

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der
Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Michael Hess Dipl.ECPVS)

Universitätsklinik für Wiederkäuer
(Leiter: Univ.- Prof. Dr. Thomas WITTEK, Dipl. ECBHM)

**„EINSATZ DER MALDI-TOF
MASSENSPEKTROMETRIE ZUR
DIFFERENZIERUNG VON STAPHYLOCOCCUS-
ISOLATEN AUS SCHAF- UND
ZIEGENMILCHPROBEN“**

Diplomarbeit

Zur Erlangung der Würde einer

MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Vorgelegt von

Anna Wurm

Wien, Dezember 2019

Betreuer:

Univ. Prof. Dr. Thomas WITTEK

Dipl. ECBHM

Universitätsklinik für Wiederkäuer

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Betreuende Assistentinnen:

Dr. Claudia HESS

Dipl. ECPVS

Universitätsklinik für Geflügel

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Dr. Martina BAUMGARTNER

Universitätsklinik für Wiederkäuer

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Problemstellung und Ziele der Arbeit	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Schaf- und Ziegenmilchproduktion in Österreich	2
2.2. Mastitiden bei Schaf und Ziege	2
2.3. Die somatische Zellzahl als Indikator für Eutererkrankungen	4
2.3.1. Schafe.....	4
2.3.2. Ziegen.....	4
2.4. Erregerspektrum bei Mastitiden kleiner Wiederkäuer	5
2.5. Bedeutung der Staphylokokken im Mastitisgeschehen.....	6
2.5.1. Gattungsmerkmale	6
2.5.2. Bedeutung und klinische Symptome bei KNS-Mastitiden	7
2.5.3. KNS-Mastitiden bei Schaf und Ziege	8
2.6. Diagnostische Verfahren	10
2.6.1. Differenzierung von KNS in der Mastitisdiagnostik	12
2.6.2. MALDI-TOF MS	12
3. Material und Methoden	14
3.1. Probenentnahme und California Mastitis Test.....	14
3.2. Bakteriologische Milchuntersuchung.....	15
3.3. Zellzahlmessung.....	17
3.4. MALDI-TOF MS	17
3.5. Statistische Auswertung	19
4. Ergebnisse	20
4.1. Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung auf Herdenebene.....	20

4.2.	Ergebnisse des MALDI-TOF-MS.....	21
4.2.1.	Speziesverteilung von Staphylokokken aus Schaf- und Ziegenmilch.....	23
4.2.2.	Zusammenhang zwischen der Zellzahl in den Hälftengemelken und der Staphylokokkenspezies.....	25
5.	Diskussion	27
5.1.	Validität der Ergebnisse der Staphylokokkendifferenzierung mittels MALDI-TOF MS.....	27
5.2.	Verteilung der Erregerspektren	29
5.3.	Vergleich zwischen Speziesverteilung beim kl. Wiederkäuer und Speziesverteilung beim Rind	33
6.	Zusammenfassung.....	35
7.	Schlussfolgerung.....	36
8.	Extended Summary.....	37
9.	Abkürzungsverzeichnis	38
10.	Literaturverzeichnis	39
11.	Abbildungsverzeichnis	44
12.	Tabellenverzeichnis	45

1. Problemstellung und Ziele der Arbeit

Das steigende Interesse der Konsumenten an Schaf- und Ziegenmilchprodukten erhöht die Wichtigkeit der Eutergesundheit in den Betrieben mit kleinen Wiederkäuern. Die antibiotische Behandlung von Infektionen des Euters ist eine wichtige Maßnahme zur Sicherstellung der tierischen Gesundheit, der Milchleistung und Qualität des Lebensmittels Milch. Der gezielte Einsatz von Antibiotika soll jedoch nicht nur eine verbesserte Wirksamkeit im Euter gewährleisten, sondern ist vor dem Hintergrund der Resistenz- und Rückstandsproblematik auch in gesetzlichen Vorgaben und Leitlinien festgeschrieben.

Staphylokokken gehören zu den häufigsten Mastitiserregern bei Schaf und Ziege. Während die Pathogenität von *Staphylococcus* (S.) *aureus* unbestritten ist, gibt es noch kaum Untersuchungen zur Bedeutung der unterschiedlichen Spezies der Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS). Beim Rind ist mittlerweile bekannt, dass ca. 20 verschiedene Spezies im Zusammenhang mit Mastitiden nachgewiesen werden können. Bei Schaf und Ziege gibt es dazu bisher kaum Untersuchungen, da die Differenzierung mit erhöhtem diagnostischem und finanziellem Aufwand verbunden ist.

In den letzten Jahren hat das massenspektrometrische Verfahren MALDI-TOF MS zunehmend Eingang in die Routinediagnostik großer Laboratorien gefunden, weil es eine rasche Identifizierung von Bakterien nach kultureller Anzüchtung erlaubt. Bei diesem Verfahren werden speziesspezifische Spektren ribosomaler Proteine von Bakterien generiert. Durch Abgleich mit in Datenbanken hinterlegten Spektren können Bakterien bis auf Speziesebene identifiziert werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden 250 Staphylokokken-Isolate aus Schaf- bzw. Ziegenmilch mittels klassischer bakteriologischer Untersuchung aus aseptisch gewonnenen Milchproben isoliert und mittels MALDI-TOF MS identifiziert. Folgende Hypothesen sollten dabei überprüft werden:

1. Die MALDI-TOF MS ist geeignet, die verschiedenen Staphylokokkenspezies aus Schaf- und Ziegenmilch zu identifizieren.
2. Die aus Schaf- und Ziegenmilch isolierten Spezies unterscheiden sich von jenen, die im Mastitisgeschehen des Rindes nachgewiesen werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Schaf- und Ziegenmilchproduktion in Österreich

Die Schaf- und Ziegenmilchproduktion konnte sich in den letzten Jahren steigender Beliebtheit erfreuen. So erhöhte sich der österreichische Schafbestand im Jahr 2017 um rund 6 % gegenüber den Vorjahren und liegt nach Angaben des Grünen Berichtes (Version 2018) derzeit bei 400.480 Schafen in 15.608 Betrieben. Die Anzahl der Schafbetriebe stieg um rund 7 %.

Auch die Ziegenhaltung erfuhr im Jahr 2017 einen Zuwachs. So stieg die Zahl der Ziegen in Österreich auf 91.134 an, was einem Wachstum von 10 % entspricht. Die Anzahl der Ziegenhalter liegt laut aktuellen Angaben bei 9.887 Betrieben.

Im Jahr 2017 wurden 11.982 t Schafmilch – was einem Plus von 11 % entspricht, von rund 27.300 Milchschaafen mit einer Jahresmilchleistung von 438 kg produziert. Die Ziegenmilchproduktion konnte ebenfalls einen Zuwachs erfahren. Im Jahr 2017 wurde von rund 35.000 Milchziegen eine Menge von 23.075 t Ziegenmilch mit einer Jahresmilchleistung von durchschnittlich 660 kg produziert. Das entspricht einem Zuwachs von 7 %. Vorwiegend wird die Milch zu Käse, vor allem Frisch- und Schnittkäse, verarbeitet. Zunehmend finden auch Trinkmilch und Joghurt Produkte Anklang bei den Konsumenten. Abgesetzt werden diese Produkte derzeit vorwiegend über die bäuerliche Direktvermarktung. Obwohl die Erzeugung von Schaf- und Ziegenmilch in Österreich nur einen kleinen Anteil im Vergleich zur Kuhmilchproduktion ausmacht, stellt sie dennoch einen wichtigen Produktionszweig in der österreichischen Landwirtschaft dar (Grüner Bericht, 2018).

2.2. Mastitiden bei Schaf und Ziege

Als Mastitis wird definitionsgemäß eine entzündliche Erkrankung der Milchdrüse bezeichnet, die dadurch bedingt wird, dass ein infektiöses Agens in die Milchdrüse eindringt, dort haftet, sich vermehrt und eine Entzündungsreaktion auslöst (Aitken et al. 2011).

Euterentzündungen zählen zu den ökonomisch bedeutsamsten Erkrankungen der Wiederkäuer. Auch in Milchschaaf- und Milchziegenbetrieben gehören Mastitiden zu den

häufigsten Erkrankungen. Aufgrund des direkten Einflusses auf die allgemeine Tiergesundheit sowie auf Milchleistung und Milchqualität, beeinträchtigen Euterentzündungen die Rentabilität der Tierhaltung auf diesem Sektor wesentlich (Gonzalo et al. 2002).

Eine rasche Erkennung von Störungen der Eutergesundheit ist daher wichtig, um finanzielle Verluste bedingt durch eine verminderte Milchleistung und Milchqualität, durch den vorzeitigen Abgang von Zuchttieren aufgrund akuter oder chronischer Mastitiden und durch Tierarztbesuche so gering wie möglich zu halten (Halasa et al. 2017).

Dabei ist es wichtig, Störungen der Eutergesundheit immer auf Einzeltierebene zu erheben und zu diagnostizieren. Zur Ursachenklärung und für ein erfolgreiches Therapiemanagement ist es jedoch ebenso wichtig, die Herdenebene zu betrachten (Winter, 2009).

Auch bei Schaf und Ziege ist der häufigste Infektionsweg die galaktogene Infektion über den Strichkanal. Daneben spielt die hämatogene Infektion im Mastitisgeschehen bei Schaf und Ziege ebenfalls eine wichtige Rolle, da bedeutsame Zoonoseerreger wie *Listeria monocytogenes* oder *Brucella species* hämatogen in die Milchdrüse gelangen und über die Milch ausgeschieden werden können (Contreras et al. 2007).

Mastitiden können aufgrund des zeitlichen Verlaufes in akute bzw. chronische Mastitiden und aufgrund des klinischen Verlaufes in klinische und subklinische Mastitiden unterteilt werden. Während bei klinischen Mastitiden Veränderungen des Milchsekretes und/oder Entzündungssymptome am Euter (Schwellung, erhöhte Temperatur, Schmerzhaftigkeit, veränderte Konsistenz des Drüsengewebes bei Palpation etc.) für die Detektion herangezogen werden können, sind für die Detektion subklinischer Mastitiden ein Erregernachweis und das Vorliegen von Entzündungsindikatoren notwendig. Beim Rind hat sich die somatische Zellzahl als wichtigster Entzündungsindikator sowohl auf Einzeltier- als auch auf Herdenebene zur Beurteilung der Eutergesundheit etabliert (Pyörälä, 2003). Im Gegensatz dazu ist die Interpretation dieser Parameter beim kleinen Wiederkäuer mit einigen Schwierigkeiten behaftet und die physiologischen Referenzbereiche des Milchrindes sind nicht uneingeschränkt übertragbar.

2.3. Die somatische Zellzahl als Indikator für Eutererkrankungen

Physiologische Angaben über den Zellgehalt in der Milch bei Milchschaafen und auch Milchziegen sind nur bedingt vergleichbar, da Rasse, Alter, Art des Milchentzuges und Laktationsstadium die Höhe des Zellgehaltes deutlich beeinflussen (Höller, 2014). Jedoch ist der Zellgehalt im Verlauf der Laktation grundsätzlich stabil und es ist nur am Beginn, sowie am Ende der Laktation ein Anstieg zu verzeichnen (Winter, 2002).

2.3.1. Schafe

In Schafmilch bewegt sich die Zellzahl zwischen 20.000 und 250.000/ml, wobei in 80-90 % der untersuchten Proben ein Zellgehalt unter 100.000/ml gemessen werden kann (Pernthaner et al. 1991). Mit der Dauer der Laktation nimmt auch die Zellzahl zu, sodass am Laktationsende ein Gehalt von 200.000/ml zu messen ist (Bostedt et al. 2018).

Zur Feststellung einer entzündlichen Reaktion durch eine subklinische Mastitis eignen sich beim Schaf sowohl die somatische Zellzählung als auch der California-Mastitis-Test (CMT). Laut Behrens et al. 2001 zeigen beide Untersuchungsmethoden eine gute Übereinstimmung.

Der somatische Zellgehalt der Milch eutergesunder Schafe ist sehr stark von der Häufigkeit des Milchentzuges abhängig, wobei ein einmaliger Milchentzug pro Tag den Zellgehalt hebt. Des Weiteren beeinflussen die Art des Milchentzuges, das Laktationsstadium, die Laktationsperiode und die Rasse den somatischen Zellgehalt der Milch (Behrens et al. 2001).

Durch den CMT können ähnlich wie beim Rind Euterhälften mit negativer Reaktion im CMT als eutergesund eingestuft werden. Viskositätsänderungen und Schlieren- bzw. Gelbildung sind eindeutige Hinweise auf eine Erhöhung der Zellzahl sowie eine Erkrankung der Milchdrüse (Winter, 2009).

2.3.2. Ziegen

Bei dieser Tierart liegt die Zellzahl in der Früh-laktation bei 150.000 bis 300.000/ml, in der mittleren Laktationsperiode bei 500.000 bis 1.000.000/ml (Winter et al. 1999). Im Mittel befinden sich eutergesunde Ziegen bei etwa 216.000 Zellen/ml. Allerdings können aufgrund der breiten Schwankungen durchaus auch Werte bis 500.000 Zellen/ml als gesund beurteilt werden. Diese hohen Schwankungen bereiten bei der Interpretation des CMT größere Schwierigkeiten (Winter, 2009).

Auch durch das Vorhandensein von zytoplasmatischen Partikeln wird die Bewertung der Zellzahl in der Ziegenmilch in Frage gestellt. Diese zytoplasmatischen Partikel haben einen Anteil von bis zu 57 % an den korpuskularen Strukturen. Sie haben aber offenbar keinen Einfluss auf den Abwehrmechanismus des Ziegeneuters (Bostedt et al. 2018). Durch Verfahren, die auf direktem oder indirektem Nachweis von DNA (als Zellkernbestandteil und nicht als Partikel) basieren, kann dieser Einfluss auf Messwerte umgangen werden, allerdings ist die Interpretation der Zellzahlen in Ziegenmilch auch deshalb schwierig, weil die Zellzahlen durch physiologische Einflüsse wie dem Laktationsstadium und der Anzahl der Laktationen stärker beeinflusst werden als bei Schaf und Rind (Persson and Olofsson, 2011).

