reagenzien sowie die benötigte Geräteausstattung für die PCR-Untersuchung kostenintensiv. Auch die PCR-Methode erfordert eine sorgfältige Probennahme, um ein kontaminationsbedingtes falsch positives Ergebnis ausschließen zu können. Falsch negative Befunde sind durch störende Faktoren im PCR-Ansatz, DNS-zersetzende Enzyme in der Milchprobe und Mutationen in der Zielsequenz der Erreger-DNS ebenfalls möglich (DVG 2010).

Stammvergleiche zur Identifikation von kuhassoziierten Stämmen oder zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge

An die Gattungs- und Speziesbestimmung kann eine weiterführende Diagnostik angeschlossen werden. Diese basiert auf einem Vergleich des genetischen Materials der vorliegenden Speziesisolate untereinander und hilft, eine Aussage über deren Diversität bzw. Stammvielfalt innerhalb eines Betriebes zu treffen (Zadoks und Schukken 2006). So kann z. B. identifiziert werden, ob wenige Stämme von *Sc. uberis* oder viele unterschiedliche im Falle eines Ausbruchs in einem Betrieb vorliegen (Zadoks et al. 2003). Eine geringe Stammvielfalt würde in diesem Fall auf ein kontagiöses Verhalten des Erregers hinweisen. Des Weiteren ist es möglich, die Stämme aus dem Umfeld der Tiere mit denen aus Milch an Mastitiden erkrankten Tieren zu vergleichen, um mögliche Übertragungswege zu identifizieren und eine geeignete Strategie zur Bekämpfung der Erreger aufzustellen (Schukken et al. 2012, Wente et al. 2019). Stammvergleiche können weiterhin zur Identifizierung von persistierenden Infektionen bei wiederkehrenden Mastitiden beitragen sowie die Bestimmung von Heilungsraten durch die Detektion von Neuinfektionen präzisieren (Wente et al. 2018). Denn eine Reinfektion mit einem anderen Stamm der gleichen Erregerspezies kann in der Routinediagnostik nicht erfasst werden. In der Routineuntersuchung sind Stammvergleichsuntersuchungen aufgrund des hohen Aufwandes bislang eine Ausnahme.

Stammvergleichsuntersuchungen werden mithilfe molekularbiologischer Methoden durchgeführt. Die Methoden (z. B. REA, PFGE, RAPD-PCR, MLST) variieren im Preis, der Präzision und der Untersuchungsdauer. Im Rahmen der REA (Restriction Endonuclease Analysis) erfolgt ein enzymatischer Zuschritt der DNS in unterschiedlich lange Fragmente, die anschließend mithilfe einer Elektrophorese nach ihrer Länge sortiert werden. Die Anzahl und die Länge der entstandenen DNS-Abschnitte hängen von der Spezies, deren Stamm und dem dafür eingesetzten Restriktionsenzym ab. Sind die Abschnitte, die dabei entstehen sollen, groß gewählt, so wird eine leistungsstärkere Elektrophorese mit einem pulsierenden elektrischen Feld eingesetzt (PFGE); als Ergebnis ergeben sich Bandenmuster für einzelne Isolate, die dann untereinander verglichen werden (Birren und Lai 1993). Beim MLST (Multilocus Sequence Typing) werden definierte Genabschnitte



Übersichtsartikel



aus dem bakteriologischen Genom mithilfe der PCR vervielfältigt und anschließend die Abfolge der Nukleotide in diesen Abschnitten bestimmt; dabei ergeben sich Profile, die mit den Profilen anderer Mikroorganismen aus speziellen Datenbanken abglichen werden können. Sind die Profile identisch, so geht man von einem Klon aus (Maiden et al. 1998). Die RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ist eine PCR-Methode mit anschließender elektrophoretischer Auf trennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe. Bei der RAPD-PCR muss der DNS-Abschnitt, im Gegensatz zu anderen Methoden, nicht bekannt sein. Es werden kurze Primer (ca. zehn Nukleotide) eingesetzt, diese haben durch ihre geringe Größe die Möglichkeit, an viele Stellen der vorliegenden DNS zu binden und somit viele Startpunkte für die replizierende Polymerase zu markieren. Dabei entstehen unterschiedlich lange DNS-Abschnitte, die nach einer Auf trennung mit der Gelelektrophorese Bandenmuster ergeben. Die entstandenen Profile einzelner Mikroorganismen werden untereinander verglichen (Williams et al. 1990). Bei ungleichen Stämmen sind die Bandenmuster aufgrund von Sequenzvariationen im Genom unterschiedlich. Für die RAPD-PCR ist keine kostenintensive Sonderausstattung der PCR anwendenden Labore notwendig, sie ist weniger aufwendig als die anderen Stammvergleichstechniken und somit besonders gut für die Routinediagnostik geeignet.

Probenahmeebene

Da das einzelne Drüsenviertel das infizierbare Kompartiment ist, ist eine Viertelgemelkprobe immer richtig. Soll mit der Untersuchung nur die Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen ausgeschlossen werden (Einzeltier bei Ankauf oder Herde nach Sanierung), können auch andere Proben (Einzelgemelk, Tankmilch) Verwendung finden (► Tab. 1 und ► Tab. 2).

Die richtige Diagnostik für jeden Anlass

Ein gezielter Antibiotikaeinsatz ist in Milchviehbetrieben nur durch Anwendung evidenzbasierter therapeutischer Konzepte möglich. Diese setzen die Anwendung von kulturellen Schnelltests bei den meisten klinischen Mastitiden voraus – lediglich bei Mastitisfällen von Tieren, die von vorneherein aufgrund ihrer Mastitis historie von einer antibiotischen Therapie nicht profitieren werden, kann auf die Anwendung des Tests verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil der Implementierung mikrobiologischer Schnelltestsysteme ist die mit ihnen einhergehende systematische Entnahme von Viertelgemelksproben klinischer Mastitiden. In Milchviehbetrieben ohne besondere Eutergesundheitsstörungen genügt dann die differenzierte kulturelle Untersuchung einer repräsentativen Stichprobe (in Milchviehbetrieben mit bis zu 20 klinischen Mastitiden pro Jahr: alle klinischen Fälle, darüber > 20 Fälle und mindestens 30 % der klinischen Fälle). Diese Stichprobe genügt, um die Erregerverteilung im Betrieb beschreiben zu können und Hinweise auf die kritische Verbreitung von *S. aureus* in der Herde (> oder < 5 % Herdenprävalenz *S. aureus*) zu erhalten (Krömker 2012). Zur Diagnostik gehört die angemessene Durchführung von Resistenzprüfungen. Da die lokale antibiotische Therapie

Fazit für die Praxis

Die verfügbaren diagnostischen Methoden erlauben Tierärzten und Landwirten eine gezielte Beurteilung der mikrobiologischen Eutergesundheitssituation. Die Vermeidung nicht geeigneter Methoden und überflüssiger Proben sowie die systematische Diskussion und Berücksichtigung der Befunde im Betrieb sind für eine Verbesserung der Eutergesundheit und eine gezielte antibiotische Mastitistherapie erforderlich.

bei modernen Therapiekonzepten auf grampositive Mikroorganismen beschränkt bleibt und Streptokokken nahezu vollständig Penicillin-empfindlich sind, ist die Resistenzprüfung von Staphylokokken besonders relevant.

Werden Tiere zugekauft (oder sollen positive Tiere direkt aus der Herde entnommen werden), empfiehlt sich die Untersuchung der Einzelgemelke dieser Tiere mithilfe der PCR-Diagnostik, um Tiere mit *S. agalactiae* und Mykoplasmen sowie evtl. *S. aureus* schnell zu identifizieren und vom Kauf abzusehen oder den Kauf rückgängig zu machen.

Im Rahmen der Begleitung von Sanierungsprozessen auf Herdenebene zur Bekämpfung von *S. agalactiae* und Mykoplasmen hat die Kontrolle der Herdensammelmilch oder von Einzeltanks zur Einschätzung des Herden- bzw. Gruppenstatus ihre Berechtigung (Krömker und Moroni 2018). Die Sanierung von Herden in Bezug auf *S. agalactiae* oder *S. canis* erfordert die wiederholte kulturelle Untersuchung von Viertelgemelksproben aller Kühe der Herde. Die Untersuchung von Poolproben oder Einzelgemelken ist aufgrund der mit dieser Untersuchungsebene einhergehenden Abnahme an Sensitivität für eine sichere Eradikation dieser Mikroorganismen auf Herdenebene nicht geeignet (► Tab. 1 und ► Tab. 2).

Die Untersuchung bestimmter Subgruppen (Frischabkalber [Fären/Kühe], hochzellige Tiere, Tiere zum Trockenstellen) kann für bestimmte Fragestellungen sinnvoll sein, beispielsweise bei hohen geburtsnahen Infektions- oder Erkrankungsraten, bei vielen chronisch euterkranken Tieren oder bei der Auswahl von Tieren und Vierteln für gezielte antibiotische Therapien zu Beginn der Trockenperiode.

Stammvergleichsmethoden sind immer dann von Wert, wenn die Verbreitungswege von Mikroorganismen innerhalb einer Herde ermittelt werden sollen. Sie erlauben die Unterscheidung zwischen kontagiösen und nichtkontagiösen Infektionsverläufen. Bei kontagiöser Infektion werden einzelne Mikroorganismenstämme aus infizierten Tieren oder aus Umwelthotspots an andere Tiere übertragen. Gelegentlich treten kontagiöse Verläufe bei „Umwelterrregern“, z. B. bei *Sc. uberis*, auf (Zadoks et al. 2003). Die alleinige Kenntnis der relevanten Bakterienarten führt hier nicht zu den richtigen Entscheidungen in der Bekämpfung. Bei nichtkontagiöser Infektion nehmen Tiere Mikroorganismen aus der Umwelt auf, geben diese

**Tab. 2: Mikrobiologische Diagnostik bei Mastitiden und Keimzahlproblemen**

Diagnostische Methode	Kosten	Probe	Ziel
Kultur im spezialisierten Labor	+	Viertelanfangsgemek	Herdenepidemiologie und Basis für Behandlungspläne, Resistenzprüfung
Kultur tierärztl. Praxis	++	Viertelanfangsgemek	Gattungsdiagnose und therapeutische Entscheidungsfindung
Kultur on-farm*	+	Viertelanfangsgemek	Therapeutische Entscheidungsfindung
PCR (kommerzielles Kit)	++	Einzelgemek oder VAG	Haupterregerbestimmung für Melzung- und Therapiemaßnahmen, Ankaufuntersuchung
Stammvergleich	+++	Isolate einer Art	Ermittlung von Infektionsmodalitäten, Bewertung des Therapieerfolgs
Mischuntersuchung aus PCR und kultureller Diagnostik	++ bis +++	Herdensammelmilch	Einschätzung des Herdenstatus
Kulturelle quantitative Keimgruppenuntersuchung von Einstreumaterial oder der Herdensammelmilch	++ bis +++	Einstreumaterial Herdensammelmilch	Beurteilung des mikrobiologischen Risikos frischer Einstreu Stufenkontrolle bei Keimzahlproblemen

*: < 10 €, ++: < 20 €, +++: > 20 €; * die Kultur „on-farm“ hat als Teil eines therapeutischen Entscheidungsprozesses einen positiven „Return on Invest“ zur Folge (Mansion-de Vries et al. 2016)

aber nicht oder nur geringfügig an andere Tiere weiter. In Betrieben mit solch einem Infektionsmuster sind zumeist viele verschiedene Stämme einer Art im Betrieb vorhanden. In diesen Fällen sind zur Verbesserung der Herdengesundheit die Überprüfung und Optimierung der Hygiene zumeist zielführend.

Die kulturelle quantitative Untersuchung von Keimgruppen (Gesamtkeimzahl, coliforme Mikroorganismen, äskulinspalende Streptokokken, Staphylokokken) in Proben frischer Einstreu kann die Kenntnisse zum einstrebbedingten Mastitisrisiko verbessern. Insbesondere wenn organisches Einstreumaterial zugekauft wird oder fragwürdiges Material benutzt werden muss, kann das Risiko

für die Eutergesundheit der Herde anhand der Untersuchung eingeschätzt werden.

Eine Untersuchung entsprechender Keimgruppen in der Herdensammelmilch – ergänzt um thermodure Mikroorganismen – kann als Stufenkontrolle (1. Probe: erste Ausschleusung der Melkanlage, 2. Probe: Tank vor der Einschleusung, 3. Probe: Tank nach der Einschleusung, 4. Probe: Tankanschluss) bei der Eingrenzung von Keimzahlproblemen helfen.

Ethische Anerkennung

Die Autoren versichern, während des Entstehens der vorliegenden Arbeit die allgemeingültigen Regeln Guter Wissenschaftlicher Praxis befolgt zu haben.

Conflict of interest

VK ist Mitinhaber des Patents zum Schnelltest, der als MastDecide erhältlich ist. Die anderen Autoren versichern, dass keine geschützten, beruflichen oder anderweitigen persönlichen Interessen an einem Produkt oder einer Firma bestehen, welche die in dieser Veröffentlichung genannten Inhalte oder Meinungen beeinflussen können.

Funding

Diese Arbeit wurde nicht finanziell unterstützt.

Autorenbeitrag

Konzeption oder Design der Arbeit: NW und VK. Manuskriptentwurf: NW, DK, VK. Kritische Revision des Artikels: NW, DK, EM, VK. Endgültige Zustimmung der für die Veröffentlichung vorgesehenen Version: NW, DK, EM, VK. ■



Übersichtsartikel



Literatur

- Barreiro JR, Gonçalves JL, Campos Braga PA, Dibbern AG, Eberlin MN, dos Santos MV (2017): Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Dairy Sci* 100(4): 2928–2934.
- Birren B, Lai E (1993): Pulsed Field Gel Electrophoresis – A practical Guide. Academic Press, inc. San Diego, California.
- Claessens I, Krömker V, Hamann J (1996): Zur Routine-Differenzierung von Mastitiserreignern – Methodische Ansätze. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Hrsg). 37. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 216–251, ISBN 3-930511-35-5.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) (2010): Stellungnahme des Sachverständigenausschusses zur Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Mastitisdiagnostik. *Dtsch Tierärztl J* 7: 914–917.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) (2018): Leitlinien zur Labordiagnostik der Mastitis – Probenahme und mikrobiologische Untersuchung. Fachgruppe „Milchhygiene“, Sachverständigenausschuss „subklinische Mastitis“. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Gießen.
- Kock J, Wente N, Zhang Y, Paduch JH, Leimbach S, Krömker V (2018): Accuracy of 12h-Petrifilm-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany. *Milchwissenschaft* 71: 10–13.
- Krömker V (2012): Strategies against mastitis due to cow-associated pathogens as a herd problem. *J Food Safety Food Qual Arch Lebensmittelhyg* 63: 61–64.
- Krömker V, Moroni P (2018): Strategische Ansätze zur Bekämpfung von Mykoplasmenmastitiden. *Prakt Tierarzt* 99(10): 1072–1079.
- Krömker V, Schmenger A, Kock J, Klocke D, Paduch JI, Leimbach S (2018): Aspekte einer modernen Mastitistherapie [Aspects of Modern Mastitis Treatment]. *Prakt Tierarzt* 99(2): 180–189.
- Leimbach S, Krömker V (2018): Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups. *J Dairy Sci* 101(7): 6357–6365.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* 95(6): 3140–3145.
- Mansion-de Vries EM, Knorr N, Paduch JH, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V (2014): A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. *Prev Vet Med* 113(4): 620–624.
- Mansion-de Vries EM, Hoedemaker M, Krömker V (2015): Aspekte einer evidenzbasierten Therapie klinischer Mastitiden. *Tierärztl Prax Großtiere* 13(5): 287–295.
- Mansion-de Vries EM, Pieper J, Knorr N, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V (2016): Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage. *Milk Sci Int* 9: 27–32.
- Schukken YH, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban, Welcome F, Zadoks R (2012): The “other” Gram-negative bacteria in mastitis *Klebsiella, Serratia*, and more. *Vet Clin Food Anim* 28: 239–256.
- Wente N, Zhang Y, Grieger AS, Paduch JH, Leimbach S, Kroemker V (2018): Recurrent mastitis – persistent or new infections? 30th World Buiatrics Congress, Sapporo, 2018.
- Wente N, Klocke D, Paduch JH, Zhang Y, tho Seeth M, Zoche-Golob V, Reinecke F, Mohr E, Krömker V (2019): Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. *J Dairy Sci*. pii: Soo22-0302(19)30689-7.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22): 6531–6535.
- Zadoks RN, Schukken YH (2006): Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. *Vet Clin Food Anim* 22: 229–261.
- Zadoks RN, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP, Schukken YH (2003): Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol Infect* 130(2): 335–349.

Nicole Wente



Studium der Milchwirtschaftlichen Lebensmitteltechnologie sowie der Milch und Verpackungswirtschaft an der Hochschule Hannover. Promotionsstudentin an der Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Tiergesundheit und Tierschutz, Leitung der Professur Prof. Dr. med. vet. habil. Elmar Mohr. Aktuell Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Hannover in Forschungsgruppe Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. vct. habil. Volker Krömker.

