

Aus dem Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality,  
Safety and Innovation, FFoQSI GmbH, Tulln  
und dem  
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen der Veterinärmedizinischen  
Universität Wien, Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und  
Öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für  
Lebensmittelmikrobiologie  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dipl. ECVPH Martin Wagner)

**Ein qPCR basierter Nachweis von Mastitis-assoziierten Pathogenen in klinisch  
gesunden Tieren auf österreichischen Milchviehbetrieben mit niedriger oder hoher  
Tankmilch-Zellzahl**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von  
Madelaine Herz

Wien, 2021

**Betreuer:**

Mag. med. vet. Viktoria Neubauer, PhD

FFoQSI GmbH, Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation, Tulln

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches Gesundheitswesen, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen der Veterinärmedizinischen Universität Wien

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung .....	1
2	Literaturübersicht .....	3
2.1	Mastitis: Eine wirtschaftlich bedeutsame Krankheit .....	3
2.2	Mastitis als Faktorenkrankheit .....	3
2.2.1	Exogene, die Mastitis beeinflussende Faktoren .....	4
2.2.1.1	Sauberkeit der Tiere .....	4
2.2.1.2	Melkhygiene .....	4
2.2.1.3	Zitzendesinfektion nach der Melkung .....	5
2.2.1.4	Zwischendesinfektion des Melkzeugs .....	6
2.2.1.5	Melkvakuum .....	6
2.2.1.6	Zitzengummis .....	6
2.2.1.7	Reinigung und Desinfektion der Melkanlage .....	6
2.2.2	Umweltassoziierte und Kuhassoziierte Erreger .....	7
2.2.2.1	Mastitiserreger im Detail .....	8
2.2.2.2	$\beta$ -Laktamase-Gen der Staphylokokken .....	13
2.3	Diagnostik der Mastitis .....	15
2.3.1	California Mastitis Test .....	15
2.3.2	Zellzahl .....	15
2.3.2.1	Milchzellen .....	16
2.3.2.2	Einflussfaktoren auf den Zellgehalt in der Milch .....	16
2.3.2.3	Zellzahlen des Viertel- und Sammelgemelks .....	16
2.3.2.4	Zellzahlen der Tankmilch .....	17
2.3.3	Bakteriologische Untersuchung .....	18
2.3.4	Polymerase Ketten Reaktion .....	19
2.3.4.1	Quantitative Polymerase Kettenreaktion .....	19
2.3.5	Polymerase Kettenreaktion und Bakteriologie im Vergleich .....	20
3	Material und Methode .....	21
3.1	Probennahme .....	21
3.2	DNA Extraktion der Milchproben .....	22
3.3	Quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PathoProof Kit) .....	23
3.4	Auswertung qPCR Daten .....	25
3.5	Statistische Auswertung .....	25
3.6	Erhebung der Betriebsdaten .....	26

4	Ergebnisse .....	28
4.1	Zellzahlklassen .....	30
4.1.1	Zellzahlen der Zellzahlklassen .....	30
4.1.2	Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene in den Zellzahlklassen Hohe Zellzahl und Niedrige Zellzahl .....	31
4.2	Betrachtung der einzelnen Betriebe .....	33
4.2.1	Zellzahlen der Betriebe A-H .....	33
4.2.2	Anzahl der detektierten Mastitispathogene in den Betrieben A-H .....	34
4.2.3	Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene aus den Betrieben A-H .....	37
4.3	Zellzahlkategorien der Sammelgemelke .....	39
4.3.1	Zellzahlen in den Zellzahlkategorien der Sammelgemelke .....	39
4.3.2	Mastitispathogene der Zellzahlkategorien 1–5 der Sammelgemelke .....	40
4.3.3	Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene in den Zellzahlkategorien der Sammelgemelke .....	41
4.4	Zellzahlkategorien der Tankmilch .....	43
4.4.1	Zellzahlen in den Zellzahlkategorien der Tankmilch .....	43
4.4.2	Anteile der Mastitispathogene in den Zellzahlkategorien der Tankmilch .....	44
4.4.3	Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene in den Zellzahlkategorien der Tankmilch .....	45
4.5	Betrachtung der Zellzahl und der Mastitispathogene in den verschiedenen Jahreszeiten .....	46
4.5.1	Zellzahlen in den Jahreszeiten Frühjahr-Sommer-Winter .....	46
4.5.2	Verteilung der Mastitispathogene in den Jahreszeiten Frühjahr-Sommer-Winter .....	47
4.5.3	Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene im Verlauf der Jahreszeiten ..	48
4.6	Veränderungen der Zellzahl durch eine unterschiedliche Anzahl an Mastitispathogenen in einem Sammelgemelk .....	49
4.7	Korrelationen des Bacterial Cell Equivalent der detektierten Mastitispathogene mit der Zellzahl .....	50

4.8	Korrelation des Bacterial Cell Equivalent der detektierten Mastitispathogene mit der Zellzahl bei Vorliegen der Pathogene in Kombinationen .....	51
4.9	Vergleich der detektierten Pathogenkombinationen bezüglich der Zellzahl und des Bacterial Cell Equivalent .....	52
4.9.1	Unterschiede in der Zellzahl der Pathogenkombinationen .....	56
4.9.2	Unterschiede des Bacterial Cell Equivalent der Pathogenkombinationen .....	57
4.10	Korrelationsanalyse zwischen der Zellzahl und dem California Mastitis Test.....	60
4.11	Betriebsmanagement .....	61
5	Diskussion .....	63
5.1	Nachweismethode quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	63
5.2	Mastitispathogene in klinisch gesunden Tieren.....	65
5.3	Zellzahl .....	70
5.3.1	Zellzahlen negativer Sammelgemelke .....	70
5.3.2	Zellzahl bei Infektion mit Minor-Pathogenen .....	70
5.3.3	Zellzahlen der Zellzahlklassen .....	72
5.3.4	Zellzahlen der Zellzahlkategorien .....	73
5.4	Das Bacterial Cell Equivalent im Zusammenhang mit der Zellzahl.....	74
5.5	Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene im Zusammenhang mit der Kombination.....	76
5.6	Zellzahl und Mastitispathogennachweise auf den Betrieben A–H .....	77
5.7	Jahreszeitliche Veränderung der nachgewiesenen Mastitispathogene und der Zellzahl .....	80
5.8	Anzahl der Mastitispathogene in einer Sammelgemelksprobe .....	81
5.9	Der California Mastitis Test im Zusammenhang mit der tatsächlichen Sammelgemelkszellzahl.....	83
6	Zusammenfassung.....	84
7	Summary.....	85
8	Förderhinweis.....	86
9	Abkürzungsverzeichnis .....	87
10	Literaturverzeichnis .....	90
11	Abbildungsverzeichnis.....	99

12 Tabellenverzeichnis .....	100
------------------------------	-----

## **1 Einleitung und Fragestellung**

Mastitis ist die wirtschaftlich wichtigste Infektionskrankheit in der Milchviehhaltung (Koskinen et al. 2009). Sie ist, nach den Fruchtbarkeitsproblemen, die zweithäufigste (Stampa et al. 2006), bzw. in manchen Herden sogar die häufigste Abgangsursache (Schulz 2003). Es handelt sich um eine Entzündung der Milchdrüse, die mit physikalischen und chemischen Veränderungen der Milch einhergeht. Je nach Form der Erkrankung führt sie zu unterschiedlichen pathologischen Veränderungen im Eutergewebe. Die Trends in industrialisierten Ländern gehen zu größeren Herden auf einem Betrieb und höherer Milchleistung der einzelnen Kuh (Hamann 2005, Winter 2009). Um die Produktion effizient zu gestalten ist die Eutergesundheit, neben der Milchmenge und der sekretorischen Aktivität der Milchdrüse, ein wichtiger Faktor (Schukken et al. 2003, Hamann 2005, Kruif et al. 2013).

Es können verschiedene Verlaufsformen der Mastitis auftreten. Bei der latenten Mastitis ist die Zellzahl (ZZ) nicht erhöht, ein Euterpathogen kann aber trotzdem nachgewiesen werden. Betrachtet man das Erkrankungsbild der klinischen Mastitis, so ist diese durch offensichtliche klinische Symptome mit Erhöhung der ZZ und dem Nachweis von Euterpathogenen gekennzeichnet. Subklinische Mastitis führt zu einer Erhöhung der ZZ und geringerer Milchleistung, jedoch sind keine klinischen Veränderungen erkennbar (Hamann 2005, Winter 2009). Dies führt häufig zu einer erheblich späteren Diagnosestellung. Der Nachweis von Erregern mithilfe der bakteriologischen Untersuchung (BU) gelingt nur in zwei von drei Fällen. Die ZZ ist eine gute Möglichkeit subklinische Mastitiden rasch zu detektieren (Winter 2009). In der Milchindustrie wird dieser Wert auf der ganzen Welt als Indikator für die Eutergesundheit eingesetzt (Schukken et al. 2003).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden acht österreichische Milchviehbetriebe nach den Kriterien eines besonders hohen oder niedrigen Jahreszellzahldurchschnittes der gelieferten Tankmilch ausgewählt. Die Einteilung erfolgte dann in Betriebe mit hoher ZZ ( $> 200.000$  Zellen) und niedriger ZZ ( $\leq 200.000$  Zellen). Schließlich wurden Sammelgemelks- (SG, Milch aus allen vier Vierteln einer Kuh) und Tankmilch (TAM)-Proben auf allen Betrieben an fünf Probenahmezeitpunkten über eineinhalb Jahre genommen. Diese wurden mittels PathoProof qPCR (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf das Vorhandensein von Mastitispathogenen und das  $\beta$ -Laktamase-Gen untersucht und mit den aus den gleichen Proben gemessenen ZZ analysiert.

Um die ZZ zur Diagnose von subklinischer Mastitis besser nutzen zu können, werden in dieser Diplomarbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

Kann von der ZZ der SG auf subklinische Infektionen mit Mastitispathogenen im Einzeltier geschlossen werden?

Wie verändert sich die ZZ der SG im Zusammenhang mit einer Infektion spezifischer Pathogene?

Wie hoch ist die ZZ eines Euters ohne nachweisbaren Pathogenen?

Welche Pathogene werden in Betrieben mit hoher bzw. niedriger ZZ häufiger detektiert?

Wie wirkt sich die Höhe der Nachweismenge (bce, bacterial cell equivalent) eines Pathogens auf die ZZ der SG bzw. der TAM aus?

Wie ist der Einfluss der einzelnen Pathogene bei Mischinfektionen auf die ZZ, auch im Hinblick auf die Nachweismenge?

Wie wirkt sich die Jahreszeit auf Schwankungen in der ZZ und das Vorkommen von unterschiedlichen Pathogenen in den Herden aus?

Wie verändert sich die ZZ bei Vorkommen von mehreren Pathogenspezies in der SG-Probe?

Wie hoch ist die Korrelation der Ergebnisse des California Mastitis Test (CMT) mit der ZZ der SG-Probe?

Weiters wurden Daten zum Betriebsmanagement, der Haltung und der Melkhygiene kontinuierlich erhoben.



## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Mastitis: Eine wirtschaftlich bedeutsame Krankheit**

Mastitis führt zu Verlusten von 75–100 € pro Kuh und Jahr. Ziel wäre eine Minimierung der Mastitisrate und damit eine Senkung dieser Kosten auf 25 € pro Kuh und Jahr (Kruif et al. 2013). Der größte Anteil der durch einen Mastitisfall generierten Kosten wird, laut dem Ländlichen Fortbildungsinstitut (LFI 2004), durch die verringerte Milchmenge generiert. Zellzahlen zwischen 150.000/ml und 500.000/ml führen zu Minderleistungen von ca. 10–20 %. Liegen die Zellzahlen über einer Million, so kann es zu Milchmengenverlusten von bis zu 30 % kommen (Schulz 2003). Weiters kann die Milch von euterkranken Tieren mit hohem Zellgehalt, bzw. von Tieren, die unter Behandlung stehen, nicht an die Molkerei geliefert werden. Milchgeldabzüge kommen zustande, wenn die höchste Qualitätsklasse (Qualitätsstufe S) nicht erreicht wird (AMA 2019).

Die subklinische Mastitis ist jener Verlauf, der zum größten Einkommensverlust führt (Hamann 2005) und mit einer ständigen Ansteckungsgefahr für den Rest der Herde verbunden ist (Stampa et al. 2006, Winter 2009). Subklinische und chronische Mastitiden kommen sieben- bis zehnmal häufiger vor als akute Mastitiden, da es auch nach Behandlung akuter Mastitiden zu länger andauernden ZZ-Erhöhung oder einer chronischen Infektion kommen kann (Schulz 2003).

### **2.2 Mastitis als Faktorenkrankheit**

Der Entstehung der Mastitis liegen mehrere Faktoren zugrunde die dazu prädisponieren. Zu diesen Faktorenbereichen gehören das Tier, die Erreger und die Umwelt, die miteinander interagieren (Grunert et al. 1996, Schulz 2003, Stampa et al. 2006, Winter 2009, Kruif et al. 2013).

Zu den endogenen Faktoren, welche vom Tier ausgehen, zählen: Alter, genetische bzw. erbliche Faktoren, anatomische und funktionelle Mängel der Zitzen, Laktationsstadium, Fütterung und Stoffwechsel, Klauenpflagestatus und körpereigene Infektionsabwehr (Grunert et al. 1996, Schulz 2003).

Exogene Faktoren gehen von der Umgebung der Tiere aus. Dazu zählen der Stall, hygienische und technische Mängel bei der Melkarbeit, Melkmaschine, Mängel bei Fütterung und Management, schlechte Aufstallung, witterungsbedingte Einflüsse und nicht zuletzt die Sauberkeit der Kuh und des Euters (Grunert et al. 1996, Schulz 2003, Schukken et al. 2003,

Kuif et al. 2013). Gutes Management inkludiert die Evaluierung und Separation von chronisch kranken Tieren und die Evaluierung der Umgebung der Tiere (Schukken et al. 2003). Auch unsachgemäße Behandlung durch den Melker oder Tierarzt spielen eine Rolle.

Zu den erregerassoziierten Faktoren zählen die Keimzahl, d.h. der Infektionsdruck, und die Pathogenität (Grunert et al. 1996).

Durch die multifaktorielle Ätiologie sollte Mastitis als Herdenproblem behandelt werden (Grunert et al. 1996). Wichtig ist es, die Quellen der Infektionserreger, bei denen es sich auch meist um den Ort ihrer Vermehrung handelt, zu erkennen. Die Übertragung erfolgt über Stallstaub, Standflächen, Liegeflächen, Einstreu, Eutertücher, Wasch- und Spülwasser, Melkzeug und Melkmaschinen. Weitere belebte Vektoren wie Melkpersonal, Nachbarkühe, Kälber und Insekten dienen ebenfalls der Übertragung. Unsachgemäßes Melken und unpassende Aufstallung begünstigen eine schlechte Zitzenkondition und somit das Eindringen von Erregern (Schulz 2003).

## **2.2.1 Exogene, die Mastitis beeinflussende Faktoren**

Um vermehrtem Auftreten von Euterkrankheiten in der Herde auf den Grund gehen zu können muss auf Haltung und Fütterung der Tiere ein Augenmerk gelegt werden. Der Kuh-Komfort hat einen starken Einfluss auf Gesundheit und Leistung (Winter 2009). Eine saubere Umgebung der Tiere vermindert Reservoir für Umwelterreger (Kruif et al. 2013).

### **2.2.1.1 Sauberkeit der Tiere**

Ein Hygienescore zur Beurteilung der Sauberkeit der Tiere kann am Fressplatz bei Betrachtung von hinten durchgeführt werden. Score 1 beschreibt nur geringe Verschmutzung, während Tiere mit Score 4 hochgradig verschmutzt sind. Der Anteil an Score 3 und Score 4 Tieren sollte unter 15 % liegen (Winter 2009). Bei höherem Verschmutzungsgrad führen vor allem koliforme Keime, aber auch fäkale Streptokokken und *Streptococcus uberis*, häufiger zu Erkrankungen (Edmondson und Bramley 2004).

### **2.2.1.2 Melkhygiene**

Gute Melkhygieneprogramme sind notwendig, um die Ausbreitung und Vermehrung von Mastitispathogenen zu verringern (Winter 2009). Gefahren der Übertragung von Pathogenen gehen von den Melkerhänden, Eutertüchern und der Melkmaschine aus. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Euterinfektionen und der Anzahl der Bakterien auf der Zitzenhaut (Kruif et al. 2013). Das Vormelken in einen Vormelkbecher dient der

Begutachtung der Milch und verhindert zudem eine Verschleppung von Pathogenen mit den Klauen bei auf den Boden gemolkenen Milchstrahlen. Die Reinigung und Vorbereitung wird als Anrüstzeit bezeichnet und sichert weiter die vollständige Milchabgabe (Grunert et al. 1996, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Die Zitzen sollten so gereinigt werden, dass sie sauber und trocken sind. Dies führt sowohl zur Reduktion klinischer Mastitis als auch zur Verbesserung des Ausmelkgrades. Bei nur mäßiger Verschmutzung können Einmalpapiertücher, wiederverwendbare Euterlappen oder Holzwolle angewandt werden. Bei stärkerer Verschmutzung sollten schleuderfeuchte Tücher benutzt werden (Winter 2009). Einwegprodukte sollten vorrangig verwendet werden, da wiederverwendbare Tücher häufig bakteriell verunreinigt sind (Winter 2009, Kruif et al. 2013). Die Euterdusche ist nur bei sehr starker Verschmutzung anzuwenden. Danach muss das Euter komplett getrocknet werden (Grunert et al. 1996, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Die Hände sollten während der Melkzeit mehrmals abgespült und desinfiziert werden. Das Tragen von Latex-Handschuhen kann die Keimübertragung über den Melker reduzieren, allerdings nur, wenn auch diese zwischen den Kühen gereinigt und desinfiziert, bzw. gewechselt werden (Edmondson und Bramley 2004, Kruif et al. 2013).

### **2.2.1.3 Zitzendesinfektion nach der Melkung**

Nach der Melkung sollten die Zitzen desinfiziert werden (Grunert et al. 1996, Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Hierfür ist ein breites Wirkungsspektrum des Präparates vonnöten. Mikroorganismen auf der Hautoberfläche und im Strichkanal werden reduziert, die Haut gepflegt und der Strichkanal schützend geschlossen. Der pH-Wert des Präparats sollte zwischen sechs und sieben liegen. Zitzendesinfektion gilt als effektivste Präventionsmaßnahme gegen *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus agalactiae*, da vor allem kuhassoziierte Erreger nach der Melkung bekämpft werden. Zur Anwendung kommen Jod, Chlor, Chlorhexidin, quarternäre Ammoniumverbindungen, Dodecyl-Benzol-Sulfonsäure, Hydrogenperoxid, Fettsäure-Produkte, Milchsäure oder Pflanzenextrakte. Als Anwendungsmöglichkeiten gibt es Dippen oder Sprays (Winter 2009, Kruif et al. 2013), wobei mindestens 75 % der Zitzenoberfläche benetzt werden müssen (Winter 2009). Zitzendesinfektion nach der Melkung reduziert die Neuinfektionsrate (Kruif et al. 2013). Edmondson und Bramley (2004) führten die Zitzendesinfektion als wichtigsten Punkt eines Melkhygieneprogramms an. Die Dippbecher sollten optimalerweise nach jeder Melkung gereinigt werden (Kruif et al. 2013).

#### **2.2.1.4 Zwischendesinfektion des Melkzeugs**

Eine Zwischendesinfektion kann mit verschiedenen Systemen, wie z.B. einem Rückspülsystem, eintauchen der Zitzenbecher in Desinfektionslösung oder Sprühverfahren durchgeführt werden (Tröger 2003). Wichtig bei manuellen Systemen ist die korrekte Durchführung, da sie nur bei korrekter Einwirkzeit, nachspülen und abtropfen des Melkzeugs ihren Zweck erfüllt. Ist dies nicht gegeben, so kann es zur Entwicklung resistenter Keime kommen. Rückspülsysteme mit Wasser benötigen keine Desinfektionsmittel da sie aufgrund der Spülung zu einer Keimverdünnung führen (Kruif et al. 2013).

#### **2.2.1.5 Melkvakuum**

Da sowohl ein zu hohes als auch ein zu niedriges Melkvakuum für eine Mastitis prädisponieren, sollte während des Melkens die Möglichkeit bestehen, das Vakuum am Melkvakuummeter zu kontrollieren. Das Vakuum sollte während des Melkens nicht stärker als 2 kPa schwanken und bei 38–46 kPa bei tiefliegenden Leitungen, 45–50 kPa bei hochverlegten Leitungen, 44–46 kPa bei Eimermelkanlagen und 44–46 kPa bei Recorderanlagen liegen. Niedriges Vakuum ist zitzenschonend, führt jedoch zu verminderter Milchflussrate und lässt das Mastitisrisiko durch unvollständiges Ausmelken steigen (Winter 2009, Kruif et al. 2013). Bei zu hohem Vakuum sinkt die Melkdauer auf Kosten einer höheren Belastung der Zitzen, was zu Hyperkeratosen und Ansiedlung von Bakterien führen kann. Das Vakuum sollte um max. 1 kPa/Woche angepasst werden (Winter 2009). Es besteht ein Zusammenhang zwischen schlecht funktionierenden Melkmaschinen und hohen Tankmilchzellzahlen. Die Melkanlage sollte einmal jährlich gewartet werden (Kruif et al. 2013).

#### **2.2.1.6 Zitzengummis**

Zitzengummis sollten gut sitzen und weder klettern noch rutschen (Winter 2009). Nach längerer Anwendungsdauer geht die Elastizität verloren, was zu einer Reizung der Zitzenspitze und somit zu Hyperkeratosen führt. Dies führt mit der Zeit zu einem schlechten Ausmelkgrad. Der Wechsel der Zitzengummis muss nach einer gewissen Anzahl an Betriebsstunden, mindestens aber alle sechs Monate erfolgen. Zitzengummis aus Silikon weisen eine längere Haltbarkeit auf (Kruif et al. 2013).

#### **2.2.1.7 Reinigung und Desinfektion der Melkanlage**

Die Reinigung und Desinfektion der Melkanlage dient dem Erhalt der Rohmilchqualität. Zunächst erfolgt eine Vorspülung und anschließend eine Desinfektion der gesamten

milchleitenden Einheiten. Hierfür können aktives Chlor, Peressigsäure, Jod, quaternäre Ammoniumverbindungen, Salpetersäure und spezielle Tenside angewendet werden. Basische und saure Reinigungsmittel werden im Wechsel eingesetzt. Um eine adäquate chemische Wirkung erreichen zu können muss die richtige Einwirktemperatur erzielt werden. Diese liegt bei kombinierten Präparaten bei ca. 40 °C (Tröger 2003). Die Anfangstemperatur sollte bei über 70 °C liegen um gerade bei langen Rohrleitungen eine Rücklauftemperatur von 40 °C nicht zu unterschreiten (Kruif et al. 2013). Die mechanische Reinigung wird durch das Zustandekommen von Turbulenzen herbeigeführt (Tröger 2003).

### **2.2.2 Umweltassoziierte und Kuhassoziierte Erreger**

Die Einteilung der Erreger erfolgt in infektiöse, auch kuhassoziierte Erreger genannt, und umweltassoziierte Keime (Grunert et al. 1996, Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009, Kruif et al. 2013).

Infektiöse Erreger haben als Hauptreservoir die Milchdrüse, wodurch die Übertragung hauptsächlich bei der Melkung stattfindet (Grunert et al. 1996, Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Dabei spielen vor allem die Hände des Melkers, verspritzte Milch, Melken des Vorgemelks auf den Boden, Eutertücher, Zitzengummis und Kälber die nicht nur bei der eigenen Mutter saugen, bei der Übertragung eine Rolle (Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Zu dieser Gruppe zählen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, Mykoplasmen, *Streptococcus canis* und *Corynebacterium bovis* (Grunert et al. 1996, Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Die Zugehörigkeit von *Streptococcus dysgalactiae* wird je nach Literaturstelle unterschiedlich festgelegt. Grunert et al. (1996) und Edmondson und Bramley (2004) zählen *S. dysgalactiae* zu den infektiösen Keimen. Winter (2008) beschreibt eine Zugehörigkeit zu beiden Gruppen. Streptokokken und Staphylokokken führen aufgrund ihrer Übertragung über das Melkzeug auch häufig zu Infektionen mehrerer Viertel (Schulz 2003). Infektionen mit kuhassoziierten Erregern verlaufen häufig subklinisch. Ist die Prävalenz der Erkrankungen am Betrieb hoch, so kommt es in der Herde zur Erhöhung der TAM-ZZ über 200.000 Zellen/ml (Grunert et al. 1996, Edmondson und Bramley 2004). Infektiöse Erreger zeichnen sich durch eine hohe Prävalenz am Betrieb bei nur geringgradiger Variabilität der Stämme aus (Kruif et al. 2013). Um diese Keime zu beherrschen konzentrieren sich Kontrollprogramme auf Zitzendesinfektion, Therapie der Trockensteller und Merzung (Edmondson und Bramley 2004).

Umweltassoziierte Erreger, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus uberis*, *Bacillus* spp., *Enterobacter* und *Enterococcus* spp. kommen ubiquitär in der Umwelt vor und entwickeln ihre Pathogenität im Zusammenhang mit anderen zuvor genannten prädisponierenden Faktoren. Sie besitzen im Allgemeinen ein nur gering krankmachendes Potential, können aber bei einer Infektion schwer therapierbare, klinisch manifeste Mastitiden hervorrufen (Grunert et al. 1996, Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Die Ansteckung erfolgt meist in der Zwischenmelkzeit und Trockenstehzeit. Allerdings kann eine Übertragung auch während des Melkens, besonders bei Vorliegen melktechnischer Mängel und mangelnder Reinigung und Desinfektion, nicht ausgeschlossen werden. Umweltassoziierte Erreger können eine hohe Affinität zum Euter entwickeln, was z.B. bei *S. uberis* der Fall ist (Winter 2009). Dieser zeigt auch Eigenschaften eines infektiösen Erregers und führt auch häufig zu subklinischen Mastitiden (Edmondson und Bramley 2004, Kruif et al. 2013). Zitzendesinfektion nach der Melkung schützt nicht vor einer Infektion mit Umwelterregern. Zur Prävention ist ein gutes Umweltmanagement, die richtige Routine bei der Melkarbeit und eine korrekt eingestellte Melkmaschine wichtig. Eine Vakzine zur Prävention von *E. coli*-Mastitiden ist erhältlich (Edmondson und Bramley 2004).

Eine weitere Einteilung der Erreger kann in Major-Pathogene und Minor-Pathogene erfolgen. Dabei sind Major-Pathogene, wie *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, koliforme Keime und *S. uberis* virulenter und befähigt, stärkere Euterschäden zu verursachen als die Minor-Pathogene *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* (Reyher et al. 2012). Ein signifikanter Anstieg der ZZ ist meist mit einer Infektion mit Major-Pathogenen assoziiert (Djabri et al. 2002).

Der Infektionsweg der Mastitiserreger kann galaktogen ascendierend, traumatogen, lymphogen oder hämatogen deszendierend geschehen, wobei der galaktogene Infektionsweg der häufigste ist (Schulz 2003, Winter 2009).

#### **2.2.2.1 Mastitiserreger im Detail**

*Staphylococcus* spp.

Koagulase-negative Staphylokokken

Die Koagulase-negativen-Staphylokokken (KNS) gehören zur Gruppe der opportunistischen bzw. infektiösen Keime und umfassen mehr als 20 Spezies. In den letzten Jahren, seit der allgemeinen Senkung der Tankmilchzellzahlen, wurden diese Keime weitaus häufiger nachgewiesen (Edmondson und Bramley 2004, Kruif et al. 2013). Die KNS befinden sich auf

der gesunden Euterhaut, Haut und Schleimhaut sowie der Umgebung (Stampa et al. 2006, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Bedeutende Mastitiserreger sind die Spezies *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus chromogens*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius* und *Staphylococcus sciuri* (Edmondson und Bramley 2004, Stampa et al. 2006, Winter 2009). Bei Infektion kommt es zu einer geringen bis mäßigen Zellreaktion. Diese nur niedrige Erhöhung der ZZ kann zum Schutz vor Major-Pathogenen an der äußeren Strichkanalöffnung beitragen (Edmondson und Bramley 2004, Kruif et al. 2013). Die Mastitiden treten vorwiegend in den ersten 30 Tagen der Laktation auf. Bei Kalbinnen sind diese Keime oft bereits vor der Laktation aus Milchproben isolierbar (Winter 2009). Es handelt sich um die bei ihnen am häufigsten nachweisbaren Mastitiserreger. Die tatsächliche pathogene Bedeutung von KNS scheint noch nicht genau geklärt zu sein (Kruif et al. 2013). Das Allgemeinbefinden der Kuh ist meist ungestört, die Milch und das Euter unverändert. Kleine Flocken im Vorgemelk sind möglich (Stampa et al. 2006).