2.4. Erregerspektrum bei Mastitiden kleiner Wiederkäuer

Als Mastitiserreger können grundsätzlich grampositive und gramnegative Bakterien sowie Mykoplasmen, Chlamydien und Pilze fungieren (Winter, 2009).

Mastitiden bei kleinen Wiederkäuern können durch verschiedene Pathogene ausgelöst werden. Die häufigsten Erreger, die diagnostiziert werden, sind laut Contreras et al. 2007 Staphylokokken. Allerdings können auch andere Erreger wie Streptokokken, *Enterobacteriaceae*, *Mannheimia haemolytica*, Corynebakterien und Sprosspilze intramammäre Infektionen beim kleinen Wiederkäuer ursächlich auslösen. Die Infektionsraten mit diesen Erregern sind allerdings niedrig (Contreras et al. 2007).

Pernthaner et al. (1991) geben an, dass auch *Clostridium perfringens* Toxovar A mit dem Haupttoxin α sowie *Mycoplasma* spp. Mastitiden bedingen können. Auch gramnegative Keime wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella pneumoniae* oder *Proteus vulgaris* und seltener Nocardien, aber auch Hefen und Algen können in sporadischen Fällen nachgewiesen werden.

2.5. Bedeutung der Staphylokokken im Mastitisgeschehen

2.5.1. Gattungsmerkmale

Staphylococcus spp. sind grampositive Kokken. Im mikroskopischen Präparat weisen sie einen Durchmesser von etwa 1 µm auf, und sind als in Haufen gelagerte Kokken sichtbar. Auf bluthaltigen Nährböden wachsen Staphylokokken nach 24 h in ca. 2 mm großen weißen bis gelblichen Kolonien ohne bzw. mit unterschiedlichen Formen der Hämolyse und sind Katalase-positiv (Valentin-Weigand, 2010). *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* ist der wichtigste Mastitiserreger aus der Gattung *Staphylococci*. *S. aureus* stellt sich in der Gramfärbung als zum Teil in Haufen gelagerte, grampositive Kokken dar und lässt sich auf Columbiaagar mit Schafblutzusatz bei 37°C gut anzüchten. Die Kultur auf Blutagar zeigt konvex gewölbte, gelblich pigmentierte Kolonien mit porzellanartiger Oberfläche und Hämolyse in unterschiedlichen Formen (Valentin-Weigand, 2010).

Hämolysine, welche die Wirtszellmembranen schädigen, sind ein Pathogenitätsfaktor von Staphylokokken (Kayser et al. 2014). Durch das Alpha-Hämolysin bilden die verschiedenen Isolate teilweise einen klaren Hämolysehof um die Kolonien. Beta-Hämolysin kann zusätzlich eine unvollständige Hämolysezone produzieren, was dann das typische Bild der Doppelhämolyse, die von *S. aureus* produziert wird, entstehen lässt. Dieses Phänomen ist allerdings nicht bei allen Isolaten vorhanden (Zecconi, 2010).

Die für die Pathogenese wichtigsten extrazellulären Toxine und Enzyme sind die Plasmakoagulase, welche eine Thrombinfunktion aufweist und so die Phagozytose erschwert. Hyaluronidase, Lipase und DNase wirken ortsständig und ermöglichen die einfache und schnelle Ausbreitung in Geweben. Leukocidine sorgen für die Schädigung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und von Makrophagen durch Porenbildung. Außerdem werden Exfoliatine und Enterotoxine gefunden. Im Hinblick auf ihr Symptomatik- und Pathogeneseverhalten lassen sich Infektionen mit *S. aureus* in 3 Gruppen einteilen: die Gruppe der lokalen, eitrigen Infektionen, die Gruppe der invasiven, systemischen Infektionen und die Gruppe der toxin-assoziierten Krankheiten (Kayser et al. 2014).

Zur Bestätigung von *S. aureus* und zur Unterscheidung zwischen *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) wird in der Routinediagnostik oft der Clumping-Faktor-Test

durchgeführt. Dieser dient zum Nachweis der zellwandgebundenen Koagulase A. Für den Test werden mehrere Kolonien mit einer Öse entnommen, auf einen Objektträger aufgebracht und dort mit gebrauchsfertigem Kaninchenplasma verrieben. Die Reaktion ist als positiv zu beurteilen, wenn innerhalb von zehn Sekunden eine eindeutige Gerinnung entsteht. Neben *S. aureus*-Isolaten können auch andere Staphylokokkenspezies eine positive Reaktion zeigen. Deshalb wird im Zweifelsfall ein Koagulase-Röhrchentest angeschlossen. Dafür werden 300 µl einer Keimsuspension der zu testenden Kolonien mit der gleichen Menge gebrauchsfertigem Kaninchenplasma vermischt und bei 36±1°C mindestens 4 Stunden inkubiert. Wenn der Röhrcheninhalt zu mehr als drei Viertel verklumpt, dann wird dies als positives Ergebnis gewertet. Auch hier sind eine bekannt positive, sowie negative Kontrolle mitzuführen. Staphylokokken, die nicht mit Doppelhämolyse wachsen und im Clumpingfaktor-Test bzw. im Koagulase-Test negativ sind, werden als Koagulase-negative Staphylokokken bezeichnet (DVG, 2009). In der englischsprachigen Fachliteratur findet sich für KNS auch die Bezeichnung Non-Aureus Staphylococci (NAS).

Eine Differenzierung der Staphylokokken in die verschiedenen Spezies ist über biochemische, massenspektrometrische und molekulare Verfahren verfügbar (Moritz, 2013). PCR-basierte Untersuchungstechniken sind für die Bestätigung und Differenzierung der verschiedenen Staphylokokkenspezies etabliert und beschrieben (Hwang et al. 2011, Drancourt and Roul, 2002). Für die Routinediagnostik erweisen sie sich allerdings oft als zu arbeits- und kostenintensiv (Lam et al. 2009).

2.5.2. Bedeutung und klinische Symptome bei KNS-Mastitiden

Die Gattung *Staphylococcus* umfasst etwa 71 Spezies und Subspezies (Kayser et al. 2014). KNS sind in vielen Ländern der Welt die am häufigsten aus Kuhmilchproben isolierten Bakterien (Tenhagen et al. 2006). Sie werden in Kühen mit oder ohne erhöhte Zellzahl gefunden und werden vor allem mit milden klinischen Mastitiden assoziiert (Waage et al. 1999; Thorberg et al. 2009; Supré et al. 2011).

Neben akut verlaufenden klinischen Mastitiden verursachen sie häufig chronische und subklinische Mastitiden. Durch ihre Beeinträchtigung der Milchqualität sowie der Milchmenge bedingen sie große wirtschaftliche Schäden (Wendt et al. 1994; Wittek et al. 1998).

KNS gelten zwar allgemein als minor pathogens, manche Spezies können allerdings ebenso wie *S. aureus* über mehrere Monate im Euter persistieren und dabei unterschiedlich hohe Zellzahlen hervorrufen (Suprè et al. 2011).

2.5.3. KNS-Mastitiden bei Schaf und Ziege

KNS sind auch die am häufigsten aus aseptisch entnommenen Milchproben bei kleinen Wiederkäuern isolierten Bakterien (Contreras et al, 2003; Moroni et al. 2005). Die Anzahl positiver Tiere innerhalb der Herden wird von 10 bis 30 % und in Einzelfällen mit bis zu 70 % angegeben. Ältere Tiere sind dabei stärker betroffen als Jungtiere. Die wichtigsten Vertreter der Gruppe der KNS bei Ziegen im Zusammenhang mit Mastitiden sind dabei *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. warneri* und *S. xylosus* (Contreras et al. 2007; Smith und Sherman, 2009).

Intramammäre Infektionen, welche durch *Staphylococcus (S.) aureus* bedingt sind, werden besonders beachtet, da diese sowohl akute klinische wie auch subklinische Mastitiden auslösen und aufgrund der Kontagiosität von *S. aureus* auch Bestandsprobleme hervorrufen können (Contreras et al. 2007). Im Unterschied dazu sind bei klinischen Verläufen seltener KNS nachweisbar (Bergonier et al. 2003).

KNS galten ursprünglich als Bakterien, die Haut und Schleimhaut besiedeln und ein geringes pathogenes Potential haben. In den letzten Jahren gewannen sie als Infektionserreger bei Schaf und Ziege allerdings zunehmend an Bedeutung. Häufig handelt es sich bei KNS um klassische Hautkeime, die durch suboptimale Melktechnik und Melkarbeit ins Euter gelangen (Contreras et al. 2003).

Infektionen mit *S. epidermidis* werden mit vorausgehenden Verletzungen der Haut und Schleimhaut in Verbindung gebracht. Als Ursache von Mastitiden wird aber auch der Milchentzug bzw. das Hantieren mit der Hand am Euter als Infektionsquelle diskutiert. Bei Milchschaafen sind daher sehr häufig Infektionen mit humanspezifischen Isolaten zu beobachten (Winter, 2002).

Bergonier et al. (2003) beschreiben ebenfalls, dass bei subklinischen Mastitiden hauptsächlich KNS isoliert werden. Diese Angabe wird mit einer Spanne von 25 bis 93 % aus deren Untersuchungsergebnissen unterlegt. Hierbei wurden besonders häufig die Spezies *S. epidermidis*, gefolgt von *S. xylosus*, *S. chromogenes* und *S. simulans* bei Schafen, und *S. caprae* bei Ziegen isoliert.

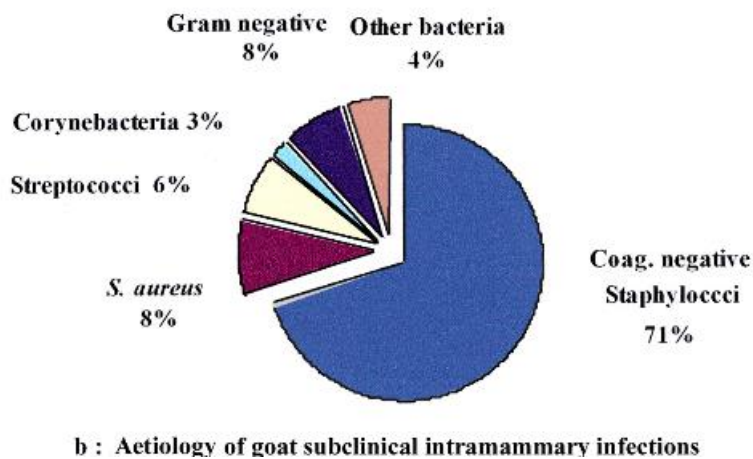
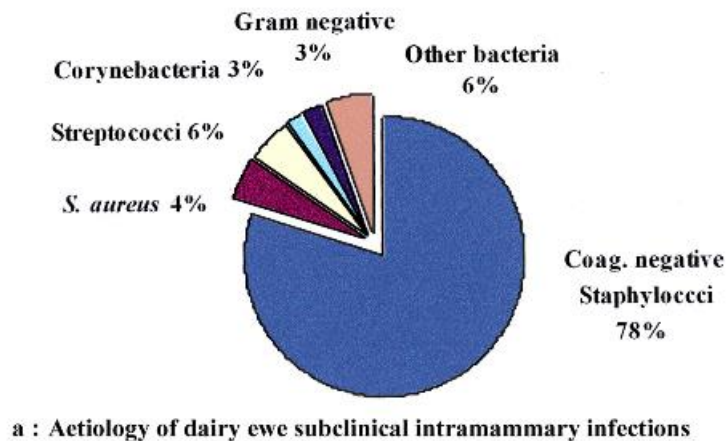


Abbildung 1: Ätiologie der subklinischen intramammären Infektionen bei Schafen und Ziegen (BERGONIER et al. 2003)

Infektionen mit KNS führen zu einem hohen Prozentsatz zu einer deutlichen Erhöhung der Zellzahl, einer Verminderung der Milchleistung und zu klinischen Veränderungen am Euter (Wittek et al. 1998). Winter (2003) beschreibt KNS zwar auch als häufigste bakterielle Ursache von Mastitiden in österreichischen Milchschaferherden, verweist aber darauf, dass KNS hauptsächlich subklinische Erkrankungen mit hoher Zellzahl bedingen können. Eine sichtbare Beeinträchtigung der Milch und klinisch erkennbare Veränderungen am Euter werden seltener beobachtet.

Auch Contreras et al. geben 2007 an, dass KNS die am häufigsten in Zusammenhang mit subklinischen Mastitiden nachgewiesenen Erreger bei kleinen Wiederkäuern sind. Diese können zwar weniger pathogen als *S. aureus* sein, aber ebenso persistierende subklinische Mastitiden mit einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl bedingen.

Im Vergleich dazu zeigt eine Studie aus dem Rinderbereich von Supré et al. 2011, dass KNS die am Zweithäufigsten gefundenen Bakterien in Rindermilchproben sind. Sie geht jedoch nicht darauf ein, um welche Art von Mastitiden es sich dabei handelt.

Bei Schafen und Ziegen werden Mastitiden grundsätzlich ähnlich behandelt wie beim Rind. Die Erfolgchancen sind allerdings durch die hohe Beteiligung von Staphylokokken mäßig. Die Infektionen mit Koagulase-negativen Staphylokokken können sowohl in der Laktation als auch zum Trockenstellen behandelt werden (Winter, 2009).

Derzeit wird eine Identifikation nur auf Ebene der Gattung und unter Beurteilung der Koagulase-Reaktion durchgeführt. Allein die Identifikation auf Speziesebene, kann jedoch helfen die Relevanz der verschiedenen KNS Spezies in Bezug auf ihre pathogene Wirkung zu erkennen (Supré et al. 2011).