Korrespondenzadresse:

Nicole Wente, Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Heisterbergallee 10A, nicole.wente@hs-hannover.de

Foto: Privat

3. Gemeinsame Zusammenfassung

3.1 Zusammenfassende Darstellung der durchgeföhrten Arbeiten und erzielten Ergebnisse

3.1.1 *Publikation 1: Associations between Streptococcus uberis strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases.*

Einleitung und Zielstellung

Die Mastitis des Rindes wird durch unterschiedliche Erreger, die sich zumeist in eine von zwei Erregergruppen einordnen lassen, hervorgerufen. Die Einordnung der Erreger in die Gruppe der kuhassoziierten oder umweltassoziierten Mastitiserreger ermöglicht ein gezieltes, strategisches Vorgehen bei der Bekämpfung dieser Erkrankung. Während die kuhassoziierten Mastitiserreger hauptsächlich durch den Melkvorgang übertragen werden, ist der Ursprung der umweltassoziierten Mastitiserreger in der Umwelt der Tiere zu suchen. Die kuhassoziierten Mastitiserreger sind in der Regel besser an den Wirt angepasst und werden auch als kontagiöse Mastitiserreger bezeichnet. Die kontagiösen Mastitiserreger zeichnen sich dadurch aus, dass in einem betroffenen Bestand überwiegend der gleiche Stamm des Erregers aus den Milchsekreten erkrankter Tiere isoliert wird. Ist die Stammvielfalt im Gegensatz dazu sehr hoch, so wird von einem umweltassoziierten Erreger ausgegangen. *S. uberis* ist ein Mastitiserreger, der besonders oft vorkommt und sowohl zu subklinischen als auch zu schweren akuten und rezidivierenden Mastitiden führt (BRAMLEY und DODD 1984, TODHUNTER et al. 1995). Dieser Erreger wurde aus der Umwelt, von der Haut, der Schleimhaut und aus dem Kot von Rindern isoliert (KRUZE und BRAMLEY 1982, WENDT et al. 1994, KRÖMKER 2007). Obwohl *Streptococcus* (*S.*) *uberis* als umweltassozierter Erreger bezeichnet wird, kann dieser innerhalb von Milchviehherden einen kuhassoziierten Charakter zeigen (DAVIES 2016). Deshalb ist es nicht einfach, die angemessenen Maßnahmen zur Bekämpfung dieses Erregers zu treffen. Die bisherigen Arbeiten beschäftigten sich mit der Isolierung von *S. uberis* innerhalb einer Herde oder deren Umwelt. Weitreichende Vergleiche der Isolate aus der Umwelt laktierender Tiere und den Milchsekreten erkrankter Tiere auf Stammebene fehlten bislang. Sie erlauben ein verbessertes Verständnis der Verbreitungseigenschaften - Übertragung aus der Umwelt oder von Tier zu Tier. Das Ziel dieser Studie war es, unter Anwendung molekularbiologischer Stammvergleiche, die Assoziation zwischen den *S. uberis* - Mastitisstämmen und den Stämmen aus der Umwelt der Tiere zu untersuchen.

Material und Methoden

Betriebe und Probenahme

Im Rahmen einer großen Prävalenzstudie wurden Betriebe aus ganz Deutschlands dazu aufgerufen im Zeitraum von Juni 2014 bis Dezember 2015, aber innerhalb von maximal 12 Monaten, Milchproben von klinischen Mastitiden zu nehmen und zur Untersuchung auf Mastitiserreger ins mikrobiologische Labor der Hochschule Hannover zu schicken. Die Studie umfasste zunächst 62 niedersächsische Betriebe. Hierfür wurden die Probennehmer von dem Studienpersonal im Vorfeld zur Entnahme der Proben nach den Leitlinien der DEUTSCHEN VETERINÄRMEDIZINISCHEN GESELLSCHAFT E.V. (2009) geschult. Der Versand der Proben erfolgte unter Zusatz des borsäurehaltigen Konservierungsmittels Ly20.

Untersuchung der Milchproben

Die Untersuchung der Milchproben wurde in Anlehnung an die Leitlinien der DEUTSCHEN VETERINÄRMEDIZINISCHEN GESELLSCHAFT E. V. (2012) durchgeführt. Dabei wurden Katalase-negative, Gram-positive Kokken mit der Fähigkeit zur Bildung von β -Galactosidase und Verwertung von Sorbit als *S. uberis* definiert. Alle *S. uberis*- Isolate wurden unter Zusatz von 20 % Glycerin bei - 80°C in einer Stammhaltung gelagert.

Probenahme und Untersuchung der Umweltproben

Die Betriebe in denen mindestens fünf Isolate aus Milch von fünf unterschiedlichen Tieren isoliert werden konnten, wurden für die Probenahme aus der Umwelt der Tiere ausgewählt. Die Probenahme erfolgte durch Studienpersonal möglichst zeitnah nach dem Nachweis der fünften *S. uberis* Mastitis. Die Umweltproben wurden an acht zuvor aus der Literatur beschriebenen Punkten entnommen, aus denen bereits *S. uberis* isoliert werden konnte (Tab. 1). Es wurde eine Probe pro Probenahmepunkt genommen. Die Materialproben wurden mit einem sterilen Beutel eingesammelt. Die Oberflächenprobenahme erfolgte mit der Nass-Trockentupfer-Technik in Anlehnung an die Norm DIN 10113-1: 1997-07. Für die Beprobung wurde ein mit gepuffertem Peptonwasser befeuchteter Tupfer und anschließend ein trockener Tupfer über die Fläche geführt. Beide Tupfer wurden anschließend in ein Transportröhrchen mit 2 ml sterilem gepufferten Peptonwasser (pH 7.0) überführt. Das Probenmaterial wurde anschließend gekühlt in das mikrobiologische Labor der Hochschule Hannover transportiert.

Tabelle 1: Probenahmepunkte aus dem Umfeld der Tiere und angewandte Techniken

Probenahmepunkt	Probenahmetechnik
Zitzengummi (ZADOKS et al. 2003)	Nass-Trockentupfer, innere Fläche
Tränke (Weide / Stall) (DÖPFER et al. 2005, ZADOKS et al. 2005)	Nass-Trockentupfer, 20 cm ² der oberen Außenfläche
Ausgangsbereich Melkstand (LOPEZ-BENAVIDES et al. 2007) / Eingangsbereich Melkstand	Material (Schlamm, Erde, Vegetation, Kot), an der von den Tieren besonders oft betretenen Stelle
Liegefläche Weide (CULLEN und LITTLE 1969, DÖPFER et al. 2005, ZADOKS et al. 2005)	Material Liegefläche
Treibewege zur Weide (LOPEZ-BENAVIDES et al. 2007)	Material (Schlamm, Erde, Vegetation, Kot), an der von den Tieren besonders oft betretenen Stelle
Einstreu Stall (BRAMLEY 1982, DÖPFER et al. 2005)	Material, erstes Drittel von dem hinteren Ende der Liegebox

Für den Probenansatz wurden 11 g der Materialprobe in 99 ml RINGER Lösung mit Hilfe des Stomachers (easyMIX, AES Chemunex / bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) homogenisiert. Die Tupferproben wurden direkt im Transportröhrchen für 1 min mit dem Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY) auf höchster Stufe gemischt. Das entstandene Probengemisch wurde auf dem EMCO Agar (SAWANT et al. 2002) nach der DIN EN 10192-5 im Doppelansatz ausgespaltet und bei 37°C für 24 h inkubiert. Es wurden maximal 20 Äskulin-hydrolysierende Kolonien nach der Inkubation entnommen und weiter untersucht. Gram-positive, Katalase-negative Kokken wurden auf dem modifizierten Rambach Agar nach WATTS (1993) sowie auf den Phenolrot Agar zur weiteren Differenzierung überimpft und 24 h bei 37°C inkubiert. β-Galactosidase- und sowie D-Sorbitol-positive Isolate wurden als *S. uberis* identifiziert und in die Stammhaltung bis zur weiteren Untersuchung überführt.

Molekularbiologische Untersuchung

Alle für den Stammvergleich vorgesehenen *S. uberis* – Isolate wurden zunächst durch die PCR nach RIFFON (2001) untersucht, um die Spezies zu bestätigen. Für diesen Zweck wurde die DNS der Isolate mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) extrahiert und in einem Mix von 25 µL (12,5 µL ReadyMix Taq PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) 20 pmol Primer mix, 5 µL

DNS-Extrakt und 5 µL H₂O für Molekularbiologie (AppliChem, Darmstadt, Germany)) für die PCR angesetzt. Die Amplifikationsreaktion wurde im Mx3005P qPCR System Thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Die PCR Produkte wurden im Anschluss mit Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany) angefärbt und im 2 %igen Agarosegel bei 100 V für 2,5 h aufgetrennt.

Der Vergleich der Stämme wurde mit der Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Methode durchgeführt. Für die DNS-Extraktion wurde das Bio-Rad CHEF Genomic DNA Plug Kit (BioRad, Munich, Germany) nach Angaben des Herstellers verwendet, die Restriktion wurde 2 h mit 20 U SmaI (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) bei 25°C durchgeführt. Anschließend wurden die Plugs mit 1 mL 0.5× Tris-borate EDTA (TBE) Puffer (Roth, Karlsruhe, Germany) 30 min lang bei Raumtemperatur gewaschen und in ein 1 %iges Agarosegel eingebettet. Die Fragmente wurden in einem Clamped Homogeneous Electric Fields Dynamic Regulation System, bei einem festen Winkel von 120° (CHEFDR II System, Bio-Rad) aufgetrennt. Als Puffer diente ein kontinuierlich auf 14°C gekühlter 0.5× TBE Puffer. Das Puls-Zeiten-Profil betrug 1 bis 15 s für 11,5 h und 15 bis 45 s für 13,5 h bei 5 V / cm (210 V). Das Gel wurde schließlich mit Midori Green Advanced (Nippon Genetics Europe GmbH) nach Herstellerangaben gefärbt und mit dem InGenius gel documentation system (Syngene, Cambridge, UK) visualisiert. Isolate, die deckungsgleiche Bandenmuster aufwiesen wurden als identische Stämme definiert.

Ergebnisse

In 15 von 62 Betrieben konnten mindestens 5 klinische *S. uberis* – Mastitisfälle nachgewiesen werden. Insgesamt 103 *S. uberis* – Umweltisolat wurden gesammelt. Die Umweltisolat konnten in 8 Betrieben vor dem Melkstand und auf dem Treibweg zur Weide isoliert werden. In 5 Betrieben konnten Isolate auf den Stalltränken identifiziert werden, 3 der Betriebe wiesen *S. uberis*- Isolate im Zitzengummi, im Ausgangsbereich des Melkstandes und in der Stalleinstreu auf. In zwei Betrieben konnten *S. uberis*- Isolate auf den Weidetränken bestätigt werden. In einem Betrieb konnten keine *S. uberis*- Umweltisolat detektiert werden (Tab. 2).

In einem Betrieb konnte ein *S. uberis*-Stamm aus einem Milchsekret vor dem Melkstand nachgewiesen werden, auf zwei Betrieben konnte auf den Treibewegen zur Weide jeweils ein Isolat gefunden werden, der identisch mit je einem Mastitisstamm des jeweiligen Betriebes war. Eines dieser Isolate konnte auf einem der Betriebe gleich mit drei Mastitisfällen in Verbindung gebracht werden und das andere mit zwei Mastitisfällen im Fundbetrieb.

Ein Isolat aus dem Zitzengummi konnte als identisch mit einem Isolat aus einem Mastitissekret identifiziert werden. Ein Isolat von der Stalltränke konnte in einem Betrieb als Mastitiserreger in einem Fall bestätigt

werden. In den Umweltproben von den Weidetränken, dem Melkstandausgang, Stalleinstreu und der Liegefläche auf der Weide konnten keine mit den Mastitisisolaten identischen *S. uberis* - Stämme nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Fundorte der Umweltisolate und Übereinstimmungen mit den Mastitisisolaten

Farm	Anzahl Isolate aus Milchsekreten (übereinstimmende Umweltisolate) / Anzahl Stämme aus Mastitisisolaten ¹	Anzahl Umweltisolate (Übereinstimmungen mit Milchisolaten)	Probenahmepunkt
A	14/13	1	Weidetränke
		2	Wartebereich Melkstand
		5	Melkstandausgang
B	7 (2)/5	1 (1)	Treibeweg zur Weide
C	9 (1)/7	11 (1)	Zitzengummi
		1 (1)	Stalltränke
D	7/4	2	Stalltränke
		8	Wartebereich Melkstand
		4	Treibeweg zur Weide
E	25 (1)/13	4	Zitzengummi
		4 (1)	Wartebereich Melkstand
		4	Melkstandausgang
		6	Stalleinstreu
F	11/6	1	Zitzengummi
		1	Stalltränke
G	6/4	1	Stalltränke
		3	Warteberich Melkstand
		1	Melkstandausgang
		4	Treibeweg zur Weide
		1	Einstreu Stall
H	9/5	1	Treibeweg Weide
		2	Liegefläche Weide
I	10/7	0 ²	
J	6/3	1	Wartebereich Melkstand
K	7 (3)/4	1	Stalltränke
		1	Weidetränke
		1	Wartebereich Melkstand
		4 (1)	Treibeweg zur Weide
L	4/4	1	Treibeweg zur Weide
M	5/4	2	Treibeweg zur Weide
N	8/6	10	Wartebereich Melkstand
		4	Treibeweg zur Weide
		6	Einstreu Stall
O	6/2	4	Wartebereich Melkstand

¹einige Isolate gehörten demselben Stamm an; ²keine Umweltisolate nachgewiesen

Zusätzlich konnten unter den Umweltisolaten unterschiedlicher Probenahmorte identische Isolate gefunden werden. In zwei Betrieben gab es einen Nachweis von je einem Stamm der sowohl im Bereich vor und hinter dem Melkstand identifiziert wurde. Weiterhin konnte ein Stamm aus dem Bereich vor dem Melkstand, in der Stalleinstreu und auf dem Treibeweg zur Weide gefunden werden, also auf einem Betrieb in gleich drei Probenahmestellen. Ein weiterer Betrieb wies auf dem Treibeweg zur Weide einen Stamm aus dem Bereich vor dem Melkstand auf. In einem Betrieb konnte ein Stamm von dem Treibeweg zur Weide am Ausgang vom Melkstand gefunden werden und auf einem anderen Betrieb in der Stalleinstreu. Es gab zwei unterschiedliche Einstreuisolate, die auf dem Treibeweg zur Weide wiedergefunden werden konnten.

Es wurden keine übereinstimmenden *S. uberis*-Stämme zwischen den Betrieben nachgewiesen.

Tabelle 3: Übereinstimmende *S. uberis*-Stämme aus den Umweltproben

Farm	Anzahl Isolate / Anzahl Stämme	Fundort identischer Stämme ¹
A	8/6	Wartebereich Melkstand (a,a) Ausgang Melkstand (a)
B	1/1 ²	kein Stammvergleich durchgeführt
C	12/7	Zitzengummi ³ (b) Stalltränke ³ (b) Zitzengummi (c,c) Zitzengummi (d,d,d,d)
D	14/11	Wartebereich Melkstand (e,e) Wartebereich Melkstand (f,f) Treibeweg Weide (g,g)
E	18/13 ⁴	Zitzengummi (h,h) Wartebereich Melkstand (i) Melkstandausgang (i) Wartebereich Melkstand(j) Stalleinstreu (j) Stalleinstreu (k,k,k)
F	2/2	keine identischen Stämme
G	10/9	Melkstandausgang (l) Treibeweg Weide (l)
H	3/2	Liegefläche Weide (m,m)
I		keine Umweltisolate gefunden
J	1/1	kein Stammvergleich durchgeführt
K	7/6 ⁵	Treibeweg Weide (n,n)
L	1/1	kein Stammvergleich durchgeführt
M	2/2	keine identischen Stämme
N	20/12	Wartebereich Melkstand (o,o,o,o) Wartebereich Melkstand (p,p) Wartebereich Melkstand (q) Treibeweg Weide (q) Stalleinstreu (q) Wartebereich Melkstand (r) Stalleinstreu (r) Treibeweg Weide (s) Stalleinstreu (s)
O	4/4	keine identischen Stämme

¹jeder Stamm wird durch einen eigenen Buchstaben benannt; ²der Stamm wurde in zwei Mastitisproben nachgewiesen; ³der Stamm wurde in einer Mastitisprobe nachgewiesen; ⁴eines der Isolate aus dem Wartebereich vor dem Melkstand (kein weiterer Fund in der Umwelt) ist identisch mit einem Milchisolat; ⁵ein Isolat vom Treibeweg zur Weide stimmt mit drei Mastitisisolaten überein.