#### *Staphylococcus aureus*

Als kuhassoziiertes Erreger beschränkt sich sein Vorkommen auf verletzte oder geschädigte Zitzenhaut und das infizierte Euter (Winter 2009). Die Verbreitung erfolgt hauptsächlich durch den Strichkanal (Stampa et al. 2006, Winter 2009). Extramammäre Quellen spielen für die Infektion eine geringe Rolle (Edmondson und Bramley 2004). Dieser Keim wird als der wichtigste Mastitiserreger angesehen, vor allem durch sein hohes Potential subklinische Mastitiden zu verursachen (Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Mit der Zahl der Laktationen, sowie gegen Ende der Laktation, kann die Anzahl an infizierten Tieren in der Herde zunehmen (Stampa et al. 2006). Die kritischen Infektionsphasen sind die Trockenstehzeit und die Zeit nach der Abkalbung. Der Keim dringt aktiv in die Zitze ein und führt zu katarrhalischen, granulomatösen oder nekrotisierenden Mastitiden. Granulomatöse Mastitiden werden chronisch und damit nicht mehr therapierbar, nekrotisierende Mastitiden verlaufen durch eine Intoxikation meist tödlich (Winter 2009). Der häufigste Verlauf ist jedoch chronisch, bzw. subklinisch. Bei der akuten Form, bei der es sich meist um eine Mischinfektion handelt, wird wenig rötliches und flockiges Sekret ermilken. Bei der chronisch-katarrhalischen Form bleibt der Milchcharakter, teilweise mit Flocken im Vorgemelk, erhalten. Der Zellgehalt des erkrankten Viertels ist erhöht. Der Nachweis, bzw. die Eradikation von *S. aureus* gestaltet sich oftmals schwierig, da der Erreger in intraalveoläres Bindegewebe eindringen kann und sich somit vor körperlicher Abwehr schützt. Er hat die Fähigkeit in Abwehrzellen, wie

polymorphkernigen-neutrophilen Granulozyten (PMN) oder Makrophagen, aber auch in Epithelzellen zu persistieren (Stampa et al. 2006, Edmondson und Bramley 2004). Eine Manifestation der Infektion findet in der folgenden Laktation durch hohe Belastungen, wie z.B. Energiemangel und Fettmobilisation, statt (Stampa et al. 2006). Bei nicht-erfolgreicher Therapie kommt es in der drauffolgenden Laktation allerdings auch oft erst im zweiten oder dritten Laktationsmonat zu Erhöhungen der ZZ. Ein vorzeitiges Trockenstellen soll die Infektionsgefahr anderer Tiere verhindern. Gruppenbildung der *S. aureus*-positiven Tiere und damit Trennung von den Gesunden ist bis zu ihrem Abgang ein Muss (Kruif et al. 2013). Für die Eradikation von *S. aureus* müssen Melker und Melkanlage optimal arbeiten. Vor allem die Einhaltung der Hygienemaßnahmen spielt eine große Rolle (Edmondson und Bramley 2004, Stampa et al. 2006).

#### *Streptococcus* spp.

Unterschiedliche Spezies haben eine unterschiedliche Affinität zur Milchdrüse (Winter 2009).

#### *Streptococcus agalactiae*

Im Fall von *S. agalactiae* erfolgt die Verbreitung während der Melkung, sowie durch Verfütterung der Milch erkrankter Tiere an die weibliche Nachzucht (Grunert et al. 1996, Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Die Vermehrung erfolgt nur im Euter, außerhalb des Euters beträgt die Dauer der Ansteckungsfähigkeit nur etwa zwei bis drei Wochen, selten bis zu 100 Tage. Es handelt sich um eine Zoonose. Der Erreger ist hochkontagiös (Stampa et al. 2006). Erfolgt eine intramammäre Infektion mit *S. agalactiae* kann es zur Ausbildung des sogenannten Gelben Galts kommen. Hierbei ist der Verlauf langwierig und ist gekennzeichnet durch wechselnd akute Entzündungsschübe mit chronischen Mastitissymptomen, bis es zur Atrophie des Viertels kommt (Schulz 2003, Winter 2009). Meist allerdings verläuft die Infektion mit *S. agalactiae* nur subklinisch mit Erhöhung der Zellzahl. (Winter 2009). Die Diagnostik kann, vor allem bei subklinischem Verlauf, durch diskontinuierliche Erregerausscheidung erschwert sein. Das Allgemeinbefinden ist nicht gestört. Selten kann es zu Fieber kommen. Bei chronischen und subklinischen Verläufen gibt es oft kaum Veränderungen. Die Milchmenge sinkt, wobei der Milchcharakter erhalten bleibt und eine Beimengung von Flocken möglich ist. Die ZZ ist fast immer über 300.000 Zellen/ml und kann bis in den Millionenbereich gehen (Stampa et al. 2006). Das Infektionsniveau korreliert gut mit der individuellen ZZ der Kuh, daher sollten verdächtige Tiere regelmäßig untersucht werden (Edmondson und Bramley



2004, Stampa et al. 2006). Es sollte auf vermehrte Melkhygiene, Zitzendesinfektion und korrekte Therapie der Trockensteller geachtet werden (Edmondson und Bramley 2004).

#### *Streptococcus dysgalactiae*

*S. dysgalactiae* verursacht meist subklinische Mastitiden. Er zeigt Eigenschaften eines umwelt- und kuhassoziierten Erregers (Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Eine Übertragung findet während der Laktation häufig von Kuh zu Kuh statt, was durch Zitzendesinfektion weitestgehend verhindert werden kann. Häufiges Vorkommen von *S. dysgalactiae* in der Herde kann auf schlechte Hygiene oder Zitzenläsionen zurückgehen. Dabei sollte ein Augenmerk auf die Überprüfung der Melkmaschine gelegt werden. Der wichtigste Zeitraum für Infektionen ist jedoch die Trockenstehzeit (Edmondson und Bramley 2004). Die Überlebensdauer im Euter einer Kuh kann fünf bis 20 Monate betragen (Winter 2009). Bei der akuten katarrhalischen Form von *S. dysgalactiae*-Mastitiden kommt es zu flockigen Sekretveränderungen (Winter 2009, Kruif et al. 2013).

#### *Streptococcus uberis*

*S. uberis* wird als umweltassoziiertes Keim zwischen den Melkzeiten übertragen. Die Infektion erfolgt zu Beginn der Laktation oder in der Trockenstehzeit und verläuft subklinisch bis chronisch, oder als akute katarrhalische Mastitis mit Sekretveränderung (Winter 2009). Es handelt sich um die am häufigsten stattfindende Infektion in der Trockenstehzeit. Je länger diese andauert, desto höher ist die Empfänglichkeit des Euters für den Keim. Die Verbreitung ist am Tier und in der Umgebung, vor allem in der Einstreu. Daher können tief mit Stroh eingestreute Ställe für Trockensteher schnell zum Risikofaktor werden (Edmondson und Bramley 2004).

Bei der selten vorkommenden akuten Mastitis von *S. uberis* und *S. dysgalactiae* ist das Allgemeinverhalten ungestört. Meist kommt die chronische oder subklinische Form vor, die sich durch einen ZZ-Anstieg auf 400.000 Zellen/ml bis in den Millionenbereich äußert (Stampa et al. 2006).

#### *Escherichia coli*

*E. coli* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist am Tier und in der Umgebung ubiquitär auffindbar (Stampa et al. 2006, Winter 2009). Die Inzidenz der Erkrankungen ist bei im Stall gehaltenen Tieren höher, da vor allem in verschmutzten Stallungen die Keimbelastung hoch

ist. Dabei kann es zu einer raschen Vermehrung von *E. coli* im Mist kommen (Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Weiters spielt die mangelnde Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eine Rolle (Kruif et al. 2013). Der Infektionsweg ist galaktogen aufsteigend, hämatogen über andere infizierte Organe im Körper des Tieres oder auch lymphogen bei Auswanderung von *E. coli* aus dem Darm (Schulz 2003, Stampa et al. 2006, Winter 2009). Der akuten und perakuten *E. coli*-Mastitis liegt eine hochgradige Endotoxinproduktion, die zu Permeabilitätsstörungen führt, zugrunde. Dies führt zu einer Störung des Allgemeinbefindens und tritt vor allem ab der Trockenstehzeit bis einige Wochen nach der Geburt auf (Winter 2009, Stampa et al. 2006, Kruif et al. 2013). Die einzelnen Stämme unterscheiden sich in Virulenz, Pathogenität und Toxinbildung. Das Sekret ist wässrig und bräunlich und enthält Fibrin und Eiter. Auch bei Regeneration wird die frühere Milchmenge nicht mehr erreicht. Die bakteriologische Untersuchung kann durch eine schnelle Elimination des Erregers aus dem Euter auch negativ ausfallen. Durch die Freisetzung von bakteriellen Endotoxinen kann eine Infektion zu einem Toxinschock und zum Tod des Tieres führen (Stampa et al. 2006). Subklinische *E. coli*-Mastitiden sind seltener. Eine Übertragung von Kuh zu Kuh spielt keine Rolle. Zitzendesinfektion und Trockenstellerprophylaxe reduziert Infektionen nicht (Edmondson und Bramley 2004).

#### *Corynebacterium bovis*

Die Bedeutung von *C. bovis* als Mastitiserreger wird diskutiert. Er gilt als Besiedler des Strichkanals mit nur geringer Pathogenität (Winter 2009). Nach neuesten Erkenntnissen wird der Erreger als Verursacher subklinischer Mastitis mit Erhöhung der ZZ angesehen (Gonçalves et al. 2016). Bei Infektionen mit *C. bovis* am Beginn der Trockenstellperiode besteht ein höheres Risiko einer klinischen Mastitis. Ganz im Gegensatz dazu führt eine Infektion in der späten Trockenstellphase und am Beginn der Laktation zu einem geringeren Risiko einer klinischen Mastitis, was auf eine etwaige Schutzfunktion der Corynebakterien gegenüber hochinfektiösen Pathogenen schließen lässt (Green et al. 2002). Eine Besiedlung kann durch Zitzendesinfektion leicht verhindert werden (Edmondson und Bramley 2004).

#### *Enterococcus* spp.

Als Mastitiserreger von Bedeutung sind *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. Sie kommen als umweltassoziierte Keime in der Umgebung des Tieres und im Kot vor und können lange im Eutergewebe persistieren. Die Verbreitung erfolgt, wie für Umweltkeime üblich, zwischen den Melkzeiten. Die Erreger führen zu einer subklinischen Mastitis mit ZZ-Erhöhung

bis 500.000 Zellen/ml. Schlechte Hygiene im Betrieb kann zu einem Herdenproblem mit *Enterococcus* spp. führen. Die Therapie kann langwierig und schwierig sein (Winter 2009).

#### *Trueperella pyogenes*

*T. pyogenes* kommt in der Umgebung und auf den Tieren selbst vor. Der Erreger wird häufig bei Routineuntersuchungen oder durch den typischen Geruch festgestellt. Die Infektion erfolgt lymphogen, galaktogen, oder hämatogen durch Wunden oder Insektenstiche (Schulz 2003, Stampa et al. 2006). Die Krankheit tritt vor allem zwischen Juni und September auf (Weidesaison, Sommermastitis, Kalbinnenmastitis), weil Fliegen als Vektoren fungieren und kann plötzlich einen Großteil der Herde betreffen. Der perakute Verlauf führt zur Störung des Allgemeinbefindens mit Fieber. Häufig bilden sich Abszesse im Eutergewebe (Schulz 2003, Edmondson und Bramley 2004, Stampa et al. 2006). Unbehandelt sind Todesfälle möglich. Hämatogen kann sich der Erreger in Leber, Nieren und Herzklappen verbreiten. Das Sekret ist bei Jungrindern dickbreiig und gelb mit Blutbeimengungen und bei Kühen serös und trüb mit eitrigen Flocken. Das Viertel atrophiert. Subakute und chronische Erkrankungen, die ohne Symptome verlaufen, fallen erst nach der Kalbung durch das bzw. die nicht sezernierenden Viertel auf (Stampa et al. 2006).

#### **2.2.2.2 $\beta$ -Laktamase-Gen der Staphylokokken**

Nach der Erfindung des Penicillins stiegen die Resistenzproblematiken im Zusammenhang mit Staphylokokken, allen voran *S. aureus*, durch den steigenden Selektionsdruck, ausgelöst durch Antibiotikatherapie und spontanen Mutationen, rasch an (Lyon und Skurray 1987, Livermore 1995). Die wichtigste Ursache ist jedoch der Austausch extrachromosomaler Plasmid-DNA, die die genetische Information der Resistenz enthält (Lyon und Skurray 1987). Das Enzym  $\beta$ -Laktamase ist die häufigste Ursache für eine Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Zhang et al. 2001) und der häufigste Resistenzmechanismus der Staphylokokken (Persson Waller et al. 2011). Die Antibiotika werden durch Hydrolysisierung des  $\beta$ -Laktam-Rings zerstört. Die Produktion der Enzyme wird durch das  $\beta$ -Laktamase-Gen (blaZ-Gen) gesteuert. Die Regulation erfolgt über ein signaltransduzierendes integrales Membranprotein und einen Transkriptionsrepressor (Zhang et al. 2001). Das Repressormolekül wird vom blaI-Gen gesteuert. Dieses bindet an das blaZ-Gen um die Transkription zu hemmen (Lyon und Skurray 1987). Das blaR1 Gen fungiert als Transducer-Gen. Diese beiden Gene sind dem blaZ-Gen direkt vorgeschaltet (Zhang et al. 2001). Die Lokalisation des blaZ-Gens liegt entweder auf Plasmiden oder auf Chromosomen,

was jedoch keinen Unterschied in der Ausprägung der Mastitis, ob klinisch oder subklinisch, zu machen scheint (Bagcigil et al. 2012). Bei den  $\beta$ -Laktamasen handelt es sich um extrazelluläre Enzyme, die auch an der Zelloberfläche angeheftet sein können. Sie werden in die Typen A–D eingeteilt (Lyon und Skurray 1987, Livermore 1995). Die Enzymtypen unterscheiden sich gering in ihrer Hydrolysierungsrate und Aminosäureresten. Die Enzymproduktion wird erst durch Penicillin in großem Maße induziert, ausgenommen davon ist Typ D (Lyon und Skurray 1987).

Bei KNS hängt die Häufigkeit der Produktion von  $\beta$ -Laktamase von der Spezies ab. Persson Waller et al. (2011) detektierte mithilfe dieses Enzym vor allem bei *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* mit nahezu 40 %, während *S. simulans* und *S. chromogens* kaum  $\beta$ -Laktamase produzierten. Zu ähnlichen Ergebnisse kamen auch Sawant et al. (2009), mit einer  $\beta$ -Laktamaseproduktion bei 46 % der *S. epidermidis*, aber nur 18 % der *S. chromogens*. Benzylpenicilline werden durch  $\beta$ -Laktamasen mit hoher Effizienz hydrolysiert. Unter anderem zählen dazu Ampicillin oder Penicillin G, genauso wie Carboxypenicilline und Aminopenicilline. Semi-synthetische Penicilline wie Methicillin und Oxacillin sind großteils stabil (Lyon und Skurray 1987, Livermore 1995). Livermore (1995) beschreibt allerdings, dass es bei einer Hyperproduktion von  $\beta$ -Laktamasen zu einer Methicillin- und Isoxazolyresistenz kommen kann. Die klassische Methicillinresistenz wird hervorgerufen durch das Penicillin-Binding Protein 2a (PBP2a), welches am *mecA*-Gen codiert ist (Zhang et al. 2001). Zur Unterscheidung zur klassischen Methicillinresistenz kann die  $\beta$ -Laktamresistenz durch  $\beta$ -Laktamaseinhibitoren umgekehrt werden (Livermore 1995). Der dritte Resistenzmechanismus ist die Toleranz gegen die bakterizide Wirkung des Penicillins (Lyon und Skurray 1987).

Das *blaZ*-Gen scheint jedoch hauptverantwortlich für phänotypische Penicillinresistenz. In Untersuchungen trugen 94,6 % der penicillinresistenten *S. aureus* Isolate das *blaZ*-Gen, allerdings waren nicht alle phänotypisch resistenten Isolate auch genotypisch resistent. Daher sollte die Detektion des *blaZ*-Gens nicht als alleiniges Diagnostikum für Penicillinresistenz angewandt werden (Yang et al. 2015).

Um die Empfänglichkeit der Pathogene gegenüber Penicillinen festzustellen werden der Kirby-Bauer-Penicillin-Diffusionstest und der Nitrocefin-Test zur Detektion von  $\beta$ -Laktamase häufig durchgeführt, diese können allerdings keine zuverlässige Aussage über deren Produktion liefern. Eine Studie zeigte auf, dass 9,5 % der phänotypisch Penicillin-empfindlichen Staphylokokken das *blaZ*-Gen trugen, was auf eine niedrige Sensitivität der phänotypischen Methoden schließen lässt (El Feghaly et al. 2012). Im Vergleich mehrerer Nachweismethoden für  $\beta$ -Laktamase war die PCR die einzige

Nachweismethode die zu keinen falsch-negativen Ergebnissen führte und, neben der Nitrocefin-Broth Methode und Nitrocefin-Disks, die einzige die zu keinen falsch-positiven Ergebnissen führte. Der Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen mittels PCR ist gut geeignet, um andere Tests zu ergänzen oder zu ersetzen und gilt somit als der Gold Standard in der  $\beta$ -Laktamase Detektion (Pitkälä et al. 2007).

## **2.3 Diagnostik der Mastitis**

Um eine Störung der Eutergesundheit einer Kuh diagnostizieren zu können, sollte die Abklärung auf Einzeltierebene erfolgen. Um die Ursache der Erkrankung zu finden sollte jedoch auf Herdenebene untersucht werden (Winter 2009). Die grobsinnliche Untersuchung der Milch einer Kuh sollte vom Landwirt vor jeder Melkung mittels Vormelkbecher erfolgen. Dabei soll auf Änderung der Farbe, des Geruchs, der Viskosität, auf Beimengungen wie Flocken und erhöhten Wassergehalt geachtet werden (Schulz 2003, Winter 2009, Kruif et al. 2013).

### **2.3.1 California Mastitis Test**

Zur indirekten Beurteilung der ZZ im Stall eignet sich der CMT (Schulz 2003, Edmondson und Bramley 2004, Winter 2009). Dieser wird zur Verlaufskontrolle von Mastitiden, zur Detektion von subklinischen Mastitiden und zur Kontrolle der Melkmaschinenwirkung angewandt (Schulz 2003). Durch Zugabe von Alkylarylsulfonat im Verhältnis 1:1 wird DNA aus den Zellen in der Milch freigesetzt und bildet bei erhöhter Zellzahl Schlieren. Die Beurteilung des CMT erfolgt wie folgt: + = 100.000–700.000 Zellen, ++ = 500.000–1.000.000 Zellen, +++ = > 1.000.000 Zellen. Bei über 500.000 Zellen wird eine Gelbildung beobachtet (Winter 2009).

### **2.3.2 Zellzahl**

Zur Detektion subklinischer Mastitis muss die ZZ und ein Erregernachweis herangezogen werden, wobei der wiederholte ZZ-Nachweis wesentlich billiger und leichter durchführbar ist und somit vorrangig angewandt wird (Schukken et al. 2003, Edmondson und Bramley 2004). Es handelt sich um einen guten Wert zu Vorhersage von Euterinfektionen und ist eine wichtige Kennzahl der Eutergesundheit und Milchqualität (Schukken et al. 2003, Kruif et al. 2013). Um Diagnosen stellen zu können ist ein einzelner Wert nicht aussagekräftig, auch das

Laktationsstadium und die Milchleistung der Kuh muss berücksichtigt werden (Edmondson und Bramley 2004).

#### **2.3.2.1 Milchzellen**

Bei den Zellen in der Milch handelt es sich um somatische Zellen, mit dem Hauptanteil an Immunzellen und ca. 2 % Epithelzellen (Stampa et al. 2006, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Die Anteile der Leukozyten betragen etwa 60 % Makrophagen, 25 % Lymphocyten und 15 % Neutrophile Granulocyten (Stampa et al. 2006). Epithelzellen werden während des physiologischen Erneuerungsvorganges abgestoßen, während Leukozyten aus dem Blut ins Euter eingeschleust werden (LFI 2004).

#### **2.3.2.2 Einflussfaktoren auf den Zellgehalt in der Milch**

Neben einer Infektion mit den oben beschriebenen Erregern, können noch weitere Ursachen einer erhöhten ZZ zugrunde liegen (Dohoo und Meek 1982, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Auch physiologische Einflussgrößen führen zur Veränderung der ZZ. Dazu zählen das Laktationsstadium, Alter, Herdengröße, Milchleistung und Rasse (Stampa et al. 2006, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Der wichtigste nicht-infektiöse Faktor ist das steigende Lebensalter. Dieser Anstieg der ZZ führt zu zunehmender Gefahr der Entwicklung einer Mastitis. Rasseunterschiede sind entweder genetisch bedingt oder auf unterschiedliche anatomische Eigenschaften des Euters oder der Zitze zurückzuführen (Kruif et al. 2013).

Weiters kann für eine Erhöhung der ZZ in allen vier Vierteln Stress oder Nervosität ursächlich sein, wie z.B. Schmerzen, große Hitzeeinwirkung im Hochsommer und Brunst. Zu kurze oder zu lange Melkintervalle können zu einem Anstieg der ZZ führen, sowie häufigeres Melken an einem Tag und Fehler in der Melktechnik. Minderwertiges Futter und Futterumstellung haben einen negativen Einfluss auf die Milchqualität (LFI 2004, Winter 2009, Kruif et al. 2013).

Durch eine Infektion kommt es zu einem Anstieg des Anteils an Leukozyten auf bis zu 99 % in der Milch (Schukken et al. 2003). Die ZZ kann bis in den Millionenbereich steigen (Kruif et al. 2013). Bei chronischer und subklinischer Mastitis kommt es zu persistierender Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten (Boutet et al. 2005).

#### **2.3.2.3 Zellzahlen des Viertel- und Sammelgemelks**

Die Ermittlung der ZZ erfolgt durch den Landeskontrollverband (LKV) im Zuge der neun- bis elfmal pro Jahr durchgeführten Leistungsprüfung, bei der neben der ZZ auch die Milchmenge, der Fett- und Eiweißgehalt, sowie der Harnstoff- und Laktosegehalt erhoben werden (LKV

2020). Die Messung erfolgt im SG (Schukken et al. 2003). Der physiologische Zellgehalt des Sammelgemelks einer Kuh reicht bis 150.000 Zellen/ml (Winter 2009). Hamann (2005) und Stampa et al. (2006) nennen einen Schwellenwert von 100.000 Zellen/ml, das LFI (2004) von 125.000 Zellen/ml.

Um von erhöhter ZZ auf eine Infektion schließen zu können eignet sich am besten die ZZ des Viertelgemelks. Wissenschaftlichen Studien aus Europa und Nordamerika zufolge liegt die mittlere ZZ von nicht-infizierten Eutervierteln bei rund 70.000 Zellen/ml (Schukken et al. 2003), Edmondson und Bramley (2004) nennen einen Wert von < 50.000 Zellen/ml für ein gesundes Euterviertel. In der ersten Laktation nennen Kruif et al. (2013) einen noch niedrigeren Wert von 10.000–30.000 Zellen/ml Viertelgemelksprobe bei nicht-infizierten Tieren. Jedoch liegt auch bei Viertelgelksproben die gesetzte Grenze zwischen gesund und krank bei 100.000–150.000 Zellen/ml (LFI 2004, Winter 2009, Kruif et al. 2013). Ein Zellzahlanstieg auf > 200.000 Zellen/ml deutet meist auf eine Infektion (Dohoo und Meek 1982, Kruif et al. 2013). Trotzdem kann eine Euterinfektion auch bei niedrigen ZZ nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (Dohoo und Meek 1982, Schukken et al. 2003, Edmondson und Bramley 2004). Einige Pathogene führen nur zu einem Anstieg auf rund 50.000 Zellen/ml (Dohoo und Meek 1982). Mastitis verändert die Zusammensetzung aller Milchinhaltsstoffe ab einem Überschreiten von 100.000 Zellen/ml, was diesen Grenzwert plausibel erscheinen lässt (Hamann 2005).

Bei Verwendung der ZZ zur Detektion subklinischer Mastitis sollten die individuellen Schwankungen bei Erkrankung verschiedener Kühe nicht außer Acht gelassen werden (Edmondson und Bramley 2004). Bei sprunghaft steigenden ZZ im laufenden Monat, ohne Auftreten von klinischer Mastitis, sollte die Melkanlage und Melkhygiene überprüft werden (Stampa et al. 2006, Kruif et al. 2013).

#### **2.3.2.4 Zellzahlen der Tankmilch**

Die Tankmilchzellzahl (TAM-ZZ) gilt als Qualitätsparameter der Liefermilch (Hamann 2005, Kruif et al. 2013). Durch Mastitiskontrollprogramme konnte bereits in vielen Ländern die ZZ der TAM gesenkt werden (Schukken et al. 2003, Winter 2009).

Die Einstufung der Tankmilch nach Qualitätsmerkmalen erfolgt wie folgt:

Bewertungsstufe S: bis 250.000 Zellen/ml (bei manchen Molkereien bis 200.000 Zellen/ml)

Bewertungsstufe I: bis 400.000 Zellen/ml

Bewertungsstufe II: > 400.000 Zellen/ml

(Erzeuger-Rahmenbedingungen-Verordnung 2021)

Als Basis für die Berechnung der TAM-ZZ für die Ermittlung der Bewertungsstufen gilt das geometrische Mittel der ZZ des Abrechnungsmonats, sowie von zwei davorliegenden Monaten. Milch der Bewertungsstufe S muss eine  $ZZ \leq 250.000/\text{ml}$  aufweisen, weiters darf die Keimzahl  $50.000/\text{ml}$  nicht überschreiten. Abzüge des Milchgeldes des jeweiligen Monats können erfolgen, wenn die Milch nicht mindestens der Bewertungsstufe 1 entspricht. (Erzeuger-Rahmenbedingungen-Verordnung 2021). Wenn die Milch innerhalb von drei Monaten nach der Überschreitung den gesetzlichen Normen von  $< 400.000$  Zellen/ml nicht entspricht, so gilt diese als nicht lieferbar und ist, laut Gesetz in Europa, nicht mehr für den menschlichen Verzehr bestimmt (Schukken et al. 2003, Winter 2009).

Wenn ausnahmslos alle Tiere in den Tank gemolken werden kann die TAM-ZZ einen Rückschluss auf die Eutergesundheit der gesamten Herde geben (Winter 2009, Kruif et al. 2013). Dabei muss beachtet werden, dass durch die Verdünnung der Milch, die vor allem bei großen Betrieben auftritt, die TAM-ZZ weniger aussagekräftig ist. Kleine Betriebe zeigen stärkere Schwankungen der TAM-ZZ. Allerdings lässt eine niedrige TAM-ZZ auf eine niedrige Rate an subklinischen Mastitiden schließen (Kruif et al. 2013). Im Umkehrschluss deutet sie bei längerfristiger Erhöhung auf eine hohe Prävalenz an subklinischen Mastitisfällen hin (Edmondson und Bramley 2004, Kruif et al. 2013). Ist die ZZ in der TAM über  $300.000/\text{ml}$  erhöht, kann von einer schlechten Eutergesundheit der Herde ausgegangen werden (Grunert et al. 1996). Der eutergesunde Betrieb liegt bei  $< 150.000$  Zellen/ml in der Tankmilch (Winter 2009). Weiters sollten weniger als 10 % der Tiere in der Herde eine ZZ des SG  $> 250.000$  Zellen/ml aufweisen (Kruif et al. 2013).

### **2.3.3 Bakteriologische Untersuchung**

Als Goldstandard in der Mastitisdiagnostik gilt bis zum jetzigen Zeitpunkt die BU (Winter 2009). Sie dient der Abklärung des Mastitiserregers, als Behandlungskontrolle, Kontrolle und Behandlungsbedarf der Trockensteher und Frischabkalber, Untersuchung bei Umstellung und Verkauf und zur Wahl der geeigneten Antibiotika (Schulz 2003). Für die bei Einzeltieren auftretende klinische Mastitis wird eine BU der Viertelgemelksproben, am besten vom Anfangsgemelk, angewandt, um kausale Erreger nachzuweisen. Viertelgemelksproben bieten die höchste diagnostische Sicherheit (Winter 2009, Kruif et al. 2013). Diese sinkt bei SG-Proben durch den Verdünnungseffekt ab. Eine mehrmalige Untersuchung von verdächtigen Tieren wird dreimal innerhalb einer Woche angeraten, da manche Mastitiserreger nicht dauerhaft ausgeschieden werden (Winter 2009). Hamann (2005)



empfiehlt eine Zytologie und BU der Viertelgemelksprobe zwei Mal im Abstand von einer Woche.

Eine erste Beurteilung des Wachstums kann nach 24 Stunden erfolgen, wobei hiernach auch entschieden wird, ob eine weitere Anzucht auf einem Selektivnährboden notwendig ist (Winter 2009). Die Anzüchtung hat, je nach Keimart und Konzentration, eine unterschiedliche Wachstumsdauer. Es sind nur wachstumsfähige Erreger nachzuweisen, wobei manche Mikroorganismen gar nicht kultivierbar sind (Busch 2007). Eine anschließende Durchführung von Resistenztests ist möglich (Edmondson und Bramley 2004).

### **2.3.4 Polymerase Ketten Reaktion**

Diese Methode wird heutzutage vermehrt in der Mastitisdiagnostik angewandt, um schnelle und verlässliche Ergebnisse zu erzielen (Koskinen et al. 2010). Die PCR ist eine enzymatische in-vitro Methode, um spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Konzipiert wurde sie von Kary Mullis im Jahre 1983. Die DNA-Polymerase vervielfältigt wiederholt bestimmte DNA-Sequenzen. Der erste Schritt der PCR ist die Schmelzung. Dabei wird bei 90–98 °C die DNA aufgespalten. Danach erfolgt das Binden bei einer Temperatur von 37–65 °C. Bei diesem Prozess legen sich die Primer an die zu vervielfältigende DNA-Region, jeweils am anderen Ende des Strangs, mit ihrem 3'Ende, an. Der letzte Schritt ist die Verlängerung. Die Temperatur wird auf das Optimum der DNA-Polymerase geändert. Diese füllt den fehlenden Strang, am 3'Ende beginnend, mit Desoxyribonukleotiden auf. Dabei wird die DNA als Vorlage benutzt. Die Primer werden zu einem Teil des DNA-Produkts (Hill und Gordon 1992).