2.6. Diagnostische Verfahren

In der Mastitisdiagnostik finden bei kleinen Wiederkäuern grundsätzlich dieselben Untersuchungsmethoden wie bei Milchkühen Anwendung. Die am Häufigsten genutzten Methoden sind die Messung der somatischen Zellzahl und die bakteriologische Untersuchung aseptisch entnommener Milchproben (Lam, 2009). Besonders zur Diagnostik von subklinischen Mastitiden bei Schafen wird die somatische Zellzahl erhoben (Bergonier et al. 2003). Die Zellzahl wird in der Eutergesundheit von Wiederkäuern als zentrales Kriterium betrachtet. Zur Erleichterung der Bestimmung der Zellzahl sind kommerzielle schnelle, semiquantitative Stallschnelltests zur Bestimmung und damit diagnostischen Bewertung unmittelbar am Tier verfügbar. Die Zellzahlbestimmung ist mit direkten und indirekten Methoden durchführbar (Moritz, 2013).

Die kulturelle Isolierung von Bakterien aus einer Milchprobe ist die häufigste eingesetzte Methode zur ätiologischen Abklärung einer Mastitis. Die bakteriologische Kultivierung von Mastitiserregern kann je nach Fragestellung entweder auf Herden- oder auf Tier- sowie auf Euterhälften-Ebene durchgeführt werden. Jede dieser Untersuchungsebenen verfolgt ein eigenes Ziel. Das Wissen über den Infektionsstatus der Milchdrüse, kann sehr hilfreich für die Vorbeugung der Ausbreitung von Mastitiserregern in einer Herde sein, da ein Bakterienreservoir in einem frühen Stadium entdeckt und behandelt werden kann. Zusätzlich sind regelmäßig dokumentierte bakteriologische Untersuchungsergebnisse hilfreich für die

Optimierung von Kontrollstrategien zur Prophylaxe von Mastitiden (Lam et al, 2009). Um eine sachgemäße Interpretation der bakteriologischen Milchuntersuchung durchführen zu können, müssen die Ergebnisse der klinischen Euteruntersuchung, die Zellzahlergebnisse, der Vorbericht zum Patienten und die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung in Verbindung gebracht werden. Einige der Mastitiserreger werden nur diskontinuierlich über die Milch ausgeschieden. Das gilt auch für *S. aureus*. Es kann daher notwendig sein, von verdächtigen Tieren wiederholt Milchproben zu nehmen. Eine Empfehlung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. hierzu ist es, die verdächtigen Tiere jeweils im Abstand von einer Woche dreimal zu untersuchen (DVG, 2009).

Auf Herdenebene kann eine bakteriologische Untersuchung der Tankmilchprobe nur in Ausnahmefällen, zum Beispiel zum Screening auf *S. aureus* oder Mykoplasmen, zur Beurteilung herangezogen werden. Hier liegt der Wert der Untersuchung primär darin, eine Information davon zu bekommen, welche euter-assoziierten Mastitiserreger in einer Herde präsent sind. Das Wissen darüber, welcher Organismus für Eutergesundheitsprobleme in einer Herde verantwortlich ist, kann bei der Therapie und vor allem für die Etablierung von Prophylaxemaßnahmen hilfreich sein (Koop et al. 2012).

In der Routinediagnostik wird bei Staphylokokken in der Regel nur die Unterscheidung zwischen *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken durchgeführt. Zur Unterscheidung zwischen *S. aureus* und Koagulase-negativen Arten wird in der Routinediagnostik der Nachweis der Plasmakoagulase und/oder des „Clumping factors“ verwendet (Kayser et al. 2013).

Eine weitere Differenzierung der Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken auf Speziesebene war bisher nur mit größerem zeitlichem und finanziellem Aufwand möglich, sodass in der Regel darauf verzichtet wurde (Boeringer Ingelheim, 2013).

Über die letzten Jahre haben sich weitere Methoden zur Bestätigung und Differenzierung von Bakterienspezies etabliert. Für wissenschaftliche Fragestellungen wurden unterschiedliche PCR-Verfahren mit Sequenzierung speziesspezifischer Gene etabliert, um KNS auf Speziesebene zu detektieren. Diese Differenzierung kann hilfreich sein, um Unterschiede in der Epidemiologie und Pathogenität der verschiedenen Spezies zu untersuchen. Für die Untersuchung epidemiologischer Fragestellungen werden zunehmend molekulare Genotypierungsverfahren herangezogen (Zadoks et Schukken, 2006).

2.6.1. Differenzierung von KNS in der Mastitisdiagnostik

Um Koagulase-negative Staphylokokken auf Speziesebene weiter differenzieren zu können, werden verschiedene Verfahren angewendet (Gosselin et al. 2018). Ein Verfahren, das dabei Einsatz findet ist etwa die Speziesidentifikation mittels dem API ID 32 Staph System von bioMérieux (Mercy l'Etoile, Frankreich). Dieses System basiert auf einer „Bunten Reihe“ und ermittelt anhand von 32 enzymatischen Einzelreaktionen die biochemischen Profile von Staphylokokken. Die Einzeltests bestehen aus einem Set von kleinen Reaktionsgefäßen (wells), die Reagenzlösungen beinhalten, die für 26 kolorimetrische Tests verwendet werden. Nach Zugabe einer Bakteriensuspension mit definierter optischer Dichte und einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C werden die Ergebnisse der Einzelreaktionen optisch abgelesen und ergeben in Kombination einen Zahlenschlüssel, der automatisch mit Hilfe einer Computersoftware ausgewertet wird. Obwohl API Systeme früher oft als Referenzmethode herangezogen wurden, ist die alleinige Verwendung von phänotypischen Bestimmungsmethoden für eine zuverlässige Identifizierung von Bakterien oft nicht ausreichend (Koop et al. 2012).

Weiters kann zur Speziesidentifikation eine 16S rRNA Sequenzierung durchgeführt werden. Diese ist eine häufig verwendete Referenzmethode zur Differenzierung von Bakterien auf Speziesebene, lässt es allerdings nicht zu, sehr eng verwandte Spezies zu unterscheiden (Jonguk et al. 2018).

Eine andere schnelle und effektive Methode zur Identifikation von Staphylokokkenspezies, ist der Einsatz von spezifischen Primern zur Durchführung einer speziesspezifischen Multiplex-Polymerasekettenreaktion (PCR). Diese hat eine höhere Identifikationsquote und beansprucht vergleichsweise weniger Zeit als die 16S rRNA Sequenzierung (Jonguk et al. 2018). In den meisten Ländern ist die PCR-Technologie allerdings für die Routinediagnostik von Mastitiden nicht verfügbar (Koskinen et al. 2008).

2.6.2. MALDI-TOF MS

In den vergangenen Jahren hat sich in Routinelabors mit großem Probendurchsatz das massenspektrometrische Verfahren MALDI-TOF MS zur Identifikation und Differenzierung von Bakterien und Pilzen durchgesetzt und andere Verfahren größtenteils verdrängt. MALDI-TOF MS

steht für **Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry**. Die Diagnosemethode beruht auf der Analyse des Proteinprofils mehrheitlich von ribosomalen Proteinen (Schubert et Wieser, 2013). Dafür werden Proteinspektren aus Reinkulturen generiert, indem Kolonienmaterial durch kurze Laserpulse desorbiert und ionisiert wird. Die Proteine werden in einer Vakuumflugröhre durch ein elektrisches Feld in Richtung eines Detektors beschleunigt. Dadurch entstehen abhängig von der Flugzeit durch Größe und Ladung bestimmte charakteristische Spektren, die mit in Datenbanken hinterlegten Spektren abgeglichen werden. Das Grundprinzip ist in Abbildung 2 grafisch dargestellt. Die MALDI-TOF MS hat in der Humanmedizin dazu beigetragen, die Diagnose von Tumoren, rheumatoider Arthritis, der Alzheimer Krankheit, sowie von Allergien durch die Identifizierung von biochemischen Markern, zu ermöglichen (Wieser et al. 2012).

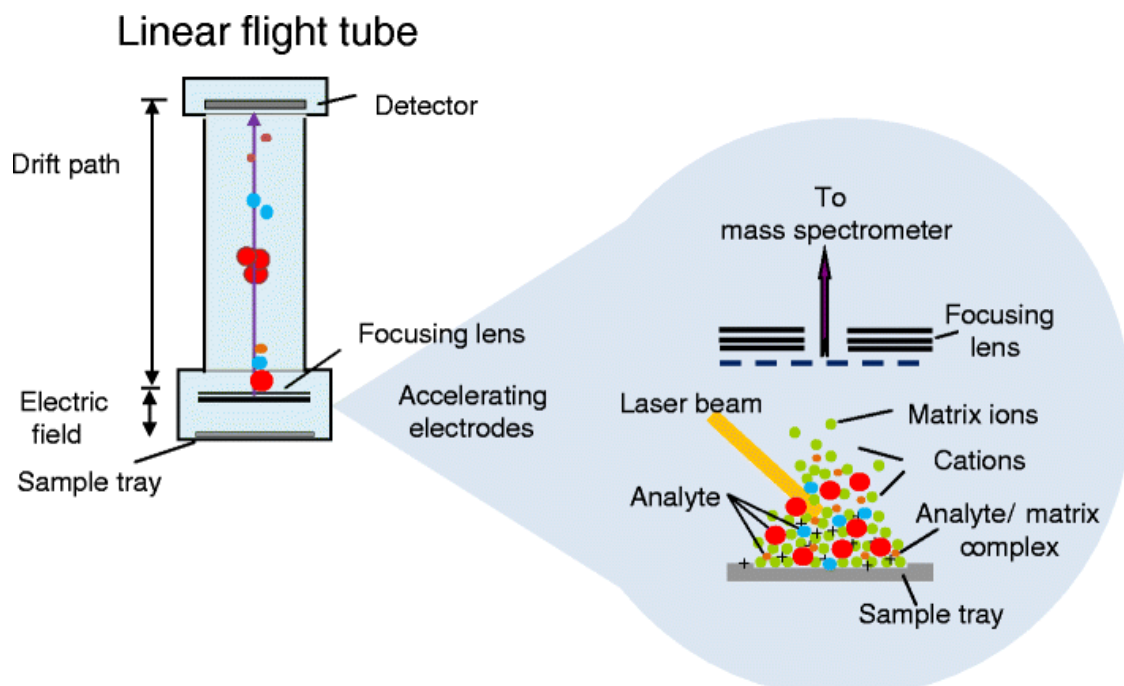


Abbildung 2: Prinzip der MALDI-TOF MS Bakterienidentifikation im schematischen Diagramm (Wieser et al. 2012, MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review))

3. Material und Methoden

Für den Aufbau einer Stammsammlung und die Differenzierung der Staphylokokken sollten mindestens je 100 Staphylokokken-Isolate aus Schaf- und Ziegenmilch mittels MALDI-TOF MS differenziert werden. Daher wurden Betriebsbesuche in Schaf- und Ziegenbetrieben zum Aufbau einer Stammsammlung durchgeführt. Außerdem wurden Proben, welche zur Routinediagnostik an das Milchlabor der Veterinärmedizinischen Universität Wien gesendet wurden, in die Studie einbezogen.

Für die Erstellung einer Stammsammlung wurden von Oktober 2017 bis Oktober 2018 insgesamt 729 aseptisch entnommene Milchproben (1458 Hälftengemelke) aus 17 Schaf- bzw. Ziegenbetrieben untersucht. 13 Betriebe wurden zur Abendmelkzeit besucht, mittels eines Fragebogens wurden Herden- sowie allgemeiner Hygiene- und Gesundheitsstatus erhoben. Im Rahmen der Melkung wurden Melkhygiene und Melkarbeit dokumentiert und es wurden je nach Herdengröße aseptisch entnommene Milchproben von durchschnittlich 61 Tieren (Spanne: 14 bis 86 Tiere) pro Betrieb aseptisch entnommen. 68 Milchproben von kleinen Wiederkäuern wurden im gleichen Zeitraum zur Routinediagnostik im Labor der Klinik für Wiederkäuer (Schwerpunkt Mastitisdiagnostik) untersucht und ebenfalls in die Studie einbezogen.

Alle in Reinkultur wachsenden Staphylokokken-Spezies wurden unabhängig von Schalmtest und Zellzahl für die weiteren Untersuchungen kryokonserviert. Für die Untersuchung mittels MALDI-TOF MS wurden die kryokonservierten Isolate auf Columbia Blutagar (CBA) rekultiviert.

3.1. Probenentnahme und California Mastitis Test

Um die Zellzahl am Betrieb semiquantitativ zu beurteilen, wurde vor der Milchprobenentnahme für die bakteriologische Untersuchung bei allen Schafen und Ziegen ein California Mastitis Test (CMT) durchgeführt und das Milchsekret beurteilt. Diese Beurteilung erfolgte nach den Kriterien, die in Tabelle 1 dargestellt sind. Anschließend wurde von allen Euterhälften eine aseptisch entnommene Milchprobe genommen.

Für den CMT wurden einige Milchstrahlen in die Testschale gemolken und der Überstand bis zur gekennzeichneten Markierung abgekippt, damit etwa 2 ml Milch in der Testschale verblieben sind. Diese Milch wurde anschließend 1:1 mit der Testlösung (Alkyl-Aryl-Sulfonat) verdünnt. Danach wurde die Testschale geschwenkt und nach ca. 20 Sekunden das Ergebnis beurteilt. Die Beurteilung erfolgte anhand der Viskositätsänderung des Gemisches auf fünf Ebenen, die in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Beurteilungsschlüssel CMT, modifiziert nach Baumgartner (2014)

Beurteilung	Testbild	Zellgehalt der Milch
-	Flüssig	< 150.000
(+)	Ggr. Schlieren	100.000-250.000
+	Hgr. Schlieren	200.000-700.000
++	Gelbildung	500.000-1.500.000
+++	Gelbildung mit Pfropf	> 1.000.000

Die Entnahme der Milchproben erfolgte nach den Vorgaben der klinischen Propädeutik (Baumgartner, 2014) sowie den DVG Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern (DVG, 2009). Um die Identifizierung der Proben zu gewährleisten, wurden die sterilen Proberöhrchen (Skarröhrchen) mit einer fortlaufenden Nummer sowie der Angabe der Tiernummer und der Euterhälfte (L, R) beschriftet. Nach Reinigung und Desinfektion der Strichkanalmündung mit alkoholgetränktem (Ethanol 70 %) Wattebausch wurde ein Milchstrahl jeder Euterhälfte in je ein sterilisiertes Skarröhrchen gemolken. Nach der Milchprobenentnahme wurde der betriebsübliche Melkvorgang mit dem Ansetzen der Melkbecher fortgesetzt. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Milchproben in das Milchlabor der Klinik für Wiederkäuer gebracht und bis zur Weiterverarbeitung am Folgetag gekühlt gelagert.