3.1.2 *Publikation 2: Recurrent mastitis – persistent or new infections?*

Einleitung und Zielstellung

Wiederkehrende klinische Mastitiden machen bis zu 50 % aller Mastitiden in Deutschland aus (PICKER 2012, ZOCHE-GOLOB und SPILKE 2013). Wenn es sich bei den wiederkehrenden Mastitiden wiederholt um den gleichen Erreger handelt, dann lassen sich persistierende Infektionen nicht mehr von Neuinfektionen abgrenzen. Dabei unterscheiden sich die Mastitisbekämpfungsstrategien erheblich je nachdem, ob es sich um persistente oder neue Infektionen handelt. Eine persistente Infektion könnte aufgrund einer ungeeigneten oder unzureichenden antibiotischen Therapie vorliegen, bei einer neuen Infektion hat nach einer bakteriologischen Heilung eine nachfolgende Infektion stattgefunden. Somit wäre die resultierende Maßnahme bei persistenten Infektionen eine Anpassung der Therapie oder eine Eliminierung der betroffenen Tiere aus der Herde. Eine Neuinfektion wird durch einen hohen Erregerdruck begünstigt und es müsste, anstatt einer Therapieanpassung, z. B. eine Verbesserung der Betriebshygiene vorgenommen werden. Eine Information zu vorliegenden Infektionen auf Herdenebene würde helfen, die geeigneten Strategien zu finden und unnötige antibiotische Therapien, wie die Erhöhung der Antibiotikadosis oder einen Einsatz der Cephalosporine der dritten oder vierten Generation oder Fluorchinolonen (kritische Antibiotika nach TÄHAV, Stand 21.2.2018) zu vermeiden.

Das Ziel dieser Studie ist es, eine molekularbiologische Stammvergleichstechnik einzusetzen, um Neuinfektionen mit der gleichen Erregerspezies aus dem Pool der persistierenden Infektionen mit einem gleichbleibend identischen Stamm abzugrenzen. Dabei soll ebenfalls untersucht werden, ob die Persistenz einer Infektion ein erregerspezifisches Erscheinungsbild haben kann.

Material und Methoden

In drei norddeutschen Milchviehbetrieben wurden von 2011 bis 2015 Viertelgemelksproben von Tieren mit klinischer Mastitis entnommen. Die Entnahme der Milchproben erfolgte durch die gemäß DVG (2009) geschulten wissenschaftlichen Mitarbeiter. Eine klinische Mastitis wurde durch Flocken im Milchsekret, Schwellung des Eutergewebes, Schmerzempfindlichkeit sowie erhöhte Temperatur definiert. Alle Milchproben wurden in Anlehnung an die DVG-Leitlinien (2009) untersucht. Dafür wurden 10 µl der Milchprobe auf einem Viertel einer Äskulin Blut Agar Platte (Oxoid, Wesel) ausgestrichen und bei 37°C aerob inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte nach 24 und 48 h. Die gewachsenen Kolonien wurden zunächst anhand ihres Gram-Verhaltens und deren Fähigkeit zur Hämolyse und der Äskulinhydrolyse differenziert. Gram-positive, Katalase-positive Kokken (3 % H₂O₂, Merck, Darmstadt, Germany) ohne zellgebundenen Koagulase (Clumping factor Test, DiaMondiaL Staph Plus Kit, Sekisui

Virotech, Rüsselsheim, Germany) wurden als nicht-aureus-Staphylokokken (NAS) bezeichnet. Die β - hämolsierenden Gram-positiven Kokken mit vorliegender zellgebundener Koagulase wurden als *Staphylococcus aureus* ausgewiesen. Die Gruppe der Katalase-negativen, Gram-positiven Kokken wurden als Streptokokken bezeichnet und im ersten Schritt mit Hilfe der Äskulin-Hydrolyse differenziert. Äskulinspaltende Streptokokken wurden auf modifiziertem Rambach Agar nach Watts (1993) angesetzt, β -Galactosidase bildende Mikroorganismen wurden als *S. uberis* und der Rest als Enterokokken angegeben. Die Gruppe der Äskulin-negativen Streptokokken wurde ihren serologischen Lancefield-Gruppen (B, C und G) zugeordnet (DiaMondiaL Streptococcal Extraction Kit, Sekisui Virotech, Rüsselsheim, Germany) und als *Streptococcus (S.) agalactiae*, *Streptococcus (S.) dysgalactiae* und *Streptococcus (S.) canis* benannt. Gram-positive, Katalase-negative, Äskulin-negative unregelmäßige Stäbchen mit feiner β -Hämolyse wurden als *Trueperella (T.) pyogenes* identifiziert. Als Coryneformen wurden dagegen Gram-positive, Katalase-positive unregelmäßige Stäbchen bezeichnet. Die Gram-negativen Stäbchen wurden initial anhand ihrer Fähigkeit zur Glukoseverwertung unter aeroben und anaeroben Bedingungen differenziert (Glukose zugesetzter OF-Test, Merck, Darmstadt). Die strikt aeroben Cytochrom C Oxidase positiven Kolonien (Bactident Oxidase, Merck, Darmstadt, Germany) wurden als Pseudomonaden ausgegeben. Die fermentativen, unbeweglichen Gram-negativen Stäbchen wurden als *Klebsiella* spp. angegeben, die beweglichen dagegen wurden auf dem Chromocult® Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) ausgestrichen, um zwischen *Escherichia (E.) coli* und sonstigen coliformen aus der Gesamtheit der *Enterobacteriaceae* zu unterscheiden. Hefen und Prototheken wurden nach ihrer Zellmorphologie mit Hilfe der Gram-Färbung mikroskopisch identifiziert.

Die Proben wurden als kontaminiert ausgegeben, wenn mehr als zwei morphologisch unterschiedliche Kolonien in einem Ausstrich gewachsen waren. Aus kontaminierten Proben wurden die kuhassoziierten Erreger *S. aureus*, *S. dysgalactiae* und *T. pyogenes* dennoch isoliert. Alle Isolate wurden bei -80°C in Hirn-Herz Bouillon (Merck, Darmstadt) unter Zusatz von 20 % Glycerin bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

Eine Symptomfreiheit von 14 Tagen zwischen den klinischen Erkrankungen wurde als Zeitraum festgelegt, um das Auftreten zweier Mastitiden im identischen Tier und Viertel als eigenständige Erkrankungen zu betrachten (BARKEMA et al. 1998, DÖPFER et al. 1999, SCHUKKEN et al. 2010).

Wenn ein Tier mit demselben Erreger auf demselben Viertel erkrankt war wie in der vorhergehenden Infektion, dann wurde ein Stammvergleich der Isolate aus den Fällen mit der Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD PCR) durchgeführt. Dafür wurde die bakterielle DNS mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) durchgeführt. Die gewonnene DNS wurde zu 5 μ L in einem 25 μ L Mix mit 12.5 μ L ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix

(Sigma-Aldrich, Munich, Germany), 20 pmol Primer (Tab. 4) und reinem Wasser für die Molekularbiologie angesetzt.

Tabelle 4: Auflistung eingesetzter RAPD-Primer

Spezies	RAPD-Primer	Primersequenz 5`–3`	Quelle
<i>S. aureus</i>	Primer C	CGGGGGACTGTTGGCGGCCATCT	DAMIANI <i>et al.</i> 1996
NAS	Primer C	CGGGGGACTGTTGGCGGCCATCT	DAMIANI <i>et al.</i> 1996
Coliforme	256	AACGCGAAC	PACHEO <i>et al.</i> 1996
<i>E. coli</i>	256	AACGCGAAC	PACHEO <i>et al.</i> 1996
<i>S. uberis</i>	OPE 04	GTGACATGCC	GILLESPIE <i>et al.</i> 1998
<i>S. dysgalactiae</i>	OPE 04	GTGACATGCC	GILLESPIE <i>et al.</i> 1998
<i>T. pyogenes</i>	Primer A	CTGGCGGCTTG	HIJAZIN <i>et al.</i> 2013

Für die Temperaturführung wurde der Thermocycler Mx3005P qPCR System (Agilent, Santa Clara, California, USA) verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit MIDORIGreen® Direct (NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren, Germany) gefärbt und in 2 %igen Agarosegel separiert. Identische Bandenmuster wurden als ein Stamm definiert.

Für die statistische Analyse wurde der Chi-quadrat-Test (χ^2) mit SPSS 25.0 (IBM SPSS 25.0.0.0., Armonk, USA) eingesetzt. Die Ergebnisse unter einem p-Wert von 0,05 wurden als signifikant angegeben.

Ergebnisse

Von 2043 untersuchten klinischen Mastitiden waren 1598 Erstfälle, 445 waren wiederkehrende Fälle innerhalb einer Laktation. In 145 der wiederkehrenden Fälle konnte derselbe Erreger wie aus der vorhergehenden Infektion isoliert werden. Als identischer Stamm wie in der vorhergegangenen Infektion konnten 49 (11 % aller 445 wiederkehrender Fälle) mit der RAPD PCR bestätigt werden (Abb. 1).

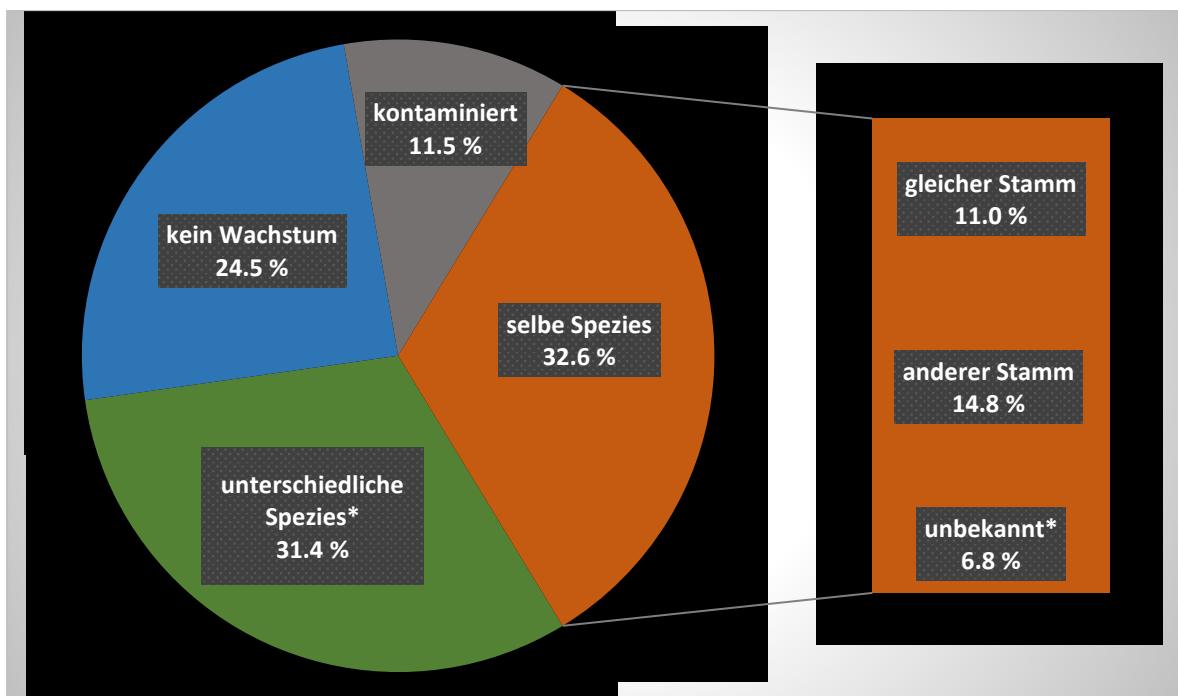


Abbildung 1: Aufteilung der wiederkehrenden klinischen Mastitisfälle

*kein Stammvergleich durchgeführt

S. uberis war der am häufigsten isolierte Erreger (Tab. 5), gefolgt von *E. coli*, *S. aureus*, NAS, *S. dysgalactiae*, sonstigen Coliformen und *T. pyogenes* als den seltensten. *T. pyogenes* war innerhalb seiner Spezies mit 37,5 % der am häufigsten aus den persistenten Infektionen nachgewiesene Erreger (37,5 %), diese Fälle beschränkten sich auf zwei Tiere. Der kuhassoziierte Mastitiserreger *S. aureus* war innerhalb seiner Spezies der zweitmeistvertretene (29,0 % aller wiederkehrenden *S. aureus* Infektionen enthielten einen identischen Stamm) gefolgt von *E. coli* (28,9 %), *S. dysgalactiae* (25,0 %) und *S. uberis* (14,8 %). Die Anzahl der kontaminierten Proben betrug 10,9 % und 23,4 % der untersuchten Proben zeigten kein Erregerwachstum. Die Verteilung der wiederkehrenden und der persistenten Infektionen war von Spezies zu Spezies signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$). *S. aureus* zeigte die höchste Wiederkehrrate (27 %) und die höchste Persistenzrate (29 %). *S. uberis* wies eine ähnliche Wiederkehrrate wie *S. aureus* (24 % aus allen *S. uberis*-Fällen), jedoch eine erheblich geringere Persistenzrate (14,8 %) auf. Somit ist jeder dritte wiederkehrende *S. aureus*-Fall und jeder siebte wiederkehrende *S. uberis*-Fall eine persistente Infektion. Fünf der Tiere (zwei in zweiter, zwei in dritter und eine in vierter Laktation) wiesen mehrere Infektionen mit demselben *S. uberis*-Stamm hintereinander auf. Bei einer mit *E. coli* infizierten Kuh (dritte Laktation) konnte gleich in 5 nachfolgenden Infektionen derselbe Stamm identifiziert werden.

Tabelle 5: Verteilung der Fälle nach Spezies

Spezies	Klinische Mastitisfälle (% aus allen Fällen)	Erstfälle (% aus allen Fällen)	Wiederkehrende Fälle (% aus allen Fällen)	Selbe Spezies wie im vorherigen Fall (% aus wiederkehrenden Fällen)	Selber Stamm wie im vorherigen Fall (% aus wiederkehrenden Fällen)	n. u.** (%) aus wiederkehrenden Fällen)
S. uberis	592 (100 %)	450 (76 %)	142 (24 %)	88/142 (62 %)	21/142 ^a (14,8 %)	24/142 (16,9 %)
E. coli	306 (100 %)	261 (85,3 %)	45 (14,7 %)	25/45 (55,6 %)	13/45 ^b (28,9 %)	2/45 (4,4 %)
S. aureus	115 (100 %)	84 (73 %)	31 (27 %)	23/31 (74,2 %)	9/31 ^c (29 %)	3/31 (9,7 %)
nicht –aureus Staphylokokken	69 (100 %)	61 (88,4 %)	8 (11,6 %)	1/8 (12,5 %)	0	0
S. dysgalactiae	57 (100 %)	45 (79 %)	12 (21 %)	4/12 (33,3 %)	3/12 (25 %)	0
Sonstige Coliforme (außer E. coli)	54 ^k (100 %)	44 ^{kf} (81,5 %)	10 ^{kr} (18,5 %)	3/10 ^{ks} (30 %)	0	0
T. pyogenes	36 (100 %)	28 (77,8 %)	8 (22,2 %)	4/8 (50 %)	3/8 ^d (37,5 %)	1/8 (12,5 %)
kein Wachstum	479 (100 %)	370 (77,2 %)	109 (22,8 %)			
kontaminiert**	222 (100 %)	171 (77 %)	51 (23 %)			
andere*	113 (100 %)	84 (74,3 %)	29 (25,7 %)			
Gesamt	2043 (100 %)	1598 (78,2 %)	445 (21,8 %)			

*Bacillus spp., Coryneforme, Enterokokken, Pseudomonaden., Prototheken, Hefen, kein Stammvergleich durchgeführt; **mehr als zwei unterschiedliche Kolonien; ***n. u.=nicht untersucht; ^kKlebsiella spp. (n=14); ^{kf}Klebsiella spp. (n=12); ^{kr}Klebsiella spp. (n=2); ^{ks}Klebsiella spp. (n=0); ^afünf Tiere mit zwei Fällen hintereinander; ^bein Tier hatte fünf Fälle hintereinander, ein Tier hatte zwei Fälle; ^czwei Tiere hatten zwei Fälle hintereinander; ^dein Tier hatte zwei Fälle hintereinander

3.1.3 *Publikation 3: Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass [Microbiological mastitis diagnostics for every occasion].*

Einleitung und Zielstellung

Die mikrobiologische Mastitisdiagnostik muss zielgerichtet angewendet werden, um als wesentlicher Bestandteil der Mastitisbekämpfung möglichst gut funktionieren zu können. Inzwischen gibt es eine Reihe diagnostischer Methoden, die auf verschiedenen Probenahmeebenen Anwendung finden können und unterschiedlichen Fragestellungen im Bereich der Mastitisbekämpfung dienen. Dabei ist es wichtig die passende Methode oder Methodenkombinationen entsprechend der Fragestellung zu wählen, die Kosten und den Nutzen abzuwägen, die Ergebnisse methodengerecht zu interpretieren und daraus resultierende Maßnahmen einzuleiten. Ist die Methode nicht adäquat gewählt, so leidet die Entscheidungsfindung der Maßnahmen und somit auch das Tierwohl und die Wirtschaftlichkeit.

Die Publikation gibt eine Übersicht über die Anwendungsoptionen mikrobiologischer Methoden im Rahmen der Mastitisbekämpfung. Dabei werden epidemiologische und therapeutische Fragen zu den für die Eutergesundheit relevanten Mikroorganismen berücksichtigt.

Probenahmeebene

Da das einzelne Drüsenviertel das infizierbare Kompartiment ist, ist eine Viertelgemelksprobe immer richtig. Soll mit der Untersuchung nur die Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen ausgeschlossen werden (Einzeltier bei Ankauf oder Herde nach Sanierung), können andere Probeebenen (Einzelgemelk, Tankmilch) sinnvoll sein (KRÖMKER et al. 2018).