#### **2.3.4.1 Quantitative Polymerase Kettenreaktion**

Bei Verwendung der quantitativen PCR (qPCR) wird die DNA vervielfältigt und zusätzlich in Echtzeit durch Fluoreszenzmessung quantifiziert (Busch 2007, LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018). Zur Anwendung kommen zwei Ansätze. Der erste beruht auf dem Einbau von einem Fluoreszenzfarbstoff in die doppelsträngige DNA (z.B. EVA Green). Als zweiten möglichen Ansatz können sequenzspezifische, mit Donor (Reporter)- und Akzeptorfarbstoffen (Quencher) markierte, Hybridisierungssonden eingebaut werden. Bei Bindung der Sonde an den DNA-Einzelstrang, nimmt das Quencher-Molekül durch die Nähe zum Reporter dessen Fluoreszenzfarbstoff auf, es wird also kein Fluoreszenzsignal emittiert. Beim Ersetzen des Reporter-Moleküls durch ein Nukleotid, durch die Polymerase, wird der Reporter-Farbstoff freigesetzt und emittiert, da er nicht mehr durch den Quencher unterdrückt wird (Busch 2007). Die Fluoreszenzmenge nimmt proportional zur vervielfältigten DNA-Menge zu und kann somit

detektiert werden (Busch 2007, LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018). Bei der quantitativen PCR ist von Vorteil, dass das Reaktionsgefäß nach der Reaktion nicht mehr geöffnet werden muss und somit das Risiko von Kreuzkontamination verringert ist (Busch 2007). Multiplex qPCR erlauben durch den Einsatz von spezifischen Sonden mehrere Zielkeime in einem Reaktionsverfahren gleichzeitig zu analysieren.

### **2.3.5 Polymerase Kettenreaktion und Bakteriologie im Vergleich**

Die Vorteile der PCR-Diagnostik sind eine hohe Sensitivität, da bereits eine geringe Erregermenge ausreicht, um diese nachweisen zu können, sowie eine hohe Spezifität durch den Nachweis von typischen DNA-Sequenzen (Busch 2007, Koskinen et al. 2010, LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018). Weiters dauert die Analyse nur vier Stunden, daher kann rascher erregerspezifisch therapiert werden (Koskinen et al. 2010, LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018). Je schneller eine Diagnose gestellt werden und daraufhin richtig therapiert werden kann, desto kürzer ist die Behandlungsdauer und somit die Wartezeit. Eine vermehrte Häufung subklinischer und chronischer Mastitiden, sowie Rückfällen, wird bei zu spätem Therapiestart häufiger beobachtet (Schulz 2003). Die BU als Diagnostikum führt zu erheblicher Zeitverzögerung (Edmondson und Bramley 2004). Die PCR ist auch im Vorteil gegenüber der BU bei schwer oder gar nicht kultivierbaren Keimen (z.B. Mykoplasmen). Weiters verfügt die qPCR über eine automatische Befundinterpretation (Koskinen et al. 2010). Die Auswertung der qPCR erfolgt semiquantitativ, was auf den Erregerdruck hinweist. Außerdem kann, z.B. wie im PathoProof Mastitis Complete 16S-Kit (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), auf Resistenzgene, wie auf das  $\beta$ -Laktamase-Gen der Staphylokokken, getestet werden. Euterassozierte Erreger können auch aus der Sammel- und Tankmilch nachgewiesen werden (LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018).

Als Nachteile der PCR wären zu nennen, dass nur die DNA nachgewiesen wird, was keine Rückschlüsse auf die Vermehrungsfähigkeit des Keimes zulässt (Busch 2007, Hiitiö et al. 2015, LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018). Tatsächliche Resistenztests sind nicht durchführbar, da eine Anzucht benötigt werden würde (LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018). Die Kosten der PCR sind höher und es werden mehrere Reagenzien benötigt (Koskinen et al. 2009, LKV Berlin-Brandenburg e.V. 2018).

### **3 Material und Methode**

#### **3.1 Probennahme**

Die Probennahme wurde an acht österreichischen Milchviehbetrieben (Betriebe A–H) fünfmal innerhalb von eineinhalb Jahren durchgeführt. Von diesen fünf Probenahmen erfolgten zwei Beprobungen im Sommer, zwei im Winter und eine Beprobung im Frühjahr. Die Einteilung der acht beprobten Betriebe erfolgte anhand der Vorjahrestankmilch-ZZ in vier Betriebe mit hoher Zellzahl (HZZ, > 200.000 Zellen) und vier Betriebe mit niedriger Zellzahl (NZZ, < 200.000 Zellen).

Je 16 Kühe wurden auf den jeweiligen Betrieben beprobt. Die Auswahl der Kühe erfolgte bei jeder Beprobung willkürlich. Daher waren die SG bei den verschiedenen Beprobungen nicht zwingend von denselben Kühen. Jene Kühe, die sich zum Zeitpunkt der Beprobung aufgrund von antibiotischer Behandlung in Wartezeit befanden, sowie Tiere knapp nach der Geburt, die noch Biestmilch gemolken haben, wurden von der Beprobung ausgeschlossen.

Vor der Melkung, bzw. nach der Reinigung des Euters durch den Landwirt, wurde bei jeder Kuh ein Schalmtest durchgeführt und dessen Ergebnis vermerkt.

Danach wurde eine aseptische Milchprobenentnahme durchgeführt. Dafür wurden die Zitzen mit einem in 70%igem Ethanol getränkten Wattebausch gereinigt. Für jede Kuh verwendete man ein Falcon-Tube für ein SG (SG 1–16) aus allen vier Zitzen. Die Reinigung der Zitzen begann auf der dem Probennehmer abgewandten Seite um eine erneute Kontamination der Zitze mit der Hand zu verhindern. Die Probennahme führte man in der umgekehrten Reihenfolge durch und begann somit an der dem Untersucher zugewandten Seite (Baumgartner 2014). Danach wurde das Melkzeug von den Landwirten angesetzt. Nach der Melkung wurde eine Probe des Gesamtgemelkes für die Analyse der Milchinhaltsstoffe gezogen und mit einer Bronysolv-Lösung (Analytic, AT) stabilisiert.

Aus dem Milchtank wurde nach der Melkung drei Mal ein Liter Milch entnommen. Aus den 1-Liter Gefäßen überführte man noch direkt am Hof je 50 ml der Tankmilch (Tankmilch 1–3: TAM 1–3), in drei Falcon-Tubes und ein Milchröhrchen für die Inhaltsstoffe. Alle Proben wurden nach der Entnahme sofort bei 4 °C gekühlt und spätestens nach 48 Stunden weiterverarbeitet. Die Proben für die Milchinhaltsstoffe wurden im jeweiligen Gebietslabor mittels Fossomatic-Equipment (FOSS GmbH, GER) auf die somatische Zellzahl analysiert.

### 3.2 DNA Extraktion der Milchproben

Die Extraktion der DNA aus den Milchproben begann spätestens 48 Stunden nach der Probennahme im Labor des Instituts für Lebensmittelsicherheit – Abteilung Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Dafür wurde das DNA-Extraktionsprotokoll des PathoProof Complete-16 Kits (Thermo Scientific PathoProof Mastitis Complete-16 assay, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in modifizierter Form verwendet (Thermo Scientific Protocol Book PathoProof Complete-16 kit 2015).

Zuerst wurden je 15 ml der SG in neue Falcon-Tubes überführt. Die Tankmilch wurde mit den je 50 ml weiterverarbeitet. Der Rest der Probe wurde als Rückstellprobe aufbewahrt.

Die Milch wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert ( $3180 \times g$ , 18,7 cm Radius, 3900 rpm; Eppendorf Zentrifuge 581R, Eppendorf, AT). Danach entfernte man mit dem Pipetboy (Easypet 3, Eppendorf, AT) den flüssigen Überstand und Teile der Fettschicht, um nur noch höchstens 2 ml des Pellets im Tube zu belassen. Dies wurde mit einer 1000 µl Pipette gut vermischt, um möglichst das ganze verbleibende Pellet in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführen zu können. Diese wurden dann bei  $10.000 \times g$  für 5 Minuten (Centrifuge 5424, Eppendorf, AT) zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde erneut mit einer 1000 µl-Pipette entfernt. Danach wurde eine Mischung aus 7 µl Proteinase-K und 350 µl Lysis-Solution-1 für jede Probe hergestellt und 350 µl der Mischung zu jeder Probe hinzugefügt. Es folgte ein Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 55 °C, danach wurde die Probe wieder bei  $5000 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert, um den flüssigen Überstand wieder mit der Pipette entfernen zu können. Danach folgte das Hinzufügen von 100 µl Lysis-Solution-2 und schließlich 20 µl Lysozym (20 mg/ml) zu jeder Probe und eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C bei 125 rpm.

Dann wurde eine Mischung aus 20 µl Proteinase-K und 200 µl Buffer AL hergestellt und 220 µl dieser Mischung zu jeder Probe zugefügt und über Nacht bei 55 °C und 300 rpm inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl Ethanol (99 %) hinzugefügt und die gesamte Probenmenge auf QIAamp-mini-spin-columns überführt und für 1 Minute bei  $20.000 \times g$  zentrifugiert. Falls noch Reste der Flüssigkeit auf dem Filter verblieben waren, wurde erneut zentrifugiert bis die gesamte Flüssigkeit gefiltert war.

Nun wurden 500 µl Buffer AW1 auf den Filter des Spin-Columns pipettiert, um die DNA zu waschen. Erneut erfolgte ein Zentrifugieren mit  $20.000 \times g$  für 1 Minute. Danach wurden 500 µl des Buffer AW2 hinzugefügt und mit  $20.000 \times g$  für 3 Minuten zentrifugiert.

Die Spin-Columns wurden zumindest einmal erneut für 2 Minuten zentrifugiert ( $20.000 \times g$ ) um verbliebene Flüssigkeit komplett vom Filter zu entfernen. Das Spin-Column, indem sich nun die gewaschene DNA befand, wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt. Das Filtrat wurde verworfen.

Nun kamen je 50 µl mit Diethylpyrokarbonat behandeltes Wasser (DEPC-Water, PCR grade water, Sigma Aldrich, AT), dass zuvor im Inkubator auf 70 °C erhitzt wurde, auf die Spin-Columns, um die im Filter befindliche DNA in das Eppendorfgefäß zu eluieren. Nach einer Zentrifugation bei  $20.000 \times g$  für 3 Minuten wurde dieser Schritt wiederholt, sodass sich schlussendlich ca. 100 µl DEPC-Water mit DNA im Eppendorfgefäß befanden. Die extrahierte DNA wurde als letzten Schritt in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß umgesetzt und wurde bei -20 °C tiefgefroren.

### 3.3 Quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PathoProof Kit)

Das Kit kann 15 Mastitis-auslösende Mikroorganismen, sowie das  $\beta$ -Laktamase Resistenzgen identifizieren. Folgende Keime sind als Targets enthalten:

- *Corynebacterium bovis*
- *Enterococcus* spp. (einschließlich *E. faecalis* und *E. faecium*)
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella* spp. (einschließlich *K. oxytoca* und *K. pneumoniae*)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus*  $\beta$ -Laktamase-Gen
- *Staphylococcus* spp.
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus dysgalactiae*
- *Streptococcus uberis*
- *Trueperella pyogenes* und *Peptoniphilus indolicus*
- (Hefen)
- (*Mycoplasma bovis*)
- (*Mycoplasma* spp.)
- (*Prototheca* spp.)

Da es sich um eine multiplex-qPCR handelt, können mit einem Primermix jeweils vier der beschriebenen Targets und eine interne Amplifications Kontrolle (IAC) analysiert werden. Da jedes Target- und IAC-Signal in einem Primermix über einen spezifischen Fluoreszenzkanal empfangen wird, würden fünf Fluoreszenzkanäle benötigt werden, um für alle Targets Ergebnisse zu erzielen. Da am Institut aber nur ein qPCR Gerät mit den vier Fluoreszenzfiltern ROX, HEX/JOE, CY5 und FAM verfügbar war, konnten die Targets vom Filter ATTO (Hefen, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma* spp., Prototheken) nicht analysiert werden und werden daher in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

Das Kit enthielt einen fertigen Mastermix und vier Primermixes. Primermix 1 (F-1651: PathoProof Complete-16 Kit Primer Mix 1) enthält Oligonucleotide zur Identifikation von *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *C. bovis*, *M. bovis* und eine interne Amplifikations Kontrolle (IAC) mit Proben-DNA. Primermix 2 (F-1652: PathoProof Complete-16 kit Primer Mix 2) enthält Oligonucleotide zur Identifikation des  $\beta$ -Laktamase-Gens der Staphylokokken, *E. coli*, *S. dysgalactiae*, *Mycoplasma* spp. und eine IAC. Primermix 3 (F-1653: PathoProof Complete-16 kit Primer Mix 3) enthält Oligonucleotide zur Identifikation von *Staphylococcus* spp., wobei alle relevanten Koagulase-negativen-Staphylokokken miteingeschlossen sind, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *Prototheca* spp. und eine IAC. Primermix 4 (F-1654: PathoProof Complete-16 kit Primer Mix 4) enthält Oligonucleotide zur Identifikation von *Klebsiella* spp., *S. marcescens*, *T. pyogenes* Hefen und eine IAC.

Beim PathoProof Master Mix handelt es sich um einen Puffer, der  $MgCl_2$ , Deoxynucleosidtriphosphate und Hot-Start-DNA-Polymerase enthält.

Die Durchführung erfolgte laut Handbuch (Thermo Scientific Protocol Book PathoProof Complete-16 kit 2015). Pro Probe wurden 11  $\mu$ l Mastermix und je 5,5  $\mu$ l jeder der vier Primermischungen berechnet um die PCR-Solution 1–4 herzustellen. Es wurden dann 15  $\mu$ l einer jeden PCR-Solution und 5  $\mu$ l Template DNA einer jeden Probe pro Reaktion verwendet und in 0,2 ml qPCR Gefäße pipettiert (MicroAmp Optical Tubes und Optical 8-Cap Stripes, applied biosystems, ThermoFisher Scientific, AT). Außerdem wurde in jedem Lauf für jede PCR-Solution eine Negativkontrolle, in die keine Probe pipettiert wurde, sowie eine Positivkontrolle mit dem dem Kit beigelegten PathoProof Universal Amplification Standard berücksichtigt. Nach dem Pipettieren der PCR-Solution und Template DNA wurden die qPCR Proben nochmals mit  $1500 \times g$  für 1 Minute zentrifugiert und schließlich in den Thermocycler (MX Pro 3000, ThermoFisher Scientific, AT) verbracht.

Als initialen Schritt wurde die Denaturierung der DNA durch eine Erhitzung auf 95 °C für 10 Minuten durchgeführt. Anschließend folgten 40 Zyklen mit dem Erhitzungsschritt auf 95 °C für 5 Sekunden und Abkühlung auf 60 °C für 60 Sekunden.

Für jede PCR wurde derselbe Thermocycler verwendet, sowie dieselben PCR Gefäße und Verschlusskappen.

### 3.4 Auswertung qPCR Daten

Für alle zwölf Targets wurde der Grenzwert der qPCR so festgelegt, dass er über dem Hintergrundrauschen lag, mindestens jedoch dort, wo sich der Fluoreszenzwert verdoppelt hat. Die mittleren Grenzwerte lagen bei: blaZ-Gen  $462 \pm 106,7$ , *C. bovis*  $87 \pm 21,9$ , *E. coli*  $193 \pm 41,8$ , *Enterococcus* spp.  $112 \pm 40,6$ , *Klebsiella* spp.  $448 \pm 152,4$ , *T. pyogenes*  $124 \pm 28,6$ , *S. agalactiae*  $104 \pm 35,4$ , *S. aureus*  $411 \pm 115,6$ , *S. dysgalactiae*  $84 \pm 18,5$ , *S. marescens*  $109 \pm 31,2$ , *S. uberis*  $101 \pm 17,2$ , *Staphylococcus* spp.  $450 \pm 107,8$ .

Anhand des dann ermittelten cycle-thresholds (Ct-Wert) wurde die Kopienanzahl, das bce, mittels einer von Thermofisher Scientific zur Verfügung gestellten Formel ausgerechnet. Dies erfolgte unter der Berücksichtigung von maximalen Ct-Werten, die laut Hersteller als negatives Ergebnis gelten, sowie durchschnittlichen Neigungswerten und Achsenabschnitte von Standardkurven. Danach wurde noch das Eluierungsvolumen bei der DNA-Extraktion und die ursprüngliche Probenmenge berücksichtigt, um den bce pro ml Milch zu berechnen. Das blaZ-Gen wurde nur in Proben berücksichtigt, die zumindest positiv für *Staphylococcus* spp. waren und einen höheren bce an *Staphylococcus* spp. als an blaZ-Gen hatten.

### 3.5 Statistische Auswertung

Die Datensammlung, Aufbereitung und Erstellung von Graphiken erfolgten in Microsoft Excel, die statistische Auswertung mit SAS Enterprise (SAS Enterprise Guide 7.1., SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Für die deskriptive Statistik wurden diverse Lage- und Streumaße (Minimum, Maximum, Mittelwert, Median, Standardabweichung, Varianz) berechnet. Für die vergleichende Statistik wurden die Variablen mittels Kolmogorov-Smirnov, Cramer von Mises und Anderson-Darling Test und Histogrammen auf Normalverteilung getestet. Die Variablen ZZ und bce waren nicht normalverteilt. Von einer log oder Wurzeltransformation wurde jedoch abgesehen, um eine Interpretation der tatsächlich vorliegenden Werte zu ermöglichen. Die Daten wurden in Folge mittels Levene Test auf ihre Homogenität überprüft. Daten mit

homogenen Varianzen wurden mittels Wilcoxon-Test analysiert. Bei Varianzheterogenität, wurde mittels Welch's ANOVA analysiert. Der Post-hoc Test erfolgte mittels Tukey HSD Test. Parametrische Daten (Pathogen ja/nein) wurden mittels Chi-Square Test (Chi-Quadrat Test von Pearson) mit exakten *P*-Werten analysiert. Als unabhängige Variablen wurden ZZ-Kategorie (SG: ZZ-Kategorie 1-5, TAM: ZZ-Kategorie < 200.000 und > 200.000), ZZ-Klasse (< 200.000 Zellen/ml TAM und > 200.000 Zellen/ml TAM nach Vorjahresdurchschnitt), Betrieb, Jahreszeit, Anzahl Pathogene, Pathogenkombinationen und Haltungsart verwendet. *P*-Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant angesehen. Für Korrelationsanalysen wurde der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient verwendet. Die Interpretation erfolgte wie folgt: Die Korrelation ist vernachlässigbar mit  $r < 0,3$ , gering mit  $r \geq 0,3 - < 0,5$ , moderat mit  $r \geq 0,5 - < 0,7$ , stark mit  $r \geq 0,7 - < 0,9$  und substantiell mit  $r \geq 0,9 - 1,0$ . Alle angegebenen Korrelationen haben ein Signifikanzniveau von  $P < 0,05$ .

### 3.6 Erhebung der Betriebsdaten

Um den möglichen Einfluss der Tierhaltung auf die ZZ und vorhandenen Mastitispathogene feststellen zu können, wurden Betriebsdaten erhoben und ein Hygienescoreing vom Probennehmer durchgeführt.

Erhoben wurde die Melkhygiene, wie die Euterreinigung und deren Effizienz, das Tragen von Handschuhen, die Überprüfung des Vorgemelks, die Melkreihenfolge und das Sitzendippen. Weiters wurde die Verwendung von einem eigenem Melkzeug für an Mastitis erkrankte Kühe notiert.

Ein Hygienescoreing der Tiere wurde am Fressplatz bei Betrachtung von hinten, bzw. im Melkstand durchgeführt und wurde wie folgt beurteilt:

Score 1: Euterspiegel und Extremitäten sind frei von Verschmutzungen.

Score 2: Euterspiegel geringgradig verschmutzt, 2–10 % der Oberflächen sind verschmutzt

Score 3: Euterspiegel und Hinterextremitäten sind mittelgradig verschmutzt, 10–30 % der Oberflächen sind verschmutzt

Score 4: Euterspiegel und Hinterextremitäten sind hochgradig verschmutzt, > 30 % der Oberflächen sind verschmutzt



Die Sauberkeit der Liegeboxen wurde überprüft. Weiters wurde der Verschmutzungsgrad der Kühe und des Euters, unabhängig von der Melkung, festgehalten. Die Bewertung erfolgte mit Schulnotensystem.

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden insgesamt 633 Sammelgemelke mittels multiplex qPCR untersucht. Obwohl alle Tiere klinisch gesund waren, wurde in nur 33 SG-Proben (5,21 %) kein Pathogen detektiert. Weiters wurde in 197 SG-Proben (31,12 %) ein einzelnes Pathogen aufgefunden. Die verbliebenen 403 Proben (63,67 %) der SG wiesen mehr als ein Pathogen auf. Von den insgesamt 40 untersuchten TAM-Proben waren nur zwei (5 %) in der qPCR negativ.

Die vorkommenden Pathogene und die ZZ der beprobten Tiere wurden in den SG-Proben und den TAM-Proben anhand der Metadaten ZZ-Klasse, ZZ-Kategorie, Betrieb, Jahreszeit und des bce miteinander verglichen. Die SG wurden auch hinsichtlich der am häufigsten vorkommenden Pathogenkombinationen und der Anzahl der Pathogene beleuchtet.

In den SG und der TAM der acht Betriebe konnten über fünf Beprobungen lang folgende Pathogene durch die qPCR detektiert werden: *Staphylococcus* spp. und das von ihnen teilweise exprimierte  $\beta$ -Laktamase-Gen (blaZ-Gen), *C. bovis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *E. coli*, *Enterococcus* spp., *S. marescens*, *S. aureus* und *T. pyogenes*. *Klebsiella* spp. wurden nur in der TAM nachgewiesen. *S. agalactiae* befand sich in keiner Probe.

Um einen genauen Überblick über die Häufigkeit der nachgewiesenen Pathogene zu bekommen, wurde deren Anteil an den 600 positiven SG-Proben in Tab.1 dargestellt. *Staphylococcus* spp. wurden in 90,16 % und somit in einem Großteil der positiven SG nachgewiesen. Dahinter folgte *C. bovis* mit einem Nachweis von 58,89 %. *S. uberis* folgte mit 14,76 % als häufigstes Major-Pathogen. *E. coli* wurde mit 10,63 % an vierter Stelle nachgewiesen.

Von den 197 Proben, in denen nur ein Pathogen nachgewiesen werden konnte, waren 85,79 % *Staphylococcus* spp. (n = 169), davon exprimierten 20,71 % das blaZ-Gen (n = 35), sowie 12,69 % *C. bovis* (n = 25). *S. uberis* kam in 1,02 % (n = 2) der 197 Proben alleinig vor, *T. pyogenes* in 0,51 % (n = 1). Andere detektierte Pathogene kamen nicht im Einzelnachweis vor.

Tab 1: Häufigkeit der detektierten Pathogene in den 600 positiv getesteten SG-Proben; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H

	Positive Proben	Anteil an SG-Proben
<b><i>Staphylococcus</i> spp.</b>	568	94,67%
<b><i>C. bovis</i></b>	371	61,83%
<b><i>E. coli</i></b>	67	11,17%
<b><i>Enterococcus</i> spp.</b>	31	5,17%
<b><i>Klebsiella</i> spp.</b>	0	0,00%
<b><i>T. pyogenes</i></b>	13	2,17%
<b><i>S. aureus</i></b>	3	0,50%
<b><i>S. dysgalactiae</i></b>	31	5,17%
<b><i>S. marescens</i></b>	3	0,50%
<b><i>S. uberis</i></b>	93	15,50%
<b><i>S. agalactiae</i></b>	0	0,00%
<b>Pathogene Gesamtnachweise</b>	1180	

Tab 2: Häufigkeit der detektierten Pathogene in den 38 positiv getesteten TAM-Proben; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H

	Positive Proben	Anteil an TAM-Proben
<b><i>Staphylococcus</i> spp.</b>	38	100,00%
<b><i>C. bovis</i></b>	24	63,16%
<b><i>E. coli</i></b>	10	26,32%
<b><i>Enterococcus</i> spp.</b>	11	28,95%
<b><i>Klebsiella</i> spp.</b>	1	2,63%
<b><i>T. pyogenes</i></b>	1	2,63%
<b><i>S. aureus</i></b>	3	7,89%
<b><i>S. dysgalactiae</i></b>	11	28,95%
<b><i>S. marescens</i></b>	2	5,26%
<b><i>S. uberis</i></b>	22	57,89%
<b><i>S. agalactiae</i></b>	0	0,00%
<b>Pathogene Gesamtnachweise</b>	123	

In der TAM wurde in allen positiven Proben *Staphylococcus* spp. nachgewiesen, *C. bovis* folgte, ähnlich den SG-Proben mit 63,16 % an zweiter Stelle. Darauf folgte auch in der TAM *S. uberis* als häufigstes Major-Pathogen, *Enterococcus* spp. und *S. dysgalactiae* wurden in der TAM jedoch häufiger aufgefunden als *E. coli* (siehe Tab. 2).

## 4.1 Zellzahlklassen

### 4.1.1 Zellzahlen der Zellzahlklassen

Wie in Tab. 3 ersichtlich bestätigte sich die Unterteilung der acht Betriebe in vier Betriebe mit hoher Zellzahl (HZZ, > 200.000 Zellen) und vier Betriebe mit niedriger Zellzahl (NZZ, < 200.000 Zellen) anhand der Vorjahrestankmilch-ZZ auch im Beobachtungszeitraum. Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (STABW), sowie Minimum (Min) und Maximum (Max) der ZZ werden angegeben (siehe Tab.3 und Tab.4).

Tab 3: Mittelwerte und STABW der ZZ der SG, eingeteilt in die ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H) ; 1.–5. Beprobung

<b>ZZ-Klasse</b>	<b>Anzahl Proben</b>	<b>Mittelwert Zellzahl</b>	<b>STABW Zellzahl</b>	<b>Minimum Zellzahl</b>	<b>Maximum Zellzahl</b>
<b>HZZ</b>	318	323 <sup>a</sup>	779,8	7	8.277
<b>NZZ</b>	312	81 <sup>b</sup>	131,2	4	1.005

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P = < 0,001$ ).

HZZ Hohe Zellzahl, > 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

NZZ Hohe Zellzahl, < 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

Tab 4: Mittelwerte und STABW der ZZ der TAM, eingeteilt in die ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H); 1.–5. Beprobung

<b>ZZ-Klasse</b>	<b>Anzahl Proben</b>	<b>Mittelwert Zellzahl</b>	<b>STABW Zellzahl</b>	<b>Minimum Zellzahl</b>	<b>Maximum Zellzahl</b>
<b>HZZ</b>	20	262 <sup>a</sup>	201,3	50	993
<b>NZZ</b>	20	75 <sup>b</sup>	40,6	20	192

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P = < 0,001$ ).

HZZ Hohe Zellzahl, > 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

NZZ Hohe Zellzahl, < 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

#### 4.1.2 Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene in den Zellzahlklassen Hohe Zellzahl und Niedrige Zellzahl

Tab 5: Mittleres bce der Pathogene und des blaZ-Gens in den SG mit Vergleich zwischen den ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H); 1.–5. Beprobung

	HZZ	NZZ	P-Wert
<b>blaZ-Gen</b>	2.363	535	0,04
STABW	15.555,5	2.705,3	
<b><i>C. bovis</i></b>	743.291	346.580	< 0,001
STABW	1.704.864,1	1.169.254,7	
<b><i>E. coli</i></b>	753	5	0,03
STABW	5.916,4	26,0	
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	6.929	81	0,15
STABW	83.423,8	827,4	
<b><i>T. pyogenes</i></b>	1.958	3	0,31
STABW	34.175,5	39,9	
<b><i>S. aureus</i></b>	287	0	0,31
STABW	4.955,6	8,7	
<b><i>S. dysgalactiae</i></b>	41.173	44	0,17
STABW	523.858,0	617,8	
<b><i>S. marescens</i></b>	6	8	0,89
STABW	112,4	131,4	
<b><i>S. uberis</i></b>	72.749	12.863	0,32
STABW	1.041.362,3	158.036,4	
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>	13.799	9.914	0,20
STABW	42.120,8	34.028,6	

HZZ Hohe Zellzahl, > 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

NZZ Hohe Zellzahl, < 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

*C. bovis*, *E. coli* und das blaZ-Gen kommen in den SG signifikant höher in der ZZ-Klasse HZZ vor. Numerisch sind, außer *S. marescens* welche im gesamten Projekt nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen wurde, alle Pathogene in den SG der ZZ-Klasse HZZ mit höherem bce vertreten ( $P \geq 0,05$ , siehe Tab.5).

Tab 6: Mittleres bce der Pathogene und des blaZ-Gens in der TAM mit Vergleich zwischen den ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H); 1.–5. Beprobung

	Hohe ZZ	Niedrige ZZ	P-Wert
<b><i>C. bovis</i></b>	13.944	4.658	0,05
STABW	15.189,8	13.455,6	
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>	2.277	987	0,02
STABW	1.639,7	1.676,2	
<b>blaZ-Gen</b>	58	17	0,36
STABW	187,4	52,2	
<b><i>E. coli</i></b>	71	10	0,16
STABW	185,2	45,0	
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	559	2.842	0,39
STABW	1.776,0	11.626,7	
<b><i>Klebsiella spp.</i></b>	206	0	0,32
STABW	921,1	0,0	
<b><i>S. aureus</i></b>	24	0	0,14
STABW	71,2	0,0	
<b><i>S. dysgalactiae</i></b>	7.804	17	0,26
STABW	30.637,9	66,4	
<b><i>S. marescens</i></b>	216	7.585	0,34
STABW	967,8	33.922,0	
<b><i>S. uberis</i></b>	1.501	2.829	0,64
STABW	1.841,7	12.582,4	

HZZ Hohe Zellzahl, > 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

NZZ Hohe Zellzahl, < 200.000 Zellen in der Vorjahrestankmilch

*C. bovis* und *Staphylococcus spp.* sind die einzigen Pathogene in der TAM, die ein signifikant höheres bce in der ZZ-Klasse HZZ haben.

Anders als bei den SG weisen in der TAM mehrere Pathogene ein höheres bce in NZZ-Betrieben auf. Wie in Tab.6 ersichtlich, handelt es sich hierbei um *Enterococcus spp.*, *S. marescens* und *S. uberis*. Dieser numerische Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ( $P \geq 0,05$ ).