3.2. Bakteriologische Milchuntersuchung

Je 1 ml Milch wurden für die Zellzahlmessung sowie für Folgeuntersuchungen abpipettiert. Für die BU wurden die Milchproben für fünf Minuten bei 1300 g zentrifugiert. Nach Beurteilung von Sediment und Überstand wurde der Überstand abgegossen und das Sediment mittels einer sterilen 5 µl Öse auf Columbiaagar (Oxoid, Wesel) mit 5 % Schafblutzusatz ausgestrichen (1 Platte für beide Häuftengemelke). Die beimpften Nährböden wurden für 24 Stunden bei 37 °C aerob inkubiert.

Die Befundung erfolgte nach 24 und 48 Stunden anhand der Kolonienmorphologie und des Hämolyseverhaltens. Kleine (bis zu 1 mm große) gräulich durchscheinende Kolonien mit fehlender Hämolyse oder Auftreten einer α -Hämolyse (unvollständige Hämolyse, grünlich verfärbte Hämolysezone) oder β -Hämolyse (vollständige Hämolyse durch Hämoglobinabbau) wurden als Streptokokken identifiziert. Die Diagnose wurde mittels Katalasetest verifiziert. Dazu wurden einige Kolonien auf einem Objektträger mit einem Tropfen Katalase-Reagenz (3 % H_2O_2) beträufelt und auf Blasenbildung beurteilt. Streptokokken sind im Gegensatz zu Mikrokokken Katalase-negativ und führen zu keiner Schaumbildung.

S. aureus bildet auf Columbiaagar mit 5 % Schafblut mittelgroße, cremefarbene bis gelbe Kolonien mit einem Durchmesser von 1 bis 3 mm. Es kommen verschiedene Hämolyseformen vor. α -Hämolysin ist verantwortlich für eine klare Zone vollständiger Hämolyse, wogegen β -Hämolysin eine deutlich abgesetzte unvollständige Hämolyse bewirkt.

KNS bilden ebenso mittelgroße, weißliche bis gelbe Kolonien mit meist fehlender oder variabler Hämolyse. Sie sind ebenso wie *S. aureus* Katalase-positiv, jedoch Koagulase-negativ und zeigen abhängig von der Spezies eine (meist) negative oder (seltener) positive Reaktion im Clumpingfaktor-Test.

Zur Bestätigung von *S. aureus* und zur Abgrenzung zwischen *S. aureus* und KNS wurden bei allen Staphylokokken der Nachweis des Clumping factors (Staphytect Test®, Oxoid) und der Koagulase-Röhrchentest Remel™, Coagulase Plasma (Thermo Scientific, Waltham USA) durchgeführt.

Bei Vorhandensein eines bakteriellen Erregers wurde ein Agardiffusionstest zur Empfindlichkeitsprüfung auf verschiedene antibiotische Wirkstoffe durchgeführt. Dafür wurde eine Einzelkolonie von einer Übernachtskultur abgenommen und in NaCl auf eine Trübungsdichte entsprechend McFarland 0,5 eingestellt. Mit Hilfe eines sterilen Tupfers wurde die Keimsuspension anschließend auf Müller Hinton Agar (Oxoid) gleichmäßig aufgebracht. Anschließend wurden kommerziell erhältliche Filterpapierplättchen mit definierter Antibiotikakonzentration aufgebracht. Die Hemmhofdurchmesser wurden nach 20-stündiger Inkubation abgelesen.

Alle Staphylokokken-Isolate wurden für die weitere Differenzierung kryokonserviert. Dazu wurde eine Kolonie einer Übernachtskultur abgenommen und in jeweils 2 ml Herz-Hirn-Boullion (Merck, Darmstadt) suspendiert und für 24 Stunden bei 38°C bebrütet. 1 ml dieser Keimsuspension wurden anschließend mit 200 μl Dimethylsulfoxid-Lösung (Sigma-Aldrich-

Chemie, Wien), bestehend aus 97,5 % Aqua Bidest. und 2,5 % Dimethylsulfoxid zur Kryoprotektion versetzt und bei -80°C konserviert.

3.3. Zellzahlmessung

Zur Beurteilung der Mastitisrelevanz wurde außerdem in allen Milchproben die somatische Zellzahl mittels De LAVAL Cellcounter® (DCC; DeLaval International AB, Tumba, Schweden) gemessen. Dazu wurde die Milch auf Zimmertemperatur gebracht, gut mittels Vortex gemischt und nach Vorschrift des Herstellers in eine Messkassette eingebracht. Diese enthält geringe Mengen an Propidiumiodid (PI) als fluoreszierenden Farbstoff. Ein Kolben befördert die Probe zu einem Zählfenster, das einer LED-Lichtquelle ausgesetzt ist. Zellkerne geben Fluoreszenzsignale ab, die in einem Bild aufgezeichnet werden, das zur Bestimmung der SCC in Milch ausgewertet wird. Die Messergebnisse können direkt am Gerät abgelesen werden.

3.4. MALDI-TOF MS

Für die Untersuchung mittels MALDI-TOF MS wurden die kryokonservierten Isolate auf Columbia Agar mit 5 % Schafblutzusatz rekultiviert. Für die massenspektrometrische Untersuchung wurde anschließend eine Übernacht-Reinkultur verwendet.

Die so vorbereiteten Isolate wurden mit dem Microflex LT Instrument (Bruker Daltonics), Flexcontrol 3.0 Software und mit der MALDI Biotyper 2.0 Datenbank untersucht.

Jede der Proben wurde im Duplikat untersucht. Zur Validierung der Methode wurde ein *E. coli*/DH5alpha Test Standard (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) verwendet, welcher ebenfalls zweimal aufgetragen und untersucht wurde.

Im ersten Durchgang wurde für die Beprobung die Direkte Transfermethode gewählt. Sie fungierte als Basismethode. Dazu wurde eine Einzelkolonie (bzw. Koloniematerial) direkt mittels einer 1 µl sterilen Einwegöse (VWR, Wien, Österreich) von der CBA-Platte abgenommen, auf die Targetplatte aufgebracht und an der Luft getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Kolonien mit je 1 µl Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic-Säure (Matrixlösung)

überschichtet. Daraufhin wurde die Targetplatte erneut bei Raumtemperatur getrocknet (MALDI Biotyper Operating Procedure, 2010).

Als zweites Verfahren wurde ein von Gosselin et al. 2018 beschriebenes Verfahren angewandt: Die wie oben beschrieben aufgetragenen Einzelkolonien wurden in einem weiteren Zwischenschritt mit 0,7 µL 70 %-iger Ameisensäure überschichtet und getrocknet, erst danach erfolgte die Überschichtung mit 1 µL der Matrixlösung (Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic-Säure).

Als dritte Methode kam die Extraktionsmethode mit Ameisensäure zur Anwendung. Dafür wurde eine Einzelkolonie in einem Eppendorf Tube in 300 µL destilliertem Wasser homogenisiert (Vortex-Mixer, 1 Minute). Nach Zugabe von 900 µL purem Ethanol und erneuter Homogenisierung wurde die Probe für zwei Minuten bei 1300 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und die Probe erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Das restliche Ethanol wurde dann mit einer Pipette abgehoben und das Pellet luftgetrocknet. Im Anschluss wurden 50 µL 70 %ige Ameisensäure zum Pellet gegeben und wieder eine Homogenisierung, dieses Mal mittels Pipette, herbeigeführt. Der Suspension wurden 50 µL Acetonitril hinzugegeben und erneut eine Homogenisierung mit der Pipette durchgeführt. Nach diesem Schritt wurden die Proben erneut zwei Minuten bei 1300 g zentrifugiert und 1 µL jeder Probe auf die Targetplatte aufgebracht. Auf die getrocknete Probensuspension wurde wieder 1 µL der Matrixlösung aufgebracht und diese erneut getrocknet. Danach wurde die Targetplatte zur Identifikation in das MALDI-TOF MS-Gerät eingelegt (MALDI Biotyper Operating Procedure, 2010).

Das erzielte Proteinprofil der untersuchten Proben wurde mit den Spektren der Proteinprofilen in der Bruker Daltonik-Referenzdatenbank (MBT Compass 1.4) abgeglichen. Die Validität der Ergebnisse wird über einen errechneten Zahlenwert (Score) ausgegeben, der die Übereinstimmung der ermittelten Spektren mit den hinterlegten Referenzspektren wiedergibt. Ein Score Value von >2,300 gibt dabei an, dass das Isolat mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf Speziesebene identifiziert werden konnte, ein Score Value von 2,000-2,299 gibt an, dass es wahrscheinlich auf Speziesebene und sicher auf Genusebene zuverlässig erkannt wurde. Score Values zwischen 1,700-1,999 beschreiben Isolate, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Genusebene erkannt wurden. Mit einem Score Value < 1,700 werden die beprobten Isolate weder auf Spezies- noch auf Genusebene erkannt.

3.5. Statistische Auswertung

Zunächst wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt und die Daten auf Vollständigkeit geprüft.

Für die Statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel 2010 und SPSS Statistics 24 herangezogen. Im ersten Schritt wurde die prozentuelle Verteilung BU negativer und BU positiver Proben errechnet. Anschließend wurde für die Differenzierung der Staphylokokken in erster Linie die Diskriminierung von Koagulase-negativen Staphylokokken und *S. aureus* herangezogen. Die grafische Darstellung erfolgte in Boxplots.

Für die Überprüfung der Validität der MALDI-TOF MS wurde eine Einteilung nach Score-Values herangezogen. Dabei wurden die in der Literatur angegebenen Grenzwerte zur Überprüfung der Validität herangezogen (Tomazi et al. 2014), wonach bei einem Scorewert von $> 1,999$ von einer zuverlässigen Speziesidentifizierung ausgegangen werden kann.

Auch die Zellzahl wurde in Bezug auf die einzelnen Spezies ermittelt und graphisch dargestellt. Diese Darstellung erfolgte auch logarithmiert, da die Zellzahlergebnisse keine Normalverteilung zeigten. Es wurden der Mittelwert, Medianwert sowie Standardabweichung und die prozentuale Verteilung der Zellzahl erhoben.

Eventuelle Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Spezies und der Zellzahl, sowie dem Auftreten bei Schaf und/oder Ziege sollten mittels Varianzanalyse erhoben werden.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung auf Herdenebene

Insgesamt wurden 1458 Hälftengemelke bakteriologisch untersucht. Davon waren 81 %, das entspricht einer Anzahl von 1181 Hälftengemelken, in der bakteriologischen Untersuchung negativ. In 16 % der Proben (231 Hälftengemelksproben) wurden KNS nachgewiesen. Davon waren 123 Hälftengemelksproben von Milchschaafen (Ostfriesische Milchschafe und Lacaune bzw. Kreuzungen) und 108 Hälftengemelksproben von Milchziegen (Weiße Deutsche Edelziegen bzw. Saanenziegen und Toggenburger Ziegen). Im Zuge der bakteriologischen Untersuchung wurden die KNS jedoch nicht weiter differenziert. Aus 20 Hälftengemelken (17 Ziegenmilchproben und 3 Schafmilchproben) wurde *S. aureus* isoliert.

In unter 1 % konnten ebenfalls *Streptococcus* spp. und sonstige Erreger (Coliforme, Enterokokken und Corynebakterien) identifiziert werden (Abb. 4).

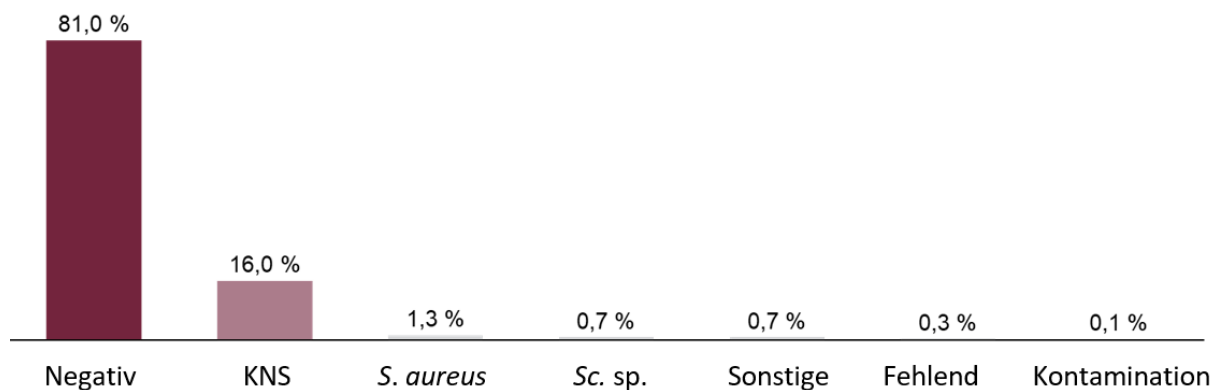


Abbildung 3: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung unter Berücksichtigung aller Hälftengemelksproben (n=1458)

4.2. Ergebnisse des MALDI-TOF-MS

In Tabelle 2 ist nochmals die Ausgangssituation für die Untersuchungen mittels MALDI-TOF MS dargestellt.

*Tabelle 2: Anzahl der Staphylokokkenisolate (KNS und *S. aureus*), die mittels MALDI-TOF MS untersucht wurden. Ausgangslage der bakteriologischen Untersuchung.*

	Gesamt	Schafe	Ziegen
Anzahl untersuchter Tiere/Hälften	729/1458	413/826	316/632
BU negative Euterhälften	1181	691	490
Kryokonservierte KNS Isolate	231	123	108
Kryokonservierte <i>S. aureus</i> Isolate	20	3	17

Für 25 Proben wurde in erster Linie die Direkttransfer-Methode gewählt. Davon konnten allerdings nur neun Isolate mit einem Score-Value > 1,999 erzielt werden. Erwähnenswert ist hierbei jedoch, dass fünf der neun identifizierten Proben *S. aureus*-Isolate waren.