Kulturelle Diagnostik

Zu der klassischen mikrobiologischen Mastitisdiagnostik in Deutschland zählt die kulturelle Diagnostik. Die meisten Mastitis-Milchproben in Deutschland werden von spezialisierten Laboratorien mit der kulturellen Diagnostik auf mesophile aerobe Mikroorganismen untersucht. Dabei orientieren sich die Labore an den Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserreger. Diese Leitlinien sind von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (2009) herausgegeben und zuletzt 2018 aktualisiert worden. Hierzu werden nicht-selektive Medien eingesetzt, auf denen, mit Ausnahme der anspruchsvollen Mykoplasmen und der langsam wachsenden atypischen Mykobakterien, die üblichen aerob anzüchtbaren Mastitiserreger innerhalb von 72 Stunden wachsen (DVG 2018). Der Erregerbefund hängt stark von dem Untersuchenden und der diagnostischen Tiefe ab. Die diagnostische Tiefe ist variabel und muss den Ansprüchen und der Wirtschaftlichkeit gerecht werden. Die umweltassoziierten Erreger werden gelegentlich in Gruppen angegeben anstatt bis zur Gattungs- oder Speziesebene ausdifferenziert zu

werden. Dennoch ist die Vergleichbarkeit der Befunde unter den deutschen Laboratorien im Hinblick auf den Nachweis der kuhassoziierten Erreger sehr gut (THO SEETH und KRÖMKER 2020). Die klassische kulturelle Diagnostik eignet sich vor allem für die Probenuntersuchung auf Viertelebene, sie ist wichtig für die Analyse der Herdenepidemiologie und bildet eine Basis für Behandlungspläne. Die kulturelle Diagnostik bietet des Weiteren durch die Gewinnung von Koloniematerial die Möglichkeit einer Resistenzprüfung, sowie einer weiterführenden massenspektrometrischen (MALDI TOF) oder ggf. molekularbiologischen Untersuchung. Die kulturelle Methode ist durch die Wahl der Anzuchtparameter, die vorausgesetzte Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen und die Innokulationsmenge limitiert. Um die Identifizierung der Erreger aus dem Milchsekret nicht zu verfälschen ist eine kontaminationsfreie Probenahme essentiell.

Kulturelle on-farm Diagnostik

Dieser Methode liegt ein Schnelltest zu Grunde, der von keinem spezialisierten Laboratorium durchgeführt werden muss. Die kulturelle on-farm Diagnostik ist ebenfalls durch die Wahl der Anzuchtparameter, die vorausgesetzte Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen und die Innokulationsmenge limitiert. Zusätzlich weist der Test eine sehr geringe diagnostische Tiefe (z. B. Gram-/Gram+) auf und kann keine Probenkontamination ausweisen, aus diesem Grund darf die Methode nicht auf Dauer allein für die Überwachung des epidemiologischen Status der Herde genutzt werden. Der Test kann von dem Landwirt vor Ort auf Viertelebene angewendet werden und dient einer schnellen therapeutische Entscheidungsfindung. Die Wartezeit vom Probenversands bis zur Befunderstellung entfallen.

PCR-Diagnostik

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode. Sie weist die DNS der sowohl lebenden als auch toten Mikroorganismen nach. Bei dieser Untersuchung kann nur die DNS nachgewiesen werden, nach der man gezielt sucht. Der Methode liegen zwei Hauptschritte zu Grunde: im ersten Schritt wird die Erreger-DNS aus dem Medium Milch und der Erregerzelle extrahiert und aufgereinigt. Dieser Schritt ist aufwändig, da viele das Verfahren störende Bestandteile wie Fett, Proteine und ggf. Blut mit möglichst niedrigem DNS-Ausbeuteverlust entfernt werden müssen. Im zweiten Schritt wird die extrahierte und aufgereinigte DNS vervielfältigt. Es gibt diverse Kits auf dem Markt, die auf Mastitis-Erreger-Diagnostik ausgerichtet sind. Die Kits bieten unterschiedliche Konstellationen zum Nachweis von Erregern (kuhassoziiert / umweltassoziiert). In einem Ansatz findet man häufig bis zu 4 Erregerkonstellationen. Interessant sind dabei die kuhassoziierten Erreger und speziell die langsam wachsenden und bei Transport weniger stabilen Mykoplasmen. Dennoch ist die Nachweisgrenze

vegetativer Mikroorganismen nicht niedriger als die der kulturellen Methode. Diese Methode eignet sich für Einzelgemelk- und Viertelanfangsgemelksuntersuchungen zur Haupterregerbestimmung für Merzungs- und Therapiemaßnahmen, so wie für Ankaufsentscheidungen.

Die kulturelle und die PCR-Diagnostik lassen sich kombinieren um die Nachweisgrenze zu senken, wenn es sich um Poolproben handelt, bei denen mit einer Verdünnung der gesuchten Erreger zu rechnen ist. Dabei kommen selektive Nährmedien zum Einsatz. Der gesuchte Erreger kann in einer Bouillon selektiv angereichert und im Anschluss mittels der PCR nachgewiesen werden. Diese Methode ist für die Untersuchung der Herdensammelmilch mit dem Ziel der Einschätzung des Herdenstatus gut geeignet.

Stammvergleich

Außerhalb von wissenschaftlichen Forschungsarbeiten sind Stammvergleiche geeignet Verbreitungswege von Mikroorganismen innerhalb einer Herde zu ermitteln. Des Weiteren können sie eine Hilfestellung zur Unterscheidung zwischen kontagiösen und nichtkontagiösen Infektionsverläufen sein. Bei kontagiöser Infektion werden einzelne Mikroorganismenstämme aus infizierten Tieren oder aus Umwelthotspots an andere Tiere übertragen. Gelegentlich treten kontagiöse Verläufe bei „Umwelterregern“, z. B. bei *Sc. uberis*, auf (ZADOKS et al. 2003, WENTE et al. 2019a). Die alleinige Kenntnis der relevanten Bakterienspezies führt hier nicht zu den richtigen Entscheidungen in der Bekämpfung. Bei nichtkontagiöser Infektion nehmen Tiere Mikroorganismen aus der Umwelt auf, geben diese aber nicht oder nur geringfügig an andere Tiere weiter. In Betrieben mit solch einem Infektionsmuster sind zumeist viele verschiedene Stämme einer Art im Betrieb vorhanden. In diesen Fällen sind zur Verbesserung der Herdengesundheit die Überprüfung und Optimierung der Hygiene zumeist zielführend (DVG 2012).

3.2 Zusammenfassende Diskussion und Einordnung der Ergebnisse

3.2.1 Studienablauf und Studiendesign

Das Ziel dieser Arbeit war es, unter Anwendung von Stammvergleichstechniken Informationen zur Übertragung von *S. uberis*, einem der bedeutendsten Mastitiserreger, zu gewinnen (Publikation 1), den Anteil an Neuinfektionen von rezidivierenden Mastitiden erregerspezifisch zu bestimmen (Publikation 2) und anschließend anhand der gewonnenen Daten zu beurteilen, inwieweit die Stammvergleichsmethoden bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen zur Mastitisbekämpfung beitragen können.

Im ersten Teil der Arbeit (Publikation 1) wurden *S. uberis* Isolate klinischer Mastitiden mit solchen aus der Umwelt der Tiere verglichen. Dafür wurden nach vorhergehender Recherche acht besonders frequentierte Bereiche im Umfeld der Tiere ausgewählt und in 15 Betrieben mit mindestens fünf nachgewiesenen *S. uberis*-Mastitiden beprobt. Die Isolate aus der Umwelt und aus den Mastitismilchproben wurden anschließend unter Anwendung der Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Methode untersucht und miteinander verglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden bei wiederkehrenden klinischen Mastitiden in Fällen einer Infektion mit derselben Spezies die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR Methode zum Vergleich der Isolate auf Stammebene eingesetzt (Publikation 2). Dafür wurden Isolate aus aufeinanderfolgenden klinischen Mastitiden gesammelt und bei Folgenachweis derselben Spezies auf Stammebene verglichen. Die dritte Publikation (Publikation 3) liefert einen Überblick über die in der Mastitisdiagnostik eingesetzten Methoden und erläutert deren Funktion bei der Mastitisbekämpfung.

3.2.2 These I: *Streptococcus uberis* ist ein umweltassozierter Mastitiserreger

In der vorliegenden Arbeit wurde das epidemiologische Verhalten von *S. uberis* unter Anwendung der PFGE untersucht. Dabei sollte die These, dass *S. uberis* ein umweltassozierter Erreger ist, untersucht werden. Eine hohe Stammvielfalt des Erregers in einem Betrieb deutet auf ein umweltassoziiertes Verhalten hin und eine geringe Stammdiversität auf ein kuhassoziertes. Zu diesem Zweck wurde die Stammdiversität von *S. uberis* aus Mastitis-Fällen in vielen Milchviehbetrieben untersucht. JAYARAO et al. (1993) haben bereits gezeigt, dass zwischen den klinischen Fällen in einem Betrieb weniger *S. uberis*-Stammvariationen vorkommen als zwischen subklinischen Mastitiden. Deshalb wurden in dieser Studie ausschließlich klinische Mastitisfälle untersucht.

Die Untersuchungstechniken der Studie basieren auf zahlreichen Methoden, die Folge der Vielfalt der genommenen Proben (flüssige Probe, stückiges Material oder Oberfläche) sind. Für die Untersuchung wurden abhängig von der Probenart unterschiedliche Probenahmetechniken verwendet. Daraus ergeben sich unterschiedliche Nachweisgrenzen. Es wurde eine Probe pro Probenahmepunkt genommen, was die Wahrscheinlichkeit einer Detektion relevanter Isolate beeinflussen kann. Um die Aussagekraft der Probe zu stärken, erfolgte die Probenahme möglichst an einer Stelle des Probenahmebereiches, wo die ständige Durchmischung des Probenmaterials durch die Bewegung der Tiere besonders hoch war.

Für die Untersuchung der Milch- und Umweltproben mussten unterschiedliche Nährmedien verwendet werden. Die Mastitismilchproben beinhalten optimalerweise eine Reinkultur des Erregers, die Umweltproben dagegen beherbergen ein großes Spektrum an Mikroorganismen. Deshalb ist es der Einsatz der selektiven Medien bei der Untersuchung der Umweltproben unabdingbar. Für den Stammvergleich der gewonnenen Isolate wurde die PFGE Methode angewandt. Diese Methode zeigt laut GILLESPIE und OLIVER (2004) ein höheres Differenzierungspotential und kann *S. uberis* besser differenzieren als andere Methoden. Die PFGE-Methode basiert auf der Restriktion der DNS durch spezielle Enzyme und der anschließenden Auftrennung der entstandenen DNS-Fragmente nach ihrer Größe im pulsierenden elektrischen Feld. Das Resultat ist ein Gelbild mit Bandenmustern. Die Deckungsgleichheit der Bandenmuster einzelner Isolate einer Spezies ist entscheidend für die Aussage über deren genetische Ähnlichkeit untereinander. Die Auswertung erfolgt durch die An- und Abwesenheit einzelner Banden unter den untersuchten Isolaten. Die Isolate einer Spezies mit gleichen Bandenmustern werden als ein Stamm bezeichnet und bilden somit eine Untereinheit einer Spezies. TENOVER et al. (1995) interpretieren Isolate einer Spezies mit deckungsgleichen Bandenmustern als ursächlich für einen Ausbruch im Betrieb. In der vorliegenden Arbeit wurden Isolate einer Spezies mit identischen Bandenmustern, also einem Unterschied von null Banden, als ein Stamm definiert. Mit diesem Kriterium wird die Aussage über die Vielfalt der Stämme streng bewertet.

OLIVER et al. (1998) haben gezeigt, dass Isolate aus einer Milchprobe ein identischer Stamm sind, deshalb wurde nur eine Kolonie *S. uberis* aus der Milchprobe für die PFGE eingesetzt. DOUGLAS et al. (2000) haben aus Milchprobenduplikaten identische *S. uberis* Stämme mittels der PFGE identifiziert. Des Weiteren haben PRYOR et al. (2009) gezeigt, dass bei einer Injektion von einem Mix aus fünf *S. uberis* Stämmen in ein Euterviertel, sich ein Stamm in 7 von 10 infizierten Vierteln durchsetzen kann. Aus jeder der Umweltproben wurden nach Möglichkeit bis zu 20 *S. uberis*- Isolate entnommen und analysiert. Laut der Studie von DÖPFER et al. (2008) werden 2 bis 20 Isolate benötigt um alle Stämme, die in einer Umweltprobe enthalten sind, zu berücksichtigen (CI 95 %).

Die Proben klinischer Mastitisfälle wurden vor der Beprobung der Umwelt bis zu ein Jahr gesammelt, so dass zwischen der ersten Untersuchung eines *S. uberis* Isolates aus der Milch und der

Umweltpoprobenahme bis zu ein Jahr liegen kann. Ein langer Zeitraum kann zu einer Eliminierung eines Stammes aus dem Betrieb oder seiner genetischen Veränderung führen. MCDougall et al. (2004) konnten mittels der PFGE-Methode eine *S. uberis*-Infektionsdauer bis zu 278 Tagen nachweisen. ZADOKS et al. (2003) wiesen mit Hilfe der RAPD-Methode bis zu 309 Tage andauernde *S. uberis*-Infektionen nach. Somit ist, trotz der langen Zeitspanne nicht ausgeschlossen, dass der ursächliche Stamm im Betrieb überdauert und mit der Stammvergleichsmethode identifiziert werden kann. WENTE und KRÖMKER (2020) konnten, ebenfalls mittels der PFGE- Methoden nachweisen, dass ein *Streptococcus dysgalactiae* - Stamm über ein Jahr in einem Betrieb überdauern kann.

Die Umweltpoprobenahmepunkte wurden gemäß den bisherigen Nachweisen der Literatur entnommen (Tab. 1). Zusätzlich wurde der Wartebereich vor dem Melkstand ausgewählt. Dieser Bereich ist stark frequentiert und ist manchmal mit der Milch der Tiere, die vor dem Melken die Milch laufen lassen kontaminiert. Die Beprobung der Zitzengummis wurde durchgeführt um die Übertragung während des Melkens und somit den kuhassoziierten Charakter von *S. uberis* zu untersuchen (SMITH und HOGAN 1993).

S. uberis-Isolate konnten in allen der 8 ausgewählten Umweltpoprobenahmepunkten nachgewiesen werden. In vier dieser Punkte konnten *S. uberis* Stämme isoliert werden, die identisch mit denen aus der Mastitisprobe waren (Wartebereich Melkstand, Zitzengummi, Stalltränke, Treibweg zur Weide; Tab. 2). Dieses Ergebnis zeigt, dass *S. uberis* in den Bereichen mit hoher Frequenz der Tiere zu finden ist und *S. uberis* einen umweltassoziierten Charakter aufweist. Es scheint naheliegend, dass diese Stellen in der Umwelt als Reservoir für *S. uberis* dienen. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass, vice versa, diese Stellen in der Umwelt der Tiere von der infektiösen Milch der Tiere kontaminiert werden.

Der Fund eines Mastitisstammes im Zitzengummi (Betrieb C) ist im Einklang mit der Arbeit von ZADOKS et al. (2003), in der nach dem Melken *S. uberis*-infizierter Tiere *S. uberis* in den Zitzengummis nachgewiesen werden konnten. Dabei ist es nicht erwiesen ob die Kontamination aus dem Euterinneren stammt, dennoch könnte dieser Nachweis ein Hinweis auf eine Übertragung beim maschinellen Milchentzug sein. Dieser Stamm konnte ebenfalls von der Oberfläche einer Stalltränke isoliert werden. Der Zeitraum zwischen dem Nachweis des Stammes aus dem Milchsekret und der Umweltprobe betrug zwei Monate. Ein weiterer Hinweis auf eine kuhassoziierte Übertragung ist eine geringe Stammvielfalt des Erregers innerhalb eines Betriebes. In dieser Studie konnte im Betrieb O in 4 von 6 Mastitisfällen derselbe Stamm nachgewiesen werden. DAVIES et al. (2016) haben ebenfalls überwiegend identische *S. uberis* Stämme bei klinischen Mastitiden gefunden. ZADOKS et al. (2001) haben einen *S. uberis*-Ausbruch analysiert und Hinweise auf eine kuhassoziierte Übertragung gefunden. Auch bei Dominanz eines Stammes innerhalb eines Betriebes kann eine Übertragung aus der Umwelt nicht ausgeschlossen

werden. Im Fall vom Betrieb O konnte nur aus einem Umweltpoint (Wartebereich vor dem Melkstand) *S. uberis* isoliert werden, dieses Isolat stimmte mit keinem Mastitis-Isolat überein. Es kann ferner nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Bereiche in der Umwelt mit *S. uberis* vorliegen, die nicht beprobt wurden oder in denen eine einzelne Probe pro Probenahmepunkt nicht ausreichend war. Dennoch bekräftigen die Studien von OLIVER et al. (1998) und ZADOKS et al. (2003) diesen Fund. OLIVER et al. (1998) haben in einer Untersuchung von *S. uberis*- Mastitiden, in einer Nicht-Ausbruchs-Situation, verstärkt identische Mastitisstämme nachgewiesen, ZADOKS et al. (2003) konnten ebenfalls Mastitiden mit einem vorherrschenden Stamm feststellen. Des Weiteren haben PRYOR et al (2009) gezeigt, dass *S. uberis* – Mastitisstämme mit pathogenen Attributen in der Milchdrüse gegenüber anderen Stämmen dominieren können.