## 4.2 Betrachtung der einzelnen Betriebe

### 4.2.1 Zellzahlen der Betriebe A-H

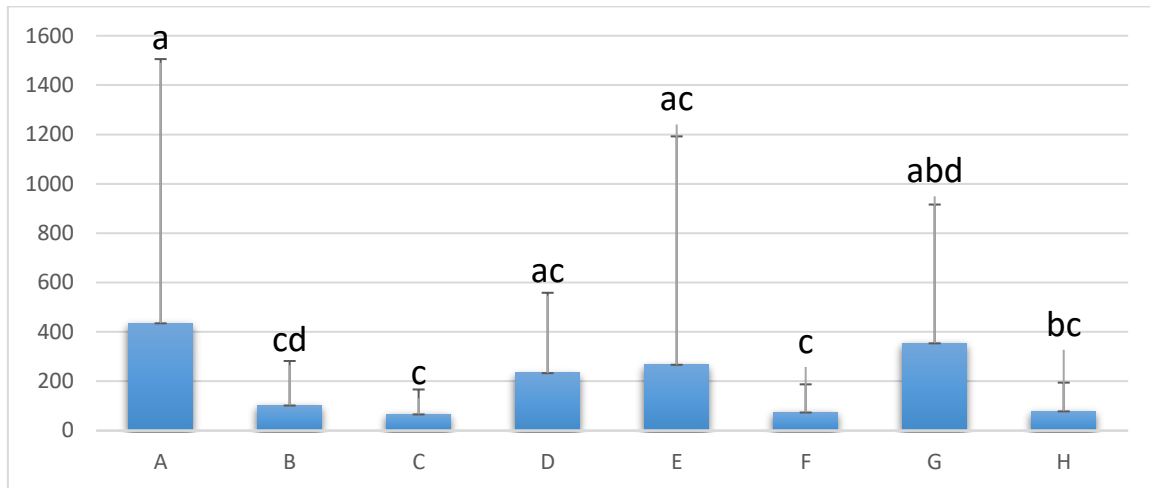


Abb 1: Mittlere ZZ mit STABW der SG der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung; <sup>abcd</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ )

Wie in Abb.1 ersichtlich, unterscheidet sich Betrieb A, mit der höchsten mittleren ZZ der SG, von allen Betrieben der ZZ-Klasse NZZ (B, C, F, H) signifikant. Betrieb G weist die zweithöchste mittlere ZZ auf und unterscheidet sich signifikant von den Zellzahlen der Betriebe F und C ( $P < 0,001$ ).

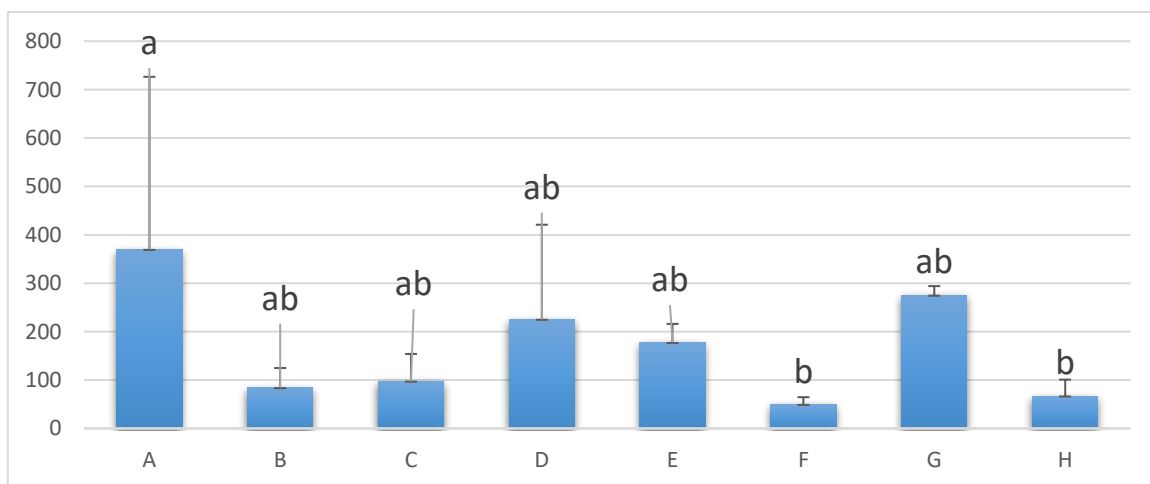


Abb 2: Mittlere ZZ mit STABW der TAM der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung; <sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ )

Bei Betrachtung der TAM unterscheidet sich der Betrieb A, mit der höchsten TAM-ZZ, signifikant von Betrieb F und H, mit der geringsten TAM-ZZ ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Anzahl der detektierten Mastitispathogene in den Betrieben A-H

Tab 7: Anzahl der SG-Proben nach Betrieben, die positiv auf das jeweilige Pathogen oder das blaZ-Gen getestet wurden; Betrieb A–H; 1.–5. Beprobung

ZZ-Klasse	HZZ	NZZ	NZZ	HZZ	HZZ	NZZ	HZZ	NZZ	
Betrieb	A	B	C	D	E	F	G	H	P-Wert
blaZ-Gen	40	11	26	26	33	17	38	6	< 0,001
<i>Staphylococcus</i> spp.	78	74	75	76	76	63	73	53	< 0,001
<i>C. bovis</i>	70	46	1	80	53	72	44	5	< 0,001
<i>E. coli</i>	17	2	7	8	8	1	20	4	< 0,001
<i>Enterococcus</i> spp.	8	3	1	1	13	1	3	1	< 0,001
<i>S. uberis</i>	31	4	0	5	14	15	21	3	< 0,001
<i>S. dysgalactiae</i>	4	0	3	14	1	1	3	5	zu wenige Nachweise
<i>T. pyogenes</i>	3	0	0	1	1	1	5	2	zu wenige Nachweise
<i>S. marescens</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	zu wenige Nachweise
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	2	1	zu wenige Nachweise

Die Tab. 7 zeigt die Anzahl an detektierten Pathogenen in den SG in den einzelnen Betrieben über fünf Beprobungen. Der Chi-Quadrat-Test ergab bei den Pathogenen *C. bovis*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli* und *S. uberis*, sowie dem blaZ-Gen zu einem  $P < 0,001$ , was für Unterschiede im Vorhandensein dieser Pathogene und dem blaZ-Gen zwischen den Betrieben spricht. Für *S. dysgalactiae*, *T. pyogenes*, *S. marescens* und *S. aureus* ist die Nachweisrate in den SG insgesamt zu gering, um eine statistische Aussage über die Häufigkeit des Vorkommens auf bestimmten Betrieben treffen zu können.

Das blaZ-Gen wird vor allem in den HZZ-Betrieben A und G häufig exprimiert, die wenigsten Nachweise konnten in Betrieb H, mit sechs Nachweisen, sowie in Betrieb B, mit elf Nachweisen, getätigt werden. *Staphylococcus* spp. wird in allen Betrieben häufig nachgewiesen, Betrieb H zeichnet sich mit 53 Nachweisen mit einer etwas geringeren Nachweisrate verglichen zu den anderen Betrieben aus. *C. bovis* ist in den Betrieben D, F und A am häufigsten in SG vertreten, während dieses Pathogen in den SG der Betriebe H und C mit fünf bzw. einem Nachweis kaum vorhanden ist. *E. coli* wurde am häufigsten in den Betrieben G und A mit 20 bzw. 17 positiven Nachweisen gefunden. *Enterococcus* spp. konnte



in Betrieb E mit 13 positiven SG am häufigsten nachgewiesen werden, darauf folgte Betrieb A mit acht Nachweisen. *S. uberis* wurde mit 31 Nachweisen am häufigsten in Betrieb A detektiert, Betrieb G folgte mit 21 Nachweisen. *S. dysgalactiae* wurde mit 14 Nachweisen am häufigsten in Betrieb D angetroffen, während dieses Pathogen in den anderen Betrieben kaum vorhanden war, dies war jedoch statistisch nicht auswertbar. *S. aureus* kam nur in zwei der acht beprobten Betriebe, Betrieb G und Betrieb H, vor, allerdings auch hier in nur zwei bzw. einer Probe. Da nicht alle Kühe auf jedem Betrieb beprobt wurden, sagen diese Pathogenzahlen nichts über die tatsächliche Prävalenz auf den Betrieben über die fünf Beprobungen aus.

Tab 8: Anzahl der Pathogennachweise in den SG-Proben der Betriebe A–H, SG-Proben ohne Pathogennachweis, der alleinige Nachweis von den Minor-Pathogenen *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen und *C. bovis*, sowie die Nachweishäufigkeit von Major-Pathogenen in den SG; 1.–5. Beprobung

ZZ-Klasse	HZZ	NZZ	NZZ	HZZ	HZZ	NZZ	HZZ	NZZ
Betrieb	A	B	C	D	E	F	G	H
Anzahl der SG-Proben/Betrieb								
Gesamt	80	80	80	80	81	78	80	74
Anzahl der Pathogennachweise in den SG-Proben/Betrieb	80	77	75	80	78	77	78	55
Anteil an positiven SG-Proben	100,00 %	96,25 %	93,75 %	100,00 %	96,30 %	98,72 %	97,50 %	74,32 %
Negative Proben	0	3	5	0	3	1	2	19
Nur <i>Staphylococcus</i> spp.	3	24	45	0	12	4	10	36
<i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	1	3	18	0	7	0	3	3
Nur <i>C. bovis</i>	1	2	0	4	1	13	3	1
Anzahl der Major-Pathogen-positiven Proben/Betrieb	48	8	11	23	29	18	36	13
Anteil an Major-Pathogen-positiven Proben/Betrieb	60,00 %	10,00 %	13,75 %	28,75 %	35,80 %	23,08 %	45,00 %	17,57 %

Der Anteil an in der qPCR positiven Proben in den Betrieben A–H ist in Tab. 8 dargestellt.

Von den 80 SG-Proben in Betrieb A und Betrieb D wurde in jeder einzelnen Probe mindestens ein Pathogen nachgewiesen. Betrieb H war mit einer positiven-Rate von 74,32 % der SG am geringsten betroffen. In den anderen Betrieben der Klasse NZZ (B, C, und F) waren in über 90 % der SG-Proben Pathogene auffindbar. Der alleinige Nachweis von *Staphylococcus* spp.

erfolgte vor allem in den NZZ-Betrieben B, C und H, der Nachweis von *Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen vor allem in Betrieb C. Einzelnachweise von *C. bovis* kamen vor allem im NZZ-Betrieb F verstärkt vor. Aus Tab.8 kann abgelesen werden, dass sowohl negative Proben, aber vor allem Einzelnachweise der Minor-Pathogene, vermehrt in Betrieben niedriger ZZ nachgewiesen werden konnten.

Aufgrund des hohen Anteils an positiven SG-Proben auf allen Betrieben wurde weiter auf Proben selektiert, in denen Major-Pathogene, bzw. Kombinationen mit Major-Pathogenen, gefunden wurden. Die auf die Kombinationen "Nur *Staphylococcus* spp.", "Nur *C. bovis*", "*Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen", "*Staphylococcus* spp. + *C. bovis*", "*Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen", "*Staphylococcus* spp. + *C. bovis* + blaZ-Gen" positiven Proben wurden hierfür ausgeschlossen.

Dabei nimmt die Anzahl an positiven Proben in allen Betrieben ab, am stärksten jedoch in den NZZ-Betrieben (siehe Tab.8). Vor allem Betrieb A, mit der signifikant höchsten ZZ (siehe Abb.1 und Abb.2), weist in 60 % der SG-Proben Major-Pathogene auf.

Nach Ermittlung der Häufigkeit des Nachweises bestimmter Pathogene auf den einzelnen Betrieben (Tab.7) ist in Tab. 9 das mittlere bce dieser detektierten Pathogene auf den Betrieben A–H aufgelistet. In Betrieb G war das bce des blaZ-Gens, verglichen zu den NZZ-Betrieben B, C, F und H und dem HZZ-Betrieb D, signifikant am höchsten. Auch *Staphylococcus* spp. sind in Betrieb G mit höchstem bce vorhanden, im Vergleich zu den Betrieben D, F und H. *C. bovis* wurde in den Betrieben A und F mit hohem bce nachgewiesen, während in den Betrieben C und H kaum Nachweise erfolgten. Das signifikant höchste bce an *E. coli* wurde im Betrieb G detektiert, das niedrigste in Betrieb B. Der Unterschied im bce von *S. dysgalactiae* zwischen den einzelnen Betrieben ist nicht signifikant ( $P \geq 0,05$ ), jedoch zeigt sich ein großer numerischer Unterschied zwischen Betrieb D, der stark mit diesem Pathogen belastet zu ist, und den restlichen Betrieben.

### 4.2.3 Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene aus den Betrieben A–H

Tab 9: MW und STABW des bce der Pathogene und des blaZ-Gens in den SG der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung

ZZ-Klasse	HZZ	NZZ	NZZ	HZZ	HZZ	NZZ	HZZ	NZZ	
Betrieb	A	B	C	D	E	F	G	H	P
<b>blaZ-Gen</b>	1.485 <sup>ab</sup>	560 <sup>a</sup>	367 <sup>a</sup>	184 <sup>a</sup>	1.338 <sup>ab</sup>	750 <sup>a</sup>	6.460 <sup>b</sup>	463 <sup>a</sup>	0,01
STABW	5.050,5	2.328,3	1.249,4	502,8	4.765,9	3.596,5	30.128,5	3.145,6	
<b>Staphylococcus spp.</b>	10.442 <sup>ab</sup>	14.714 <sup>ab</sup>	17.636 <sup>ab</sup>	3.866 <sup>a</sup>	15.665 <sup>ab</sup>	3.451 <sup>a</sup>	25.200 <sup>b</sup>	3.189 <sup>a</sup>	0,001
STABW	15.997,7	46.249,9	45.644,6	4.890,0	46.659,6	7.449,4	66.749,0	11.137,1	
<b>C. bovis</b>	1.099.391 <sup>a</sup>	185.753 <sup>bc</sup>	1 <sup>c</sup>	704.133 <sup>ab</sup>	379.644 <sup>bc</sup>	1.195.629 <sup>a</sup>	794.544 <sup>ab</sup>	181 <sup>c</sup>	< 0,001
STABW	149.8965,4	402.623,8	12,7	704.804,8	992.977,3	2.087.663,9	2.786.228,6	949,9	
<b>E. coli</b>	737 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	9 <sup>ab</sup>	11 <sup>ab</sup>	248 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	2.024 <sup>b</sup>	8 <sup>ab</sup>	0,03
STABW	4.537,1	11,5	30,8	35,4	865,0	17,4	10.862,2	36,6	
<b>S. dysgalactiae</b>	396	0	136	164.430	56	2	326	34	0,059
STABW	3.002,8	0,0	1.202,1	1.044.556,1	502,2	21,9	2.395,5	219,5	
<b>Enterococcus spp.</b>	998	72	154	848	25.325	68	318	26	0,09
STABW	8.690,5	616,4	1.381,1	7.584,0	165.049,2	602,4	2.660,7	220,9	
<b>T. pyogenes</b>	12	0	0	2	181	1	7.659	11	0,44
STABW	80,3	0,0	0,0	17,1	1.629,6	4,5	68.443,1	81,6	
<b>S. aureus</b>	0	0	0	0	0	0	1.151	2	0,39
STABW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9.923,1	17,8	
<b>S. marescens</b>	25	0	29	0	0	1	0	0	0,56
STABW	225,1	0,0	259,4	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	
<b>S. uberis</b>	53.320	98	0	15	232.116	51.214	3.553	146	0,49
STABW	164.218,0	854,0	0,0	75,7	2.067.549,2	314.462,1	13.524,9	1.215,0	

Tab 10: MW und STABW des bce der Pathogene und des blaZ-Gens in der TAM der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung

ZZ-Klasse	HZZ	NZZ	NZZ	HZZ	HZZ	NZZ	HZZ	NZZ	
Betrieb	A	B	C	D	E	F	G	H	P-Wert
<b>C. bovis</b>	19.555	3.615	0	23.123	1.299	14.984	11.801	31	0,04
STABW	10.154,9	3.950,9	0,0	21.195,4	1.187,0	25.609,7	13.853,3	69,8	
<b>S. aureus</b>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0,01
STABW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	123,9	0,0	
<b>blaZ-Gen</b>	199	9	46	1	4	13	28	0	0,31
STABW	362,7	18,4	103,8	1,8	8,6	17,9	40,4	0,0	
<b>Staphylococcus spp.</b>	1.905	926	933	2.726	1.078	1.769	3.397	320	0,08
STABW	774,4	1.003,5	378,3	1.469,0	868,4	3.271,1	2.338,7	409,7	
<b>E. coli</b>	177	0	0	40	0	40	68	0	0,45
STABW	343,5	0,0	0,0	54,7	0,0	90,0	142,6	0,0	
<b>Enterococcus spp.</b>	600	265	0	0	66	10.634	1.571	470	0,48
STABW	1.341,0	593,0	0,0	0,0	120,3	23.223,4	3.345,7	1.050,4	
<b>Klebsiella spp.</b>	0	0	0	0	0	0	824	0	0,45
STABW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1.842,2	0,0	
<b>T. pyogenes</b>	0	0	0	0	0	0	1	0	0,45
STABW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	
<b>S. dysgalactiae</b>	99	0	59	31.108	0	0	10	8	0,26
STABW	218,3	0,0	132,7	59.611,7	0,0	0,0	22,1	16,6	
<b>S. marescens</b>	0	0	0	0	0	30.341	866	0	0,45
STABW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	67.844,1	1.935,5	0,0	
<b>S. uberis</b>	3.481	27	0	19	1.311	11.257	1.193	31	0,50
STABW	1.794,4	39,1	0,0	40,4	2.156,6	25.171,6	656,1	69,8	

*C. bovis* wurde mit höchstem bce in der TAM von Betrieb D nachgewiesen, darauf folgten Betrieb A und F, wohingegen in Betrieb H kaum ein Nachweis erfolgt ist, in Betrieb C wurde kein *C. bovis* in der TAM aufgefunden. *S. aureus* wird nur in der TAM von Betrieb G nachgewiesen und unterscheidet sich somit signifikant von allen anderen Betrieben ( $P = 0,01$ ) (siehe Tab.10).

Die Betriebe B, C, F und H die der ZZ-Klasse NZZ angehören, weisen im Allgemeinen den geringsten Anteil an hochpathogenen Keimen und auch ein niedrigeres bce der Pathogene auf. Betrieb F ist der am stärksten mit Major-Pathogenen belastete Betrieb der Klasse NZZ, hat jedoch im Vergleich zu anderen Betrieben dieser Klasse eine relativ niedrige ZZ, in der TAM sogar die niedrigste.

### 4.3 Zellzahlkategorien der Sammelgemelke

Die SG wurden nach ihrer ZZ in fünf Kategorien eingeteilt, um schließlich den Erregerdruck und die vorherrschenden Erreger in den einzelnen Kategorien bestimmen zu können. Drei Proben konnten nicht zugeteilt werden, da die Bestimmung der ZZ nicht erfolgreich durchgeführt wurde.

Die Einteilung erfolgte wie folgt:

Kategorie 1:  $\leq 50.000$  Zellen/ml (n = 261 Proben)

Kategorie 2: 50.001–100.000 Zellen/ml (n = 145)

Kategorie 3: 100.001–250.000 Zellen/ml (n = 123)

Kategorie 4: 250.001–500.000 Zellen/ml (n = 45)

Kategorie 5:  $> 500.000$  Zellen/ml (n = 56)

#### 4.3.1 Zellzahlen in den Zellzahlkategorien der Sammelgemelke

Tab 11: MW und STABW der ZZ der SG in den ZZ-Kategorien 1–5; 1–5 Beprobung; Betrieb A–H

Zellzahlkategorie	Gesamtzahl Proben/Kategorie	Mittelwert Zellzahl	STABW Zellzahl	Minimum Zellzahl	Maximum Zellzahl
1	261	26 <sup>c</sup>	12	4	49
2	145	69 <sup>c</sup>	14	50	100
3	123	153 <sup>bc</sup>	38,9	102	250
4	45	351 <sup>b</sup>	75,1	251	498
5	56	1364 <sup>a</sup>	1473,2	414	8277

<sup>abc</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant.

Kategorie 5 unterscheidet sich betreffend der ZZ von den Kategorien 1–4. Auch Kategorie 4 unterscheidet sich, außer zu Kategorie 3, zu allen anderen Kategorien signifikant ( $P < 0,001$ ). Diese Unterscheidung ist unter den niedrigen ZZ-Kategorien nicht mehr gegeben.

#### 4.3.2 Mastitispathogene der Zellzahlkategorien 1–5 der Sammelgemelke

Tab 12: Anzahl bzw. Anteil der einzelnen Pathogene und des blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien 1–5 der SG; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H

	Kat 1	Kat 2	Kat 3	Kat 4	Kat 5	Gesamt	P-Wert
<i>C. bovis</i>	120	89	80	40	41	370	< 0,001
<i>C. bovis</i> %	45,98 %	61,38 %	65,04 %	88,89 %	73,21 %		
<i>Staphylococcus</i> spp.	224	130	116	42	53	565	0,055
<i>Staphylococcus</i> spp. %	85,82 %	89,66 %	94,31 %	93,33 %	94,64 %		
blaZ-Gen	72	36	50	19	19	196	0,016
blaZ-Gen %	27,59 %	24,83 %	40,65 %	42,22 %	33,93 %		
<i>E. coli</i>	17	13	20	4	13	67	0,001
<i>E. coli</i> %	6,51 %	8,97 %	16,26 %	8,89 %	23,21 %		
<i>S. dysgalactiae</i>	7	4	5	5	9	30	0,0003
<i>S. dysgalactiae</i> %	2,68 %	2,76 %	4,07 %	11,11 %	16,07 %		
<i>S. uberis</i>	19	16	20	14	24	93	< 0,001
<i>S. uberis</i> %	7,28 %	11,03 %	16,26 %	31,11 %	42,86 %		
<i>Enterococcus</i> spp.	8	7	6	3	7	31	0,056
<i>Enterococcus</i> spp. %	3,07 %	4,83 %	4,88 %	6,67 %	12,5 %		
<i>T. pyogenes</i>	7	2	1	1	2	13	0,684
<i>T. pyogenes</i> %	2,68 %	1,38 %	0,81 %	2,22 %	3,57 %		
<i>S. aureus</i>	1	0	0	1	1	3	0,131
<i>S. aureus</i> %	0,38 %	0 %	0 %	2,22 %	1,79 %		
<i>S. marescens</i>	1	1	0	0	1	3	0,669
<i>S. marescens</i> %	0,38 %	0,69 %	0 %	0 %	1,79 %		
Kein Pathogen	21	6	5	1	0	33	0,065
Kein Pathogen %	8,05 %	4,14 %	4,07 %	2,22 %	0 %		
Nur <i>Staphylococcus</i> spp.	78	29	20	1	4	132	n.a.
Nur <i>Staphylococcus</i> spp. %	29,89 %	20,00 %	16,26 %	2,22 %	7,14 %		
<i>Staphylococcus</i> spp. (+ blaZ-Gen)	17	10	7	0	1	35	n.a.
<i>Staphylococcus</i> spp. (+ blaZ-Gen %)	6,51 %	6,90 %	5,69 %	0,00 %	1,79 %		
Nur <i>C. bovis</i>	13	8	2	0	2	25	n.a.
Nur <i>C. bovis</i> %	4,98 %	5,52 %	1,63 %	0,00 %	3,57 %		
Gesamt in Kategorie	261	145	123	45	56		

In Tab. 12 wird die Anzahl bzw. der Anteil positiver Proben eines Pathogens innerhalb einer ZZ-Kategorie berechnet. Der Anteil von *C. bovis* steigt von Kategorie 1 bis Kategorie 4

signifikant an, auch *E. coli* steigt von Kategorie 1 bis 3 und ist in Kategorie 5 am stärksten vertreten. *S. dysgalactiae* und *S. uberis* verzeichnen einen signifikanten Anstieg von Kategorie 1–5 ( $P \leq 0,05$ ). Das blaZ-Gen ist in den Kategorien 3 und 4 signifikant am stärksten vertreten. *Staphylococcus* spp. ist in allen Kategorien mit hohem Anteil vorhanden, am häufigsten jedoch in den Kategorien 3 bis 5. Major-Pathogene sind in geringen Anteilen, trotz des niedrig angesetzten Schwellenwertes von  $\leq 50.000$  Zellen/ml in Kategorie 1, in geringer Anzahl vorhanden. Auch *Enterococcus* spp., *T. pyogenes*, *S. aureus* und *S. marescens* sind in höheren Kategorien verstärkt vorhanden. Weiters wurden in Tab. 12 Pathogene dargestellt, die alleinig in einem SG, ohne Koinfektion mit weiteren Mastitispathogenen, vorkamen. In dieser Diplomarbeit wurden nur *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* in jenen Einzelnachweisen häufig genug angetroffen, um eine Aussage über ihr Verhalten treffen zu können. In der qPCR negative Proben nahmen von Kategorie 1–5 stetig ab ( $P \geq 0,05$ ), genauso wie das Minor-Pathogen *Staphylococcus* spp., dass alleinig nachgewiesen wurde. Bei *C. bovis* im alleinige Nachweis war dieser Abfall bei steigender Kategorie nicht so deutlich zu erkennen.

#### 4.3.3 Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene in den Zellzahlkategorien der Sammelgemelke

Tab 13: MW und STABW des bce der in der SG aufgefunden Pathogene und blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien 1–5; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H

	Kat. 1	Kat. 2	Kat. 3	Kat. 4	Kat. 5	P-Wert
<i>E. coli</i>	45 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	669 <sup>ab</sup>	107 <sup>ab</sup>	2.350 <sup>b</sup>	0,004
STABW	353,0	777,4	6.125,9	484,2	10.710,2	
<i>T. pyogenes</i>	64 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	13.604 <sup>b</sup>	<10 <sup>a</sup>	0,01
STABW	909,5	11,2	6,6	91.258,4	42,0	
<i>S. aureus</i>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	1.972 <sup>b</sup>	60 <sup>ab</sup>	0,01
STABW	9,5	0,0	0,0	13.227,6	451,7	
<i>S. dysgalactiae</i>	2.745 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	3.143 <sup>a</sup>	41.761 <sup>ab</sup>	182.253 <sup>b</sup>	0,02
STABW	37.997,3	377,3	31.272,3	187.815,3	1.238.555,5	
<i>S. uberis</i>	9.019 <sup>a</sup>	14.931 <sup>a</sup>	14.646 <sup>a</sup>	19.400 <sup>ab</sup>	360.222 <sup>b</sup>	0,03
STABW	143.782,4	133.927,8	93.198,7	67.045,7	2.486.174,0	

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich zwischen den ZZ-Kategorien signifikant.

Tabelle 13 zeigt das bce der sich in der ZZ-Kategorie der SG signifikant unterscheidenden Pathogene in den Kategorien 1–5. Das bce von *E. coli* kommt in Kategorie 5 am höchsten vor und unterscheidet sich somit signifikant von Kategorie 1 und 2, in denen das Vorkommen sehr gering ist. Das höchste bce von *T. pyogenes* wurde vor allem in Kategorie 4 detektiert, das nur geringe Vorkommen in Kategorie 5 könnte an der geringen Probenanzahl liegen. Dasselbe kann bei *S. aureus* beobachtet werden. *S. dysgalactiae* ist im Vergleich zu den ersten drei Kategorien signifikant am höchsten in Kategorie 5, genauso *S. uberis*.

Das bce von *Staphylococcus* spp., des blaZ-Gen, *C. bovis*, *Enterococcus* spp. und *S. marescens* zeigt keinen Unterschied in den Zellzahlkategorien. Das bce von *C. bovis* hat prinzipiell einen Einfluss auf eine Einteilung in ZZ-Kategorien ( $P = 0,03$ ), jedoch konnten bei der Einteilung in diese ZZ-Kategorien keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Über *Klebsiella* spp. und *S. agalactiae* konnte keine Aussage getroffen werden, da sie nicht in den SG vorkamen.

Tab 14: MW und STABW des bce der in den SG aufgefundenen *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* bei alleinigem Nachweis in den ZZ-Kategorien 1–5; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H

	Kat. 1	Kat. 2	Kat. 3	Kat. 4	Kat. 5	P-Wert
<b>MW</b> <i>Staphylococcus</i> spp.	15.065 <sup>a</sup>	16.569 <sup>a</sup>	9.800 <sup>a</sup>	22.460 <sup>a</sup>	23.010 <sup>a</sup>	0,968
<b>STABW</b> <i>Staphylococcus</i> spp.	46.673,3	35.334,6	19.181,6	0,0	36.856,3	
<b>MW</b> <i>C. bovis</i>	294.670 <sup>a</sup>	570.052 <sup>ab</sup>	1.658.437 <sup>b</sup>		38.553 <sup>a</sup>	0,016
<b>STABW</b> <i>C. bovis</i>	442.392,8	706.803,1	292.992,1		48.394,4	

Um die klinische Relevanz einer mit *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* infizierten Kuh besser beleuchten zu können, wurde das bce von *C. bovis* und *Staphylococcus* spp. entlang der ZZ-Kategorien der SG berechnet, für Proben in denen *C. bovis* bzw. *Staphylococcus* spp. alleinig vorkamen. Wie in Tab. 14 abgebildet wurde deutlich, dass sich das bce der *Staphylococcus* spp. in keiner der fünf Kategorien signifikant unterschied.

*C. bovis* hingegen kam in Kategorie 3 mit signifikant höchstem bce, verglichen zu den Kategorien 5 und 1 vor, in Kategorie 4 war *C. bovis* nie im Einzelnachweis vorhanden. *C. bovis* in Kombination ist sehr wohl in den hohen ZZ-Kategorien vorhanden.