Bei 120 Isolaten wurden die Einzelkolonien auf dem Träger mit jeweils 0,7 µl Ameisensäure überschichtet. Auch dabei konnte nur in 46 % der Proben ein aussagekräftiges Ergebnis mit einem Score-Value > 1,999 erzielt werden. Daher wurde abschließend die Ameisensäureextraktionsmethode für alle 261 Isolate durchgeführt.

Von den 261 kryokonservierten Isolaten aus der Routinediagnostik wurden 10 Isolate mittels MALDI-TOF MS mit einem Score-Value über 2,30 als *Corynebacterium* spp. identifiziert. Diese Isolate wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Von den verbleibenden 251 Staphylokokkenisolaten konnten 30 Isolate nicht auf Speziesebene differenziert werden (Score < 1,700). Insgesamt wurden 145 KNS Isolate (von 69 Ziegen und 76 Schafen) mit einem Score Wert von über 1,999 zuverlässig auf Spezieseben differenziert. Auch alle 20 *S. aureus* Isolate (17 von Ziegen, 3 von Schafen) wurden mit einem Score-Value von > 1,999 bestätigt. 55 Isolate wurden zwar auf Gattungsebene sicher bestätigt, mit einem Scorewert zwischen 1,999 und 1,700 ist die Identifizierung auf Speziesebene jedoch als nicht zuverlässig

zu bewerten. Ein weiteres Isolat, das in der MALDI-TOF MS mit zuverlässigem Score erkannt wurde, wurde aus den Untersuchungen ausgeschlossen, da es nur als *S. species* identifiziert wurde und keine nähere Zuordnung passierte.

Die prozentuelle Verteilung der Scores für Staphylokokken aus Schaf- und Ziegenmilch ist in Abbildung 4 dargestellt.

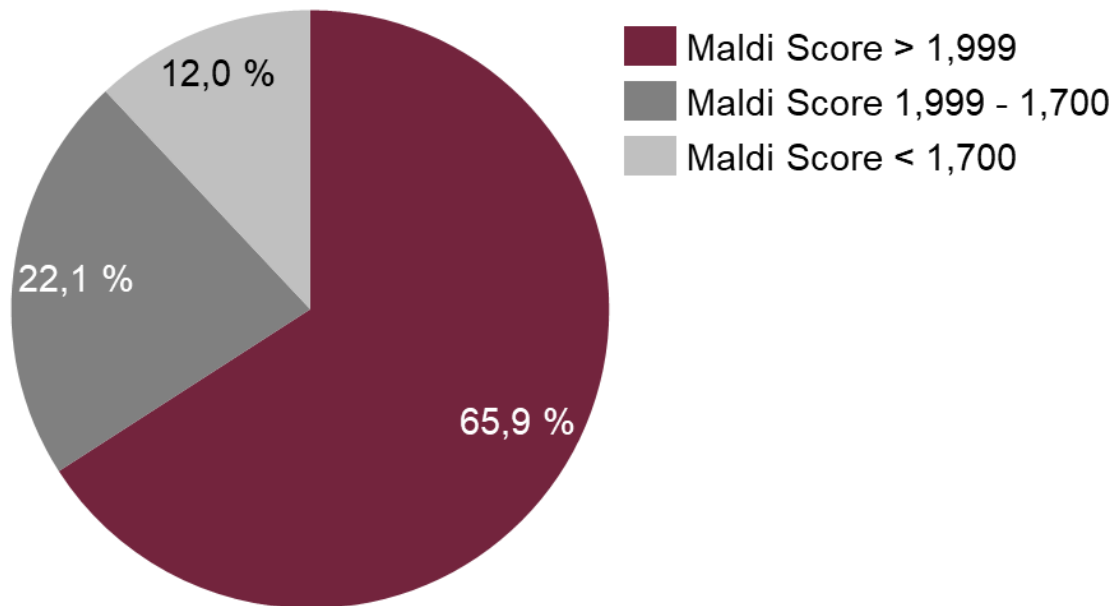


Abbildung 4: Verteilung der Score-Werte nach der Untersuchung von 261 Isolaten aus Schaf- und Ziegenmilch

In Abbildung 5 ist die Speziesverteilung auf Basis der Scores dargestellt. Daraus kann abgelesen werden, dass *S. aureus* zu 100 % auf Speziesebene erkannt werden konnte. Dasselbe gilt für *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. fleuretti*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. microti*, *S. simulans* und *S. succinus*. Allerdings ist die Anzahl der gefundenen Isolate aufgrund der Probandenanzahl und des breiten Spektrums teilweise gering.

S. xylosus, eine Staphylokokkenspezies, die sehr häufig isoliert werden konnte, weist wie in Abbildung 5 dargestellt sehr variable Scores auf, und konnte somit teilweise sehr gut auf Speziesebene identifiziert werden, teilweise waren die Scores allerdings zu niedrig für eine sichere Speziesidentifikation.

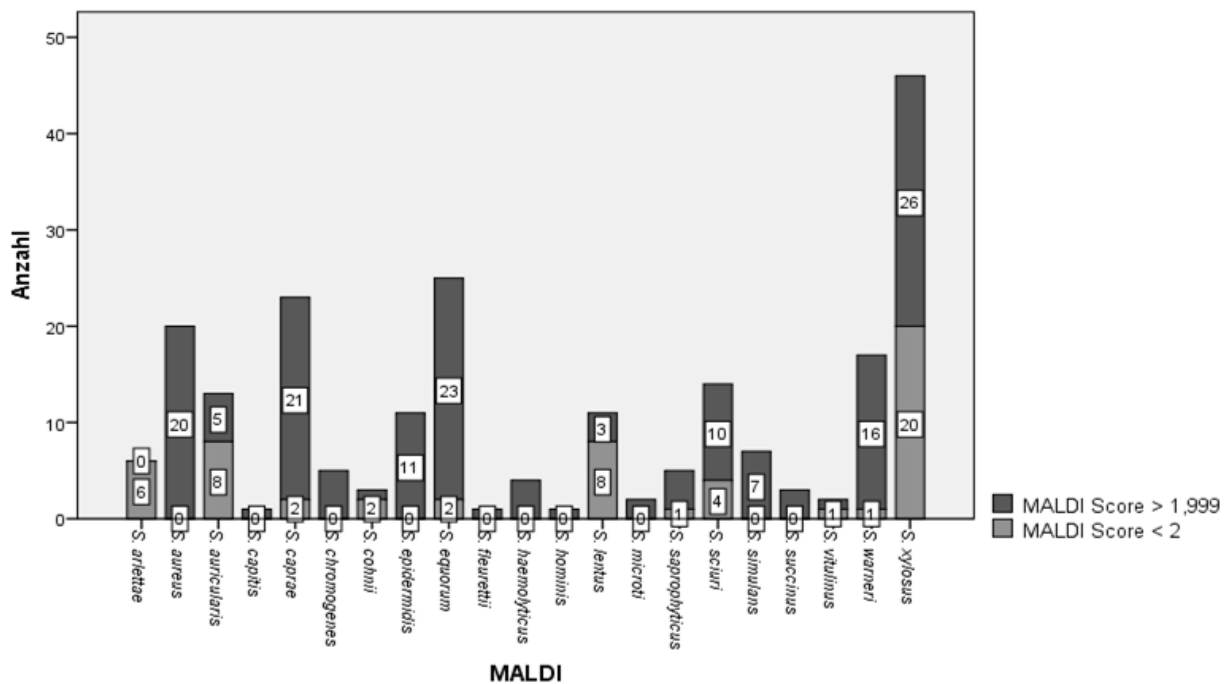


Abbildung 5: Speziesverteilung auf Basis des Score Values (n=220)

4.2.1. Speziesverteilung von Staphylokokken aus Schaf- und Ziegenmilch

In Abbildung 6 wird die Speziesverteilung für Schaf- und Ziegenmilch grafisch dargestellt. Dabei werden nur mehr jene Isolate berücksichtigt welche in der MALDI-TOF MS einen Score Value von > 1,999 erzielt haben und somit eine sichere Genusidentifikation und eine zuverlässige Speziesidentifikation aufweisen.

Während *S. warneri*, *S. vitulinus*, *S. succinus*, *S. hominis* und *S. fleuretti* ausschließlich aus Ziegenhälftengemelken identifiziert werden konnten, wurden *S. auricularis*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus* und *S. microti* nur in Schafhälftengemelken gefunden.

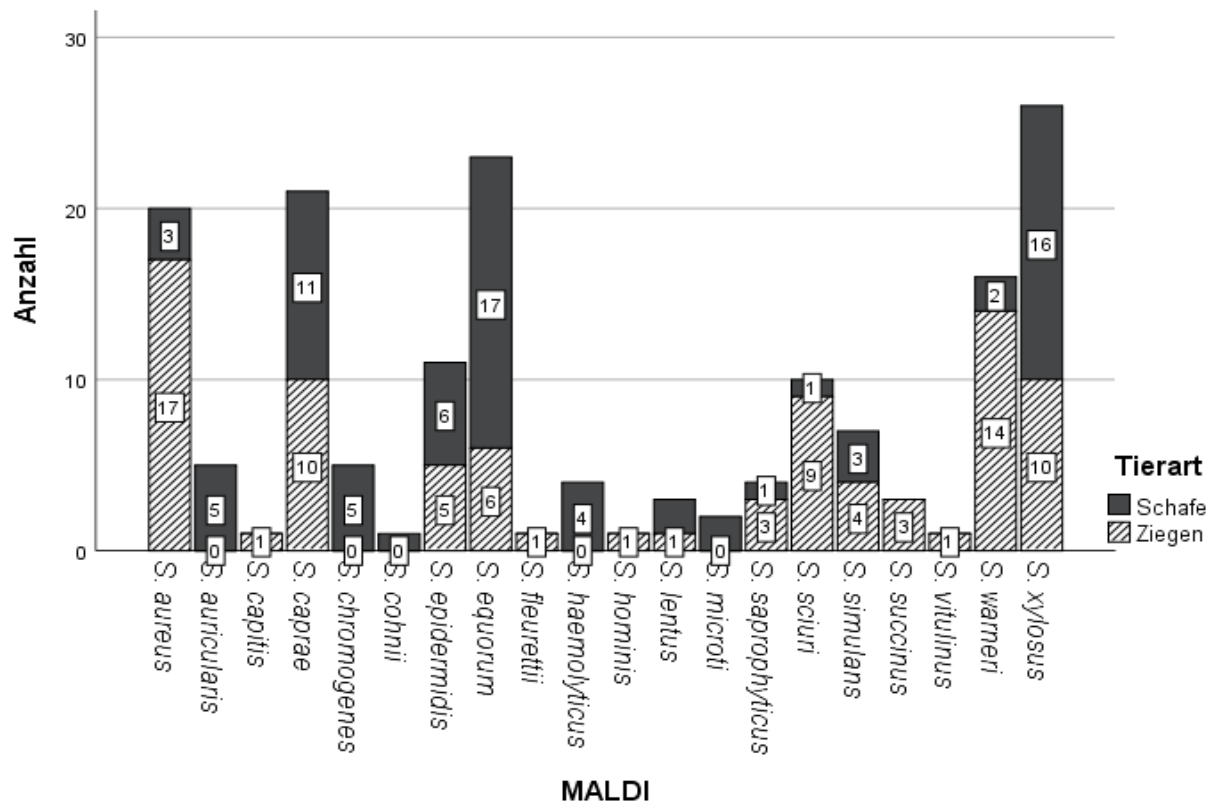


Abbildung 6: Speziesverteilung nach Tierart. Ergebnisse mit einem Score Value > 1,999 (n =165, 79 Schafe und 86 Ziegen)

Sowohl aus Schaf- wie auch aus Ziegenmilch wurde am häufigsten *S. xylosus* isoliert (siehe Abbildung 6). Auch mittels MALDI-TOF MS wurden die in der bakteriologischen Untersuchung gefundenen *S. aureus*-Isolate bestätigt. Diese wurden zum überwiegenden Teil (n=17) aus Ziegenmilchproben isoliert. Nur 3 *S. aureus* Isolate stammten aus Schafmilchproben.

4.2.2. Zusammenhang zwischen der Zellzahl in den Hälftengemelken und der Staphylokokkenspezies

Die Zellzahlen bei Schaf und Ziege zeigten keine Normalverteilung. Daher wurden die Zellzahlen logarithmiert (dekadischer Logarithmus). In der Tabelle 3 wird die Zellzahlverteilung bei BU negativen Proben bzw. bei Proben mit Nachweis von KNS und *S. aureus* dargestellt.

Tabelle 3: Median, Maximal- und Minimalwert sowie Mittelwert und Standardabweichung der somatischen Zellzahl in Milchproben BU negativer Euterhälften bzw. in S.aureus- und KNS-positiven Hälftengemelken

	BU negativ (n=1170)		KNS (n=222)		<i>S. aureus</i>	
	SCC/μl	SCClog10	SCC/μl	SCClog10	SCC/μl	SCClog10
Median SCC/μl	71	4,851	418	6,037	2950	7,990
Minimum/μl	2	3,30	10	2,300	10	2,30
Maximum/μl	5481	6,74	6424	8,770	5554	8,620
Mittelwert/μl	201	4,903	903	5,971	2767	7,421
Standardabweichung	428	0,546	1251	1,381	1676	1,556

Abbildung 7 zeigt anhand von Boxplots die Verteilung der Zellzahlen bei KNS und bei Nachweis von *S. aureus* im Vergleich zu den Zellzahlen in BU negativen Milchproben. Die parallel zur x-Achse eingezogene Linie entspricht einer Zellzahl von 250 Zellen pro μl, die als ein Richtwert für eutergesunde Tiere angenommen wurde. Die Unterschiede zwischen den Zellzahlen von KNS- und *S. aureus*-infizierten Tieren waren statistisch signifikant ($p < 0,001$, Mann-Whitney U-Test für nicht-normalverteilte unabhängige Stichproben).