In 5 von 14 Betrieben konnten innerhalb des Betriebes an unterschiedlichen Orten in der Umwelt identische Stämme gefunden werden (Tab. 3). Das zeigt, dass *S. uberis* von einem Punkt zum anderen innerhalb eines Betriebes übertragen wird und deshalb ein Stamm unterschiedliche Infektionsquellen haben kann. ZADOKS et al. (2005) haben gezeigt, dass die Kotverteilung eine Rolle als *S. uberis*-Überträger spielt. Treibbewege und Wartebereiche können Kot und Schlamm aufweisen, beides ist flüssig und kann durchaus das Euter direkt vor oder nach dem Melken, während die Tiere vor dem Melkstand warten oder den Melkstand verlassen, kontaminieren. Dabei können die Zitzenkanäle bereits oder immer noch offen sein, so gelangt der Erreger unter erleichterten Bedingungen durch den Zitzenkanal (KRÖMKER et al. 2014). In der Arbeit konnten in zwei Betrieben (B und K) Mastitisstämme auf den Treibbewegen nachgewiesen werden, im Betrieb K wurde der Stamm vom Treibeweg gleich in 3 von 7 Mastitisproben identifiziert. Der Zeitraum zwischen der Probenahme des Milchsekretes und dem Nachweis der dazugehörigen *S. uberis*-Isolate aus der Umwelt betrug bei dem Betrieb K ein Monat (ein Mastitisisolat) und 6 Monate (zwei Mastitisisolate), bei dem Betrieb B waren es 5 Monate und ein Jahr (je ein Mastitisisolat).

Im Wartebereich vor dem Melkstand konnte im Betrieb E ein Mastitisstamm nachgewiesen werden. Der Zeitraum zwischen dem Nachweis dieses Stammes im Milchsekret und der Umweltprobe betrug zwei Monate. Insgesamt wurden die meisten Umweltisolaten aus dem Wartebereich vor dem Melkstand isoliert (Tab. 2). Den Wartebereich passieren alle laktierenden Tiere der Herden, dort findet sich der Kot, Urin und ggf. die laufende Milch der Tiere. Die Bewegung der Kühe begünstigt das Spritzen der Ausscheidungen. Ebenfalls ist es möglich, dass das Abwasser vom Abspritzen der Melkplätze aus dem Melkstand (Milch, Kot, Urin gemischt mit Wasser) in den Wartebereich gelangt. *S. uberis* kann verhältnismäßig hohe Konzentrationen im Milchsekret infizierter Tiere aufweisen (TASSI et al. 2013, HAMEL et al. 2020) und somit eine hohe Menge an *S. uberis* in die Umwelt freigeben. *S. uberis*-Stämme,

die im Wartebereich vor dem Melkstand gefunden wurden konnten gleich in zwei Betrieben (A und E) ebenfalls im Ausgangsbereich des Melkstand detektiert werden. Im Betrieb E konnte ein weiterer Stamm aus dem Wartebereich des Melkstandes in der Einstreu festgestellt werden. Im Betrieb N konnten sogar gleich zwei unterschiedliche Stämme aus dem Wartebereich im Melkstand in der Einstreu nachgewiesen werden (Tab. 3), einer dieser Stämme wurde sogar ein drittes Mal im Betrieb auf dem Treibeweg zur Weide nachgewiesen. Die Funde der Isolate häufen sich im Wartebereich vor dem Melkstand, was auf die Bedeutung dieses Ortes bei der *S. uberis* Übertragung hindeutet. Zudem weisen die Befunde drauf hin, dass dieser Ort eine Verbindung zwischen den Fundorten sein kann. Der Wartebereich vor dem Melkstand und auch der Treibeweg zur Weide könnten eine wesentliche Rolle in der Verbreitung pathogener *S. uberis* Stämme spielen. Es konnten identische Isolate im Wartebereich vor dem Melkstand, dem Melkstandausgang und der Einstreu nachgewiesen werden. Diesen Umweltbereichen sollte bei der *S. uberis*-Mastitisprävention sowie -Mastitisbekämpfung besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Beim Vergleich aller Stämme zwischen den einzelnen Betrieben konnten keine Übereinstimmungen festgestellt werden, das deutet drauf hin, dass jeder Betrieb seine eigene spezielle Stammvielfalt aufweist. Die Studien von DOUGLAS et al. (2000) und MCDougall et al. (2004) kamen ebenfalls zu derselben Aussage. Die Konstellation der Orte mit dem *S. uberis*-Nachweis und die Variabilität der Mastitisstämme zeigen sich ebenfalls betriebsindividuell, daraus lässt sich ableiten, dass erst ein betriebsindividueller *S. uberis*-Stammvergleich Informationen zur Übertragung von *S. uberis* liefert. Beispielsweise zeigte der Betrieb A der vorliegenden Studie eine hohe Vielfalt der Mastitisstämme und der Betrieb O dagegen eine sehr geringe (Tab. 2), der Befund zeigt im Betrieb O eine deutlich kontagiösere Übertragung mit einem besser an das Euter angepassten Stamm als in Betrieb A an.

Abschließend kann ebenfalls festgehalten werden, dass in jedem der Probenahmepunkte, die durch Literaturrecherche aus vorhergehenden Arbeiten ausgewählt wurden, *S. uberis* nachgewiesen werden konnte. An einigen Probenahmestellen wurden zusätzlich Mastitisstämme isoliert. Deshalb sollte bei der *S. uberis*-Mastitisbekämpfung die Hygiene der Bereiche vor dem Melkstand, der Treibewege und der Tränken besonders beachtet werden. Der Nachweis von *S. uberis*-Mastitisstämmen aus der Umwelt der Tiere konnte in einem Zeitraum bis zu einem Jahr festgestellt werden. *S. uberis* kann demzufolge lange in einem Betrieb überdauern. Die These, dass *Streptococcus uberis* ein umweltassozierter Mastitiserreger ist und verbesserter Hygiene im Liege- und Laufbereich der Tiere helfen kann die durch den Erreger verursachten Mastitiden zu reduzieren, konnte somit nur teilweise bestätigt werden. Jeder Betrieb weist andere Stämme auf. In jedem Betrieb können andere Bereiche im Betrieb die mastitisauslösenden *S. uberis* Stämme beherbergen. Somit muss die Mastitisbekämpfung betriebsindividuell sein.

3.2.3 These II: Bei wiederkehrenden klinischen Mastitiden handelt es sich häufig um Neuinfektionen

Für die Untersuchung der wiederkehrenden Mastitiden wurden 2.043 klinische Mastitisfälle betrachtet. 1.598 der Fälle waren Erstfälle und 445 wiederkehrende Fälle in der Laktation. 145 der Fälle wiesen anhand der üblichen Mastitisdiagnostik gemäß DVG dieselbe Erregerspezies wie im vorangegangenen Fall auf. Diese Fälle wären bei konventioneller kultureller Untersuchung als persistierende Fälle eingestuft worden. Mit der RAPD PCR Methode wurden davon jedoch nur 49 der Fälle als persistierend bestätigt. Dieses Ergebnis berücksichtigt nicht die Fälle einer Reinfektion mit demselben Stamm, somit kann die Zahl der tatsächlich persistierenden Fälle noch geringer ausfallen. BAR et al. (2008) haben ermittelt, dass die Hälfte aller wiederkehrenden Mastitiden von derselben Erregerspezies wie im Erstfall verursacht wird, in dieser Arbeit war es annähernd ein Drittel. Dieses Verhältnis kann jedoch von dem vorherrschenden Erreger, wie z. B. einem kuhassoziierten Erreger, verschoben werden.

Für diese Untersuchung ist die gewählte Definition einer rezidivierenden Mastitis entscheidend, ist der Zeitraum zwischen Erstfall und Folgefall kurz gewählt, so werden mehr persistierende Infektionen ermittelt. In der Literatur wurden Zeiträume \geq 3, 5, 7, oder 14 Tagen aufgeführt (BARKEMA et al. 1998, DÖPFER et al. 1999, BRADLEY et al. 2001, GRÖHN et al. 2004; SCHUKKEN et al. 2010). Für die vorliegende Untersuchung wurde ein Zeitintervall von mindestens 14 Tagen gewählt um eine möglichst scharfe Grenze zwischen den Fällen ziehen zu können. Die Untersuchung wurde auf Viertelebene durchgeführt.

Bei einigen Mastitiserreignern treten Mastitisrezidive häufiger als Folge persistierender Infektionen auf (*S. aureus*, *T. pyogenes*), während bei anderen Spezies Rezidive häufiger durch Neuinfektionen mit anderen Stämmen verursacht werden (*S. uberis*). *S. uberis*, gefolgt von *E. coli*, *S. aureus*, *NAS*, *S. dysgalactiae*, anderen coliformen Keimen und *T. pyogenes*, wurden besonders häufig isoliert. *T. pyogenes* wies als der seltenste Erreger die höchste Persistenzrate (37,5 %) auf, hierbei muss beachtet werden, dass dieses Ergebnis nur auf den Befunden von zwei Tieren basiert. Beim kuhassoziierten *S. aureus* konnte eine hohe Wiederkehrrate und eine hohe Persistenzrate (29 %) gezeigt werden. Bei der höchsten Fallzahl war *S. uberis* dennoch der Erreger mit der niedrigsten Persistenzrate (14,8 % aller rezidiven *S. uberis*-Fälle waren Infektionen mit dem identischen Stamm oder basierten auf persistierenden Infektionen). Somit war jede dritte wiederkehrende *S. aureus*-Infektion und jede siebte wiederkehrende *S. uberis*-Infektion persistierend. Aus der Gesamtheit der *S. uberis*-Infektionen (592 Infektionen) konnten nur 3,5 % (21 Infektionen) als persistierende Infektionen bestätigt werden. Beim *S. aureus* dagegen waren es 7,8 %. SWINKELS et al. (2013) haben in ihrer Studie *S. uberis* als einen der am häufigsten wiederkehrende

Mastitiden verursachenden umweltassoziierten Erreger identifiziert. Dieses Ergebnis findet sich in der vorliegenden Arbeit wieder. Bedeutsam ist jedoch die relativ geringe Anzahl persistierender *S. uberis* Infektionen als Ursachen klinischer *S. uberis* - Mastitisfälle (3,5 % aller *S. uberis*-Fälle), die in dieser Arbeit ermittelt werden konnte. Damit verändert sich die Sicht auf die Rolle von *S. uberis* innerhalb von wiederkehrenden Mastitiden erheblich.

In dieser Studie wurden mehrere aufeinanderfolgende persistierende Infektionen innerhalb eines Wirtes nachgewiesen. In fünf Tieren wurden mehrmals persistierende *S. uberis* – Infektionen diagnostiziert (zwei waren in der zweiten, zwei in der dritten und eins in der vierten Laktation), ein Tier hatte gleich fünf persistierende *E. coli*-Mastitiden innerhalb einer Laktation). Dieses Tier war in der dritten Laktation. PINZÓN-SÁNCHEZ und RUEGG (2011) haben gezeigt, dass eine höhere Laktationsnummer mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Tier an Mastitis zu erkranken assoziiert ist. TODHUNTER et al. (1995) wiesen höhere Infektionsraten für Tiere ab der vierten Laktation nach. An dieser Stelle kann, erregerunabhängig, das geschwächte Immunsystem des Tieres zu einer persistierenden Infektion beigetragen haben.

10,9 % aller untersuchten Proben waren kontaminiert und 23,4 % haben keinen Erregernachweis ergeben. Ein negativer Erregernachweis kann mit einer geringen Erregerausscheidung zusammenhängen (KRÖMKER et al. 2010). In dieser Studie wurden, wie in der Standarddiagnostik nach der DVG (2018), 10 µl der Milchprobe als Inokulat eingesetzt, damit wäre erst bei einer Ausscheidung von 100 KbE / ml ein Erregerwachstum zu erwarten. Des Weiteren gibt es Erreger wie z.B. *Mycoplasma* spp. und *Clostridium* spp., die unter den gewählten Bedingungen nicht wachsen und somit zu einem negativen kulturellen Nachweis führen.

Für den Stammvergleich wurde lediglich eine Kolonie aus dem kulturellen Nachweis verwendet. OLIVER et al. (1998) haben gezeigt, dass *S. uberis* -Isolate aus derselben Milch zu einem Stamm gehörten und eine Kolonie somit ausreichend ist. Dennoch ist es möglich, dass eine Mischung unterschiedlicher Stämme innerhalb einer Infektion vorlag und durch das Verfahren nur ein Stamm berücksichtigt wurde.

Die RAPD-PCR ist die Methode der Wahl, wenn es um einen hohen Durchsatz an Untersuchungen geht (OLIVER et al. 1998, DÖPFER et al. 1999, ZADOKS und SCHUKKEN 2006). Diese Methode hat dennoch ihre Grenzen in der Differenzierung. Die Methode basiert auf der randomisierten Vervielfältigung einzelner DNS-Sequenzen der Spezies. Für diese PCR- Methode werden Primer verwendet, die durch besonders kurze Länge oft an die DNS binden und somit viele einzelne DNS-Abschnitte produzieren. Diese Abschnitte werden in einem elektrischen Feld aufgetrennt und ergeben im Idealfall stammspezifische Bandenmuster. Unterschiedliche amplifizierte Regionen in unterschiedlichen amplifizierten bakteriellen

Genomen können dieselbe Länge haben und somit nicht mehr unterscheidbar sein und ein Ergebnis als identischen Stamm ausgeben. Dennoch konnten in dieser Studie wesentlich mehr unterschiedliche Stämme der Spezies aus rezidivierenden Mastitiden gefunden werden als identische. Ein geringerer Anteil an persistierenden Infektionen hätte die Schlussfolgerung dieser Studie nicht verändert, sondern nur weiter bekräftigt.

Die These, dass wiederkehrende klinische Mastitiden nicht immer auf persistierende Infektionen hinweisen, konnte anhand dieser Untersuchung bestätigt werden. Die Studie hat gezeigt, dass persistierende Infektionen aus vorherigen Mastitisfällen bei wiederkehrenden Mastitiden sehr selten sind (11% alle wiederkehrenden Mastitiden waren persistent oder eine Neuinfektion mit demselben Stamm). Für die Bekämpfung von wiederkehrenden Mastitiden bedeutet das, dass nicht – wie bisher angenommen – unzureichende Therapien der Erstfälle ursächlich für den Folgefall sind, sondern dass in den meisten Fällen Neuinfektionen der Milchdrüsenviertel für das Entstehen dieser Fälle verantwortlich sind.

3.2.4 These III: Stammvergleichstechniken können bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen erheblich zur Lösung beitragen

Durch die Anwendung von molekularbiologischen Stammvergleichstechniken wurden bislang fehlende Informationen gewonnen. Diese Informationen verändern die Sichtweise bei der Bekämpfung von Mastitiden erheblich.

Mit dem Einsatz der PFGE Technik konnte der Charakter von *S. uberis*-Infektionen auf einzelnen Betrieben untersucht werden. *S. uberis* tritt in einzelnen Betrieben kuhassoziiert auf, in diesen Fällen muss verstärkt auf Melkhygiene geachtet werden. Maßnahmen, die nur auf einen umweltassoziierten Erreger zugeschnitten sind, wären unzureichend. Des Weiteren wurde typische Bereiche in Milchviehbetrieben ermittelt, die die mastitisverursachenden Mikroorganismen aufweisen. In der Bekämpfung ist die Reinigung dieser Bereiche zur Minderung des Infektionsdrucks besonders wichtig.

Des Weiteren konnte durch die Anwendung der RAPD PCR gezeigt werden, dass der Anteil persistierender Infektionen unter den wiederkehrenden Mastitiden erheblich geringer ist, als bislang angenommen. Unter der alleinigen Anwendung der Speziesbestimmung wären 32,6 % aller wiederkehrenden Mastitiden in den untersuchten Betrieben als persistierend eingestuft worden. Die Ergebnisse der RAPD PCR konnten dagegen nur knapp ein Drittel davon als eine Infektion mit demselben Stammbestätiigen (11 %). Der am häufigsten aus wiederkehrenden Infektionen isolierte Erreger, *S. uberis*, hat sich als ein Mikroorganismus erwiesen, der die meisten Neuinfektionen und die wenigsten persistierenden Infektionen verursacht. Diese gewonnenen Informationen verändern die Bekämpfungsstrategien bei wiederkehrenden Mastitiden. Es rücken verstärkt präventive Maßnahmen zur Verhinderung der Neuinfektion in den Vordergrund. Dieses ist auch im Sinne der angestrebten Antibiotikareduktion.