#### 4.4 Zellzahlkategorien der Tankmilch

Die Einteilung der TAM-Zellzahlkategorien richtete sich nach dem von einigen Molkereien verwendeten Grenzwert von 200.000 Zellen/ml für die S-Klasse:

≤ 200.000 Zellen/ml (n = 29 Proben)

> 200.000 Zellen/ml (n = 11 Proben)

##### 4.4.1 Zellzahlen in den Zellzahlkategorien der Tankmilch

Tab 15: MW und STABW der ZZ der TAM in den ZZ-Kategorien < 200.000 Zellen/ml und > 200.000 Zellen/ml; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H

<b>Zellzahlkategorie</b>	<b>Anzahl Proben</b>	<b>Mittelwert Zellzahl</b>	<b>STABW Zellzahl</b>	<b>Minimum Zellzahl</b>	<b>Maximum Zellzahl</b>
<b>&lt; 200.000 Zellen/ml</b>	29	96 <sup>a</sup>	52,8	20	196
<b>&gt; 200.000 Zellen/ml</b>	11	358 <sup>b</sup>	229,8	209	993

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P = 0,004$ ).

#### 4.4.2 Anteile der Mastitispathogene in den Zellzahlkategorien der Tankmilch

Tab 16: Anzahl bzw. Anteil der einzelnen Pathogene und des blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien < 200.000/ml und > 200.000/ml der TAM; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H

	< 200.000 Zellen/ml	> 200.000 Zellen/ml	
<i>E. coli</i>	2	8	< 0,001
<i>E. coli</i> %	6,9	72,73	
<i>S. uberis</i>	12	10	0,011
<i>S. uberis</i> %	41,38	90,91	
<i>S. aureus</i>	0	3	0,017
<i>S. aureus</i> %	0	27,27	
<i>Enterococcus</i> spp.	7	4	0,694
<i>Enterococcus</i> spp. %	24,14	36,36	
<i>Klebsiella</i> spp.	0	1	0,275
<i>Klebsiella</i> spp. %	0	9,09	
<i>T. pyogenes</i>	0	1	0,275
<i>T. pyogenes</i> %	0	9,09	
<i>S. dysgalactiae</i>	7	4	0,694
<i>S. dysgalactiae</i> %	24,14	36,36	
<i>S. marescens</i>	1	1	1
<i>S. marescens</i> %	3,45	9,09	
<i>Staphylococcus</i> spp.	27	11	0,591
<i>Staphylococcus</i> spp. %	93,1	100	
blaZ-Gen	7	6	0,128
blaZ-Gen %	24,14	54,55	
<i>C. bovis</i>	16	8	0,473
<i>C. bovis</i> %	55,17	72,73	
Kein Pathogen	2	0	0,591
Kein Pathogen %	6,9	0	

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Anzahl bzw. den Anteil der Pathogene in den ZZ-Kategorien der TAM. Die Major-Pathogene *E. coli*, *S. uberis* und *S. aureus* sind statistisch signifikant häufiger in der ZZ-Kategorie > 200.000 Zellen anzutreffen. Alle anderen hier detektierten Pathogene waren auch in der höheren ZZ-Kategorien häufiger vorhanden, dies ist jedoch nicht signifikant. Negativ getestete TAM-Proben (n = 2) kamen nur in der Kategorie < 200.000 Zellen/ml vor.

#### 4.4.3 Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene in den Zellzahlkategorien der Tankmilch

Tab 17: MW und STABW des bce der in der TAM aufgefunden Pathogene und des blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien < 200.000 Zellen/ml und > 200.00 Zellen/ml; 1.–5 Beprobung; Betrieb A–H

Pathogen/blaZ-Gen	< 200.000 Zellen/ml TAM	> 200.000 Zellen/ml TAM	P-Wert
<b><i>E. coli</i></b>	11 <sup>a</sup>	120 <sup>b</sup>	0,022
STABW	41,7	241,6	
<b><i>S. aureus</i></b>	0 <sup>a</sup>	44 <sup>b</sup>	0,013
STABW	0,0	93,2	
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>	1.215 <sup>a</sup>	2.732 <sup>b</sup>	0,013
STABW	1.526,6	1.936,2	
<b><i>C. bovis</i></b>	6.539 <sup>a</sup>	16.581 <sup>a</sup>	0,056
STABW	13.052,1	17.641,4	
<b>blaZ-Gen</b>	13 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	0,062
STABW	43,7	248,4	
<b><i>Klebsiella spp.</i></b>	0 <sup>a</sup>	374 <sup>a</sup>	0,105
STABW	0,0	1.242,0	
<b><i>T. pyogenes</i></b>	0 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0,105
STABW	0,0	2,2	
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	1.972 <sup>a</sup>	987 <sup>a</sup>	0,742
STABW	9.668,3	2.353,7	
<b><i>S. dysgalactiae</i></b>	630 <sup>a</sup>	12.559 <sup>a</sup>	0,123
STABW	1.955,9	41.472,3	
<b><i>S. marescens</i></b>	5.231 <sup>a</sup>	393 <sup>a</sup>	0,576
STABW	28.170,7	1.304,9	
<b><i>S. uberis</i></b>	2.024 <sup>a</sup>	2.537 <sup>a</sup>	0,873
STABW	10.438,2	1.929,5	

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant.

Im Gegensatz zu den SG ist *Staphylococcus* spp. mit höherem bce signifikant häufiger in der ZZ-Kategorie > 200.000 Zellen/ml anzutreffen. Von den Major-Pathogenen ist das bce in der Kategorie > 200.000 Zellen/ml nur von *E. coli* und *S. aureus* signifikant höher als in der Kategorie < 200.000 Zellen/ml (siehe Tab. 17).

Auch bei allen weiteren Pathogenen ist das mittlere bce in der Kategorie > 200.000 Zellen/ml höher, ausgenommen sind *Enterococcus* spp. und *S. marescens* ( $P \geq 0,05$ ).

## 4.5 Betrachtung der Zellzahl und der Mastitispathogene in den verschiedenen Jahreszeiten

### 4.5.1 Zellzahlen in den Jahreszeiten Frühjahr-Sommer-Winter

Tab 18: Mittlere ZZ und STABW der SG in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

Jahreszeit	Mittelwert Zellzahl	STABW Zellzahl	Minimum Zellzahl	Maximum Zellzahl
Frühjahr	119 <sup>a</sup>	236,4	5	1.596
Sommer	271 <sup>b</sup>	829,5	8	8.277
Winter	178 <sup>ab</sup>	326,1	4	2.384

<sup>ab</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P = 0,03$ ).

In Tab. 18 ist die mittlere ZZ der SG in den Jahreszeiten abgebildet. Die höchste ZZ mit der höchsten STABW wird im Sommer erreicht und unterscheidet sich zum Frühjahr, mit der niedrigsten ZZ.

Tab 19: Mittlere ZZ und STABW der TAM in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

Jahreszeit	Mittelwert Zellzahl	STABW Zellzahl	Minimum Zellzahl	Maximum Zellzahl
Frühjahr	105	86,3	26	282
Sommer	200	228,1	34	993
Winter	168	134,7	20	561

In der TAM können keine Unterschiede der ZZ im Bezug auf die Jahreszeiten festgestellt werden ( $P = 0,45$ ).

#### 4.5.2 Verteilung der Mastitispathogene in den Jahreszeiten Frühjahr-Sommer-Winter

Tab 20: Anteil der Pathogene und des blaZ-Gens in den SG in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

	Frühjahr	Sommer	Winter	N gesamt	P-Wert
<b>blaZ-Gen %</b>	26,56	39,68	24,9	13	< 0,001
<b>Staphylococcus spp. %</b>	87,5	94,05	86,56	568	0,014
<b>C. bovis %</b>	59,38	62,3	54,55	371	0,211
<b>E. coli %</b>	4,69	13,49	10,67	67	0,03
<b>Enterococcus spp. %</b>	1,56	6,35	5,14	31	0,126
<b>S. uberis %</b>	7,81	18,25	14,62	93	0,026
<b>T. pyogenes %</b>	6,25	1,19	0,79	13	0,001
<b>Kein Pathogen %</b>	3,13	2,78	8,7	33	0,007
<b>S. aureus %</b>	0,78	0,79	0	3	0,328
<b>S. dysgalactiae %</b>	4,69	5,95	3,95	31	0,572
<b>S. marescens %</b>	0,78	0	0,79	3	0,425

In Tab. 20 ist der prozentuale Anteil des numerischen Vorkommens der Pathogene, des blaZ-Gens und der negativen SG in den drei Jahreszeiten, in denen Proben gezogen wurden, abgebildet. *Staphylococcus* spp., das blaZ-Gen, *C. bovis*, *E. coli*, *Enterococcus* spp. und *S. uberis* werden signifikant häufiger in Proben aus den Sommermonaten nachgewiesen. *T. pyogenes* wurde, als einziges Pathogen, im Frühjahr am häufigsten nachgewiesen. In der qPCR negative Proben wurden vor allem im Winter detektiert ( $P < 0,05$ ).

Tab 21: Anteil der Pathogene und des blaZ-Gens in der TAM in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

	Frühjahr	Sommer	Winter	Gesamt N	P-Wert
<b>blaZ-Gen %</b>	0	56,25	25	13	0,021
<b><i>Enterococcus</i> spp. %</b>	12,5	50	12,5	11	0,043
<b><i>E. coli</i> %</b>	0	31,25	31,25	10	0,227
<b><i>C. bovis</i> %</b>	37,5	62,5	68,75	24	0,404
<b><i>Klebsiella</i> %</b>	0	6,25	0	1	1
<b><i>T. pyogenes</i> %</b>	0	0	6,25	1	1
<b><i>S. uberis</i> %</b>	37,5	62,5	56,25	22	0,647
<b><i>S. aureus</i> %</b>	0	12,5	6,25	3	0,793
<b><i>S. dysgalactiae</i> %</b>	37,5	31,25	18,75	11	0,727
<b><i>S. marescens</i> %</b>	0	12,5	0	2	0,344
<b><i>Staphylococcus</i> spp. %</b>	87,5	100	93,75	38	0,672
<b>Kein Pathogen %</b>	12,5	0	6,25	2	0,672

In Tab. 21 erfolgte die Darstellung, analog zu Tab. 20, mit den TAM-Proben. Deutlich weniger Pathogene zeigten in ihrem jahreszeitlichen Vorkommen signifikante Unterschiede, einzig das blaZ-Gen und *Enterococcus* spp. waren signifikant häufiger im Sommer ( $P < 0,05$ ). Bis auf *S. dysgalactiae* wurden alle Pathogene im Frühjahr am seltensten nachgewiesen. In der qPCR negative Proben waren in der TAM im Frühjahr am häufigsten ( $P > 0,05$ ).

#### 4.5.3 Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene im Verlauf der Jahreszeiten

Diese unterscheidet sich weder bei den SG, noch bei der TAM in den Jahreszeiten signifikant.

#### 4.6 Veränderungen der Zellzahl durch eine unterschiedliche Anzahl an Mastitspathogenen in einem Sammelgemelk

Tab 22: MW und STABW der ZZ, je nach Anzahl der aufgefundenen Pathogene in den SG

Anzahl Pathogene	Anzahl Proben	MW Zellzahl	STABW Zellzahl	Min. ZZ	Max. ZZ
0	33	55 <sup>bc</sup>	68,4	9	362
1	197	87 <sup>c</sup>	188,0	4	2.127
2	264	148 <sup>c</sup>	222,8	5	1.485
3	107	348 <sup>b</sup>	579,1	8	3.118
4	26	1.174 <sup>a</sup>	2.184,6	29	8.277
5	6	452 <sup>bc</sup>	546,8	28	1.313

<sup>abc</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P = < 0,001$ ).

Die STABW steigt mit steigender Pathogenanzahl stark an. Die Proben, in denen vier Pathogene aufgefunden werden, weisen die höchste ZZ, aber auch die höchste STABW auf. Da nur sechs Proben mit fünf Pathogenen vorhanden waren ist diese Gruppe kaum aussagkräftig.

Die Anzahl der Pathogene hat jedoch keinen Einfluss auf die ZZ der TAM ( $P = 0,16$ ).

#### 4.7 Korrelationen des Bacterial Cell Equivalent der detektierten Mastitispathogene mit der Zellzahl

Tab 23: Pathogene, deren bce eine Korrelation zur SG-ZZ aufweist

	<b><i>C. bovis</i></b>	<b><i>S. uberis</i></b>
<b>r-Wert</b>	0,28	0,27
<b>P-Wert</b>	< 0,001	< 0,001

Das bce der Pathogene, die in den SG aufgefunden wurden, weist nur bei *C. bovis* und *S. uberis* eine schwach positive Korrelation zur ZZ auf. In der TAM hingegen korreliert das bce mehrerer Pathogene mit der ZZ (siehe Tab. 23 und Tab.24)

Tab 24: Pathogene, deren bce eine Korrelation zur TAM-ZZ aufweist

	<b>blaZ-Gen</b>	<b><i>C. bovis</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>S. uberis</i></b>	<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>
<b>r-Wert</b>	0,31	0,35	0,56	0,38	0,6	0,51
<b>P-Wert</b>	0,05	0,03	< 0,001	0,02	< 0,001	< 0,001

In der TAM weist das bce des blaZ-Gens und der Pathogene *C. bovis*, und *S. aureus* eine geringe Korrelation, *E. coli*, *S. uberis* und *Staphylococcus spp.* eine moderate Korrelation mit der ZZ auf.



#### 4.8 Korrelation des Bacterial Cell Equivalent der detektierten Mastitspathogene mit der Zellzahl bei Vorliegen der Pathogene in Kombinationen

Tab 25: Korrelation des bce mit der ZZ der SG bei Vorliegen der Pathogene und des blaZ-Gens in den am häufigsten vorkommenden Kombinationen

Kombination	Korrelation bce-ZZ
Nur <i>Staphylococcus</i> spp.	Keine Korrelation
<i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	Keine Korrelation
Nur <i>C. bovis</i>	Keine Korrelation
<i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	Keine Korrelation
<i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	blaZ-Gen $r = 0,29$ ; $P = 0,02$ <i>Staphylococcus</i> spp. $r = 0,3$ ; $P = 0,01$
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	Keine Korrelation
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	Keine Korrelation
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	Keine Korrelation
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	Keine Korrelation
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>E. coli</i> $r = 1$ ; $P < 0,001$ <i>Staphylococcus</i> spp. $r = -1$ ; $P < 0,001$
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	Keine Korrelation
<i>C. bovis</i> + <i>Enterococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>C. bovis</i> $r = -0,79$ ; $P = 0,04$
<i>C. bovis</i> + <i>Enterococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	Keine Korrelation
<i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	Keine Korrelation
<i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	<i>S. uberis</i> $r = 0,75$ ; $P = 0,05$
<i>C. bovis</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. uberis</i> $r = 0,6$ ; $P = 0,01$
<i>C. bovis</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	<i>S. uberis</i> $r = 0,45$ ; $P = 0,04$
<i>C. bovis</i> + <i>S. dysgalactiae</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. dysgalactiae</i> $r = 0,89$ ; $P = 0,01$ <i>Staphylococcus</i> spp. $r = -0,86$ ; $P = 0,01$
<i>C. bovis</i> + <i>S. dysgalactiae</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	Keine Korrelation

#### 4.9 Vergleich der detektierten Pathogenkombinationen bezüglich der Zellzahl und des Bacterial Cell Equivalent

Wird kein Pathogen nachgewiesen, so liegt die mittlere ZZ in den niedrigsten Bereichen, jedoch über der in dieser Diplomarbeit festgelegten Grenze < 50.000 Zellen/ml für Kategorie 1. *Staphylococcus* spp. lassen die ZZ kaum ansteigen und führen zu einer mittleren ZZ von 82.445 bzw. bei Expressierung des blaZ-Gens von 84.114 Zellen/ml SG. Auch *C. bovis* gilt mit einer durchschnittlichen mittleren ZZ von 109.280 Zellen/ml als Minor-Pathogen (siehe Abb.3).

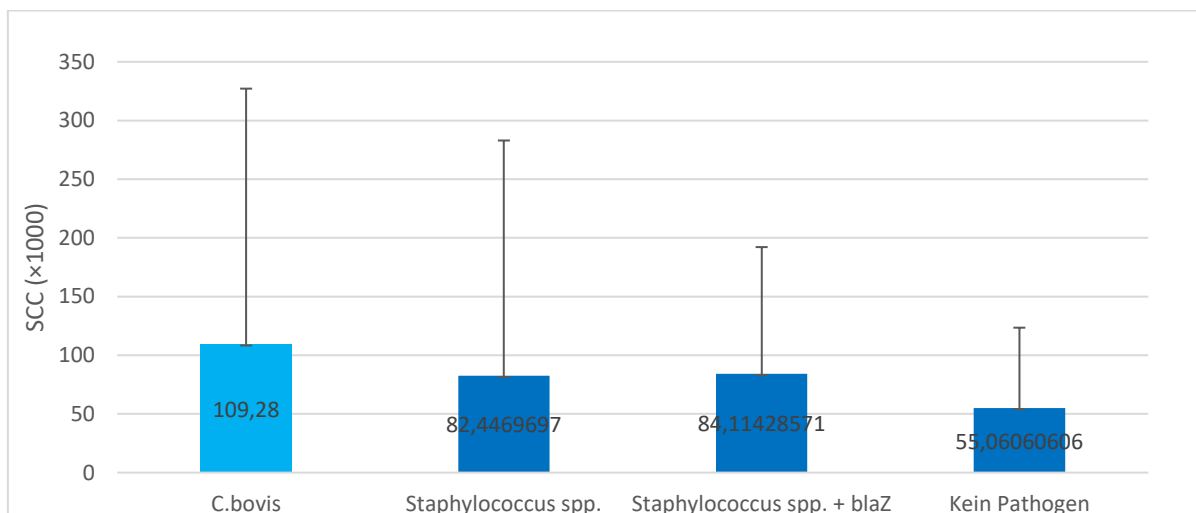


Abb 3: Veränderungen der ZZ bei keinem Pathogennachweis; *Staphylococcus* spp.; *Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen; *C. bovis*

Betrachtet man nun die detektierten unterschiedlichen Pathogenkombinationen wird deutlich, dass in fast allen Kombinationen *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* zusammen, kombiniert mit einem Major-Pathogen vorliegen. Weiters kommen Major-Pathogene in alleiniger Kombination mit *Staphylococcus* spp. vor. Die Kombination von *C. bovis* und einem Major-Pathogen ohne das Vorkommen von *Staphylococcus* spp. konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei Vergleich der Pathogenkombinationen liegen *Staphylococcus* spp. in jeder Kombination bei deutlich geringerem bce vor als *C. bovis*. Bei zusätzlichem Vorhandensein von Major-Pathogenen in der Kombination steigt die ZZ an (siehe Abb.4–6).

*C. bovis* und *S. uberis* führen bei steigendem bce zu einem signifikanten Anstieg der ZZ (siehe Tab.23). Dies ist auch in Abb.4 und Tab.26 bei Vergleich der Kombinationen Nur *C. bovis*, *C. bovis* + *S. uberis* + *Staphylococcus* spp. und *Staphylococcus* spp. + *S. uberis* gut

ersichtlich. Wie in Tab. 25 erkennbar, zeigt auch die Kombination *C. bovis* + *S. uberis* + *Staphylococcus* spp. eine positive Korrelation zur ZZ durch *S. uberis*.

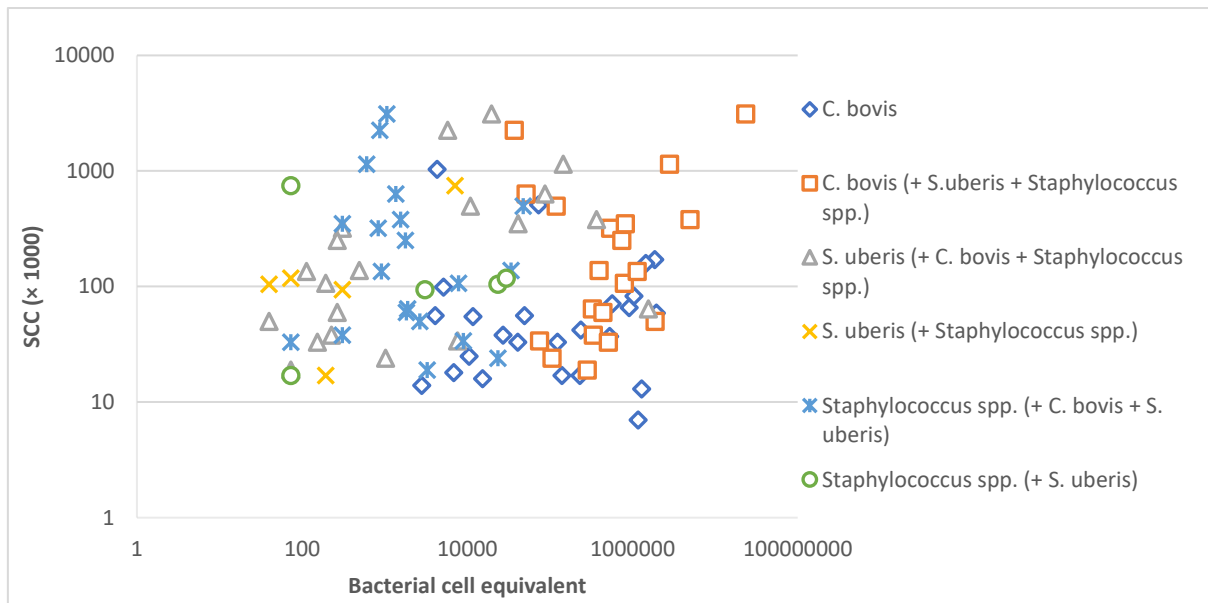


Abb 4: Veränderungen der ZZ und des bce der Pathogene bei Vorhandensein von *S. uberis*, *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* in den Kombinationen: Nur *C. bovis*; *Staphylococcus* spp. + *S. uberis*; *C. bovis* + *Staphylococcus* spp. + *S. uberis*

Tab 26: ZZ und bce von *S. uberis*, *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* in den Kombinationen: Nur *C. bovis*; *Staphylococcus* spp. + *S. uberis*; *C. bovis* + *Staphylococcus* spp. + *S. uberis*

Kombinationen	MW ZZ	STABW ZZ	Min ZZ	Max ZZ	bce <i>C. bovis</i>	bce <i>S. uberis</i>	bce <i>Staphylococcus</i> spp.
Nur <i>C. bovis</i>	109	217,9	7	1037	471.404,267		
<i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	217	300,2	17	749		1.544	11.254,66
<i>C. bovis</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	483	814,6	19	3.118	1.993.993	112.247	7.063

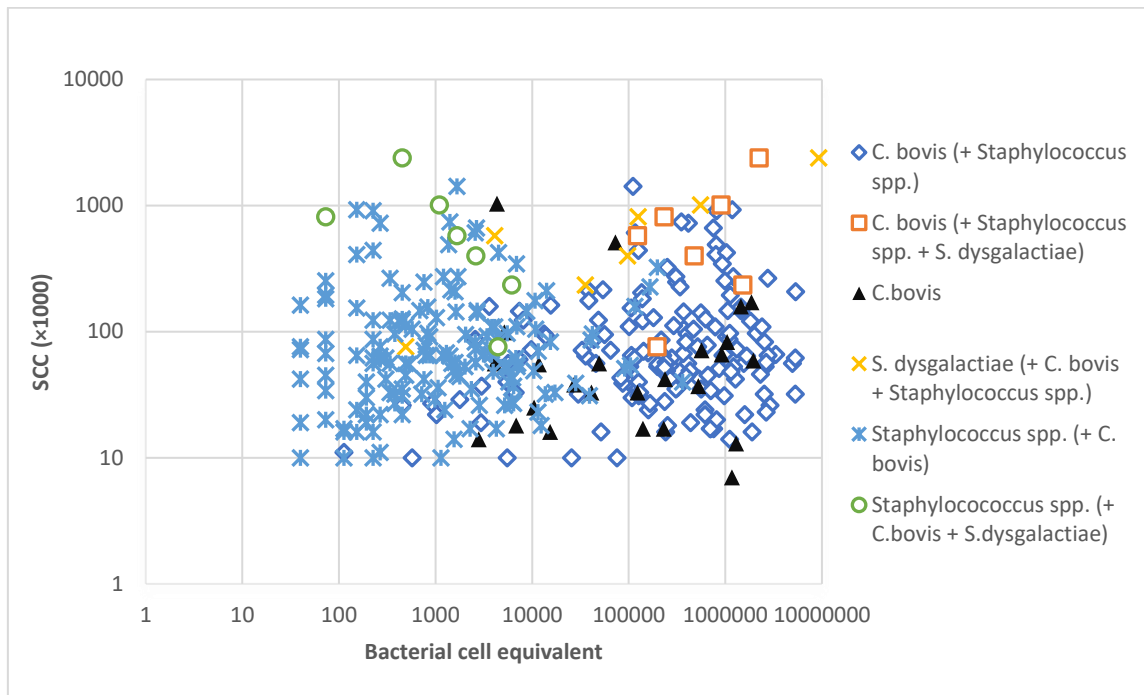


Abb 5: Veränderungen der ZZ und des bce der Pathogene bei Vorhandensein von *C. bovis*, *Staphylococcus* spp. und *S. dysgalactiae* in den Kombinationen: Nur *C. bovis*; *C. bovis* + *Staphylococcus* spp.; *C. bovis* + *Staphylococcus* spp. + *S. dysgalactiae*

In Abb. 5 ist erkennbar, dass *C. bovis* bei alleinigem Vorkommen eine relativ niedrige ZZ hat, die ZZ steigt in Kombination mit *Staphylococcus* spp. an und erreicht ihren Höchstwert in Kombination mit *Staphylococcus* spp. und *S. dysgalactiae*. *S. dysgalactiae* kommt bei hoher ZZ mit hohem bce vor ( $P \geq 0,05$ ).

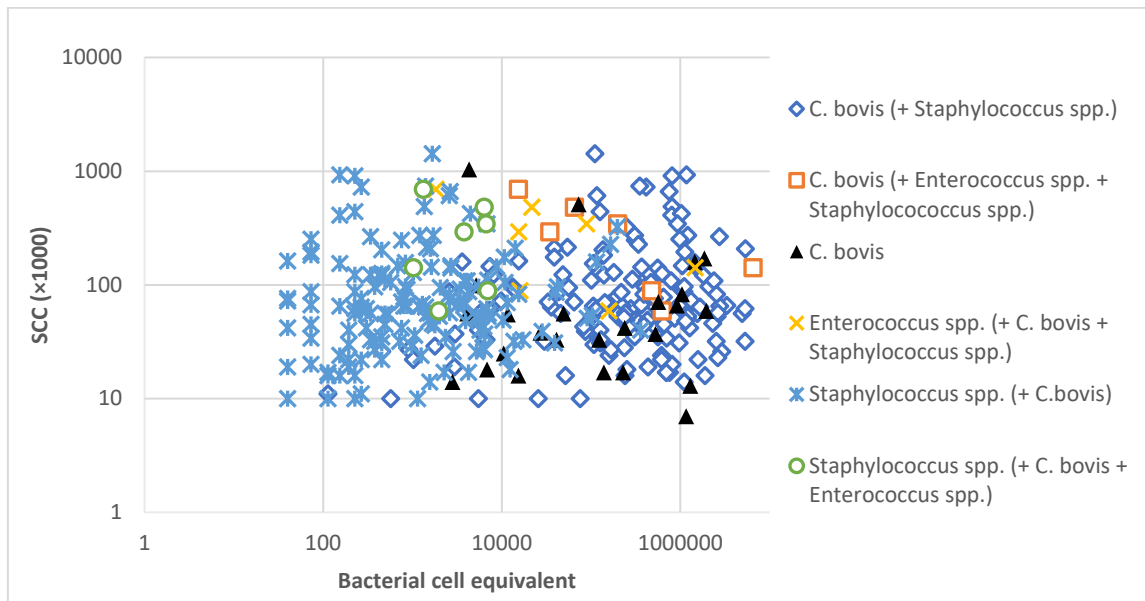


Abb 6: Veränderungen der ZZ und des bce der Pathogene durch das Vorhandensein von *C. bovis*, *Staphylococcus* spp. und *Enterococcus* spp. in den Kombinationen: Nur *C. bovis*; *C. bovis* + *Staphylococcus* spp.; *C. bovis* + *Staphylococcus* spp. + *Enterococcus* spp.

Die ZZ von *C. bovis* und *Staphylococcus* spp. steigt in Kombination mit *Enterococcus* spp. an (siehe Abb.6).

Das bce der *Staphylococcus* spp. der Kombination *C. bovis* + *Enterococcus* spp. + *Staphylococcus* spp. unterscheidet sich signifikant zum bce der *Staphylococcus* spp. der Kombination *C. bovis* + *Staphylococcus* spp. ( $P < 0,001$ ).

#### 4.9.1 Unterschiede in der Zellzahl der Pathogenkombinationen

Tab 27: Die ZZ der vorkommenden Pathogenkombinationen der SG; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H; \*\* Werte sind signifikant unterschiedlich zu anderen Werten

Kombinationen	MW Zellzahl	STABW Zellzahl	Min. Zellzahl	Max. Zellzahl
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	117	66,3	29	204
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	140	144,2	24	580
<i>C. bovis</i> + <i>Enterococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> spp.	301	230,5	59	694
<i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	126	190,8	10	1.421
<i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	169	199,1	12	1.005
<i>C. bovis</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	483	814,6	19	3.118
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	268	400,5	21	1.161
<i>Enterococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> spp.	31	10,1	20	40
Kein Pathogen	55	68,4	9	362
Nur <i>C. bovis</i>	109	217,9	7	1.037
Nur <i>Staphylococcus</i> spp.	82	200,5	4	2.127
<i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	84	108,0	10	594
<i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	292	378,5	20	851
<i>C. bovis</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	260	392,0	9	1.769
<i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	217	300,2	17	749
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	43	50,2	10	169
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen	1.483**	3.207,9	104	8.030

Eine Zuordnung der Pathogenkombinationen zu einer Zellzahlrange scheint nicht möglich, da sich nur eine Kombination, *C. bovis* + *E. coli* + *S. uberis* + *Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen, in der ZZ signifikant von der ZZ anderer Kombinationen der SG unterscheidet ( $P = 0,002$ , Tab. 27).