In Abbildung 8 sind die Zellzahlen (logarithmiert) für die einzelnen Spezies als Boxplots dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt dabei eine Grenze von 250 Zellen/μL dar, die strichlierte Linie bedeutet die Grenze von 1.000 Zellen/μL. Auf eine getrennte Darstellung für Schaf und Ziege musste aufgrund der großen Variabilität der Spezies und damit geringen Anzahl an Tieren bei den einzelnen Spezies verzichtet werden.

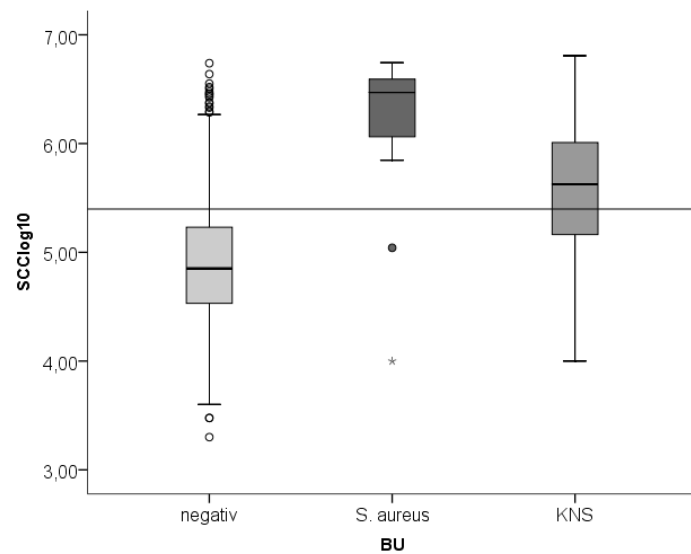


Abbildung 7: Zusammenhang zwischen Zellzahl in BU negativen Proben und in Milchproben mit Nachweis von KNS bzw. *S. aureus*. Die durchgezogene Linie stellt die Zellzahlgrenze von 250 Zellen pro μl dar

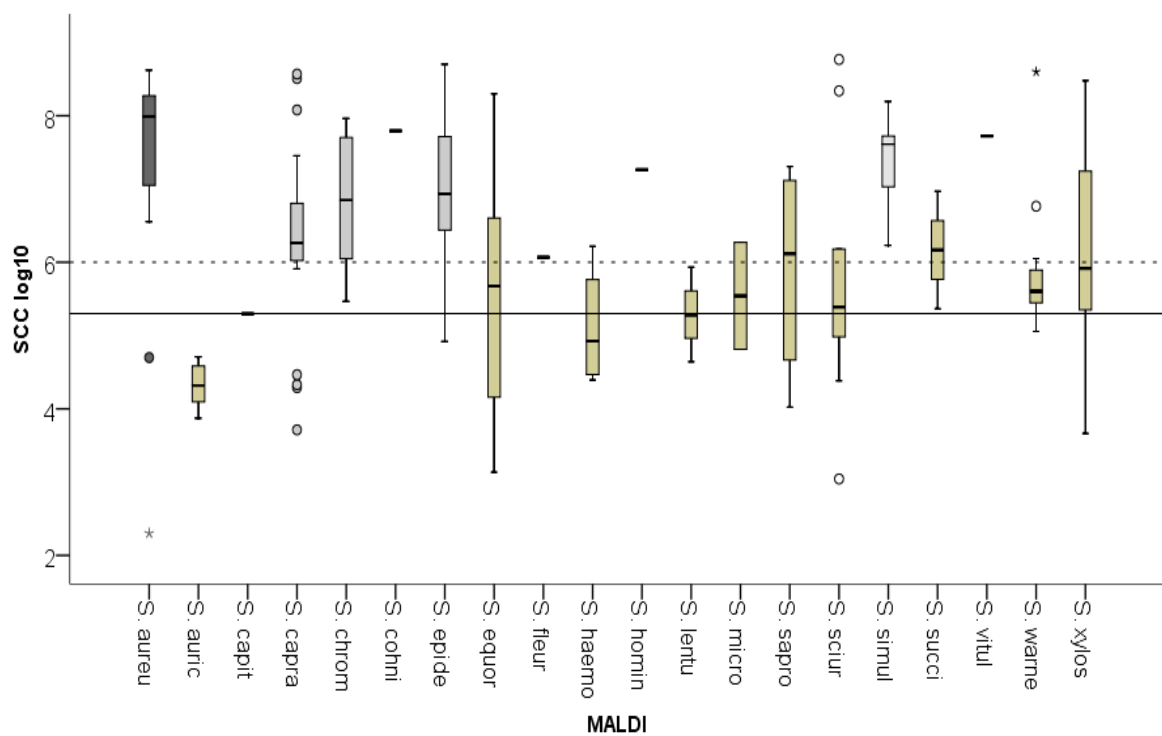


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Zellzahl und nachgewiesener Spezies in den 79 Schaf- und 86 Ziegenmilchproben mit zuverlässiger Identifizierung. *S. aureu*= *S. aureus*, *S. auric*= *S. auricularis*, *S. capit*= *S. capitis*, *S. capra*= *S. caprae*, *S. chrom*= *S. chromogenes*, *S. cohnii*= *S. cohnii*, *S. epide*= *S. epidermidis*, *S. equor*= *S. equorum*, *S. fleur*= *S. fleuretti*, *S. haemo*= *S. haemolyticus*, *S. homin*= *S. hominis*, *S. lentu*= *S. lentus*, *S. micro*= *S. microti*, *S. sapro*= *S. saprophyticus*, *S. sciur*= *S. sciuri*, *S. simul*= *S. simulans*, *S. succi*= *S. succinatus*, *S. vitul*= *S. vitulinus*, *S. warne*= *S. warneri*, *S. xylos*= *S. xylosus*

5. Diskussion

5.1. Validität der Ergebnisse der Staphylokokkendifferenzierung mittels MALDI-TOF MS

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden 261 präsumtive Staphylokokkenstämme aus Schaf- und Ziegenmilch mittels MALDI-TOF MS differenziert. 10 Isolate wurden in der Routinediagnostik fälschlicherweise als KNS identifiziert (aufgrund der positiven Katalasereaktion und der Kolonienmorphologie). Letztendlich wurden 250 Isolate in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Für die Bewertung der Validität der Ergebnisse wurde der systemintegrierte Zahlencode (Score) herangezogen. Für die Probenaufbereitung wurden alle 3 derzeit in der Literatur beschriebenen Verfahren angewandt. Im ersten Untersuchungsdurchlauf wurde die Direkttransfermethode angewendet. Diese ist die Basismethode für den MALDI Biotyper Workflow. Das dabei verwendete Material sind Einzelkolonien, welche auf einer Agarplatte angezüchtet und direkt auf die Analysenplatte übertragen wurden. Die Messung erfolgte nach Übersichtung mit Matrixlösung. Es wurden 25 Proben mit der Direkten Transfermethode untersucht, allerdings konnten hier nur neun Isolate mit einem zuverlässigen Score-Value > 1,999 erkannt werden.

Aus diesen neun identifizierten Proben waren fünf Isolate von *S. aureus*, was ein Hinweis darauf ist, dass sich *S. aureus* über die Direktausstrichmethode Methode gut identifizieren lässt. Laut Shafer et al. 2017 ist die Direktausstrichmethode zwar schnell und einfach, aber die Ergebnisse sind im Vergleich zur chemischen Extraktion manchmal inkonsistent. Wenn das System einen Stamm nicht genau identifizieren kann, kann dies auch auf nur ein einziges eindeutiges Profil des jeweiligen Stammes in der Datenbank zurückzuführen sein. Dieses reicht dann möglicherweise nicht aus, um die Vielfalt dieser Art darzustellen. Eine Erhöhung der Anzahl der repräsentativen Spektren für die zu detektierende Spezies dazu könnte dazu führen, dass die Biotyper-Software diese Spezies genauer identifizieren kann (Shafer et al. 2017).

Neben der Anzahl der Referenzspektren in der Datenbank, können viele andere Faktoren die Identifizierung durch die Massenspektrometrie beeinflussen, wie z.B. die Zellwandsteifigkeit, der Kulturzustand und das Alter der Bakterienkultur. Auch die Anzahl der auf der Zielplatte aufgetragenen Zellen beeinflussen die Identifizierung mit der direkten Ausstrichmethode. Zu

viele Bakterienzellen können die Lyse von Ameisensäure und Matrixlösung und damit die Darstellung der Zellspektren der Bakterienzellen stören (Shafer et al. 2017).

Von Mc Elvania TeKippe et al. 2012 wurde ein Versuch zur Optimierung der Identifikation von klinisch relevanten grampositiven Bakterien unter Verwendung von verschiedenen Direktausstrich-Protokollen durchgeführt. Von den Studienautoren wurden signifikant höhere Score-Werte erzielt, wenn nach dem Direktausstrich noch 1 µl Ameisensäure auf das Kolonienmaterial aufgebracht wurde.

Auch in unserem zweiten Versuchsteil wurde das Protokoll von Gosselin et al (2018) angewandt. Die erreichten Score-Values waren höher als bei der Direkten Transfermethode und es konnten deutlich mehr Isolate auf Speziesebene identifiziert werden. In einer Studie von Gorton et al. 2014 wurde ebenfalls dieses alternative Verfahren zur Ameisensäureextraktionsmethode angewandt. Dabei wurde versucht eine On-Plate Extraktion durchzuführen. Das beschreibt ein Verfahren, bei welchem die Extraktion mittels Ameisensäure direkt auf der Targetplatte durchgeführt wird. In der angegebenen Studie wurden allerdings Isolate von *Candida* spp. und nicht von Staphylokokken untersucht. Die Erfolgsrate der Identifizierung mittels der On-Plate Methode wurde mit 41,1 % für einen Score Value von > 1,999 ermittelt. Die Autoren zeigten allerdings auch, dass mit der Extraktionsmethode der Anteil von Isolaten, die mit einem Score > 1,999 identifiziert wurden von 41,1 % auf 83,7 % erhöhen. Auch in unserer Studie konnte bei Anwendung der Extraktionsmethode mit Ameisensäure eine deutlich größere Anzahl an Staphylokokken-Isolaten (75 %) mit einem zuverlässigen Score von > 1,999 ermittelt werden. Zusammenfassend beschreibt Abbildung 9 das von Gorton et al. 2014 empfohlene Differenzierungsschema, das auch unseren Erfahrungen entspricht.

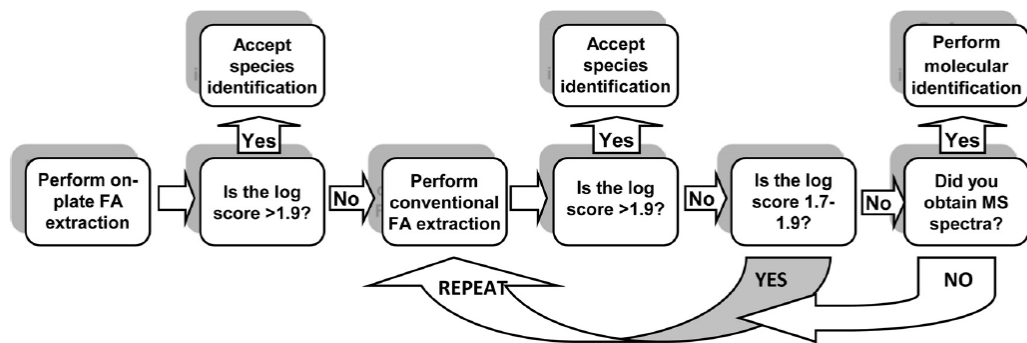


Abbildung 9: Arbeitsschema Gorton et al. 2014

Einen möglichen Erklärungsansatz dazu, dass nicht alle Staphylokokken-Spezies mit einem ausreichend hohen Score-Value erkannt werden können, lieferten auch Tomazi et al. 2014. Demnach könnte das Fehlen von Proteinprofilen von Staphylokokken Subspezies in der Datenbank der Identifizierungssoftware, ein Grund dafür sein, dass keine ausreichende Übereinstimmung der zu untersuchenden Proteinspektren gefunden wurden.

Cameron et al. 2017 konnten in einer Vergleichsstudie 64 % bovine Staphylokokkenstämme (n=258) unter Anwendung der Direkten Transfermethode, zuverlässig auf Speziesebene differenzieren. Basis für diese Untersuchung waren allerdings nur Isolate, deren Spezies zuvor mittels genotypischer Methoden sicher identifiziert worden waren. Wurde auch der Scorebereich zwischen 2,000 und 1,700 in der Berechnung berücksichtigt erhöhte sich der Prozentsatz der richtig identifizierten Isolate auf 92 %. Ein Vorgehen, das auch für die zuverlässige Identifizierung von Mykoplasmen empfohlen wurde (Spergser et al. 2019).

5.2. Verteilung der Erregerspektren

KNS gehören auch beim Rind zu den häufigsten Mastitisserregern (Suprè et al. 2011) und Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies hinsichtlich der Pathogenität werden beschrieben (Sampimon et al. 2011, Suprè et al. 2011, Vanderhaeghen, 2014).

Für den Rinderbereich wurden ebenfalls Versuche zur Isolation von KNS-Spezies aus aseptischen Milchproben durchgeführt. Die Ergebnisse, die daraus entnommen werden

können, unterscheiden sich nur teilweise von den Ergebnissen, die bei Schaf und Ziege gefunden werden. Wie in Tabelle 5 ersichtlich, wurden *S. chromogenes*, *S. epidermidis* und *S. simulans* in den 12 Untersuchungen die Vanderhaeghen et al. 2015 verglichen hat, durchwegs in sämtlichen Rinder-, sowie auch kleinen Wiederkäuerbeständen gefunden. Weiters ist aus dieser Studie ersichtlich, dass *S. caprae* sich, abgesehen von einer Untersuchung, nur in Beständen von kleinen Wiederkäuern findet. In der hier durchgeführten Studie ließ sich diese Spezies nur in Ziegenbetrieben isolieren. In einem zweiten Betrieb mit gemeinsamer Haltung sowohl von Milchschaafen als auch Milchziegen wurde *S. caprae* auch aus der Schafmilch isoliert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Spezies spezifisch für Ziegen ist, sich jedoch bei gemeinsamer Haltung von Ziegen mit anderen Tierarten auch auf diese überträgt.