Die Stammvergleichstechniken können erheblich dazu beitragen die Ursache für die Mastitisserkrankungen zu ermitteln und somit betriebsindividuelle Lösungskonzepte bei Mastitisproblemen zu finden. Ihre Anwendung erfordert allerdings zusätzliche Infrastruktur und Erfahrung im Labor und epidemiologische Kenntnisse zur Interpretation der Befunde. Somit bleibt diese Untersuchung wohl vor allem wenigen Einzelfallen vorbehalten. Weitere Verbreitung solcher Methoden in der Praxis sind vielleicht durch kostengünstigere und anwenderfreundlichere Methoden zu erwarten, die dann z.B. Massenspektrometrie mit machine-learning Technologien verbinden (ESNER et al. 2018).

3.3 Schlussfolgerungen

Mit der Anwendung der molekularbiologischen Stammvergleiche konnte die Epidemiologie von *S. uberis*-Mastitiden in Milchviehbetrieben untersucht werden. Es wurden Umweltquellen von *S. uberis*-Mastitisstämmen identifiziert und ein Nachweis einer Übertragung in der Umwelt erbracht. Es gibt ebenfalls Hinweise auf kontagiösen *S. uberis*-Charakter in einzelnen Betrieben. *S. uberis*-Stämme können ein Jahr im Betrieb überdauern. Die These, dass *S. uberis* ein umweltassozierter Erreger ist, konnte damit nicht komplett bestätigt werden. Aufgrund dessen ist bei der *S. uberis*-Mastitisbekämpfung eine betriebsindividuelle Vorgehensweise sinnvoll. Zusätzlich muss die betriebliche Hygiene, speziell in Bereichen vor dem Melkstand, sowie auf den Treibewegen zur Weide bei der Vorbeuge von *S. uberis*-Infektionen Berücksichtigung finden.

Im Gegensatz zu den bisherigen Annahmen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die meisten wiederkehrenden klinischen Mastitisfälle die Folge von neuen Infektionen mit Mikroorganismen sind. Lediglich ein Drittel der wiederkehrenden Mastitiden, die eine Infektion mit derselben Erregerspezies zeigten, wiesen einen identischen Stamm auf. Die These, dass wiederkehrende klinische Mastitiden nicht immer auf persistierende Infektionen hinweisen, konnte bestätigt werden. Deshalb sind vorbeugende Maßnahmen zur Verhinderung von Neuinfektionen (z. B. Verminderung des Erregerdrucks durch Verbesserung der Betriebshygiene und Entfernung therapieunwürdiger Tiere aus dem Bestand) wichtiger zur Vermeidung von Mastitisrezidiven als eine Intensivierung der Mastitisbehandlung der Erstfälle. Die Anwendung der Stammvergleichstechniken konnte zusätzlich zeigen, dass unterschiedliche Erreger ein individuelles unterschiedliches Persistenzverhalten aufweisen. Ein vermehrtes Auftreten von *S. uberis* in aufeinanderfolgenden wiederkehrenden Mastitiden wurde bislang als persistente Infektion eingestuft, aus der aktuellen Untersuchung kann abgeleitet werden, dass diese Fälle (vor allem bei den Tieren in den ersten Laktationen) überwiegend einer Neuinfektion zuzuordnen sind. Dadurch erscheint eine Reduzierung der antibiotischen Therapie möglich, da der Erreger weder häufigpersistiert noch umfängliche Resistenzegenschaften aufweist. Der Fokus sollte auf die Umfeld-Hygiene, um Neuinfektionen zu vermeiden, und auch auf das Immunsystem der Kuh gerichtet werden, um die tierindividuelle Empfänglichkeit gegenüber Neuinfektionen zu vermindern.

Jedem Stammvergleich geht eine Probenentnahme und eine kulturelle Diagnostik voraus. Erst nach der Gewinnung und der Auswahl der Isolate erfolgt die Anwendung der Stammvergleiche, so ist jede Stammvergleichsuntersuchung abhängig von der Planung und den zuvor geleisteten Arbeitsschritten. Die nachfolgende Auswahl der Stammvergleichsmethode ist von der Fragestellung, der Anzahl der

ausgewählten Isolate und der erforderlichen Präzision abhängig. Aufgrund des erforderlichen Aufwands und wenig verbreiteten Kenntnissen zur Interpretation solcher Befunde ist die Verbreitung dieser Methoden außerhalb der Forschung gering. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Anwendung dieser Methoden das Potential hat die Mastitisbekämpfung in Milchviehbetrieben erheblich zu verbessern. Gleichzeitig wurden neue wesentliche Erkenntnisse zur Pathogenese und Epidemiologie von Mastitiden gewonnen.

4. Zusammenfassung

Molekularbiologische Stammvergleichsmethoden sind bislang kein Bestandteil der Routinediagnostik von Mastitissekreten in Deutschland (DVG 2018). Diese Methoden sind aber geeignet um Verbreitungswege von Mikroorganismen innerhalb einer Herde nachzuvollziehen, die Unterscheidung zwischen kontagiösen und nichtkontagiösen Infektionsverläufen zu treffen und den Anteil persistierender Infektionen unter wiederkehrenden Infektionen zu ermitteln (ZADOKS und SCHUKKEN 2006). Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Stammvergleichstechniken, die Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) und Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technik, angewandt um drei Thesen zu untersuchen. So wurde den Fragen nachgegangen ob *S. uberis* ein umweltassoziiert Mastitiserreger ist und ob die verbesserte Hygiene im Liege- und Laufbereich der Tiere helfen die durch den Erreger verursachten Mastitiden zu reduzieren und ob wiederkehrende klinische Mastitiden nicht immer auf persistierende Infektionen hinweisen. Letztlich wurde basierend auf den vorherigen Untersuchungen beantwortet ob Stammvergleichstechniken bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen erheblich zur Lösung beitragen können.

In dieser Arbeit wurde die PFGE als molekularbiologische Stammvergleichsmethode angewendet um das Vorkommen von *S. uberis*- Stämmen aus klinischen Mastitiden in der Umwelt der Tiere zu untersuchen. *S. uberis* ist einer der bedeutendsten Erreger boviner Mastitiden, seine epidemiologischen Eigenschaften gelten als inkonsistent und bislang gelang eine klare Beschreibung der Infektionsmodalitäten nicht. Unter Anwendung der PFGE Methode konnte gezeigt werden, dass *S. uberis* Stämme aus Milchsekreten von an klinischer Mastitis erkrankten Tieren in der Umwelt zu finden sind und bis zu mindestens einem Jahr im Betrieb überdauern können. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sowohl Mastitisstämme, als auch die Stämme aus der Umwelt, innerhalb des Betriebes zwischen verschiedenen Lokalitäten übertragen werden. Das führt zu der Schlussfolgerung, dass bei einer dominierenden *S. uberis* Präsenz in einem Betrieb zukünftig eine diagnostische Klärung der Infektionswege erforderlich ist. Unter Umständen müssen Vorbeugemaßnahmen sowohl auf umwelt- als auch auf kuhassoziierte Übertragungswege ausgerichtet sein. Weiterhin haben die Daten gezeigt, dass betriebsindividuelle Strategien erforderlich sind, da sowohl die Stämme als auch die Übertragungswege zwischen Betrieben variieren. Es wurden Hinweise auf kontagiöse Übertragung der *S. uberis*-Mastitisstämme festgestellt. In einigen der Betriebe konnte innerhalb der Mastitiden eine *S. uberis* Stammdominanz nachgewiesen werden. Im Betrieb O waren vier der Milchsekret-Isolate von 6 identisch. Die These, dass *S. uberis* ein umweltassozierter Mastitiserreger ist, konnte damit nicht bestätigt werden.

Die RAPD PCR wurde angewandt um persistierende Infektionen bei wiederkehrenden klinischen Mastitisfällen zu bestimmen. Bei einem wiederholten Nachweis vom Erreger derselben Spezies aus aufeinanderfolgenden Infektionen unterstellt man in der Praxis, mangels tiefergehender Untersuchung auf Stammesebene, eine persistierende Infektion. Mithilfe von Stammvergleichen können Neuinfektionen mit anderen Stämmen von persistierenden Infektionen unterschieden werden. Insgesamt ein Drittel aller wiederkehrenden Fälle zeigte eine Infektion mit derselben Erregerspezies (145 von 445 wiederkehrenden Mastitiden enthielten wiederholt dieselbe Erregerspezies). Nach der Durchführung des Stammvergleichs wurden lediglich 49 der wiederkehrenden Infektionen als Infektionen mit demselben Erregerstamm identifiziert, somit sind maximal 11 % (49 of 445) aller wiederkehrenden Infektionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, als persistent einzustufen. Die These, dass wiederkehrende klinische Mastitiden nicht immer auf persistierende Infektionen hinweisen, wurde damit bekräftigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Anteil der persistierenden Infektionen aus der Gesamtheit aller wiederkehrenden Infektionen erregerspezifisch und die epidemiologische Bedeutung dieser Erreger innerhalb der Herde somit unterschiedlich ist. *S. uberis* zeigte mit 24 % (142 wiederkehrende Mastitiden von allen 592 *S. uberis* Mastitiden), direkt nach dem kontagiösen *S. aureus* (27 %, 31 wiederkehrende *S. aureus* Mastitiden von 115 aller *S. aureus*-Mastitiden), die höchste Rate der wiederkehrenden Infektionen, jedoch aber die niedrigste Persistenzrate von 14,8 % (21 der 142 wiederkehrenden *S. uberis* Fällen waren laut der Stammvergleichsuntersuchung persistent oder eine Neuinfektion mit demselben Stamm) aller Erreger, die untersucht wurden. *S. aureus* zeigte dagegen eine Persistenzrate von 29 % (9 von 31 *S. aureus* Fälle waren laut der Stammvergleichsuntersuchung persistent oder eine Neuinfektion mit demselben Stamm). Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass Maßnahmen der Neuinfektionsvermeidung zur Verhinderung von wiederkehrenden Mastitiden, auch bei Infektionen mit demselben Erreger, von besonders großer Bedeutung sind.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass Stammvergleichstechniken das Potential haben bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen erheblich zur Lösung beizutragen.

5. Summary

Molecular biological methods are expensive and not a part of standard mastitis diagnostics of mastitis milk samples (DVG 2018). Nonetheless, those methods can be applied to track the ways of pathogens transmission, to differentiate between contagious and environmental pathogens and to distinguish the persistent cases within recurrent infections (ZADOKS und SCHUKKEN 2006).

For the present work, two different strain typing methods, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), were applied to check three theses.

Thus, the questions were investigated whether *S. uberis* is an environmentally associated mastitis pathogen and whether improved hygiene in the lying and walking area of the animals helps to reduce the mastitis caused by this pathogen, and whether recurrent clinical mastitis does not always indicate persistent infections. Finally, based on the previous investigations, the question was answered whether molecular strain typing methods can contribute significantly to the solution of individual farm mastitis problems.

PFGE was applied to investigate the occurrence of *S. uberis* strains from clinical mastitis in the environment of the animals. *S. uberis* is one of the most important bovine mastitis pathogens, its epidemiological characteristics are considered as inconsistent and are not always clearly assigned to environmental or contagious transmission. Using the PFGE method, it has been shown that *S. uberis* strains from milk are found in the environment of animals suffering from clinical mastitis. We verified that both environmental *S. uberis* strains and mastitis strains could be transmitted to various spots in the environment of cows. This led to the conclusion that the modes of transmission of *S. uberis* include environmental sources in a contagious pattern, indicating that *S. uberis* control strategies require approaches that address environmental as well as contagious ways of transmission. Moreover, an individualized *S. uberis* control strategy is needed for each farm. In some of the farms, *S. uberis* strain dominance was detected within the clinical mastitis cases. In farm O, four of the clinical mastitis milk isolates out of 6 were identified as identical by the PFGE method. The hypothesis that *S. uberis* is an environment associated mastitis pathogen could thus not be confirmed.

Persistence rates of different mastitis pathogens from recurrent infections were determined using RAPD PCR. In the case of repeated detection of the pathogen of the same species from recurrent cases of mastitis, a persistent infection is assumed in practice, due to the lack of a more in-depth investigation at the strain level. A strain comparison helped to identify new infections with another strain out of the total of persistent infections to a certain extent. Overall, about one-third of all recurrent cases (145 of 445) were caused by same species. The RAPD PCR results confirmed the frequency of persistent recurrent

infections with the same strain at 11 % (49 of 445). The thesis, whether recurrent clinical mastitis does not always indicate persistent infections, could be confirmed. Persistence and recurrence vary between different pathogens. Therefore, the epidemiological role of those pathogens differs from species to species. Pathogens, such as *S. uberis*, compared to the contagious *S. aureus* (recurrence frequency of 27 %; 31 out of all 115 *S. aureus* mastitis cases), may have also high recurrence frequency (24 %, 142 out of all 592 *S. uberis* mastitis cases) but the lowest persistence frequency (14,8 %, 21 out of 142 recurrent *S. uberis* cases were a persistent infection or a new infection with the same strain) out of all isolated and examined pathogens in this study (persistence frequency of *S. aureus* 29 %; 9 out of 31 *S. aureus* cases were a persistent infection or a new infection with the same strain). This result leads to the conclusion that measures of new infection prevention are of particular importance in preventing recurrent mastitis, even in cases of infection with the same pathogen.

In summary, the results have shown that strain typing techniques have the potential to contribute significantly to the solution of individual farm mastitis problems.

6. Literaturverzeichnis

BAR, D., GRÖHN, Y. T., BENNETT, G., GONZÁLEZ, R. N., HERT, J. A., SCHULTE, H. F., TAUER, L. W., WELCOME, F. L., SCHUKKEN, Y. H., 2008:

Effects of repeated episodes of generic clinical mastitis on mortality and culling in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 2196-2204.

DOI: 10.3168/jds.2007-0460.

BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., LAM, T. J., BEIBOER, M. L., WILMINK, H., BENEDICTUS, G., und BRAND, A., 1998:

Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81, 411-419.

DOI:10.3168/jds.S0022-0302(98)75591-2.

BARREIRO, J. R., GONÇALVES, J. L., CAMPOS BRAGA, P. A., DIBBERN, A. G., EBERLIN, M. N. und dos SANTOS; M. V., 2017:

Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 100, 2928-2934.

DOI: 10.3168/jds.2016-11741

BASEGGIO, N., MANSELL, P. D., BROWNING, J. W. und BROWNING, G. F., 1997:

Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis.

Mol. Cell. Probes 11, 349-354.

DOI: 10.1006/mcpr.1997.0126.

BEY, R., FARNSWORTH, R. und STEWART, S., 2004:

Environmental mastitis. National Mastitis Council regional meeting proceedings, Bloomington, MN. national mastitis council, Madison, WI.

BIRREN, B. und LAI, E., 1993:

Pulsed Field Gel Electrophoresis – A practical Guide. Academic Press, inc. San Diego, California.

BRADLEY, A. J. und GREEN, M. J., 2001:

Adaption of Escherichia coli to the bovine mammary gland. J. Clin. Microbiol. 39, 1845-1849.
DOI:10.1128/JCM.39.5.

BRAMLEY, A. J., 1982:

Sources of Streptococcus uberis in the dairy herd. Isolation from bovine faeces and from straw bedding of cattle. J. Dairy Res. 49, 369-373.
DOI: 10 .1017/ S0022029900022500.

BRAMLEY, A. J. und DODD, F. H., 1984:

Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control—progress and prospects. J. Dairy Res. 51, 481-512.
DOI: 10 .1017/ S0022029900023797.

CLAESSENS, I., KRÖMKER, V., und HAMANN, J., 1996:

Zur Routine-Differenzierung von Mastitisserregern – methodische Ansätze. in: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (hrsg.), 37. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 246-251.
ISBN 3-930511-35-5

COFFEY, T. J., PULLINGER, G. D., URWIN, R., JOLLEY, K. A., WILSON, S. M., MAIDEN, M. C. und LEIGH, J. A., 2006:

First insights into the evolution of Streptococcus uberis: A multilocus sequence scheme that enables investigation of its population biology. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1420-1428.
DOI: 10 .1128/ aem .72 .2 .1420 -1428 .2006

CROWLEY, R. C., LEIGH, J. A., WARD, P. N., LAPPIN-SCOTT, H. M. und BOWLER, L. D., 2011:

Differential protein expression in Streptococcus uberis under planktonic and biofilm growth conditions. Appl. Environ. Microbiol. 77, 382-384.
DOI:10 .1128/ aem .01099 -10

CULLEN, G. A., und LITTLE, T. W. A., 1969:

Isolation of Streptococcus uberis from the rumen of cows and from soil. Vet. Rec. 85, 115-118.
DOI: 10 .1136/ vr .85 .5 .115

DAMIANI, G., TELECCO, S., COMINCINI, S., SIRONI, M., CARRETTO, E. und MARONE, P., 1996:
Comparison of an improved RAPD fingerprinting with different typing methods for discriminating
clinical isolates of *Staphylococcus* spp. Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. 12, 163-169.
DOI:10.1007/BF00145502.

DAVIES, P. L., LEIGH, J. A., BRADLEY, A. J., ARCHER, S. C., EMES, R. D. und GREEN, M. J., 2016:
Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity
and transmission. J. Clin. Microbiol. 54, 68-74.
DOI:10.1128/JCM.01583-15.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 1995:

DIN 10192-5:1995-05. Mikrobiologische Milchuntersuchung - Bestimmung der Keimzahl – Teil 5:
Spatelverfahren. Beuth, Berlin, Germany.
DOI:10.31030/ 2778921.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 1997:

DIN10113 -1: 1997 -07. Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und
Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich - Teil 1: Quantitatives Tupferverfahren. Beuth, Berlin,
Germany.
DOI:10.31030/ 7305517.