#### 4.9.2 Unterschiede des Bacterial Cell Equivalent der Pathogenkombinationen

Bei allgemeiner Betrachtung hat die Kombination einen Einfluss auf das bce der zehn am häufigsten nachgewiesenen Pathogene ( $P < 0,001$ ). Bei Betrachtung der einzelnen Pathogene in den detektierten Kombinationen unterscheiden sich einige signifikant (Tab. 28–32).

Tab 28: Kombinationen, in denen sich das bce von *E. coli* unterscheidet. Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung

Kombination	<i>E. coli</i>	STABW	Anzahl
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	20.068 <sup>a</sup>	33.552,1	7
<i>E. coli</i> + <i>S. uberis</i>	1.427 <sup>b</sup>	1.480,2	2
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ	1.419 <sup>b</sup>	1.346,8	6
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ	898 <sup>b</sup>	1.737,1	14
<i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	417 <sup>b</sup>	520,2	6
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ	321 <sup>b</sup>	525,4	9

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant.

Das bce von *E. coli* ist, im Vergleich zu Kombinationen mit anderen Major-Pathogenen, bei gemeinsamem Vorkommen mit dem Minor-Pathogen *Staphylococcus* spp. signifikant am höchsten, hat allerdings eine deutlich höhere STABW (siehe Tab. 28).

Tab 29: Kombinationen, in denen sich das bce von *Enterococcus* spp. unterscheidet; Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung

Kombination	<i>Enterococcus</i> spp.	STABW	Anzahl
<i>C. bovis</i> + <i>Enterococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> spp.	253.731 <sup>a</sup>	540.396,9	7
<i>C. bovis</i> + <i>Enterococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ	11.020 <sup>b</sup>	25.352,8	6

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant.

Tab 30: Kombinationen, in denen sich das bce von *S. dysgalactiae* unterscheidet; Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung

Kombination	<i>S. dysgalactiae</i>	STABW	Anzahl
<b><i>C. bovis</i> + <i>S. dysgalactiae</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.</b>	1.440.770 <sup>a</sup>	3.456.192,2	7
<b><i>C. bovis</i> + <i>S. dysgalactiae</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ</b>	94.448 <sup>b</sup>	130.369,6	6

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant.

*S. dysgalactiae* und *Enterococcus* spp. unterscheiden sich in nur zwei Kombinationen signifikant in ihrem bce: Bei Vorhandensein des blaZ-Gen sinkt das bce in den ansonsten gleichen Kombinationen signifikant ab (siehe Tab. 29 und Tab.30).

Tab 31: Kombinationen, in denen sich das bce von *C. bovis* unterscheidet; Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung

Kombination	<i>C. bovis</i>	STABW	Anzahl
<b><i>C. bovis</i> + <i>E. coli</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ</b>	3.298.553 <sup>a</sup>	7.509.799,3	6
<b><i>C. bovis</i> + <i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ</b>	121.868 <sup>b</sup>	218.669,9	21
<b><i>S. uberis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ</b>	12.714 <sup>b</sup>	21.468,3	7
<b><i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.</b>	1.544 <sup>b</sup>	3.111,4	153

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant.

*C. bovis* unterscheidet sich mit höchstem bce in der Kombination *C. bovis* + *E. coli* + *S. uberis* + *Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen zu Kombinationen, in denen es mit weniger Pathogenen gemeinsam vorkommt.



Tab 32: Kombinationen, in denen sich das bce von *Staphylococcus* spp. unterscheidet; Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung

Kombination	<i>Staphylococcus</i> spp.	STABW	Anzahl
<b><i>C. bovis</i> + <i>Enterococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> + <i>blaZ</i></b>	70.909 <sup>a</sup>	144.427,1	6
<b><i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.</b>	10.072 <sup>b</sup>	38.289,7	153

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant.

*Staphylococcus* spp. die in Kombination mit *C. bovis* nachgewiesen wurden, weisen, wie in Tab. 32 aufgeführt, einen signifikanten Unterschied im bce zur Kombination *C. bovis* + *Enterococcus* spp. + *Staphylococcus* spp. + *blaZ*-Gen auf.

#### 4.10 Korrelationsanalyse zwischen der Zellzahl und dem California Mastitis Test

Der Zusammenhang zwischen ZZ und CMT im Allgemeinen zeigt eine moderate Korrelation an (siehe Tab.33).

Betrachtet man die Betriebe separat, so fällt ein starker Unterschied der Korrelation auf den einzelnen Betrieben auf. Während die Betriebe A, D, E und G eine moderate Korrelation zwischen ZZ und Schalmtest aufweisen, ist die Korrelation bei den Betrieben B und H nur gering, bei den Betrieben C und F gar nicht gegeben. Der Anteil an SG-Proben unter 100.000 Zellen/ml auf den einzelnen Betrieben in Tab. 33 ebenso dargestellt.

Tab 33: Korrelation zwischen dem CMT und der gemessenen ZZ der SG in den Betrieben A–H, 1.–5. Beprobung

Betrieb	Korrelationskoeffizient	P-Wert	Proben < 100.000 Zellen/ml
Alle	0,51885	< 0,001	
A	0,65646	< 0,001	41,25 %
B	0,31816	0,01	76,25 %
C	0,11642	0,30	83,75 %
D	0,52373	< 0,001	40,00 %
E	0,53293	< 0,001	61,73 %
F	0,17791	0,12	87,18 %
G	0,65122	< 0,001	43,75 %
H	0,49205	< 0,001	81,08 %

Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient  $r$  ist schwach bei einem Wert von  $< 0,3$ , gering bei Werten von  $\geq 0,3 - < 0,5$ , moderat bei  $\geq 0,5 - < 0,7$ , stark bei  $\geq 0,7 - < 0,9$  und erheblich bei Werten von  $\geq 0,9 - 1,0$ .

#### 4.11 Betriebsmanagement

Den Aufzeichnungen der Probennahmen wurde entnommen, dass auf allen Betrieben, außer auf Betrieb A und Betrieb E, während der Melkung Handschuhe getragen wurden. Auf dem Betrieb D wurden nur während der 2., 3. und 4. Beprobungen Handschuhe getragen, bei der 1. und 5. Beprobung war dies jedoch nicht der Fall.

Die Euterreinigung wurde auf Betrieb A bei allen fünf Beprobungen mit Einwegpapiertüchern durchgeführt, auf Betrieb B mit Einwegpapiertüchern und zusätzlichem Reinigungsschaum. Betrieb C nutzte Einwegeutertücher mit zusätzlichem Schaum.

In Betrieb D wurde die Art der Reinigung mehrmals geändert: In Beprobung 1 und 2 wurden Handtücher zur Mehrwegreinigung verwendet, in Beprobung 3 Mehrwegeutertücher. Bei der vierten Beprobung wurden schließlich wieder Handtücher verwendet, bei der fünften Beprobung Einwegeutertücher.

Betrieb E verwendete anfangs einen in Labu-cit getränkten Mehrwegwetex. Bei Beprobung 2, 3 und 5 wurden Einwegeutertücher angewandt. In der vierten Beprobung kamen Einwegeutertücher mit zusätzlichem Schaum zum Einsatz. Betrieb F verwendete Holzwolle, die bei jeder Kuh gewechselt wurde. Betrieb G nutzte Einwegpapiertücher, Betrieb H Einwegeutertücher.

Tab 34: Sauberkeit und Trockenheit der Zitzen nach der Reinigung und vor dem Ansetzen des Melkzeugs (S&T: sauber und trocken bzw. NS&T: nicht sauber und trocken); Euterverschmutzung vor dem Ansetzen des Melkzeugs in Schulnoten (1 = sehr sauber); 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Sauberkeit,</b>	S&T-	S&T-	S&T-	N	N	S&T-	N	S&T-
<b>Trockenheit</b>	2	1	1	S&T-	S&T-	1	S&T-	1
<b>Verschmutzungsgrad</b>				3	2		2	

Der HZZ-Betrieb D und der NZZ-Betrieb F waren die einzigen Betriebe, die kein Zitzendippen nach der Melkung bei keiner der fünf Beprobungen durchführten. Die Betriebe A, B, C, E und G verwendeten Dippmittel regelmäßig bei jeder Melkung.

Das Vorgemelk wurde auf den Betrieben D, G und H bei keiner der fünf Beprobungen überprüft. Eigenes Melkzeug für an Mastitis erkrankten Kühen wurde nur auf den Betrieben B, C, D, F und H verwendet. Eine Melkreihenfolge wurde in den Betrieben A, D und F eingehalten.

Tab 35: Mittlerer Verschmutzungsgrad der Kühe; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Verschmutzungsgrad der Kühe</b>	1,49	1,45	1,32	2,84	2,52	3,08	1,61	2,11

Der mittlere Verschmutzungsgrad der Kühe wurde aus den Ergebnissen aller fünf Beprobungen errechnet (siehe Tab.36). Die NZZ-Betriebe C und B wiesen den niedrigsten Verschmutzungsgrad der Kühe auf, darauf folgte allerdings der HZZ-Betrieb A mit der höchsten ZZ. Der NZZ-Betrieb F wies den höchsten Verschmutzungsgrad der Kühe auf.

Tab 36: Durchschnittlicher Verschmutzungsgrad der Euter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Verschmutzungsgrad des Euters</b>	1,7	1	1	1,4	2,2	1	2,3	2

Der Verschmutzungsgrad der Euter wurde nur einmalig, unabhängig von der Melkung, detektiert. Tab. 37 zeigt, dass die NZZ-Betriebe B, C und F den niedrigsten Verschmutzungsgrad aufweisen. Die HZZ-Betriebe A und D hatten jedoch sauberere Euter als der NZZ-Betrieb H.

Tab 37: Durchschnittlicher Verschmutzungsgrad der Liegeboxen; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H

	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Verschmutzungsgrad der Liegeboxen</b>	3	1	1	2	3	1	3	1

Der Verschmutzungsgrad der Liegeboxen wurde nur einmalig detektiert. In Tab. 38 ist ersichtlich, dass die saubersten Liegeboxen allesamt auf den NZZ-Betrieben B, C, F und H aufgefunden wurden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Nachweismethode quantitative Polymerase Kettenreaktion

In der heutigen Milchwirtschaft erlangt die Milchqualität, und damit das Wissen über das Vorhandensein von Mastitispathogenen in einer klinisch gesunden Herde, immer größere Bedeutung. Die qPCR wurde bereits in einigen Studien angewandt (Koskinen et al. 2010, Spittel und Hoedemaker 2012, Keane et al. 2013, Hiitiö et al. 2015, Hiitiö et al. 2016), jedoch wurde in den meisten Studien, die die Prävalenz der Pathogene und den Einfluss der Pathogene auf die ZZ untersuchten, mit dem bisherigen Gold-Standard, der BU, gearbeitet (Barrett et al. 2005, Piepers et al. 2007, Schwarz et al. 2010, Jashari et al. 2016). In der BU wurde in vielen Prävalenzstudien subklinischer Mastitis von einer hohen Zahl an negativen Proben berichtet (Barrett et al. 2005, Koskinen et al. 2010, Schwarz et al. 2010).

Anders als in dieser Arbeit wurden in den meisten Studien Viertelgemelke als Probenmaterial verwendet (Piepers et al. 2007, Schwarz et al. 2010, Koskinen et al. 2010, Spittel und Hoedemaker 2012, Hiitiö et al. 2015, Jashari et al. 2016). Barrett et al. (2005) verwendete SG als Probenmaterial. Schukken et al. (2003) nannte SG sogar als weltweit beste Methode, um subklinische Mastitis zu detektieren. Jedoch fanden Spittel und Hoedemaker (2012) bei Vergleich von Viertelgemelksproben und Sammelgemelksproben in der qPCR 16,2 % falsch-negative Sammelgemelksproben, was diese als Probematerial nicht ideal erscheinen lassen. Es kann argumentiert werden, dass bei der vorliegenden Arbeit durch das Verwenden von SG eine Senkung der Kosten und des Arbeitsaufwandes erreicht werden konnte und dabei trotzdem ein guter Überblick über das Vorhandensein der Pathogene in den Herden aufgezeigt wurde. Das unterschiedliche Probenmaterial, Probenaufarbeitung, sowie unterschiedliche Nachweismethoden anderer Studien erlauben nicht immer direkte Vergleiche zu ziehen.

In dieser Arbeit wurde keine BU durchgeführt, diese aber, aufgrund der fehlenden Studien mit qPCR diskutiert.

In vergleichenden Studien von BU und qPCR erbrachte die qPCR bei vielen Autoren höhere Nachweisraten (Koskinen et al. 2010, Spittel und Hoedemaker 2012, Keane et al. 2013), was die Vergleichbarkeit von Ergebnissen der qPCR und der BU weiter erschwert. In der BU negative Proben wurden in der qPCR zu 43 % (Taponen et al. 2009), 79 % (Keane et al. 2013), 76 % (Koskinen et al. 2010), 47 % (Bexiga et al. 2011), bzw. 46,5 % (Hiitiö et al. 2015) positiv getestet. Ursächlich für diesen höheren Anteil an positiven Proben durch die qPCR könnte z.B. der zusätzliche Nachweis von toten Zellen sein (Koskinen et al. 2010). Weiters fanden Spittel und Hoedemaker (2012) in einer Studie heraus, dass bei *S. aureus*, *S. uberis*,

*Staphylococcus* spp. und *Corynebacterium* spp. der mittlere CT-Wert in der qPCR von in der BU negativen Proben signifikant höher war als bei in der BU positiven Proben, was bedeutet, dass bei in der BU negativen Proben eine nur geringe DNA-Menge vorlag (Hiitiö et al. 2016). Dies spricht für eine geringere Sensitivität der BU im Vergleich zur qPCR, mit der, bereits bei Vorhandensein von geringen Pathogenmengen, ein Nachweis erbracht werden kann (Koskinen et al. 2010, Hiitiö et al. 2015). Der häufigste Nachweis in bakteriologisch-negativen und in qPCR-positiven Proben in vergleichenden Studien war *Staphylococcus* spp. in meist niedriger Nachweismenge (Spittel und Hoedemaker 2012, Hiitiö et al. 2015), sowie *C. bovis* (Spittel und Hoedemaker 2012). Der Nachweis dieser Minor-Pathogene in geringen Mengen wirft Fragen bezüglich deren Relevanz auf. Der normalerweise verwendete cut-off der qPCR für eine positive Probe liegt bei einem CT-Wert von 37,0. CT-Werte über diesem Wert sprechen für zu geringe DNA-Mengen und somit für eine negative Probe (Hiitiö et al. 2015). Dieser bisher verwendete cut-off Wert ist, laut Hiitiö et al. (2015), zu unspezifisch, um tatsächliche Infektionen mit *Staphylococcus* spp. zu detektieren und müsste niedriger angesetzt werden, für *S. aureus* und *S. agalactiae* ist er aber sehr wohl geeignet. Eine Senkung könnte somit dazu führen, wichtige Major-Pathogene zu übersehen die in nur kleinen Mengen vorkommen und trotzdem relevant sind (Koskinen et al. 2010, Hiitiö et al. 2015). *Staphylococcus* spp., bei alleinigem Nachweis in einer Probe, nimmt auch in dieser Arbeit mit 28,17 % der positiven SG-Proben, einen großen Anteil ein. Um deren klinische Relevanz feststellen zu können, wurde das mittlere bce dieser alleinig in einer Probe vorkommenden *Staphylococcus* spp. über die fünf ZZ-Kategorien errechnet. Das bce zeigte jedoch, entgegen unserer Erwartungen, keine signifikanten Unterschiede in den fünf ZZ-Kategorien (siehe Tab. 14), womit es nicht möglich war zwischen einer möglichen Kontamination und Infektion zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit entsprach für *Staphylococcus* spp. ein Ct-Wert von 37,7 der minimalen Nachweisgrenze (<10 Kopien pro Durchlauf). Hiitiö et al. (2015) nennt z.B. eine falsch-positiven Rate von 50 % für *Staphylococcus* spp. in der qPCR und begründet dies mit zu geringem Anwachsen des Pathogens in der BU (< 5 cfu/0,01 ml Milchprobe). Der Mittelwert der ZZ der mit *Staphylococcus* spp. infizierten Tiere in dieser Arbeit lag 30.000 Zellen/ml SG über der mittleren ZZ der negativen Proben, was auf eine leichte Erhöhung der ZZ hindeuten könnte. Dieser Unterschied in der ZZ war jedoch nicht signifikant unterschiedlich ( $P > 0,05$ ). Schwarz et al. (2010) nennen eine etwaige Kontamination bei Vorkommen von *Staphylococcus* spp. bei einer ZZ unter 100.000/ml. Dies wäre bei Betrachtung von Proben in unserer Arbeit, in denen nur *Staphylococcus* spp. nachgewiesen wurde (auch mit Exprimierung des blaZ-Gens), zu 79,29 % der Fall. In der Studie von Hiitiö et al. (2016) wurde

*Staphylococcus* spp. in Viertelgemelksproben unter 100.000 Zellen/ml bei einem, zu unserer Studie vergleichbaren CT-Wert von 37, in 56,3 % der Proben nachgewiesen. Bei einer Senkung des CT-Werts auf 34 erfolgte der Nachweis nur noch in 18,8 % der Proben. Eine Senkung des CT-Werts wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, womit keine Aussage über eine etwaige Änderung der Prävalenz getroffen werden kann.

Die niedrigste ZZ einer nur mit *Staphylococcus* spp. infizierten Kuh lag in dieser Arbeit bei 4.000 Zellen/ml SG mit einem bce von 73,33/ml Milch, was eine sehr geringe Belastung darstellt. Auch wenn keine statistischen Unterschiede des bce der *Staphylococcus* spp. über die ZZ-Kategorien festgestellt werden konnten, können diese oftmals nur geringen Nachweisraten mit nur niedrigem ZZ-Anstieg dazu führen, fälschlicherweise gesunde Kühe als mit Mastitis infiziert zu detektieren (Koskinen et al. 2010). Auch in einer Studie von Hiitiö et al. (2016), in der unter Anwendung einer qPCR eine konventionelle Milchprobenentnahme mit einer Probennahme direkt von der Milchzisterne verglichen wurde, war die Nachweisrate von *Staphylococcus* spp. mit der konventionellen Probenahmetechnik zweimal so hoch, was für eine häufig stattfindende Kontamination durch die Umwelt bzw. durch die Zitzenhaut spricht. Des Weiteren muss das Probenvolumen in Betracht gezogen werden. In dieser Studie wurden 15 ml SG, bzw. 50 ml TAM, als Ausgang für die DNA-Extraktion gewählt, was im Gegensatz zum Einsatz von geringeren Mengen eine höhere Wahrscheinlichkeit ergibt, ein Pathogen zu erfassen.

Die Interpretation von PCR-positiven und bakteriologisch-negativen Proben scheint in der Literatur noch nicht endgültig geklärt (Koskinen et al. 2010, Keane et al. 2013, Hiitiö et al. 2015). Bei alleiniger Verwendung der qPCR als diagnostisches Mittel sollte mit Vorsicht beurteilt werden, vor allem bei geringen Nachweismengen von Minor-Pathogenen. Bexiga et al. (2011) empfehlen die Verwendung einer real-time PCR bei negativen Ergebnissen in der BU, bzw. bei Nachweisen von Minor-Pathogenen in der BU, da zusätzlich vorhandene Major-Pathogene in der BU oftmals nicht detektiert werden.

## **5.2 Mastitispathogene in klinisch gesunden Tieren**

Die 633 mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay untersuchten SG-Proben klinisch gesunder Tiere an fünf Beprobungen in acht Herden waren zu 94,8 % auf mindestens ein Pathogen positiv. In nur 5,2 % der Proben wurde kein Pathogen nachgewiesen. Hiitiö et al. (2016) detektierten 23 % negative Proben bei einem CT-Wert von 40, bei Verwendung von Proben

mit einer durchschnittlichen ZZ von über einer Million, wobei die durchschnittliche ZZ der acht Betriebe in dieser Arbeit über die fünf Beprobungen nur bei 202.979 Zellen/ml SG lag. Eine Erklärung für den höheren Anteil an negativen Proben kann jedoch die Verwendung von Viertelgemelken sein. Barret et al. (2005) wies in einer Studie aus Irland mit 285 Kühen in der BU einen mit 28 % der SG-Proben, im Vergleich zu dieser Arbeit, relativ hohen Anteil an negativen Proben nach, obwohl sie nur Tiere beprobten, die über die letzten drei Milchleistungskontrollen ZZ über 200.000/ml aufwiesen. In unserer Arbeit war von 123 SG mit einer ZZ über 200.000 Zellen/ml nur eine Probe in der qPCR negativ.

Koskinen et al. (2010) detektierten per qPCR in Viertelgemelken von 46 Kühen mit subklinischer Mastitis, Spittel und Hoedemaker (2012) in 681 Viertelgemelksproben klinisch gesunder Tiere mit variabler ZZ, eine Prävalenz von 91 % bzw. 70,6 % positiver Viertel. Koskinen et al. (2010) definierte subklinische Mastitis über eine erhöhte ZZ und beprobte somit nur Kühe mit ZZ ab 296.000 Zellen/ml bis in den Millionenbereich. In der BU wurden bei Jashari et al. (2016) und Piepers et al. (2007) nur 72 % bzw. 40 % infizierte Tiere detektiert. In beiden Studien erfolgte die Beprobung von Tieren mit variabler ZZ. Die größten Unterschiede zu unseren Ergebnissen ergeben sich wieder zu den Studien, die eine BU verwendeten.

Interessanterweise kamen vor allem die Minor-Pathogene *Staphylococcus* spp. (85,8 %) und *C. bovis* (12,7 %) mit alleinigem Nachweis, d.h. ohne das zusätzliche Vorhandensein eines weiteren Pathogens einer SG-Probe dieser Arbeit, vor. Auch Spittel und Hoedemaker (2012) detektierten in Proben mit nur einem Pathogennachweis verstärkt Minor-Pathogene wie *C. bovis* (45,2 %) und *Staphylococcus* spp. (41,3 %). Andere Pathogene waren in unterschiedlichen Mengen als alleiniger Keim vorhanden, variierend von 0–20 %. Wir detektierten noch niedrigere Nachweisraten von Major-Pathogenen die alleinig in einer SG-Probe vorkamen, wie *S. uberis* (1,1 %) und *T. pyogenes* (0,5 %).

*Staphylococcus* spp. gelten als die am häufigsten im Zusammenhang mit subklinischer Mastitis isolierten Pathogene (Taponen und Pyörälä 2009, Sampimon et al. 2009) und kamen auch in dieser Arbeit in nahezu allen Mischinfektionen vor, was sie zu einer Gesamtprävalenz von 94,7 % der positiven SG-Proben bringt. Weiters wurden *Staphylococcus* spp. in allen positiv getesteten TAM-Proben nachgewiesen. Auch Piepers et al. (2007) detektierte in der BU in einer großen Prävalenzstudie in Belgien 99,2 % von 1087 Herden positiv auf *Staphylococcus* spp.



Ein Vergleich der Pathogenprävalenzen unterschiedlicher Studien erscheint schwierig, da die Probenart, die Definition einer infizierten Probe, die Art der Probennahme und schließlich die Nachweismethode (qPCR vs. BU) variieren. Prinzipiell scheint allerdings, wie bereits von Spittel und Hoedemaker (2012) festgestellt, die Reihenfolge der Pathogenprävalenz bei den meisten Studien übereinzustimmen. Auch andere Studien detektierten *Staphylococcus* spp. als häufigste Spezies in subklinisch infizierten Tieren mit variabler ZZ, sowohl bei Studien der BU (Dohoo und Leslie 1991, Pitkälä et al. 2004, Piepers et al. 2007, Schwarz et al. 2010, Jashari et al. 2016) als auch bei Studien der qPCR, wie bei Hiitiö et al. (2015), in der Proben subklinischer und milder klinischer Mastitis untersucht wurden. Interessanterweise wurde in der Studie von Barrett et al. (2005) eine mit 9 % nur sehr geringe Prävalenz von *Staphylococcus* spp. gefunden, sie nennen als Ursache für unterschiedliche Pathogenprävalenzen im Vergleich zu anderen Studien die stark variierenden Haltungs- und Managementbedingungen in Irland.

In unserer Arbeit exprimierten 20,71 % der *Staphylococcus* spp. das blaZ-Gen, bei *S. aureus* wurde es, vermutlich aufgrund der geringen Nachweismenge dieses Pathogens, nicht nachgewiesen. Spittel und Hoedemaker (2012) fanden, ebenfalls mit dem PathoProof PCR Assay, das blaZ-Gen in 27,7 % der *S. aureus* und 37 % der *Staphylococcus* spp.

*C. bovis* kam häufig in Kombinationen mit *Staphylococcus* spp., bzw. *Staphylococcus* spp. und einem Major-Pathogen, mit einer Prävalenz von 61,8 % der positiven SG-Proben, vor. Auch Gonçalves et al. (2014) und Tomazi et al. (2015) sprechen von einer häufigen Isolierung dieses Pathogens, ähnlich den Staphylokokken, im Zusammenhang mit subklinischer Mastitis. In dieser Arbeit war *C. bovis*, nach *Staphylococcus* spp., das zweithäufigste detektierte Pathogen, was auch in anderen Studien bestätigt werden konnte (Pitkälä et al. 2004, Schwarz et al. 2010, Jashari et al. 2016). Supré et al. (2011) und Spittel und Hoedemaker (2012) wiesen *C. bovis*, mit einem Anteil von ca. der Hälfte der detektierten Pathogene als Haupterreger subklinisch infizierter Kühe nach. Pitkälä et al. (2004) nennen als Ursache für eine hohe Prävalenz an *C. bovis* schlechtes Management, wie das mangelnde Zitzendippen. Andere Studien hatten nur niedrige Nachweisraten an *C. bovis*, wie Dohoo und Leslie (1991) mit 9,3 %, bzw. Piepers et al. (2007) mit 0,8 % auf Viertelgemelksebene. Dieses geringe Vorkommen von *C. bovis* in der Studie von Dohoo und Leslie (1991) scheint nicht gut mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar, da hier nur eine einzige Herde beprobt wurde. Weiters könnten niedrige Nachweisraten durch die strenge Definition für eine Infektion (Erhöhung der ZZ auf über 300.000 Zellen/ml an zwei von drei wöchentlich gezogenen

Proben) zustandekommen, wobei Piepers et al. (2007) Herden mit durchschnittlichen TAM-ZZ von 179.000–211.000 Zellen/ml untersuchte und dabei zu einer noch geringeren Nachweisrate von *C. bovis* kam. Über die Managementbedingungen, die das geringe Vorhandensein von *C. bovis* eventuell erklären könnten, lagen weder bei Dohoo und Leslie (1991) noch bei Piepers et al. (2007) Daten vor.

Durch das dauerhafte Auftreten von *Staphylococcus* spp., bzw. Mischinfektionen mit *C. bovis*, stellt sich die Frage, inwieweit diese eine Infektion mit anderen Pathogenen begünstigen können. In der Literatur herrschen gegensätzliche Studien, inwieweit eine vorhergehende Infektion mit Minor-Pathogenen eine Neuinfektion mit Major-Pathogenen begünstigen bzw. verhindern kann. Reyher et al. (2012) fasste 68 Studien zusammen, in denen der Effekt von *C. bovis* und *Staphylococcus* spp. auf Neuinfektionen mit Major-Pathogenen untersucht wurde. Dabei konnte in Beobachtungsstudien kein klarer Zusammenhang zwischen schützendem Effekt der Minor-Pathogene bzw. erhöhter Gefahr einer Neuinfektion erfasst werden. In Challenge-Studien jedoch, in denen Major-Pathogene direkt in das Euter eingebracht wurden, zeigte sich ein schützender Effekt der Minor-Pathogene. Bei größer werdendem Intervall zwischen der Infektion mit dem Minor-Pathogen und dem künstlich eingebrachten Major-Pathogen, sowie bei höherer Menge des Major-Pathogens, nahm die Schutzfunktion jedoch ab (Reyher et al. 2012).

*S. uberis* war das am häufigsten, in 14,8 % der positiven SG-Proben, vorkommende Major-Pathogen, was relativ gut mit dem Ergebnis von Barrett et al. (2005), mit einem Anteil von *S. uberis* in 19 % der positiven SG, übereinstimmt. Auch Schwarz et al. (2010) wies *S. uberis* mit 8,7 % in den Viertelgemelken klinisch gesunder Kühe als zweithäufigstes Major-Pathogen nach. Spittel und Hoedemaker (2012) detektieren *S. uberis* mit 7 % erst an fünfter Stelle, hinter *S. aureus* (9,5 %) und *T. pyogenes* (7,2 %) im Viertelgemelk. Auch in dieser Studie wurden klinisch gesunde Kühe beprobt.

*E. coli* folgte mit 10,6 % positiver SG-Proben an vierter Stelle. Andere Studien wiesen sehr niedrige Prävalenzen an coliformen Keimen in der BU nach (Pitkälä et al. 2004, Piepers et al. 2007, Schwarz et al. 2010). Spittel und Hoedemaker (2012) detektierten in ihrer Studie klinisch gesunder Kühe keine *E. coli* in der BU, dafür handelte es sich bei 0,9 % (n = 6) der positiven Proben in der qPCR um *E. coli*. Von diesen sechs positiven Proben wurde allerdings nur in einer Probe *E. coli* im alleinigen Nachweis detektiert. Auch in der Studie von Keane et al.

(2013) wurde *E. coli* in der qPCR signifikant häufiger mit einem zweiten Pathogen detektiert. Dies stimmt mit unseren Erkenntnissen überein, da *E. coli* in dieser Arbeit nie im alleinigen Nachweis vorkam. Wir konnten in den *E. coli*-positiven Proben nicht bestätigen, dass eine etwaige ZZ-Erhöhung durch *E. coli* verursacht wurde. Es muss beachtet werden, dass coliforme Keime wie *E. coli* auch durch fäkale Kontamination durch unhygienische Bedingungen bei der Probennahme in die Milchprobe gelangen kann (Martin et al. 2016) und somit zu einer höheren Nachweisrate in dieser Arbeit führen könnte. Eine Kontamination durch die Hände bei der Probennahme kann mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, da Handschuhe getragen und diese zwischen den Kühen gewechselt wurden. Eine Inklusion von Negativ-Kontrollen ist von Vorteil, um Hinweise auf Kontaminationen aus dem Umfeld zu bekommen.