Während sich im Vergleich von Vanderhaeghen et al. 2015 in den Rinderbetrieben *S. chromogenes* am Häufigsten vertreten fand, wurde diese Spezies bei kleinen Wiederkäuern zwar ebenfalls isoliert, allerdings weniger stark vertreten. Hier herrschten vor Allem *S. epidermidis* sowie *S. xylosus* vor.

Wald et al. 2017, untersuchten aseptische Rindermilchproben aus österreichischen Milchviehbetrieben und differenzierten 100 KNS-Isolate ebenfalls mittels MALDI-TOF MS. Dabei konnten Sie zu großen Teilen dieselben Spezies differenzieren, wie es in diesem Versuch gelang. Auch hier konnte am häufigsten *S. xylosus* identifiziert werden, was unserem Ergebnis entspricht. Die Ergebnisse der Untersuchung von Wald et al. 2019 wird in Abbildung 10 grafisch dargestellt.

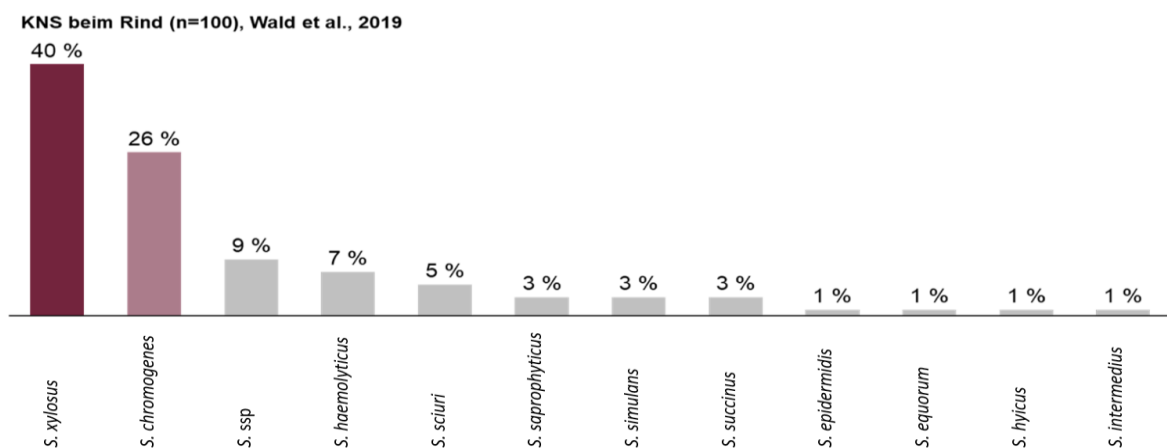


Abbildung 10: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung beim Rind von Wald et al. 2019

2011 wurden von Supré et al. mittels PCR KNS-Spezies aus Kuhmilchproben identifiziert. Die bei ihrem Versuch identifizierten Spezies unterscheiden sich jedoch von den KNS-Spezies, die in den aseptischen Milchproben beim kleinen Wiederkäuer gefunden wurden. Während Supré et al. am häufigsten *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. xylosus* und *S. simulans* identifizieren konnte- waren von diesen in unserer Untersuchung einzig *S. xylosus* mit einer hohen Anzahl vertreten.

Dabei verweist sie aber daraufhin, dass das Vorhandensein verschiedener Spezies durchaus herdenabhängig sei. Auch im hier durchgeführten Versuch zeigte sich, dass es durchaus innerhalb der einzelnen beprobten Herden gehäuft einen bestimmten Erreger gibt, welcher in höherer Anzahl vertreten ist als andere. Welcher Erreger das ist, ist allerdings in den einzelnen Herden sehr verschieden.

Eine weitere Untersuchung aus dem Rinderbereich wurde 2016 von Taponen et al. durchgeführt. Dabei konnten am häufigsten *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* und *S. warneri* isoliert werden. Die Unterschiede in der Speziesverteilung könnten auch hier wieder auf die Tierart sowie auf die geografische Lage der Untersuchung zurückgeführt werden. Auch ein herdenspezifischer Einfluss lässt sich in unseren Daten aufgrund der niedrigen Fallzahlen statistisch nicht bestätigen, die Speziesverteilung innerhalb und zwischen den Betrieben weist jedoch darauf hin.

Ebenso wurde eine Untersuchung zur Identifikation von Staphylokokkenspezies mittels MALDI-TOF MS bei Ziegen von Gosselin et al. 2018 durchgeführt. Die Spezies mit der höchsten Prävalenz war dabei *S. simulans*. In unserer Untersuchung konnten wir keine entsprechenden Ergebnisse bekommen. Aus Ziegenmilch wurde in diesem Versuch am häufigsten *S. aureus* isoliert. Ein Ergebnis, welches jedoch auch darauf zurückzuführen ist, dass es sich bei einem der beprobten Betriebe um einen *S. aureus*-Problembetrieb handelte. Generell ergaben sich in unserer Studie Hinweise, dass *S. aureus* in Ziegenbetrieben stärker vertreten war als, in Schafmilch produzierenden Betrieben. Aufgrund der geringen Prävalenz ließ sich diese Beobachtung jedoch nicht statistisch belegen. Gefolgt wurde dieser Erreger von *S. xylosus* und *S. caprae*. Dieses Ergebnis deckt sich mit jenem aus der Studie von Gosselin et al.: Auch sie fand mit der zweit- und dritthäufigsten Prävalenz *S. xylosus* und *S. caprae*. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wir ein sehr breites Spektrum an verschiedenen Spezies aus Schaf- und Ziegenmilch isoliert haben. Dadurch waren viele Spezies in so geringer Zahl vertreten, dass

es nicht möglich war, mittels Varianzanalyse Zusammenhänge zwischen Speziesverteilung und Tierart (Schaf/Ziege) sowie zwischen somatischer Zellzahl und KNS Spezies zu berechnen. Unsere Auswertungen (siehe Abbildung 6) weisen jedoch darauf hin, dass *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. simulans* und *S. caprae* mit hohen Zellzahlen assoziiert sind. Mit Ausnahme von *S. caprae*, der beim kl. Wiederkäuer eine besondere Rolle zu spielen scheint, handelt es sich dabei um jene Spezies, die auch beim Rind als besonders bedeutsam gelten.

Es zeigte sich jedoch auch, dass die Zellzahlen in der Milch *bei S. aureus* Infektion signifikant höher als bei KNS-Mastitiden waren. Dies unterstreicht nochmals die besondere Rolle von *S. aureus* im Mastitisgeschehen beim kl. Wiederkäuer.

5.3. Vergleich zwischen Speziesverteilung beim kl. Wiederkäuer und Speziesverteilung beim Rind

In einer Studie von Vanderhaeghen et al., 2015 wurden die Ergebnisse aus 12 verschiedenen Untersuchungen zur Differenzierung von KNS bei Rind, Ziege und Schaf verglichen. In Tabelle 4 werden die Herkunft der dort verwendeten Isolate, die Untersuchungsmethode sowie die Autoren aufgelistet. Tabelle stellt dann dementsprechend die Ergebnisse dar, sowie auch vergleichend die Ergebnisse dieser Studie.

Tabelle 4: Beschreibung der Herkunft der Studienergebnisse in Tabelle 5

<u>Herkunft der Isolate</u>	<u>Methode</u>	<u>Referenz</u>
Bovine		
1 QMS from six herds	16 rRNA + rpoB	Park et al., 2011
2 QMS taken each months from 10 randomly selected cows per herd in six herds	AFLP + rpoB	Piessens et al., 2011
3 WMS taken during 12 samplings within 17 months from 89 cows distributed over three herds	tDNA + rpoB	Supré et al., 2011
4 QMA from all lactating cows in five herds	sodA + PFGE	Mørk et al., 2012
5 Milk samples from acute CM	tuf	Persson Waller et al., 2011
6 Milk samples from SCM	tuf	Persson Waller et al., 2011
7 QMS of CM and SCM	rpoB	Sampimon et al., 2009b
8 Convenience sample of CNS isolates from the CBMRN (originally isolated from QMS from randomly selected cows with SCM)	rpoB	Fry et al., 2014
Caprine		
9 HMS from five herds (California, USA), early mid- and late lactation, and goats of different parity	tDNA	Koop et al., 2012a
10 HMS from five herds (The Netherlands), early, mid- and late lactation, and goats of different parity	tDNA	Koop et al., 2012a
11 HMS from all goats in 29 herds with a tank milk SCC $>5 \times 10^6$ /ml in the last three controls	groEL PCR-RFLP	Onni et al., 2012
Ovine		
12 HMS from all sheep in 15 flocks with a tank milk SCC $>5 \times 10^6$ /ml in the last three controls	gap and 16S rRNA PCR-RFLP + gap	Onni et al., 2010
13 Proben dieser Studie: HMS von 261 Euterhälften, Herkunft wird genauer in Material und Methoden beschrieben	tuf	

Tabelle 5: Vergleichende Auflistung verschiedener Studienergebnisse zur Speziesverteilung in Schaf-, Ziegen und Rindermilch (modifiziert nach Vanderhaeghen et al. 2015)

	Anzahl der Isolate	<i>S. caprae</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. xyloso</i>
1	263	3	190	-	2	-	16	1	8	-	-	9	7	-	24
2	134	-	41	4	16	2	37	5	-	-	4	1	15	3	-
3	179	-	83	20	1	1	11	-	1	-	-	3	17	-	28
4	244	-	76	3	34	-	37	7	-	-	-	-	63	23	-
5	56	-	16	-	4	-	8	-	6	-	-	-	14	-	2
6	98	-	21	-	30	-	14	-	1	-	7	-	13	-	4
7	172	-	63	5	23	10	9	1	9	-	2	3	9	13	15
8	877	-	417	26	34	5	71	3	8	-	5	8	166	9	92
9	115	7	23	6	38	1	-	-	-	-	-	-	23	-	9
10	343	15	119	1	69	-	6	-	-	15	-	-	54	3	44
11	142	19	45	-	53	1	1	-	-	-	-	-	8	4	4
12	226	30	34	-	131	2	10	-	-	-	-	6	4	-	5
13	261	21	5	1	11	23	4	1	-	-	4	10	7	16	26

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob die MALDI-TOF Massenspektrometrie eine zuverlässige und sensitive Differenzierung Mastitis-relevanter Staphylokokken-Spezies bei Schaf und Ziege erlaubt.

Dazu wurden von Oktober 2017 bis Oktober 2018 insgesamt 729 aseptisch entnommene Milchproben (1458 Hälftengemelke) aus 17 Schaf- und Ziegenbetrieben untersucht. 68 Milchproben von Kleinen Wiederkäuern wurden im gleichen Zeitraum zur Routinediagnostik im Labor der Klinik für Wiederkäuer (Schwerpunkt Mastitisiagnostik) untersucht und ebenfalls in die Studie einbezogen. Die bakteriologische Untersuchung erfolgte entsprechend den DVG Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. Insgesamt wurden 261 Isolate für die weiteren Untersuchungen kryokonserviert. Zur weiteren Charakterisierung der Isolate wurden ein Clumpingfaktor-Test und im Zweifelsfall auch ein Röhrchen-Koagulasetest durchgeführt. Zusätzlich wurde die somatische Zellzahl in allen Hälftengemelken mittels DC Cellcounter (De Laval) gemessen. Anschließend wurden alle Isolate für die weitere Untersuchung kryokonserviert. Für die Identifizierung der Staphylokokken wurden mittels MALDI-TOF MS drei Methoden verwendet: die Direkte Transfermethode, die Direkte Transfermethode mit Übersichtung mit Ameisensäure und die Extraktionsmethode mit Ameisensäure. Die Extraktionsmethode mit Ameisensäure erwies sich als die beste Methode zur Speziesidentifizierung von Staphylokokken Isolaten aus Milchproben von Schaf und Ziege.

Mittels MALDI-TOF MS wurden 10 Isolate als *Corynebacterium* sp. identifiziert und somit von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Von den verbliebenen 251 Isolaten konnten 30 nicht auf Speziesebene identifiziert werden. Die restlichen 221 Isolate konnten zu 65,9 % mit einem Score-Wert von > 1,999 und zu 22,1 % mit einem Score-Wert von 1,700-1,999 artdiagnostisch bestimmt werden. Am häufigsten konnten *S. xylosus*, *S. equorum* und *S. caprae* identifiziert werden.

Sowohl aus den Schaf- wie auch aus den Ziegenmilchproben wurde am häufigsten *S. xylosus* isoliert. In der weiteren Speziesverteilung variierten die beiden Tierarten. Auch mittels MALDI-TOF MS wurden die in der bakteriologischen Untersuchung gefundenen *S. aureus*-Isolate bestätigt.

7. Schlussfolgerung

MALDI-TOF MS ist geeignet, Staphylokokken auf Speziesebene zu differenzieren. Am geeignetsten erwies sich die Extraktionsmethode mit Ameisensäure für die Aufarbeitung der Bakterien. Hinsichtlich der Speziesidentifizierung scheint jedoch eine Erweiterung der Datenbank mit Referenzspektren notwendig, um eine zuverlässige Identifizierung von Isolaten der Schafe und Ziegen gewährleisten zu können. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten auch, dass sich, mit Ausnahme von *S. caprae*, die bei Schafen und Ziegen nachgewiesenen Spezies nicht wesentlich von jenen beim Rind unterscheiden. Aufgrund der Kontagiosität und Pathogenität nimmt *S. aureus* eine Sonderstellung innerhalb der Staphylokokkenspezies ein.

8. Extended Summary

In this project the mass spectrometric method MALDI-TOF was used to differentiate coagulase-negative staphylococci at species level.

Between October 2017 and October 2018, a total of 729 aseptic milk samples (1458 halves) from 17 sheep and goat farms were tested. 68 milk samples from small ruminants were examined during the same period for routine diagnostics in the laboratory of the clinic for ruminants (focus mastitis diagnostics) and also included in the study. The bacteriological examination was carried out in accordance with the DVG guidelines for the extraction of milk samples under antiseptic conditions and for the isolation and identification of mastitis pathogens. All staphylococci species growing in pure culture were cryopreserved independently of California Mastitis Test and cell number for further investigations. Additionally, a clumping factor test and, in case of doubt, a tube coagulase test were carried out to characterize the strains. The somatic cell count in all udder-halves was measured by DC Cellcounter (De Laval). Subsequently, all strains were cryopreserved for further evaluation /testing.