DEUTSCHE VETERINARMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT E.V., 2009:

Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur
Isolierung und Identifizierung von Mastitisregern. [Guidelines for antiseptic milk sampling and
guidelines to isolate and identify mastitis pathogens.]

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT E. V., 2010:

Stellungnahme des Sachverständigenausschusses zur Verwendung der Polymerase- Kettenreaktion
(PCR) in der Mastitisdiagnostik. Dtsch Tierärztbl 7, 914-917.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT E.V., 2012:

Leitlinien Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Verlag der Deutschen
Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Gießen.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT E. V., 2018:

Leitlinien zur Labordiagnostik der Mastitis – Probenahme und mikrobiologische Untersuchung. Fachgruppe „Milchhygiene“, Sachverständigenausschuss „subklinische Mastitis“. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen.

DODD, F. H., WESTGARTH, D. R., NEAVE, F. K. und KINGWILL, R. G. 1969:

Mastitis - The strategy of control. *J. Dairy Sci.* 52, 689-695.

DOI:10.3168/jds.S0022-0302(69)86631-2

DÖPFER, D., BARKEMA, H. W., LAM, T. J. G. M., SCHUKKEN, Y. H. und GAASTRA, W., 1999:

Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 80-85.

DOI: 10.3168/jds.S0022-0302 (99)75211-2

DÖPFER, D., ZADOKS, R. N., BUIST, W. und ENGEL, B., 2005:

Optimised sample sizes for analysing the genetic heterogeneity of mammary pathogen isolates from environmental samples. Pages 434–438 in *Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

DOI: 10 .3920/ 978 -90 -8686 -550 -5

DÖPFER, D., BUIST, W., SOYER, Y., MUÑOZ, M. A., ZADOKS, R. N., GEUE, L., und ENGEL, B., 2008:

Assessing Genetic Heterogeneity within Bacterial Species Isolated from Gastrointestinal and Environmental Samples: How Many Isolates Does It Take? *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3490-3496.

doi:10.1128/AEM.02789-07

DOUGLAS, V. L., FENWICK, S. G., PFEIFFER, D. U., WILLIAMSON, N. B. und HOLMES, C.W., 2000:

Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsedfield gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 75, 27–41.

DOI: 10 .1016/ S0378 -1135(00)00184 -X.

ESENER, N., GREEN, M. J., EMES, R. D., JOWETT, B., DAVIES, P. L., BRADLEY, A., J. und DOTTORINI, T. 2018:

Discrimination of contagious and environmental strains of *Streptococcus uberis* in dairy herds by means of mass spectrometry and machine-learning. *Sci Rep.* 8, 17517

DOI: 10.1038/s41598-018-35867-6

GILLESPIE, B. E., JAYARAO, B. M., PANKEY, J. W., und OLIVER, S. P., 1998:
Subtyping of *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions by DNA fingerprinting. *J. Vet. Med.* 45, 585-593.
DOI:10.1111/j.1439-0450.1998.tb00831.x.

GILLESPIE, B. E., und OLIVER, S. P., 2004:
Comparison of an automated ribotyping system, pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for differentiation of *Streptococcus uberis* strains. *Biotechnology (Faisalabad)* 3, 165-172.
DOI:10.3923/biotech.2004.165.172

GRIEGER, A.-S., ZOCHE-GOLOB, V., PADUCH, J.-H., HOEDEMAKER, M. und KRÖMKER, V., 2014:
Rezidivierende klinische Mastitiden bei Milchkühen–Bedeutung und Ursachen.
[Recurrent clinical mastitis in dairy cattle–importance and causes]. *Tierarztl. Prax.*
Ausg. G Grosstiere. 42, 156-162.
DOI:10.1055/s-0038-1623218

GRÖHN, Y. T., WILSON, D. J., GONZALES, R. N., HERTL, J. A., SCHULTE, H., BENNETT, G. und SCHUKKEN, Y. H., 2004:
Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3358-3374.
DOI:10.3168/jds.S0022-0302(04)73472-4

HAMEL, J., ZHANG, Y., WENTE, N. und KRÖMKER, V., 2020:
Heat stress and cow factors affect bacteria shedding pattern from naturally infected mammary gland quarters in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 104, 786-794.
DOI: 10.3168/jds.2020-19091

HEESCHEN, W., REICHMUTH, J., TOLLE, A. und ZEIDLER, H., 1969:
Die Konservierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchung. *Milchwissenschaft* 24, 729-734.

HEJLICEK, K., 1994:

Mastitis durch *Streptococcus agalactiae* (Gelber Galt). In Euter- und Gesaugerkrankheiten. K.Wendt, H. Bostedt, H. Mielke, and H. W. Fuchs, ed. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Germany.

HIJAZIN, M., SAMMRA, O., ULBEGI-MOHYLA, H., NAGIB, S., ALBER, J., LÄMMLER, C., KÄMPFER, P., GLAESER, S. P., BUSSE, H. J., KASSMANNHUBER, J., PRENGER-BERNINGHOFF, E., WEISS, R., SIEBERT, U., HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A. und ZSCHÖCK, M., 2013:

Arcanobacterium phocisimile sp. nov., isolated from harbour seals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 2019-2024.

DOI:10.1099/ijss.0.045591-0

HILLERTON, E., und BOOTH, J. M., 2018:

The five-point mastitis control plan—A revisory tutorial! Proc. 57th Annu. Mtg. National Mastitis Council, Tucson, AZ. National Mastitis Council, Madison, WI.

HILLERTON, J. E., BRAMLEY, A. J., STAKER, R. T. und MCKINNON, C. H., 1995:

Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a five year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. J. Dairy Res. 62, 39–50.

DOI: 10.1017/S0022029900033653

HØIBY, N., CIOFU, O., JOHANSEN, H. K., SONG, Z. J., MOSER, C., JENSEN, P. Ø., MOLIN, S., GIVSKOV, M., TOLKER-NIELSEN, T. und BJARNSHOLT, T., 2011:

The clinical impact of bacterial biofilms. Int. J. Oral Sci. 3, 55-65.

DOI:10.4248/IJOS11026

JAMALI, H., BARKEMA, H. W., JACQUES, M., LAVALLÉE-BOURGET, E.-M., MALOUIN, F., SAINI, V., STRYHN, H. und DUFOUR, S., 2018:

Invited review: incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. J. Dairy Sci. 101, 4729-4746.

DOI:10.3168/jds.2017-13730

JAYARAO, B. M., SCHILLING, E. E. und OLIVER, S. P. 1993:

Genomic deoxyribonucleic acid restriction fragment length polymorphism of *Streptococcus uberis*: Evidence of clonal diversity. J. Dairy Sci. 76, 468-474.

DOI: 10 .3168/ jds .S0022 -0302(93)77367 -1

KLAAS, I. C. und ZADOKS, R. N., 2018:

An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 166-185.
DOI:10.1111/tbed.12704

KOCK, J., WENTE, N., ZHANG, Y., PADUCH, J. H., LEIMBACH, S. und KRÖMKER, V. 2018:

Accuracy of 12h-Petrifilm-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany. *Milchwissenschaft* 71, 10-13.

KROMKER, V., 2007:

Euterkrankheiten. Pages 47–74 in *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. V. Kromker, ed. Parey, Stuttgart, Germany.

KRÖMKER, V., PADUCH, J. H., KLOCKE, D. und ZINKE, C., 2010:

Microbiological investigation of culture negative milk samples of clinical mastitis cows. *Milchwissenschaft*. 65, 123-126.

KRÖMKER, V., 2012:

Strategies against mastitis due to cow-associated pathogens as a herd problem. *J Food Safety Food Qual Arch Lebensmittelhyg.* 63, 61-64.

KRÖMKER, V., REINECKE, F., PADUCH, J. H. und GRABOWSKI, N., 2014:

Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis. *Clin. Microbiol.* 3, 1000157.
DOI: 10.4172/2327-5073.1000157

KRÖMKER, V. und MORONI, P., 2018:

Strategische Ansätze zur Bekämpfung von Mykoplasmenmastitiden. *Prakt. Tierarzt* 99, 1072-1079.
DOI: 10.2376/0032-681X-17-82

KRÖMKER, V., SCHMENGER, A., KOCH, J., KLOCKE, D., PADUCH, J. H., und LEIMBACH, S., 2018:

Aspekte einer modernen Mastitistherapie [Aspects of Modern Mastitis Treatment]. *Prakt. Tierarzt* 99, 180-189.

DOI: 10.2376/0032-681X-17-75

KRÖMKER, V., KLOCKE, D., LEIMBACH, S., PADUCH, J.-H., WENTE, N., THO SEETH, M., 2018:
Leitfaden Eutergesundheit bei Stall- und Weidehaltung, Hannover/Oldenburg, Juni 2018
<https://www.lwk-niedersachsen.de/index.cfm/portal/1/nav/2043/article/32388.html> (04.02.2021)

KRUZE, J., und BRAMLEY, A. J., 1982:

Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. II Evidence of colonization of the bovine intestine by *Str. uberis*. *J. Dairy Res.* 49, 375-379.
DOI:10 .1017/S0022029900022512

LEIGH, J. A., FIELD, T. R. and WILLIAMS, M. R., 1990:

Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defence factors. *Res. Vet. Sci.* 49, 85-87.
DOI:10 .1016/ S0034 -5288(18)31052 -X.

LEIGH, J. A., 1999.

Streptococcus uberis: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet. J.* 157, 225-238.
DOI: 10 .1053/ tvjl .1998 .0298

LEIMBACH, S. und KRÖMKER, V., 2018:

Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups. *J. Dairy Sci.* 101, 6357-6365.
DOI: 10.3168/jds.2017-14198

LOPEZ-BENAVIDES, M. G., WILLIAMSON, J. H. und CURSONS, R. T., 2005:

Association between *Streptococcus uberis* populations on farm races and climatic changes during a twelve-month period. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 65, 153-156.

LOPEZ-BENAVIDES, M. G., WILLIAMSON, J. H. PULLINGER, G. D., LACY-HULBERT, S. J., CURSONS, R. T. und LEIGH, A. A., 2007:

Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasturebased dairy farm. *J. Dairy Sci.* 90, 5558-5566.
DOI:10.3168/ jds .2007 -0194

MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J. A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J. E., URWIN, R., ZHANG, Q., ZHOU, J., 1998:

Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 3140-3145.

DOI: 10.1073/pnas.95.6.3140

MANSION-DE VRIES, E. M., KNORR, N., PADUCH, J. H., ZINKE, C., HOEDEMAKER, M. und KRÖMKER, V., 2014:

A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. Prev Vet Med 113(4): 620–624.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.11.019

MANSION-DE VRIES, E. M., HOEDEMAKER, M. und KRÖMKER, V., 2015:

Aspekte einer evidenzbasierten Therapie klinischer Mastitiden. Tierärztl Prax Großtiere 43, 287-295.

DOI:10.15653/TPG-150227

MANSION-DE VRIES, E. M., PIEPER, J., KNORR, N., ZINKE, C., HOEDEMAKER, M. und KRÖMKER, V., 2016:

Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage. Milk Sci. Int. 69, 27-32.

MATTHEWS, K. R. und OLIVER, S. P., 1993:

Encapsulation of streptococci isolated from bovine milk. Zentralbl. Veterinarmed. B. 40, 597-602.

DOI:1439 -0450 .1993 .tb00181 .x

MATTHEWS, K. R., ALMEIDA, R. A. und OLIVER, S. P., 1994:

Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. Infect. Immun. 62, 5641-5646.

DOI: 10.1128/IAI.62.12.5641-5646.1994

MCDougall, S., PARKINSON, T. J., LEYLAND, M., ANNISS, F. M. und FENWICK, S. G. 2004:

Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. J. Dairy Sci. 87, 2062-2072.

DOI: 10 .3168/ jds .S0022 -0302(04)70024 -7

ODIERNO, L., CALVINO, L., TRAVERSSA, P., LASAGNO, M., BOGNI, C. und REINOSO, E. 2006:
Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy
herds. *J. Dairy Sci.* 89, 3886-3890
DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72431-6

OLIVER, S. P., GILLESPIE, B. E. und JAYARAO, B. M., 1998:
Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary
infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 69-73.
DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12892.x

OLIVEIRA, M., BEXIGA, R., NUNES, S.F., CARNEIRO, C., CAVACO, L. M., BERNARDO, F. und
VILELA, C. L., 2006:
Biofilm- forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis
isolates. *Vet. Microbiol.* 118, 133-140.
DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.07.008

PACHEO, A. B. F., GUTH, B. E. C., de ALMEIDA, D. F. und FERREIRA, L. C. S., 1996:
Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. *Res.
Microbiol.* 147, 175-182.
DOI: 10.1016/0923-2508(96)80217-8

PADUCH, J. H., MOHR, E. und KROMKER, V. 2013:
The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*,
Streptococcus uberis and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. *J.
Dairy Res.* 80, 159-164.
DOI: 10.1017/S0022029913000046

PHUEKTES, P., MANSELL, P. D., DYSON, R. S. HOOPER, N. D., DICK, J. S. und BROWNING, G. F.
2001:
Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J. Clin.
Microbiol.* 39, 1460-1466.
DOI: 10.1128/JCM.39.4.1460-1466.2001

PICKER, J.C., 2012:

Aspects of Recurrent Mastitis. Masterthesis, Universität Göttingen Deutschland.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C. und RUEGG, P.L., 2011:

Risk factors associated with short-term posttreatment outcomes of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94, 3397–3410.

DOI: 10.3168/jds.2010-3925

PRYOR, S. M., CURSONS, R. T., WILLIAMSON, J. H. und LACY-HULBERT, S. J., 2009:

Experimentally induced intramammary infection with multiple strains of *Streptococcus uberis*. *J. Dairy Sci.* 92, 5467-5475.

DOI: 10 .3168/ jds .2009 -2223

RIFFON, R., SAYASITH, K., KHALIL, H., DUBREUIL, P., DROLET, M. und LAGACE, J. 2001.

Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2584-2589.

DOI: 10 .1128/ JCM .39 .7 .2584-2589 .2001

SAWANT, A. A., PILLAI, S. R. und JAYARAO, B. M. 2002:

Evaluation of five selective media for isolation of catalase-negative gram-positive cocci from bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 85:1127–1132.

DOI: 10 .3168/ jds .S0022 -0302(02)74174 -X

SCHUKKEN, Y. H., BAR, D., HERTL, J. und GRÖHN, Y. T., 2010:

Correlated time to event data: modeling repeated clinical mastitis data from dairy cattle in New York State. *Prev. Vet. Med.* 97, 150–156.

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2010.09.012

SCHUKKEN, Y.H., CHUFF, M., MORONI, P., GURJAR, A., SANTISTEBAN, C., WELCOME, F. und ZADOKS, R., 2012:

The “other” Gram-negative bacteria in mastitis Klebsiella, Serratia, and more. *Vet. Clin. Food. Anim.* 28, 239-256.

DOI: 10.1016/j.cvfa.2012.04.001

SCHÖNBORN, S., WENTE, N., PADUCH, J. H. und KRÖMKER, V., 2017:

In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. J. Dairy Res. 84, 198-201.

DOI: 10.1017/S0022029917000218

SEETH, M., THO und KRÖMKER, V., 2020:

Vergleichsuntersuchung von vier ausgewählten Milchproben in deutschen Mastitislaboren 2019.

Praktischer Tierarzt. 101, 1104-1115.

DOI: 10.2376/0032-681X-2038

SHINJI, H., YOSIZAWA, Y., TAJIMA, A., IWASE, T., SUGIMOTO, S., SEKI, K. und MIZUNOE, Y., 2011:

Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 79, 2215-2223.

DOI: 10.1128/IAI.00133-11

SMITH, K. L., und HOGAN, J. S., 1993:

Environmental mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 9, 489-498.

DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30616-2

SWINKELS, J. M., LAM, T. J. G. M., GREEN, M. J. und BRADLEY, A. J., 2013: Effect of extended cefquinome treatment on clinical persistence or recurrence of environmental clinical mastitis. Vet. J. 197, 682-687.

DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.03.010

TASSI, R., MCNEILLY, T. N., FITZPATRICK, J. L., FONTAINE, M. C., REDDICK, D., RAMAGE, C. LUTTON, M., SCHUKKEN, Y. H. und ZADOKS, R. N., 2013:

Strain-specific pathogenicity of putative host-adapted and nonadapted strains of *Streptococcus uberis* in dairy cattle. J. Dairy Sci. 96:5129-5145.

DOI: 10.3168/jds.2013-6741

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKESEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., SWAMINATHAN, B., 1995:

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Mikrobiol. 33, 2233-2239.