*S. dysgalactiae* wurde in 4,9 % der SG-Proben detektiert, was mit den Erkenntnissen von Pitkälä et al. (2004), Barrett et al. (2005) und Piepers et al. (2007) übereinstimmt. *S. dysgalactiae* ist in dieser Arbeit der am häufigsten nachgewiesene kuhassoziierte Erreger.

*S. aureus* wurde in nur drei SG-Proben in zwei Herden nachgewiesen (0,5 %), dazu zählen die Betriebe G und H. Andere Studien hatten, trotz der Untersuchung von Viertelgemelken, höhere Nachweisraten. Die Nachweisraten bewegten sich in klinisch gesunden Herden mit variablen Zellzahlen von 5,01 %–18 % der Viertelgemelke (Dohoo und Leslie 1991, Pitkälä et al. 2004, Piepers et al. 2007, Schwarz et al. 2010, Spittel und Hoedemaker 2012). Barrett et al. (2005) detektierten *S. aureus* bei Tieren mit Zellzahlen > 200.000/ml sogar als Hauptpathogen, nannten als Ursache jedoch wieder andere Managementbedingungen in Irland. Auch in einer großen Prävalenzstudie in Belgien (2007) waren 86,6 % der Herden positiv auf *S. aureus*. Der Betrieb H dieser Arbeit hatte ein Bestandsproblem von *S. aureus* durch Zukauf positiver Kalbinnen im Jahr 2017 (vor den Probennahmen), konnte dies aber, laut den hier generierten Ergebnissen, durch Merzung einiger Tiere gut in den Griff bekommen.

*S. agalactiae* wurde in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. In Österreich kommt *S. agalactiae* selten vor, sodass in den letzten fünf Jahren auf der Universitätsklinik für Wiederkäuer in Wien in nur 0,6 % der positiven Viertelgemelksproben Streptokokken der Lancefield-Gruppe-B, zu denen auch *S. agalactiae* gehört, nachgewiesen werden konnten (Wald et al. 2020). Piepers et al. (2007) berichtete ebenfalls von nahezu keinem Vorkommen von *S. agalactiae* in Belgien, auch in Finnland 2001 war das Vorkommen gering (Pitkälä et al. 2004).

Mastitiskontrollprogramme, wie z.B. von Neave et al. (1969), führten zu einer Reduktion von *S. aureus*. Diese bisherigen Kontrollprogramme sind jedoch gegenüber Umweltkeimen nicht wirksam (Piepers et al. 2007), was auch das hohe Vorkommen von *S. uberis* und *E. coli* in unseren Herden erklären könnte. *Staphylococcus* spp. sind mittlerweile in den meisten Ländern häufiger geworden als *S. aureus*, wobei sie, im Gegensatz zu *S. aureus*, der auch klinische Mastitis auslösen kann, zu keiner schweren Mastitis führen (Taponen und Pyörälä 2009, Supré et al. 2011). Die bisherigen Kontrollprogramme führten somit eher zu einer Veränderung der Pathogenspezies, nicht aber zu einer Senkung der Mastitis-Prävalenz (Pitkälä et al. 2004).

### **5.3 Zellzahl**

#### **5.3.1 Zellzahlen negativer Sammelgemelke**

Die ZZ scheint von vielerlei Faktoren beeinflusst, der Infektionsstatus gilt jedoch als wichtigster Faktor (Schepers et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wird nicht auf andere Faktoren, wie Laktationsstadium, Alter und Umwelt näher eingegangen.

Die ZZ nicht-infizierter Tiere lag bei 55.000 Zellen/ml. Dieser Unterschied war jedoch zu keiner Infektion mit einem Pathogen, bzw. Pathogenkombinationen, signifikant. Zu einer ähnlichen mittleren ZZ kamen Lopes Júnior et al. (2012) mit 52.000 Zellen/ml, allerdings bei Viertelgemelken. Djabri et al. (2002) nannte eine ZZ von 68.000 Zellen/ml für nicht-infizierte Viertel, Gonçalves et al. (2016) ermittelte mit einer mittleren ZZ von 87.770 Zellen/ml bei nicht-infizierten Vierteln einen etwas höheren Wert. Der für SG festgelegte Schwellenwert zwischen gesund und krank scheint, bei Betrachtung unserer Ergebnisse, mit 100.000 Zellen/ml relativ hoch angesetzt. Hier wird sogar die von einigen Autoren festgelegte Grenze, von 70.000 Zellen/ml für Viertelgemelke, unterschritten (Schepers et al. 1997, Djabri et al. 2002). Vom Landeskontrollverbands (LKV) wird allerdings erst Alarm geschlagen, wenn die SG-ZZ von 200.000/ml überschritten wird, bzw. es zu einer Verdopplung der ZZ seit der letzten Probennahme kam und diese dabei eine ZZ über 100.000/ml erreicht (Gehring 2018).

#### **5.3.2 Zellzahl bei Infektion mit Minor-Pathogenen**

Bereits Schepers et al. (1997) fand heraus, dass, im Vergleich zu *S. aureus*, *S. uberis* und *S. dysgalactiae* der ZZ-Anstieg von *Staphylococcus* spp. bzw. *C. bovis* geringer ist. Auch Sampimon et al. (2010) kamen zu diesem Ergebnis. Sie beschrieben aber auch, dass

*Staphylococcus* spp. zu einer höheren ZZ führten als ein negatives Ergebnis der BU. Dieser nur moderate ZZ-Anstieg durch *Staphylococcus* spp. (Taponen und Pyörälä 2009) kann in dieser Arbeit bestätigt werden. Die mittlere ZZ der SG der nur an *Staphylococcus* spp. infizierten Tiere lag bei 82.000 Zellen/ml, exprimierten diese das blaZ-Gen, so lag die ZZ bei 84.000 Zellen/ml. Die etwas höhere ZZ bei Vorhandensein des blaZ-Gens war statistisch nicht signifikant. Damit lag die ZZ immer noch unter der als gesund geltenden SG-ZZ unter 100.000 Zellen/ml (Winter 2009), war allerdings höher als bei der Gruppe der nicht-infizierten Tiere mit durchschnittlichen 55.000 Zellen/ml SG. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant. Lopes Júnior et al. (2012) kamen in der BU von Viertelgemelken zu einem ähnlichen Wert von 85.000 Zellen/ml bei Infektionen mit *Staphylococcus* spp. Schwarz et al. (2010) und Djabri et al. (2002) nannten für *Staphylococcus* spp. höhere als in dieser Studie detektierte ZZ zwischen 100.000 und 200.000 Zellen/ml Viertelgemelk, bzw. eine mittlere ZZ von 138.000 Zellen/ml Viertelgemelk. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind dadurch erklärbar, dass unterschiedliche Spezies des Genus *Staphylococcus* spp. unterschiedliche Auswirkungen auf die ZZ haben, was eine Speziesidentifikation sinnvoll erscheinen lässt (Supré et al. 2011, Fry et al. 2014, Tomazi et al. 2015). Zum Genus *Staphylococcus* spp. gehören viele Spezies, wobei nur wenige tatsächlich Mastitis auslösen können (Taponen und Pyörälä 2009). Supré et al. (2011) fand beispielsweise bei den Spezies *S. chromogens*, *S. simulans* und *S. xylosus* eine ähnliche ZZ-Erhöhung wie bei *S. aureus*. Diese drei Spezies wurden in verschiedenen Studien auch am häufigsten identifiziert, allen voran *S. chromogens* (Sampimon et al. 2009, Persson Waller et al. 2011, Fry et al. 2014, Tomazi et al. 2015). In dieser Arbeit wurde keine Speziesidentifikation durchgeführt.

In unserer Arbeit wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der ZZ-Kategorie und dem von den *Staphylococcus* spp. exprimiertem blaZ-Gen detektiert. Am häufigsten wurde es in den Kategorien 3 und 4 detektiert, vor allem im Vergleich zu den Kategorien 1 und 2. Auf den HZZ-Betrieben A und G wurde es am häufigsten nachgewiesen. Über die Auswirkungen des blaZ-Gens auf die ZZ ist ansonsten noch nichts bekannt und bedarf weiterer Erforschung.

Es herrschen kontroverse Meinungen über *Corynebacterium* spp. als Auslöser subklinischer Mastitis bzw. als reine Kommensale im Zitzenkanal. Manche Studien berichteten von höheren Nachweisraten aus dem Zitzenkanal als bei Entnahme der Probe direkt aus der Zitzenzisterne (Black et al. 1972, Bexiga et al. 2011b). Hiitiö et al. (2016) detektierten *C. bovis* in der qPCR sowohl bei Entnahme der Probe aus der Euterzisterne als auch mit konventioneller

Entnahmetechnik gleichermaßen, was auch auf das Vorhandensein des Pathogens in anderen Teilen des Euters spricht.

Bei Betrachtung aller nachgewiesenen *C. bovis* wurde das Pathogen vor allem in der ZZ-Kategorie 4 angetroffen, jedoch handelt es sich hierbei meist um Proben mit Mischinfektionen, in denen auch Major-Pathogene vorhanden waren, die zu einem Anstieg der ZZ führten. Betrachtet man nun die mittlere ZZ von nur mit *C. bovis* infizierten Kühen dieser Arbeit, ist diese mit 109.280 Zellen/ml SG leicht erhöht. *C. bovis* im alleinigen Nachweis wurde mit signifikant höchstem bce in der ZZ-Kategorie 3 nachgewiesen. In Kategorie 4 erfolgte kein Nachweis von *C. bovis*, in Kategorie 5 war nur ein geringes bce vorhanden. Somit kann klar gesagt werden, dass *C. bovis* bei alleinigem Nachweis nicht befähigt ist, die ZZ stark anzuheben, ein leichter Anstieg der ZZ bestätigt jedoch ihre Zugehörigkeit zur Gruppe der Minor-Pathogene (Gonçalves et al. 2014, Tomazi et al. 2015). Dieser Unterschied in der ZZ war zu nicht-infizierten Eutern jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Interessanterweise scheinen *C. bovis* positive Euter immer ein höheres ZZ-Niveau als *Staphylococcus* spp. positive zu haben. *Corynebacterium* spp. fanden sich bei Schwarz et al. (2010) in der BU vor allem in Proben zwischen 100.000 und 800.000 Zellen/ml. Djabri et al. (2002) nannte eine mittlere ZZ von 105.000 Zellen/ml und damit einen niedrigeren Wert als für *Staphylococcus* spp. In der Studie von Gonçalves et al. (2016) war die mittlere ZZ von mit *C. bovis* infizierten Vierteln bei 174.280 Zellen/ml.

Auch Bexiga et al. (2011b) schließen, trotz ihres Studienergebnisses von *C. bovis* als Kommensale des Strichkanals, eine Infektion durch *Corynebacterium* spp. nicht aus. Supré et al. (2011) und Sampimon et al. (2010) detektierten eine höhere ZZ bei mit *Staphylococcus* spp. infizierten Tieren.

### 5.3.3 Zellzahlen der Zellzahlklassen

Die in dieser Arbeit untersuchten Herden der ZZ-Klasse NZZ hatten nur eine sehr geringe mittlere ZZ von 81.000 Zellen/ml SG und 75.000 Zellen/ml TAM. Die mittlere ZZ der SG liegt somit unter den Schwellenwerten für gesunde SG der angeführten Autoren (LFI 2004, Hamann 2005, Stampa et al. 2006, Winter 2009). In einer Studie aus Hessen lag die mittlere ZZ der TAM von Betrieben mit hoher Qualität bei 180.000 Zellen/ml (Schwarz et al. 2010). Winter (2008) nennt einen Wert von 150.000 Zellen/ml TAM für eine gesunde Herde. Die mittlere TAM-ZZ der NZZ-Betriebe ist deutlich niedriger als dieser Wert.

Die ZZ-Klasse HZZ wies eine mittlere ZZ von 323.000 Zellen/ml SG und 282.000 Zellen/ml TAM auf. Somit lag die Klasse HZZ mit der durchschnittlichen TAM-ZZ nicht mehr in der in Österreich definierten Qualitätsklasse S (Winter 2009).

#### 5.3.4 Zellzahlen der Zellzahlkategorien

Bei der anteilmäßigen Verteilung der Pathogene in den einzelnen Kategorien der SG muss beachtet werden, dass auch Minor-Pathogene wie z.B. *C. bovis* und *Staphyococcus* spp., durch das Vorliegen der Pathogene in Kombinationen, in höheren ZZ-Kategorien vorliegen können.

Eine Senkung des Limits auf 100.000 Zellen/ml für ein gesundes Euter wurde durch die Veränderung der Mastitis erregenden Pathogene zu vermehrten Minor-Pathogenen angesetzt (Pitkälä et al. 2004, Piepers et al. 2007, Schwarz et al. 2010).

Die von uns in dieser Arbeit festgelegte unterste ZZ-Kategorie der SG war mit  $\leq 50.000$  Zellen/ml noch niedriger angesetzt, da ein großer Anteil der Pathogene noch unter der Grenze von 100.000 Zellen/ml SG aufgefunden werden konnte, und wir versuchten, eine möglichst genaue ZZ der negativen Tiere zu ermitteln. Die mittlere ZZ der in der qPCR negativen SG lag jedoch mit 55.061 Zellen/ml knapp über dieser Grenze. Mehr als die Hälfte der in der qPCR negativen Proben wiesen allerdings eine  $ZZ \leq 50.000$  (63,6 %) auf. Keine Pathogennachweise in SG-Proben mit einer ZZ von 100.001–250.000 Zellen/ml (15,2 %), könnten eventuell noch durch andere, wie z.B. nicht-infektiöse Faktoren, erklärt werden. Die in der ZZ-Kategorie 4 liegende Probe (3 %) könnte durch eine falsch-negative Probe begründet werden.

41,2 % der gesamten SG-Proben lagen in der vorliegenden Arbeit in Kategorie 1 ( $\leq 50.000$  Zellen/ml), 64,1 % der SG-Proben unter dem als physiologisch bezeichneten Grenzwert von 100.000 Zellen/ml. In der Studie von Schwarz et al. (2010) lagen ca. 62 % der Viertelgemelke in diesem physiologischen Bereich. In unserer Arbeit waren jedoch 93,7 % der SG-Proben  $< 100.000$  Zellen/ml in der qPCR positiv, während Schwarz et al. (2010) nur 8,5 % positive Viertelgemelksproben in der BU und Koskinen et al. (2010) nur 7,5 % positive Viertelgemelksproben in der qPCR in Proben niedriger ZZ detektierten.

Eine ZZ von 100.000 Zellen/ml spricht für eine Entzündungsreaktion (Winter 2009). Dies würde dafürsprechen, dass in unserem Fall von den 19,9 % der Proben in ZZ-Kategorie 1 und 22,5 % der Proben in ZZ-Kategorie 2 trotz der Anwesenheit von Major-Pathogenen keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird, was auf eine einfache Besiedelung durch diese

Pathogene deutet, bzw. auch durch eine etwaige Kontamination zustandekommen könnte. Schwarz et al. (2010) spricht von einer möglichen subklinischen Mastitis unter 100.000 Zellen/ml. Anders als in der Studie von Schwarz et al. (2010), in der die Prävalenz an Mastitispathogenen < 100.000 Zellen/ml deutlich niedriger war, wurden in unserer Arbeit 25 % der Major-Pathogene in der ZZ-Kategorie 1, sowie 17,92 % in der ZZ-Kategorie 2, aufgefunden.

83,6 % der SG-Proben lagen unter 250.000 Zellen/ml. Der von Schukken et al. (2003) errechnete cut-off zur Detektion einer subklinischen Mastitis von 200.000–250.000 Zellen/ml macht für uns wenig Sinn, da 78,5 % der Proben in den Kategorien 1–3 (bis 250.000 Zellen/ml SG) mindestens ein Pathogen enthalten, 23,4 % der Proben in den Kategorien 1–3 enthalten mindestens ein Major-Pathogen. In der ZZ-Kategorien 4 und ZZ-Kategorie 5 dieser Arbeit waren von 101 Proben 100 Proben positiv in der qPCR. Schwarz et al. (2010) fand in den Viertelgemelksproben > 100.000 Zellen/ml zu 83 % Pathogene an, in unseren SG waren 97,3 % Proben positiv.

Will man Minor-Pathogene nicht außer Acht lassen, so scheint es schwierig einen ZZ-Schwellenwert für subklinische Mastitis zu nennen, bzw. negative Probanden zu detektieren. Dohoo und Leslie (1991) nennen die ZZ als besseren Indikator für eine Infektion, wenn man Minor-Pathogene außer Acht lässt. Jashari et al. (2016) nennen eine Steigerung von Sensitivität und Spezifität bei einer Zellzahl von 200.000 Zellen/ml wenn nur auf die Detektion von Major-Pathogenen geachtet wird.

#### **5.4 Das Bacterial Cell Equivalent im Zusammenhang mit der Zellzahl**

Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, ob Pathogene bei steigendem bce auch zu einem Anstieg der ZZ führten. Bei Betrachtung der SG führte ein steigendes bce von *C. bovis* und *S. uberis* zu einer signifikant höheren ZZ. In der höheren ZZ-Klasse stieg das bce von *E. coli*, *C. bovis* und auch dem blaZ-Gen signifikant an, alle anderen Pathogene, ausgenommen *S. marescens*, waren numerisch ebenfalls in der höheren ZZ-Klasse mit höherem bce vertreten, allerdings nicht signifikant. Wie bereits im Kapitel "Zellzahl der Minor-Pathogene" ausführlich diskutiert wurde, liegt das hohe bce von *C. bovis* in den hohen ZZ-Bereichen hauptsächlich an dessen häufigem Vorkommen in Mischinfektionen. In den ZZ-Kategorien der SG lagen nur die Major-Pathogene *E. coli*, *T. pyogenes*, *S. aureus*, *S. dysgalactiae* und *S. uberis* signifikant mit höherem bce in den höchsten ZZ-Kategorien 4 bzw. 5 vor. Dies lässt



darauf schließen, dass die Menge an ausgeschiedenem Pathogen, wie die Spezies selbst, einen Einfluss auf die Höhe der ZZ hat. Auch Lopes Júnior et al. (2012) fanden in der BU unter Verwendung des Total-Bacterial-Count (TBC) heraus, dass die ZZ bei steigender ausgeschiedener Pathogennummer/ml ansteigt. Weiters kamen sie zu dem Schluss, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer bestimmten ZZ und einem bestimmtem TBC eines Pathogens gab.

Auch in einer Studie von Borneman und Ingham (2014) wurde in der Regressionsanalyse eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Specific-Pathogen-Count (SPC) der BU und der monatlich festgestellten ZZ detektiert. Bei einem Anstieg des SPC stieg auch die ZZ und umgekehrt. Ein nur geringer Korrelationskoeffizient wies daraufhin, dass noch weitere Faktoren die ZZ beeinflussen können. Borneman und Ingham (2014) gingen jedoch nicht auf spezifische Pathogene ein, während Lopes Júnior et al. (2012) bei Vergleich zwischen unterschiedlichen Pathogenen eine unterschiedlich hohe Ausscheidungsmenge detektierten, was auch in dieser Arbeit der Fall war. In ihrer Studie lag der TBC bei *Staphylococcus* spp. nahe an dem der negativen Proben, weiters führte *Staphylococcus* spp., auch zum geringsten ZZ-Anstieg. Diese Erkenntnisse konnten auch in unserer Arbeit getroffen werden, da *Staphylococcus* spp., unabhängig von der Kombination, immer mit geringem bce vorlagen. Unseres Wissens nach gibt es bis jetzt kaum Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem aus der qPCR ermittelten bce und der ZZ untersuchten, daher wurde auch hier wieder auf Studien, die mit einer BU arbeiteten, zurückgegriffen. Hier mangelt es allerdings wieder an der Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Hiitiö et al. (2015) kamen bei einem Vergleich von Colony-Forming-Units/ml (CFU/ml) in der BU und genome copies/ml in der qPCR auf eine gute Korrelation bei *S. aureus* (0,68), allerdings nur auf eine nur moderate Korrelation bei *Staphylococcus* spp. (0,47), obwohl hier nur die Proben untersucht wurden, die in der qPCR und BU denselben Nachweis erbrachten.

Es bedarf weiterer Studien, um eine genaue Aussage über den Einfluss des Pathogen-Loads einzelner Pathogene auf die ZZ festzustellen. Koskinen et al. (2010) schlug bereits vor die Quantifizierung der DNA auch zu nutzen um die Relevanz der Minor-Pathogene als Erreger oder Kommensale zu richtig einzustufen und weist auf die Notwendigkeit weiterer Studien hin.

In der TAM waren die Minor-Pathogene *C. bovis*, *Staphylococcus* spp. und auch das von ihnen exprimierte blaZ-Gen, sowie die Major-Pathogene *E. coli*, *S. uberis* und *S. aureus* mit höherem bce bei höherer ZZ vorhanden. In der höheren ZZ-Klasse der TAM stieg das bce von *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* an. In der ZZ-Kategorie > 200.000 Zellen/ml der TAM war

der bce von *E. coli*, *S. aureus* und *Staphylococcus* spp. signifikant stärker vertreten. Dieser Anstieg von *Staphylococcus* spp., der nur in der TAM zu verzeichnen war, ist auch auf die häufigen Nachweise in fast jeder Probe zurückzuführen, was es bei der starken Verdünnung in der TAM einfacher macht, diese zu detektieren.

In dieser Arbeit wurden aufgrund des häufigen Vorkommens von Mischinfektionen in den SG auch der Einfluss des bce der verschiedenen Pathogene in Kombinationen auf die ZZ untersucht. Betrachtet man die rein aus Minor-Pathogenen bestehende Kombination *C. bovis* + *Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen, so führt ein höheres bce von *Staphylococcus* spp. zu einem Anstieg der ZZ. Betrachtet man jedoch die Kombination *C. bovis* + *S. dysgalactiae* + *Staphylococcus* spp. wird deutlich, dass es durch Zunahme des bce von *S. dysgalactiae* und einer Abnahme des bce der *Staphylococcus* spp. (negative Korrelation) zu einer Zunahme der ZZ kommt. Dies ist auch in der Kombination *C. bovis* + *E. coli* + *S. uberis* + *Staphylococcus* spp. der Fall, in der eine Zunahme von *E. coli* positiv mit der ZZ korreliert, *Staphylococcus* spp. allerdings mit höherer ZZ abnehmen. Allerdings wird auch hier wieder deutlich, dass auch *C. bovis* in einer Kombination nicht zur Erhöhung der ZZ führt. In der Kombination *C. bovis* + *Enterococcus* spp. + *Staphylococcus* spp. zeigt ihr bce eine negative Korrelation zur ZZ. Weiters geht aus Tab.25 hervor, dass, wie bereits bei Betrachtung einzelner Pathogene, das bce von *S. uberis* auch in drei Kombinationen eine positive Korrelation zur ZZ aufweist. Da das Vorkommen von drei oder mehr Pathogenen in einer Probe, vor allem in der BU, als Kontamination angesehen und diese Proben für gewöhnlich nicht weiter bearbeitet werden (Koskinen et al. 2010), gibt es keine vergleichbaren Studien, die sich mit den Auswirkungen des bce unterschiedlicher Pathogene in der Kombination auf die ZZ auseinandersetzen.

## **5.5 Bacterial Cell Equivalent der Mastitispathogene im Zusammenhang mit der Kombination**

*E. coli* hat in Kombination mit *Staphylococcus* spp., im Vergleich zu Kombinationen in denen sich auch Major-Pathogene befinden, ein signifikant höheres bce, allerdings weist *E. coli* in Kombination mit *Staphylococcus* spp., die das blaZ-Gen exprimieren, ein sehr niedriges bce auf. Auch *Enterococcus* spp. und *S. dysgalactiae* weisen, beide in der jeweiligen Kombination mit den beiden Minor-Pathogenen *Staphylococcus* spp. und *C. bovis*, ein höheres bce auf, als bei zusätzlicher Expressierung des blaZ-Gens. Diese Auffälligkeiten werfen die Frage auf, ob

Staphylokokken, die das blaZ-Gen exprimieren, zu einer Unterdrückung des bce der Major-Pathogene befähigt sind.

Das bce von *C. bovis* unterscheidet sich in nur einer Kombination, *C. bovis* + *E. coli* + *S. uberis* + *Staphylococcus* spp. + blaZ-Gen, die sich auch in der ZZ von einigen Kombinationen unterscheidet mit dem signifikant höchsten bce, von Kombinationen, die weniger Pathogene beinhalten.

Da sich das bce von *Staphylococcus* spp. in Kombination mit *C. bovis* nur von einer Kombination, in der ein Major-Pathogen vorkommt, unterscheidet, hat dies kaum eine Aussage im Bezug auf das generelle bce von *Staphylococcus* spp. in Kombination mit Major-Pathogenen.

Unseren Wissens nach gibt es noch keine weiteren Studien, ob und wie sich das bce von Pathogenen in unterschiedlichen Kombinationen unterscheidet. Wir gehen wieder davon aus, dass die Ursache bei den mangelnden Studien liegt, die Proben mit drei oder mehr Pathogenen als relevant betrachten.

## 5.6 Zellzahl und Mastitispathogennachweise auf den Betrieben A–H

Die durchschnittliche ZZ der SG der NZZ-Betriebe liegt bei den Betrieben C, F und H unter der Grenze von 100.000 Zellen/ml, bei Betrieb B mit 102.563 Zellen/ml SG knapp darüber. Verwendet man den ZZ-Schwellenwert des LFI (2004), so ist auch diese durchschnittliche SG-ZZ noch im physiologischen Bereich. Betrieb A liegt mit der durchschnittlichen ZZ von 435.613 Zellen/ml SG deutlich am höchsten. Darauf folgt Betrieb G mit 354,633 Zellen/ml. Betrieb E mit 267.550 Zellen/ml und Betrieb D 233.759 Zellen/ml liegen etwas tiefer, jedoch ebenso deutlich über dem physiologischen Bereich.

Die Betriebe A, D und G liegen mit der durchschnittlichen TAM-ZZ über alle fünf Beprobungen über der festgelegten Qualitätsklasse S (Winter 2009), alle NZZ-Betriebe sogar unter 100.000 Zellen/ml. Schwarz et al. (2010) wies eine durchschnittliche ZZ von 400.000 Zellen/ml in Problembetrieben nach. Dieser Wert wird von keinem der Betriebe erreicht, Betrieb A liegt mit einer TAM-ZZ von 369.800 Zellen/ml knapp darunter.

Betrachtet man nun die Daten, die am Betrieb erhoben wurden, so konnte häufig besseres Management und bessere Hygiene in den NZZ-Betrieben beobachtet werden (Handschuhe während der Melkung, Reinigung der Zitzen bis zur vollständigen Sauberkeit, Untersuchung des Vorgemelks, eigenes Melkzeug für Waste-Milch, Sauberkeit der Liegeboxen). Auch

Barkema et al. (1998) kamen zu dem Schluss, dass die TAM-ZZ durch Management beeinflussbar ist, da auch in ihrer Studie vor allem in den Betrieben mit niedriger TAM-ZZ, im Vergleich zu Betrieben mit mittleren und hohen ZZ, verstärkt auf Hygiene geachtet wurde. In ihrer Studie waren saubere Kühe mit niedriger TAM-ZZ assoziiert. In dieser Arbeit befanden sich die saubersten Kühe auf den NZZ-Betrieben B und C, allerdings erreichten die HZZ-Betriebe A und G bessere Noten *in puncto* Kuh-Sauberkeit als der NZZ-Betrieb H. Betrieb F hatte mit einer Bewertungsnote von 3,08 als NZZ-Betrieb sogar die schmutzigsten Kühe. Betrachtet man nun allerdings die Sauberkeit des Euters (unabhängig von der Melkung), so punkten die NZZ-Betriebe B, C und F mit Bestnoten. Betrieb A und D wiesen trotzdem noch sauberere Euter auf als Betrieb H. Diese Ergebnisse würden nicht klar auf bessere Hygiene der NZZ-Betriebe hindeuten, betrachtet man jedoch die Sauberkeit der Liegeboxen, so konnten nur die NZZ-Betriebe Bestnoten erreichen. Somit scheint, zumindest bei unseren Betrieben, die gesamt-Sauberkeit der Tiere eine untergeordnetere Rolle, aber Sauberkeit beim Melken und auf den Liegeflächen eine deutlich größere Rolle im Bezug auf subklinische Mastitis zu haben.

Trotz der niedrigen SG- und TAM-ZZ in den besten Betrieben der Klasse NZZ gibt es kaum negative SG-Proben. Betrieb H hatte mit 19 negativen Proben mit Abstand die meisten, verglichen zu den Betrieben B, C, und F mit drei, fünf und nur einer negativen Probe. Nachweise von *Staphylococcus* spp. ohne Koinfektion sind in den Betrieben B, C und H höher als in HZZ-Betrieben, Betrieb F hat dafür mit 13 Nachweisen eine hohe Nachweisrate von *C. bovis*. Häufige Nachweise von *C. bovis* konnten auch in den HZZ-Betrieben D und A gemacht werden. Außerdem wiesen alle drei Betriebe ein erhöhtes bce an *C. bovis* in der TAM auf. Ursächlich dafür könnte die fehlende Zitzendesinfektion nach der Melkung auf den Betrieben D und F sein, da Neuinfektionen von *C. bovis* durch Zitzendippen eingedämmt werden können (Eberhart et al. 1983). Dies würde auch die geringe Nachweisrate an *C. bovis* in den NZZ-Betrieben C und H, die bei jeder Melkung eine Zitzendesinfektion durchführten, erklären. Weiters ist die Zitzendesinfektion nach der Melkung assoziiert mit einer niedrigen ZZ (Dufour et al. 2010). Auch in der Studie von Barkema et al. (1998) wurde die Zitzendesinfektion nach der Melkung vor allem in Herden mit niedriger ZZ durchgeführt. Betrieb F weist insgesamt trotzdem eine niedrige ZZ auf. Die relativ hohe Belastung des Umweltkeims *S. uberis* und eine hohe Nachweisrate von *C. bovis* im alleinigen Vorkommen in diesem Betrieb könnte durch Zitzendippen eingedämmt werden, um die ZZ des Betriebs und die Eutergesundheit weiter zu verbessern. Die niedrige ZZ und das gleichzeitig hohe Vorkommen von Umweltkeimen auf

Betrieb F könnte auch an der hohen Rate an schmutzigen Kühen liegen, was bei der Melkung bzw. Probennahme leichter zu Kontamination führen kann. Auch Betrieb D hat eine hohe Belastung an Umweltkeimen, da *E. coli* zehnmal und *S. dysgalactiae* neunzehnmal nachgewiesen wurden. Auch das Tragen von Handschuhen während der Melkung war in der Studie von Dufour et al. (2010) assoziiert mit niedrigeren ZZ, was wir in dieser Arbeit bestätigen konnten.