Using MALDI-TOF MS 10 strains were identified as *Corynebacteria*, which were excluded from further investigations. From 251 samples tested, 30 could not be identified at species level, while 221 of the isolates could. Those were 65,9 % with a score over 1,999 and 22,1 % with a score in the range from 1,700-1,999.

In both the sheep's and goat's milk *S. xylosus* was most commonly isolated. In the further species distribution, the two species varied. Also the MALDI-TOF MS confirmed the *S. aureus* isolates which were found in the bacteriological examination.

Basically, the MALDI-TOF MS is suitable for differentiation of staphylococci at species level.

To conclude, staphylococcal species isolated from ewes and goats are consistent with those found in aseptically collected milk samples from dairy cattle with exception of *S. caprae*. *S. caprae* is not regularly isolated from cow's milk but seems to be prevalent in small ruminants.

9. Abkürzungsverzeichnis

BU	Bakteriologische Untersuchung
CBA	Columbia Blutagar
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LDH	Laktatdehydrogenase
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry
NAS	Non-Aureus Staphylococci
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
<i>S. spp</i>	Staphylococcus spp.
ZZ	Zellzahl

10. Literaturverzeichnis

- Aitken S.L, Corl C.M, Sordillo L.M. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16(4):291-304.
- Baumgartner W. 2014. Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. 8. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke.
- Behrens H, Ganter M, Hiepe T. 2001. Lehrbuch der Schafkrankheiten. 4., vollständig neubearbeitete Auflage. Berlin, Wien: Parey.
- Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Bertholet X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res*, 34: 689-716.
- Boeringer Ingelheim GmbH. 2013. Diagnostik-Kompass Mastitis beim Rind. 1. Auflage. Schweiz.
- Bostedt H, Ganter M, Hiepe T. 2018. Klinik der Schaf- und Ziegenkrankheiten. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Cameron M, Barkema H.W, De Buck J, De Vliegher S, Chaffer M, Lewis J, Keefe G.P. 2017. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. *J Dairy Sci*, 100: 2137-2147.
- Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales J.C, Marco J.C, Paape M.J, Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Rum Res*, 68: 145-153.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis. 2009. Leitlinie Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. Zweite Aufl. Gießen: DVG. 33-54.
- Drancourt M, Raoult D. 2002. rpoB gene sequence-based identification of staphylococcus species. *J Clin Microbiol*, Apr. 2002: 1333-1338.
- Gonzalo C, Carriedo J.A, Blanco M.A, Beneitez E, Juárez M.T, De La Fuente L.F, San Primitivo F. 2005. Factors of variation influencing bulk tank somatic cell count in dairy sheep. *J Dairy Sci*, 88: 969-974.

- Gosselin V.B, Lovstad J, Dufour S, Adkins P.R.F, Middleton J.R. 2018. Use of maldi-tof to characterize staphylococcal intramammary infections in dairy goats. J Dairy Sci, Vol. 101 No. 7: 6262-6270.
- Gorton R.L, Seaton S, Ramnarain P, McHugh T.D, Kibbler C.C. 2014. Evaluation of a short, on-plate formic acid extraction method for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based identification of clinically relevant yeast isolates. J Clin Microbiol, Volume 52, Number 4: 1253-1255.
- Grüner Bericht 2018. 59. Auflage www.gruenerbericht.at (Zugriff 24.1.2018).
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review, Vet Q, 29: 18-31.
- Höller R. 2015. Risikobewertung von Zellzahlen in der Milch zur Unterstützung der Mastitisdiagnostik in Milchschaferherden [Dissertation]. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien.
- Hwang S.M, Kim M.S, Park K.U, Song J, Kim E-C. 2011. tuf gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol: 4142-4149.
- Ieven M, Verhoeven J, Pattyn S.R, Goossens H. 1995. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol: 1060-1063.
- Jimenez-Granado R, Sanchez-Rodriguez M, Arce C, Rodriguez-Esteyez V. 2014. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. Span J Agr Res 2014, 12(1): 133-150.
- Jonguk K, Jisoo H, Jeong-A L, Sunggi H, Eunjung R. 2018. Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. Arch Micr, Volume 200, Issue 1: 73-83.
- Kayser F.H, Böttger E.C, Deplazes P, Haller O, Roers A. 2014. Medizinische Mikrobiologie. 13., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme.
- Koop G, Nielen M, van Werven T. 2012. Diagnostic tools to monitor udder health in dairy goats. Vet Q. 2012, 32(1): 37-44.

- Koskinen M.T, Holopainen J, Salmikici L. 2008. Analytical detection limit of the pathoproof mastitis PCR assay using two different experimental approaches. Proceedings mastitis control. The Hague, The Netherlands: 183-189.
- Lam T.J.G.M, Olde Riekerink R.G.M, Sampimon O.C, Smith H. 2009. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. Ir Vet J Volume 62 Supplement: 34-39.
- Mackie D.P, Rodgers S.P. 1986. Mastitis and cell content in milk from Scottish blackface ewes. Vet Rec, 118: 20-22.
- McElvania TeKippe E, Shuey S, Winkler D.W, Butler M.A, Burnham C-A.D. 2013. Optimizing identification of clinically relevant gram-positive organisms by use of the Bruker biotyper matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. J Clin Microbiol, 51(5): 1421-1427.
- Moritz A. 2013. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Gießen: Schattauer.
- Pernthaner A, Deutz A, Schlerka G, Baumgarner W. 1991. Untersuchungen über den Zellgehalt in Schaf- und Ziegenmilch. Tierärztl Praxis, 19: 612-6.
- Persson Y, Olofsson I. 2011. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. Acta Vet Scand, 53: 15.
- Pyörälä S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet Res 2003 Sep-Oct, 34(5): 565-578.
- Sampimon O.C, Lam T.J.G.M, Mecius D.J, Schukken Y.H, Zadoks R.N. 2011. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. Vet Microbiol, 150: 173-179.
- Schaeren W, Maurer J. 2007. Eutergesundheit und Qualität von Ziegen- und Schafmilch in der Schweiz. Milchkonferenz, September, Wien, Österreich: 98-100.
- Schubert S, Wieser A. 2013. Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik. Biospektrum. Molekulare Diagnostik, 19 (7): 743–747.
- Schukken Y.H, Gonzáléz R.N, Tikofsky H.F, Schulte H.F, Santisteban G.C, Welcome F.L, Bennett G.J, Zurakowski M.J, Zadoks R.N. 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? Vet Microbiol, 134: 9-14.

- Shafer D, Liu H, Dong J, Liu W, Loft J, Phelps T, Zhang Y. 2017. Comparison of direct smear and chemical extraction methods for maldi-tof mass spectrometry identification of clinical relevant anaerobic bacteria. *Fron Lab Med*, 1(1): 27-30.
- Spergser J, Hess C, Loncaric I, Ramirez A.S. 2019. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry is a superior diagnostic tool for the identification and differentiation of mycoplasma isolated from animals. *J Clin Microbiol* doi: 10.1128/JCM.00316-19.
- Suprè K, Haesebrouck F, Zadoks R.N, Vaneechoutte M, Piepers S, De Vlieghe S. 2011. Some coagulase-negative staphylococcus species affect udder health more than others. *Am Dairy Sci Ass*, 94: 2329-2340.
- Szabados F, Tix H, Anders A, Kaase M, Gattermann S.G, Geis G. 2012. Evaluation of species-specific score cutoff values of routinely isolated clinically relevant bacteria using a direct smear preparation for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based bacterial identification. *Europ J Clin Micr & Inf Dis*, 31(6): 1109-1119.
- Taponen S, Björkroth J, Pyörälä S. 2008. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *J Dairy Res*, 75(4): 422-9.
- Thorberg B.-M, Danielsson-Tham M.L, Emanuelson U, Persson Waller K. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci*, 92: 4962-4970.
- Tomazi T, Goncalves J.L, Barreiro J.R, Aparecida de Campos Braga P, Prada e Siva L.F, Eberlin M.N, Veiga dos Santos M. 2014. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 52(5):1658-1663.
- Valentin-Weigand P. 2010. Grampositive Kokken. In Selbitz H.J. 2010. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 9., vollst. Überarb. Aufl. Stuttgart: Enke. 250-275.
- Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vlieghe S. 2015. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *Vet J* 203 (2015): 44-51.

- Vanderhaegen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. 2014. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative staphylococcus species associated with ruminant udder health. *J Dairy Sci* 97: 5275-5293.
- Waage S.T, Mork T, Roros A, Aasland D, Hunshamar A, Odegaard S.A. 1999. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J Dairy Sci* 82. 712-719.
- Wald R, Hess C, Urbantke V, Wittek T, Baumgartner M. 2019. Characterization of staphylococcus species isolated from bovine quarter milk samples. *Animals* 2019, 9, 200.
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. 2012. Maldi-tof ms in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93:965-974.
- Winter P, Fuchs K, Walshe K, Colditz I.G. 2003. Serum amyloid A in the serum and milk of ewes with mastitis induced experimentally with staphylococcus epidermidis. *Vet Res* 152, 558-562.
- Winter P. 2009. *Praktischer Leitfaden Mastitis; Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand*. Parey: Stuttgart.
- Winter P, Baumgartner W. 1999. Schalmtestreaktionen in Ziegenmilch und deren Interpretation. *Dtsch Tierärztl Wschr*; 106: 30-4.
- Zadoks R.N, Schukken Y.H. 2006. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet Clin NAFAP* 2, 229-261.
- Zecconi A. 2010. Staphylococcus aureus mastitis: What we need to know to control them. *Isr J Vet Med*, 65(3): 93-99.

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ätiologie der subklinischen intramammären Infektionen bei Schafen und Ziegen (BERGONIER et al. 2003).....	9
Abbildung 2: Prinzip der MALDI-TOF MS Bakterienidentifikation im schematischen Diagramm (Wieser et al. 2012, MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review)	13
Abbildung 3: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung unter Berücksichtigung aller Hälftengemelksproben (n=1458).....	20
Abbildung 4: Verteilung der Score-Werte nach der Untersuchung von 261 Isolaten aus Schaf- und Ziegenmilch	22
Abbildung 5: Speziesverteilung auf Basis des Score Values (n=220)	23
Abbildung 6: Speziesverteilung nach Tierart. Ergebnisse mit einem Score Value > 1,999 (n =165, 79 Schafe und 86 Ziegen)	24
Abbildung 7: Zusammenhang zwischen Zellzahl in BU negativen Proben und in Milchproben mit Nachweis von KNS bzw. <i>S. aureus</i> . Die durchgezogene Linie stellt die Zellzahlgrenze von 250 Zellen pro µl dar	26
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Zellzahl und nachgewiesener Spezies in den 79 Schaf- und 86 Ziegenmilchproben mit zuverlässiger Identifizierung. <i>S. aureu</i> = <i>S. aureus</i> , <i>S. auric</i> = <i>S. auricularis</i> , <i>S. capit</i> = <i>S. capitis</i> , <i>S. capra</i> = <i>S. caprae</i> , <i>S. chrom</i> = <i>S. chromogenes</i> , <i>S. cohn</i> = <i>S. cohnii</i> , <i>S. epide</i> = <i>S. epidermidis</i> , <i>S. equor</i> = <i>S. equorum</i> , <i>S. fleur</i> = <i>S. fleuretti</i> , <i>S. haemo</i> = <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. homin</i> = <i>S. hominis</i> , <i>S. lentu</i> = <i>S. lentus</i> , <i>S. micro</i> = <i>S. microti</i> , <i>S. sapro</i> = <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciur</i> = <i>S. sciuri</i> , <i>S. simul</i> = <i>S. simulans</i> , <i>S. succi</i> = <i>S. succinatus</i> , <i>S. vitul</i> = <i>S. vitulinus</i> , <i>S. warne</i> = <i>S. warneri</i> , <i>S. xylos</i> = <i>S. xylosus</i>	26
Abbildung 9: Arbeitsschema Gorton et al. 2014.....	29
Abbildung 10: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung beim Rind von Wald et al. 2019	30

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beurteilungsschlüssel CMT, modifiziert nach Baumgartner (2014).....	15
Tabelle 2: Anzahl der Staphylokokkenisolate (KNS und <i>S. aureus</i>), die mittels MALDI-TOF MS untersucht wurden. Ausgangslage der bakteriologischen Untersuchung.	21
Tabelle 3: Median, Maximal- und Minimalwert sowie Mittelwert und Standardabweichung der somatischen Zellzahl in Milchproben BU negativer Euterhälften bzw. in <i>S.aureus</i> - und KNS-positiven Hälftengemelken.....	25
Tabelle 4: Beschreibung der Herkunft der Studienergebnisse in Tabelle 5.....	33
Tabelle 5: Vergleichende Auflistung verschiedener Studienergebnisse zur Speziesverteilung in Schaf-, Ziegen und Rindermilch (modifiziert nach Vanderhaeghen et al. 2015)	34

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med.vet. Martina Baumgartner bedanken, die mich bei der Probenentnahme in den Betrieben, sowie bei der Aufarbeitung der Proben im Labor unterstützt hat. Danke auch dafür, dass Sie sich die Zeit nahm, meine Diplomarbeit Korrektur zu lesen.

Mein Dank geht auch an Frau Dr. vet.med. Claudia Hess Dipl. ECPVS und an Frau Dr. Merima Alispahic, BSC (Hons), die mir im Labor bei der Probenaufarbeitung mittels MALDI-TOF-MS helfend zur Seite standen. Außerdem bedanke ich mich noch bei Frau Delfina Jandreski-Cvetkovic für Ihre Hilfe.

Herrn Univ. Prof. Dr. med.vet. Thomas Wittek danke ich für die Überlassung des Themas und die fachliche Durchsicht dieser Arbeit.

Meine Familie und meine Freunde hatten in dieser sehr arbeitsreichen Zeit immer ein Ohr für mich und Worte der Unterstützung und Motivation für mich bereit. Dafür möchte ich Euch danken.