DOI: 10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995

THOMAS, L. H., HAIDER, W., HILL, A. W. und COOK, D R. S., 1994: Pathological findings of experimentally-induced *Streptococcus uberis* infection in mammary gland of cows. Am. J. Vet. Res. 55, 1723-1728.
PMID: 7887517

TODHUNTER, D. A., SMITH, K. L. und HOGAN, J. S., 1995:
Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 78, 2366-2374.
DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76864-3

WATTS, J. L., SALMON, A. und YANCEY JR., R. J., 1993:
Use of modified Rambach agar to differentiate *Streptococcus uberis* from other mastitis streptococci. J. Dairy Sci. 76, 1740-1743.
DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77506-2

WENDT, K., BOSTEDT, H., MIELKE, H. und FUCHS, H. W., 1994:
Euter und Gesäugerkrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

WENTE, N., ZHANG, Y., GRIEGER, A. S., PADUCH, J. H., LEIMBACH, S. und KROEMKER, V., 2018:
Recurrent mastitis – persistent or new infections? 30th World Buiatrics Congress, Sapporo.

WENTE, N., KLOCKE, D., PADUCH, J.-H., ZHANG, Y., THO SEETH, M., ZOCHE-GOLOB, V., REINECKE, F., MOHR, E. und KRÖMKER, V., 2019a:
Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. J. Dairy Sci. 102, 9360-9369.
DOI: 10.3168/jds.2019-16669

WENTE, N., KLOCKE, D., MOHR, E. und KRÖMKER, V., 2019b:
Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass. Praktischer Tierarzt. 100, 1067-1075.
DIO: 10.2376/0032-681X-1925

WENTE, N., GRIEGER, A.S., KLOCKE, D., PADUCH, J.-H., ZHANG, Y., LEIMBACH, S., THO SEETH, M., MANSION- DE VRIES, E.M., MOHR, E. und KRÖMKER, V. 2020:
Recurrent – persistent or new infections? Vet. Mic. 244, 108682

DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108682

WENTE, N. und KRÖMKER, V. 2020:

Streptococcus dysgalactiae—Contagious or Environmental? Animals 10, 2185

DOI: 10.3390/ANI10112185

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990:

DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535.

DOI: 10.1093/nar/18.22.6531

ZADOKS, R. N., ALLORE, H. G., BARKEMA, H. W., SAMPIMON, O. C., GRÖHN, Y. T. und SCHUKKEN, Y. H., 2001:

Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. J. Dairy Sci. 84, 590-599.

DOI: 10 .3168/ jds .S0022 -0302(01)74512 -2

ZADOKS, R. N., GELLESPIE, B. E., BARKEMA, H. W., SAMPIMON, O. C., OLIVER, S. P. und SCHUKKEN, Y. H., 2003:

Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. Epidemiol. Infect. 130, 335-349.

DOI: 10 .1017/s0950268802008221

ZADOKS, R. N., TIKOFSKY, L. L. und BOOR, K. J., 2005:

Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. Vet. Microbiol. 109, 257-265.

DOI: 10 .1016/j .vetmic .2005 .05 .008

ZADOKS, R.N., SCHUKKEN, Y.H., 2006:

Use of molecular epidemiology in veterinary practice. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 22, 229–261.

DOI: 10.1016/j.cvfa.2005.11.005

ZOCHE-GOLOB, V. und SPILKE, J., 2013:

Herd-specific estimation of milk yield reduction due to recurrent clinical mastitis. Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr. 126, 269–276.
PMID: 23901581

7. Anhang

7.1 Danksagung

Der Weg zu einer Dissertation beginnt mit einer Idee, die Umsetzung dieser Idee ist eine lange und manchmal steinige Reise, die von wechselndem Wetter begleitet wird. Ich hatte das Glück und Vergnügen, dass ich viele Weggefährten hatte, die sich auf dieser Reise zu mir gesellt haben.

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. vet. habil. Volker Krömker für die Idee und die ständige zuverlässige Begleitung auf dieser Reise. Genauso danke ich Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. Elmar Mohr, dass er mir diese Reise erst ermöglicht und mich begleitet hat.

Jan-Hendrik Paduch hat mir einen Pfad vorgetrampelt, Claudia Zinke hat meinen Rucksack voll mit Grundlagen gepackt und Doris Klocke hat mich in Wanderschuhe gesteckt. Wenn der Anstieg zu steil wurde hat Yanchao Zhang mich angeschoben und ein Teil meines Gepäcks mitgetragen. Anne und Christiane Schmenger haben mich ständig, auf eine zuverlässig schräge Weise, motiviert und verpflegt. Vielen Dank.

Wenn die Wege nicht eindeutig zu erkennen sind, bedarf es eines Wegweisers, dafür bin ich Stefanie Leimbach sehr dankbar.

Martin Bartels, Vincent Meyer und Anton Fetsch haben mir geholfen manches distanziert aus luftiger Höhe zu betrachten und den Weg wieder zu finden, wenn ich mich doch mal verlaufen habe. Danke.

Auf meiner Reise lernte ich viele Reisende kennen. Für die vielen Lagerfeuergespräche bedanke ich mich bei Susanne Steidel, Mark Douvidzon, Martin tho Seeth, Maria Hohmann, Johannes Hamel, Jan Kock, Jonathan Wallis, Marco Ziesch, Sonja Degen, Ann-Christin Diepers, Isabel Titze, Julia Nitz, Sahra Schönborn, Ellen Mansion-de Vries, Johanna Lücking und Veit Zoche-Golob. Ich würde mich freuen, wenn unsere Wege sich wieder kreuzen und wir wieder ein Stück gemeinsam laufen.

Unterwegs hatte ich stets die Sicherheit, dass ich jeder Zeit einkehren und rasten kann, dafür danke ich meinem Mann David Wente.

Danke!

7.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich durch eigenhändige Unterschrift, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus den Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedankensind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in dieser Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Ort, Datum

Unterschrift

7.3 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Nicole Wente (geb. Knorr)

Geburtsdatum: 16.08.1985

Geburtsort: Novosibirsk, Russland

Berufstätigkeit

03/2008 - 12/2009	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Hochschule Hannover, Fakultät II, Abteilung Bioverfahrenstechnik, AG Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Volker Krömker
01/2010 - 02/2010	Hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Hannover, Fakultät II, Abteilung Bioverfahrenstechnik, AG Milchtechnologie unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Hülsen
03/2010-12/2012	Hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Hannover, Fakultät II, Abteilung Bioverfahrenstechnik, AG Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Volker Krömker
01/2011-12/2011	Ferdinand Eimermacher GmbH & Co. KG, Nordwalde, Bereich Forschung und Entwicklung
2011-2013	Lehrbeauftragte für die Veranstaltung „Allgemeine Mikrobiologie Praktikum“ in der Abteilung Bioverfahrenstechnik der Fachhochschule Hannover
02/2011-heute	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Hannover, Fakultät II, Abteilung Bioverfahrenstechnik, AG Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. habil. Volker Krömker
04/2014-02/2019	Steinbeis Forschungszentrum Milchwissenschaft, Steinbeis Transferzentren Niedersachsen GmbH

Studium

- 09/2006 - 02/2010 Studium im Studiengang Milchwirtschaftliche Lebensmitteltechnologie an der Fachhochschule Hannover, Abschluss B. Eng. Bearbeitung der Bachelorthesis bei Ferdinand Eimermacher GmbH & Co. KG in Nordwalde (Thesis: Entwicklung eines Desinfektionsmittels zur Prävention von *Dermatitis digitalis*)
- 03/2011 - 02/2013 Studium im Studiengang Milch- und Verpackungswirtschaft an der Hochschule Hannover, Abschluss M. Eng. Bearbeitung der Masterthesis bei MSD Intervet Deutschland GmbH (Thesis: Determination of minimal inhibitory concentration of cephalonium, cephapirin and cefquinome against bovine mastitis pathogens from subclinical mastitis considering regional variances within the scope of a Germany-wide study) (WENTE, N., ZOCHE-GOLOB, V., BEHR, M. und KRÖMKER, V. 2016: Short communication: Susceptibility to cephalosporins of bacteria causing intramammary infections in dairy cows with a high somatic cell count in Germany, June 2016 Prev. Vet. Med. 131:146-151 DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.06.010 PMID: 27401227)
- seit 02/2016 Promotionsstudium an der Universität Rostock, Thema: „Anwendung molekularbiologischer Stammvergleichstechniken in der klinischen Mastitisepidemiologie“ (wissenschaftliche Betreuer: Prof. Dr. med. vet. habil. E. Mohr, Prof. Dr. med. vet. habil. V. Krömker)

Schulausbildung

- 2000-2006 Besuch des Bismarckgymnasiums in Hannover, Abschluss: Abitur

Sonstiges

- mehrjährige ehrenamtliche soziale Arbeit bei „Das Rote Telefon e.V.“, Hannover
Sportklettertrainer - Ausbildung

7.4 Zielstellung und Thesen der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Anwendung der molekularbiologischen Stammvergleichstechniken zur Verbesserung des Verständnisses der epidemiologischen Bedeutung boviner Mastitiserreger auf Herdenebene und damit auch zur Optimierung der Bekämpfung von Mastitisinfektionen.

Dabei sollen folgende Thesen untersucht werden:

These I: *Streptococcus uberis* ist ein umweltassozierter Mastitiserreger, verbesserte Hygiene im Liege- und Laufbereich der Tiere kann helfen die durch den Erreger verursachten Mastitiden zu reduzieren.

These II: Bei wiederkehrenden klinischen Mastitiden handelt es sich häufig um Neuinfektionen.

These III: Stammvergleichstechniken können bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen erheblich zur Lösung beitragen.

7.5 Hauptaussagen der Arbeit

- *S. uberis* Stämme aus Milchsekreten an klinischer Mastitis erkrankten Tieren sind in der Umwelt der Tiere, speziell im Wartebereich vor dem Melkstand, auf dem Treibeweg zur Weide, auf einer Tränke und im Zitzengummi, nachgewiesen worden. Diese Stellen können potentielle *S. uberis* Infektionsquellen darstellen.
- Identische *S. uberis* Stämme konnten in mehreren Probenahmestellen in der Umwelt nachgewiesen werden. Die Stämme können aus einem Ort in einen anderen übertragen werden.
- Es wurden keine übereinstimmenden *S. uberis*-Stämme auf den unterschiedlichen Betrieben gefunden. Es liegt eine hohe Stammvielfalt von *S. uberis* vor.
- Ein *S. uberis*-Stamm kann in einem Betrieb dominieren und einen kuhassoziierten Charakter aufweisen. Bei der *S. uberis*-Bekämpfung werden somit Maßnahmen benötigt, die sowohl für umwelt- als auch für kuhassoziierte Pathogene konzipiert sind.
- 11 % aller wiederkehrenden klinischen Mastitisfälle konnten mit der RAPD PCR als persistierende Infektionen identifiziert werden. Damit rücken präventive Maßnahmen zur Verhinderung der Neuinfektionen in den Vordergrund.
- Wiederkehr- und Persistenzrate konnten als erregerindividuell identifiziert werden: bei ähnlichen Wiederkehrraten (*S. aureus* 27 % und *S. uberis* 24 %) war jeder dritte wiederkehrende *S. aureus*-Fall und jeder siebte *S. uberis*-Fall ein Ergebnis einer persistierenden Infektion. *E. coli* zeigte eine Wiederkehrrate von 14,7 %, jedoch annähernd die gleiche Persistenzrate wie *S. aureus*. Umso wichtiger ist der Vergleich der persistierenden Fälle an allen Fällen zwischen den Erregern.
- Maßnahmen der Neuinfektionsvermeidung zur Verhinderung von wiederkehrenden Mastitiden sind auch bei Infektionen mit dengleichen Erreger, von besonders großer Bedeutung, nicht die Intensivierung der antibiotischen Therapie oder die Berücksichtigung der Resistzenzen.
- Anwendung der molekularbiologischen Stammvergleichstechniken kann zum Verständnis des Mastitisgeschehens, und damit bei einzelbetrieblichen Mastitisproblemen erheblich zur Lösung beitragen.

7.6 Wissenschaftliche Wertung der Ergebnisse

Bisherige Arbeiten beschäftigten sich mit der Isolierung von *S. uberis* innerhalb einer Herde oder in deren Umwelt. Es fehlte bislang der Vergleich der Isolate aus der Umwelt und den Milchsekreten erkrankter Tiere auf Stammebene, um eine Verknüpfung zu einer Übertragung aus der Umwelt oder ebenfalls von Tier zu Tier herzustellen. In dieser Studie konnte zum ersten Mal, unter Anwendung molekularbiologischer Stammvergleiche, die Assoziation zwischen den *S. uberis* - Mastitisstämmen und den Stämmen aus der Umwelt der Tiere für eine umfangreiche Anzahl unterschiedlicher Betriebe gezeigt werden.

Bisher wurde bei wiederkehrenden Mastitiden in Milchdrüsenvierteln in einer Laktation von einer Persistenz der Infektion über die klinische Episode hinaus ausgegangen. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe molekularbiologischer Stammvergleiche gezeigt werden, dass zumindest im untersuchten sehr umfangreichen Datenmaterial persistierende Infektionen die Ausnahme und Neuinfektionen mit anderen Bakterienstämmen die Regel sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Wiederkehrrate, sowie die Persistenzrate, erregerspezifisch sind.

7.7 Allgemeine Bedeutung der Ergebnisse

Bovine Mastitiden verursachen hohe ökonomische Verluste in Milchviehbetrieben. Um gezielte wirtschaftliche und gesellschaftliche Mastitisbekämpfungsstrategien im Sinne einer Antibiotikareduktion entwickeln zu können, ist die Kenntnis der Epidemiologie der vorliegenden Erreger entscheidend. In dieser Arbeit konnte unter Anwendung von molekularbiologischen Stammvergleichstechniken gezeigt werden, dass einer der am häufigsten vorkommenden und als umweltassoziiert geltenden Mastitiserreger zwar aus der Umwelt der Tiere kommt, aber dennoch Muster einer kontagiösen Übertragung zeigt. Somit sind nicht nur hygienische Maßnahmen in der Umwelt der Tiere zu treffen, sondern auch Maßnahmen, die üblicherweise für die Bekämpfung der kontagiösen Erreger vorgesehen sind.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nur aus 11 % aller wiederkehrenden klinischen Mastitiden derselbe Stamm wie in der vorhergegangenen Infektion isoliert werden konnte. Dieser Fund führt zu der Erkenntnis, dass die Prävention der Neuinfektionen eher im Vordergrund stehen sollte als eine Therapieintensivierung. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nicht alle Erreger, die eine hohe Wiederkehrrate aufwiesen, auch eine hohe Persistenzrate haben. Somit kann bei der Strategiefindung die Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen persistenten Infektion erregerabhängig abgeschätzt werden.

7.8 Anteilserklärung

Manuskript	Autor (N. Wente)	Co-Autoren
WENTE, N., KLOCKE, D., Idee, Versuchsplanung, PADUCH, J. H.; ZHANG, Y., Durchführung THO SEETH, M., ZOCHE-GOLOB, V., REINECKE, F., GOLOB, V., REINECKE, F., MOHR, E. und KRÖMKER, V., 2019: Associations between <i>Streptococcus uberis</i> strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases: J. Dairy Sci. 102, 9360 9369.	Idee, Versuchsplanung, Durchführung Untersuchungen, Ergebnisauswertung, Erstellung Manuskriptes, Revision	V. Krömker (Idee, Versuchsplanung, Durchführung der Feldstudie, Ergebnisauswertung, Erstellung des Manuskriptes, kritische Revision) E. Mohr (kritische Revision) D. Klocke (Versuchsplanung, kritische Revision) J. H. Paduch (Versuchsplanung, kritische Revision) Y. Zhang (Durchführung Untersuchungen, kritische Revision) M. tho Seeth (Durchführung Feldstudie, kritische Revision) V. Zoche-Golob (Durchführung Feldstudie, kritische Revision) F. Reinecke (Durchführung Feldstudie, kritische Revision)

Manuskript	Autor (N. Wente)	Co-Autoren
WENTE, N., GRIEGER, A. S., KLOCKE, D., PADUCH, J. H. ZHANG, Y., LEIMBACH, S., THO SEETH, M., MANSION-DE VRIES, E. M., MOHR, E. und KRÖMKER, V., 2020: Recurrent mastitis- persistent or new infections? Vet. Microbiol. 244, 108682.	Idee, Durchführung Untersuchungen, Ergebnisauswertung, Erstellung der kritische Revision	V. Krömker (Idee, der Versuchsplanung, Ergebnisauswertung, Erstellung des Manuskriptes) E. Mohr (kritische Revision) A. S. Grieger (Durchführung der Feldstudie) D. Klocke (Ergebnisauswertung, kritische Revision) J. H. Paduch (Versuchsplanung, kritische Revision) Y. Zhang (Durchführung Untersuchungen, kritische Revision) S. Leimbach (kritische Revision) M. tho Seeth (kritische Revision) E. M. Mansion-de Vries (Durchführung Feldstudie, kritische Revision)
WENTE, N., KLOCKE, D., MOHR, E., und KRÖMKER, V., 2019: Mikrobiologische Mastitisdiagnostik für jeden Anlass. Prakt. Tierarzt 100, 1067 1075.	Idee, Planung, Umsetzung, Erstellung Manuscriptes, kritische Revision	V. Krömker (Idee, Planung, Erstellung des Manuskriptes) E. Mohr (kritische Revision) D. Klocke (Erstellung des Manuscriptes, kritische Revision)