In den Betrieben A und D wurde in jeder SG-Probe zumindest ein Pathogen nachgewiesen. Allerdings lagen, bis auf Betrieb H, auch alle NZZ-Betriebe auf über 90 % positiver Proben. Diese häufigen Nachweise von Minor-Pathogenen in den vier besten Betrieben dieser Arbeit und deren nur geringe Zahl an negativen SG-Proben lassen deren klinische Aussagekraft als fraglich erscheinen. Major-Pathogene lagen deutlich vermehrt in den HZZ-Betrieben vor. In den Betrieben A, G, E und D waren 60 %, 45 %, 35,8 %, 28,75 % positiv auf mindestens ein Major-Pathogen. Passend dazu waren auch die ZZ der SG in Betrieb A am höchsten und fielen von Betrieb G, zu Betrieb E, zu Betrieb D, ab. Der Umweltkeim *E. coli* wurde signifikant am häufigsten auf den Betrieben A und G nachgewiesen, das bce war auf Betrieb G signifikant am höchsten. Häufige Nachweise von anderen Umweltkeimen wie *Enterococcus* spp. und *S. uberis* erfolgten auf den HZZ-Betrieben A und E, bzw. A und G. Diese häufigen Nachweise an Umweltkeimen könnten an den, vor allem in Betrieb A und G, verschmutzten Liegeboxen liegen und mit häufigerer Reinigung eingedämmt werden. Auch Barkema et al. (1998) nennt Hygiene als wichtigen Managementpunkt zur Minimierung der Ansteckungsraten mit Umweltkeimen. Die Liegeboxen der NZZ-Betriebe wurden allesamt mit Schulnote 1 bewertet, was das geringe Auftreten von Major-Pathogenen in den NZZ-Betrieben erklären könnte. Auch die Euterreinigung der NZZ-Betriebe erhielt Bestnoten. Trotz Verwendung von Einwegeutertüchern in der 5. Beprobung auf Betrieb D, wies diese Beprobung die höchste SG- und TAM-ZZ der fünf Beprobungen auf diesem Betrieb auf, obwohl in den Beprobungen 1–4 Mehrweghandtücher bzw. Mehrwegeutertücher verwendet wurden. Betrieb E wies in der 1. Beprobung, in der ein Mehrwegwetex verwendet wurde, eine höhere ZZ der SG und der TAM als in den Beprobungen 2 und 3, in denen Einwegeutertücher angewandt wurden, auf. Die ZZ war jedoch nicht höher als in der 5. Beprobung, in der ebenso Einwegeutertücher zum Einsatz kamen. In Betrieb E war die ZZ, sowohl der SG als auch der TAM, in der vierten Beprobung, bei Verwendung von Eutertüchern und Schaum, interessanterweise am höchsten. Diese fehlende Senkung der ZZ bei Wechsel auf Einwegprodukte auf den Betrieben D und E können wir uns dadurch erklären, dass nicht effizient genug gereinigt wurde, um saubere und

trockene Zitzen zu erreichen (siehe Tab.34) Die Einwegpapiertücher der Betriebe A und G führten ebenso zu keinen vollständig sauberen Eutern. Auf den Betrieben B, C und H wurde mit den Einwegtüchern effizient genug gereinigt, um die Sauberkeit der Euter mit der Schulnote 1 bewerten zu können. Auch die auf dem Betrieb F angewandte Holzwolle führte zu einem sehr guten Ergebnis.

## 5.7 Jahreszeitliche Veränderung der nachgewiesenen Mastitispathogene und der Zellzahl

In dieser Arbeit kommen die Minor-Pathogene *Staphylococcus* spp. mit dem blaZ-Gen und *C. bovis* signifikant am häufigsten im Sommer vor, im Gegensatz zum Frühjahr und Winter. Auch die Major-Pathogene *E. coli*, *Enterococcus* spp. und *S. uberis* werden signifikant häufiger in Proben aus den Sommermonaten nachgewiesen, ihr Vorkommen unterscheidet sich zum geringen Vorkommen im Frühjahr signifikant. Passend zum vermehrten Vorhandensein der Major-Pathogene ist die ZZ der SG im Sommer signifikant höher als im Frühling. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Riekerink et al. (2007), mit einem Anstieg der SG-ZZ der Kühe von Mai bis August, einem Höchststand im August und einen Abfall im Februar. In ihrer Studie berichteten sie, im Unterschied zu unseren Erkenntnissen, von geringen jahreszeitlichen Unterschieden im Bezug auf das Vorhandensein von Minor-Pathogenen, jedoch stellten auch sie einen Anstieg von *S. uberis* und *E. coli* im Juni, August und Oktober fest. *T. pyogenes* ist das einzige Pathogen in dieser Arbeit, dass signifikant häufiger im Frühjahr vorkommt, obwohl es als Auslöser der Sommermastitis, die meist eher im Spätsommer und Herbst auftritt, gilt (Schulz 2003). In unserer Arbeit wurde es mit 13 Nachweisen allerdings nicht häufig genug detektiert um eine, auch außerhalb dieser Arbeit, aussagekräftige jahreszeitliche Verteilung darzustellen. Die meisten in der qPCR negativen Proben wurden im Winter nachgewiesen, die wenigsten im Sommer.

In der TAM ist das Vorkommen von *Enterococcus* spp. im Sommer signifikant häufiger als im Frühjahr und Winter. McAuley et al. (2015) wiesen *Enterococcus* spp. in der Rohmilch von sechs Molkereien mit einer BU im Sommer mit höheren CFU/ml nach als im Winter. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht ganz mit dem unserer Arbeit vergleichbar, da wir *Enterococcus* spp. im Sommer zwar häufiger nachweisen konnten als im Winter, das bce unterschied sich allerdings bei keinem der detektierten Pathogene in dieser Arbeit in den

Jahreszeiten signifikant. Das blaZ-Gen wird in der TAM im Frühjahr gar nicht nachgewiesen, obwohl 87,5 % der TAM-Proben im Frühjahr auf *Staphylococcus* spp. positiv sind. Bisher konnten wir keine Erklärung für diese geringere Expressierung dieses Gens im Frühjahr finden. Im Sommer zeigt das blaZ-Gen den signifikant höchsten Peak, was durch die zu 100 % auf *Staphylococcus* spp. positive TAM-Proben in dieser Jahreszeit erklärbar ist. In der TAM zeigen sich keine Unterschiede der ZZ in Bezug auf die Jahreszeit. In der Studie von Riekerink et al. (2007) in 300 dänischen Milchviehherden kam es jedoch auch in der TAM zu einem Anstieg der ZZ, über jedes der vier Beobachtungsjahre hinweg, von August bis September. Auch Barkema et al. (1998) detektierte eine Steigung der TAM-ZZ im Sommer und nannte dafür die Temperatur, bzw. auch verringerte Maßnahmen zur Verhinderung der Transmission von Pathogenen bei der Melkung, als Ursache. Die Managementmaßnahmen in den von uns beprobten Betrieben variierten, unseres Wissens nach, kaum über die Jahreszeiten.

Da in dieser Arbeit keine Rücksicht auf weitere Parameter wie das Laktationsstadium, den Abkalbezeitraum und die Tragezeit genommen wurde, und diese ebenso die ZZ und die Inzidenzrate mit Mastitispathogenen um den Abkalbezeitraum beeinflussen können, kann es zu einer Verzerrung der Ergebnisse, was den Einfluss der Jahreszeit auf die Infektion mit bestimmten Pathogenen betrifft, kommen (Riekerink et al. 2007). Allerdings stieg auch in den Studien von Sargeant et al. (1998) und Norman et al. (2000) die TAM-ZZ im Spätsommer und Herbst an. Da sich die TAM-ZZ aus den SG-ZZ zusammensetzt sind diese Ergebnisse zu denen unserer Diplomarbeit trotzdem vergleichbar.

## **5.8 Anzahl der Mastitispathogene in einer Sammelgemelksprobe**

Bis auf die Studie von Hiitiö et al. (2015) mit Proben aus klinischer und subklinischer Mastitis, die in der BU 12,9 % Mischinfektionen, in der qPCR allerdings nur 8,1 % Mischinfektionen detektierte, wurden in anderen vergleichenden Studien vermehrt Mischproben in der qPCR detektiert (Koskinen et al. 2010, Bexiga et al. 2011, Spittel und Hoedemaker 2012, Keane et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde in 68,9 % der SG-Proben mehr als ein Pathogen nachgewiesen. Ein, zwei, drei, vier und fünf Pathogene wurden in 32,8 %, 44 %, 17,8 %, 4,3 % und 1 % der positiven SG-Proben detektiert. Spittel und Hoedemaker (2012) detektierten in Viertelgemelken klinisch gesunder Kühe ein, zwei, drei, vier und fünf Pathogene in 56,3 %, 34,3 %, 7,9 %, 1 % und 0,4 % der positiven Proben. Der geringere Anteil von Pathogenen im alleinigen Nachweis in unserer Arbeit ist durch die Konzentrierung der Pathogene aus allen vier Vierteln in den SG noch verstärkt, wobei in der Studie von Hiitiö et al. (2016) in

Viertelgemelken variabler ZZ auch nur 27,4 % der in der qPCR positiven Proben nur ein Pathogen enthielten. Hiitiö et al. (2015) detektierte in der qPCR in Viertelgemelken eine etwas geringere Anzahl an Proben mit zwei Spezies (20 %) und drei oder mehr Pathogenen (8,1 %). Koskinen et al. (2010) fand von 1000 gezogenen Viertelgemelksproben in 137 Proben klinischer Mastitis, in fünf Proben subklinischer Mastitis und in einer Probe eines durch die niedrige ZZ definierten gesunden Viertels drei oder mehr Pathogene. Dabei waren in den Mischproben der subklinischen Mastitis *Staphylococcus* spp., *C. bovis*, oder auch beide Minor-Pathogene, in neun von zehn Proben, die zwei Spezies enthielten und in allen fünf Proben mit drei oder mehr Spezies, enthalten. Auch in dieser Arbeit waren in fast allen Mischproben *Staphylococcus* spp. enthalten, bzw. *Staphylococcus* spp. in Kombination mit *C. bovis* und weiteren Pathogenen.

Da in der BU die Empfehlung gilt bei drei, bzw. mehr als drei Pathogenen in einer Probe, diese erneut zu ziehen (Koskinen et al. 2010) wurde auch von Hiitiö et al. (2015) die geringe Nachweisrate von Proben mit drei oder mehr Pathogenen, sowohl in der BU als auch in der qPCR, als gute Hygiene bei der Probennahme interpretiert. In einer weiteren Studie von Hiitiö et al. (2016) wurden in der qPCR eine signifikant höhere Zahl an Pathogenen pro Probe bei einer konventionellen Probennahme, im Gegensatz zu einer Probennahme direkt aus der Zitzenzisterne, detektiert, was wieder für Kontamination bei Vorhandensein von mehreren Pathogenen spricht. Würden auch wir von einer Kontamination bei drei oder mehr Pathogenen in der SG-Probe ausgehen, so würde man in unserer Arbeit eine Wiederholung von 22 % der SG-Proben durchführen müssen. Für die qPCR gibt es allerdings dahingehend noch keine Empfehlungen (Spittel und Hoedemaker 2012). In dieser Arbeit wurde deutlich, dass diese vermehrte Anzahl an Pathogenen, vor allem bei Vorhandensein von drei und vier Pathogenen in einer Probe, einen signifikanten Einfluss auf die ZZ hat und somit, mit hoher Wahrscheinlichkeit, nicht von Kontamination rührt.



## **5.9 Der California Mastitis Test im Zusammenhang mit der tatsächlichen Sammelgemelkszellzahl**

Es fällt auf, dass vor allem die Betriebe der ZZ-Klasse HZZ eine Korrelation zwischen tatsächlicher ZZ und CMT aufweisen. Eine höhere Korrelation wird beobachtet, wenn wenige SG-Proben in den ZZ-Kategorien 1 und 2 liegen, da der CMT erst bei einer ZZ von 100.000 Zellen/ml ein positives Ergebnis anzeigt (Winter 2009). Dieser Test ist vor allem als Screening für Kühe, die mit einem Major-Pathogen infiziert sind, geeignet, gute Ergebnisse zu erzielen (Sargeant et al. 2001). Aus unseren Ergebnissen schlussfolgern wir, dass der CMT nicht immer geeignet ist subklinische Mastitis zu detektieren, da die ZZ durch Minor-Pathogene kaum angehoben wird. Weiters ist auch das Vorhandensein von Major-Pathogenen bei niedriger ZZ nicht ausgeschlossen.

## 6 Zusammenfassung

Subklinische Mastitis ist die häufigste Verlaufsform der Mastitis und birgt eine ständige Ansteckungsgefahr für den Rest der Herde, womit deren Überwachung große Bedeutung zukommt. Die Zellzahl ist ein guter Wert zur Vorhersage von Euterinfektionen und eine wichtige Kennzahl der Eutergesundheit und Milchqualität. Die Bakteriologische Untersuchung gilt immer noch als Gold-Standard in der Mastitisdiagnostik, allerdings erlangt die quantitative PCR aufgrund ihrer Sensitivität, der raschen Durchführung und des Nachweises von schwer kultivierbaren Pathogenen, wie z.B. Mykoplasmen, zunehmende Bedeutung.

In dieser Arbeit erfolgte die Probennahme an acht österreichischen Milchviehbetrieben, die aufgrund der durchschnittlichen Vorjahrestankmilchzellzahl in Hohe-Zellzahl-Betriebe (A, D, E, G, Zellzahl > 200.000) und Niedrige-Zellzahl-Betriebe (B, C, F, H, Zellzahl < 200.000) eingeteilt wurden. Auf jedem Betrieb wurden Sammelgemelks- und Tankmilchproben gezogen. Es wurde die Zellzahl ermittelt, DNA mithilfe des PathoProof CompleteKits extrahiert und eine qPCR auf elf Pathogene und das  $\beta$ -Laktamase Gen durchgeführt.

Von 633 untersuchten Sammelgemelken waren nur 33 Proben (5,2 %) in der qPCR negativ. In 197 Proben (31,1 %) wurde ein einzelnes Pathogen detektiert, bei 403 Sammelgemelken (63,7 %) handelte es sich um Mischinfektionen. Das Minor-Pathogen *Staphylococcus* spp. wurde in beinahe jedem Sammelgemelk detektiert. Betriebe mit hoher Zellzahl wiesen eine höhere Nachweisrate an Major-Pathogenen als Betriebe mit niedriger Zellzahl auf, wobei auch Betriebe mit niedrigen Zellzahlen eine hohe Nachweisrate an Minor-Pathogenen aufwiesen. Major-Pathogene wurden in den höheren Zellzahlkategorien der Sammelgemelke vermehrt angetroffen, konnten aber auch in den niedrigen Kategorien, die eigentlich als gesund gelten, nicht ausgeschlossen werden. Ein Großteil der Pathogene der Sammelgemelke wurde vermehrt im Sommer detektiert, was sich auch in der signifikant höchsten Zellzahl im Sammelgemelk in dieser Jahreszeit widerspiegelt.

Die Probenart (Sammelgemelk vs. Viertelgemelk) sowie die Nachweismethode (Bakteriologische Untersuchung vs. qPCR) führten in den bisherigen Studien zu verschiedenen Ergebnissen. Dies erschwert die Interpretation der qPCR Daten. Es ist jedoch klar hervorgegangen, dass Betriebe mit hoher Zellzahl auch in subklinischen Mastitiden höhere Nachweisraten an Mastitis-Pathogenen haben. Die Annahme, dass Mischinfektionen eine Kontamination darstellen, konnten wir mit unseren Ergebnissen nicht bestätigen, da die Anzahl an unterschiedlichen detektierten Pathogenen die Zellzahl veränderte. Es bedarf weiterer Studien, um den Zusammenhang von qPCR Ergebnissen und der Zellzahl zu definieren.

## 7 Summary

Subclinical Mastitis is the most common form of mastitis and harbors a constant risk of infection for other cows in a herd, so monitoring is of major importance. The somatic cell count is an important predictive value to identify intramammary infections, as well as an important index for udder health and milk quality. The gold standard for mastitis diagnostic is still bacteriological culture, but, due to high sensitivity, fast performance, and detection of pathogens that are difficult to culture, like for example mycoplasma, qPCR gains popularity.

In this thesis samples were taken from eight Austrian dairy farms, which were divided in High-Somatic-cell-count-farms (A, D, E, G, Somatic cell count > 200.000) and Low-Somatic-cell-count-farms (B, C, F, H, Somatic cell count < 200.000) based on average previous year's bulk tank milk somatic cell count. On each farm composite milk samples and bulk tank milk samples were taken. The somatic cell count was measured, DNA extracted with the PathoProof CompleteKit, and a quantitative PCR, targeting eleven pathogens and the  $\beta$ -lactamase gen, performed.

Only 33 (5,2 %) of the 633 composite milk samples examined showed a negative result in quantitative PCR. A single pathogen was detected in only 197 (31,1 %) of the samples, 403 composite milk samples (63,7 %) contained mixed infections. The minor pathogen *Staphylococcus* spp. was detected in almost every composite milk sample. The detection rate of major pathogens was higher in High-somatic-cell-count-farms than in Low-somatic-cell-count-farms, but even those had a high infection rate of minor pathogens. Major pathogens were also detected more commonly in composite milk samples of higher somatic cell count, but they couldn't be excluded in the low somatic cell count cows, which were considered healthy. A higher proportion of pathogens could be detected in summer, which goes well with a significantly higher somatic cell count in composite milk samples during this season.

Comparison with previous studies is challenging, due to a different type of sample (composite milk sample vs. quarter milk sample) and different detection method used (bacteriological culture vs. quantitative PCR). However, it was clear that also with qPCR data, herds with a high somatic cell count do face more mastitis pathogens than herds with low somatic cell count in subclinical mastitis. The assumption, that mixed infections are the consequence of contamination, could not be confirmed by the results of this study, because the number of different pathogenes detected, affected somatic cell count. More studies are needed to comprehend the relationship between qPCR data and somatic cell count.

## **8 Förderhinweis**

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens des Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation (FFoQSI) erstellt. Das COMET-K1 Kompetenzzentrum FFoQSI wird im Rahmen von COMET – Competence Centers for Excellent Technologies durch die österreichischen Bundesministerien BMK, BMDW und die Bundesländer Niederösterreich, Oberösterreich und Wien gefördert. Das Programm COMET wird durch die FFG abgewickelt.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

µl: Mikroliter

Abb: Abbildung

AMA: Agrar Markt Austria

Bce: bacterial cell equivalent

BlaZ-Gen: β-Laktamase Gen der Staphylokokken

BU: Bakteriologische Untersuchung

*C. bovis*: *Corynebacterium bovis*

cfu: colony forming units

cm: Centimeter

CMT: California Mastitis Test

CT: cycle treshold

DEPC-Water: Diethylpyrocarbonat-Wasser

*E. coli*: *Escherichia coli*

FRET: Fluoreszenz-Energietransfer

HZZ: Hohe Zellzahl

IAC: Interne-Amplifikations-Kontrolle

KNS: Koagulase-negative Staphylokokken

kPa: Kilopascal

LFI: Ländliches Fortbildungsinstitut

LKV: Landeskontrollverband

log: logarithmisch

Max: Maximum

*M. bovis*: *Mycoplasma bovis*

MgCl<sub>2</sub>: Magnesiumchlorid

Min: Minimum

ml: Milliliter

MW: Mittelwert

n: Anzahl

NS&T: Nicht Sauber und Nicht Trocken

NZZ: Niedrige Zellzahl

*P*: Signifikanz

PBS: Phosphatgepuffertes Salzwasser

PMN: Polymorphnuklärer Neutrophiler Granulocyt

Prob: Signifikanz

qPCR: quantitative Polymerase Kettenreaktion

r: Korrelationskoeffizient nach Pearson

RIS: Rechtsinformationssystem

rpm: rounds per minute

S&T: Sauber und Trocken

*S. agalactiae*: *Streptococcus agalactiae*

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

*S. chromogens*: *Staphylococcus chromogens*

*S. dysgalactiae*: *Streptococcus dysgalactiae*

*S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*

SG: Sammelgemelk

SG-Probe: Sammelgemelksprobe

SG-ZZ: Sammelgemelkszellzahl

*S. haemolyticus*: *Staphylococcus haemolyticus*

*S. marescens*: *Serratia marescens*

spp.: species pluralis

*S. simulans*: *Staphylococcus simulans*

STABW: Standardabweichung

*S. uberis*: *Streptococcus uberis*

Tab: Tabelle

TAM: Tankmilch

TAM-Probe: Tankmilchprobe

TAM-ZZ: Tankmilchzellzahl

TBC: Total Bacterial Count

*T. pyogenes*: *Trueperella pyogenes*

ZZ: Zellzahl

ZZ-Anstieg: Zellzahlanstieg

ZZ-Bereich: Zellzahlbereich

ZZ-Erhöhung: Zellzahlerhöhung

ZZ-Kategorie: Zellzahlkategorie

ZZ-Klasse: Zellzahlklasse

ZZ-Nachweis: Zellzahlachweis

ZZ-Niveau: Zellzahlniveau

ZZ-Schwellenwert: Zellzahlschwellenwert

SPC: Specific Pathogen Count

## 10 Literaturverzeichnis

Agrar Markt Austria. 2019. Änderung der Rohmilch-Bewertung. <https://www.ama.at/Marktinformationen/Milch-und-Milchprodukte/Aktuelle-Informationen/2019/Aenderung-der-Rohmilch-Bewertung> (Zugriff 16.01.2020).

Bagcigil AF, Taponen S, Koort J, Bengtsson B, Myllyniemi A-L, Pyörälä S. 2012. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. *Acta veterinaria Scandinavica*, 54:69.

Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Benedictus G, Brand A. 1998. Management Practices Associated with Low, Medium, and High Somatic Cell Counts in Bulk Milk. *Journal of Dairy Science*, 81:1917–1927.

Barrett DJ, Healy AM, Leonard FC, Doherty ML. 2005. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the Republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 58:333–337.

Baumgartner W, Hrsg. 2014. Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. Achte Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 485–487.

Bexiga R, Koskinen MT, Holopainen J, Carneiro C, Pereira H, Ellis KA, Vilela CL. 2011. Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *Journal of Dairy Research*, 78:49–55.

Bexiga R, Pereira H, Pereira O, Leitao A, Carneiro C, Ellis KA, Vilela CL. 2011b. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. from bovine milk samples by use of a teat cannula. *Journal of Dairy Research*, 78:9–14.

Black RT, Marshall RT, Bourland CT. 1972. Locus of mammary gland infections of *Corynebacterium bovis*. *Journal of Dairy Science*, 55:413–416.

Borneman DL, Ingham S. 2014. Correlation between standard plate count and somatic cell count milk quality results for Wisconsin dairy producers. *Journal of Dairy Science*, 97:2646–2652.



- Boutet P, Gillet L, Closset R, Vanderplasschen A, Bureau F, Lekeux P. 2005. Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis: Possible involvement in persistent accumulation of cells in milk. In: Hogeveen H, Hrsg. Mastitis in dairy production: Current knowledge and future solutions. Erste Aufl. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 208–214.
- Busch U. 2007. Real time PCR. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Basel: Birkhäuser Verlag, 2:111–112.
- Djabri B, Bareille N, Beaudeau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. Veterinary Research, 33:335–357.
- Dohoo IR, Leslie KE. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. Preventive Veterinary Medicine, 10:225–237.
- Dohoo IR, Meek AH. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. Canadian Veterinary Journal, 23(4):119–125.
- Dufour S, Fréchette A, Barkema HW, Mussell A, Scholl DT. 2010. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. Journal of Dairy Science, 94:563–579.
- Eberhart RJ, Le Van PL, Griel LC Jr. 1983. Germicidal Teat Dip in a Herd with Low Prevalence of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* Mastitis. Journal of Dairy Science, 66:1390–1395.
- Edmondson PW, Bramley AJ. 2004. Mastitis. In: Andrews AH, Hrsg. Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle. Zweite Aufl. Oxford: Blackwell Science Ltd. A Blackwell Publishing Company, 326–335.
- El Feghaly RE, Stamm JE, Fritz SA, Burnham C-AD. 2012. Presence of the blaZ beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 74:388–393.

Fry PR, Middleton JR, Dufour S, Perry J, Scholl D, Dohoo I. 2014. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97:4876–4885.

Gehring M. 2018. LKV Kennzahl: Block Eutergesundheit.

<https://noe.lko.at/lkv-kennzahl-block-eutergesundheit+2500+2800302> (Zugriff: 03.02.2021)

Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, Beuron DC, Arcari MA, Hwa In Lee S, Rodrigues Martins CM, Araújo Junior JP, Dos Santos MV. 2016. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. *The Veterinary Journal*, 209:87–92.

Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, Braga PA., Ferreira CR., Araújo Junior JP, Eberlin MN, Dos Santos MV. 2014. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 173: 147–151.

Green MJ, Green LE, Medley GF, Schukken YH, Bradley AJ. 2002. Influence of Dry Period Bacterial Intramammary Infection on Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 85:2589–2599.

Grunert E, Hoedemaker M, Weigt U. 1996. Euterkrankheiten. In: Grunert E, Hrsg. *Buiatrik Band 1: Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. Fünfte Aufl. Hannover: Verlag M. & H. Schaper Alfeld, 21–69.

Hamann J. 2005. Diagnosis of mastitis and indicators of milk quality. In: Hogeveen H, Hrsg. *Mastitis in dairy production: Current knowledge and future solutions*. Erste Aufl. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 82–90.

Hiitiö H, Riva R, Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen J, Pyörälä S, Pelkonen S. 2015. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *Journal of Dairy Research*, 82:200–208.

Hiitiö H, Simojoki H, Kalmus P, Holopainen J, Pyörälä S, Taponen S. 2016. The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. *Journal of Dairy Science*, 99:6532–6541.

Hill P.J, Gordon S.A.B.S. 1992. The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Micro-biology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 10:1, 343–378.

Jashari R, Piepers S, De Vliegher S. 2016. Evaluation of the composite milk somatic cell count as a predictor of intramammary infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 99:9271–9286.

Keane OM, Budd KE, Flynn J, McCoy F. 2013. Increased detection of mastitis pathogens by real-time PCR compared to bacterial culture. *Veterinary Record*, doi:10.1136/vr.101598.

Koskinen MT, Holopainen J, Pyörälä S, Bredbacka P, Pitkälä A, Barkema HW, Bexiga R, Roberson J, Sølverød L, Piccinini R, Kelton D, Lehmusto H, Niskala S, Salmikivi L. 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 92:952–959.

Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, Van Haeringen WA, Lam JGM, Pyörälä S. 2010. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93:5707–5715.

Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M. 2013. Eutergesundheit und Milchqualität. In: Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M, Hrsg. *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. Dritte Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 91–128.

Landeskontrollverband Berlin-Brandenburg eV. 2018.  
[https://www.lkvbb.de/fileadmin/formularcenter/Mastitislabor/Faltblatt-PCR\\_0\\_.pdf](https://www.lkvbb.de/fileadmin/formularcenter/Mastitislabor/Faltblatt-PCR_0_.pdf) (Zugriff 27.09.2019)

Landeskontrollverband

Österreich.

[https://lkv.at/at/doorpage/?we\\_objectID=250#:~:text=Die%20Leistungspr%C3%BCfung%20wird%20je%20nach,Oktober%20und%20endet%20am%2030](https://lkv.at/at/doorpage/?we_objectID=250#:~:text=Die%20Leistungspr%C3%BCfung%20wird%20je%20nach,Oktober%20und%20endet%20am%2030) (Zugriff: 03.02.2021)

LFI- Ländliches Fortbildungsinstitut, Hrsg. 2004. Eutergesundheit 2004. Linz: Denkmayr Druck.

Livermore DM. 1995.  $\beta$ -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clinical Microbiology Reviews, 8:557–584.

Lopes Júnior JEF, Lange CC, Brito MAVP, Santos FR, Silva MAS, Moraes LCD, Souza GN. 2012. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. Ciência Rural, Santa Maria v.42, 4:691–696.

Lyon BR, Skurray R. 1987. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. Microbiological Reviews, 51:88–134.

Martin NH, Trmcic A, Hsieh T, Boor KJ, Wiedmann M. 2016. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. Frontiers in Microbiology, 7:1549.

McAuley C, Britz ML, Gobius KS, Craven HM. 2015. Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. Journal of Dairy Science, 98:8348–8358.

Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR. 1969. Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management. Journal of Dairy Science, 52:696–707.

Norman HD, Miller RH, Wright JR, Wiggans GR. 2000. Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement. Journal of Dairy Science, 83:2782–2788.

Persson Waller K, Aspán A, Nyman A, Persson Y, Grönlund Andersson U. 2011. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. Veterinary Microbiology, 152:112–116.

Piepers S, Meulemeester L, Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, Vliegheer S. 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, 74:478–483.

Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. 2004. Bovine Mastitis in Finland 2001-Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science*, 87:2433–2441.

Pitkälä A, Salmikivi L, Bredbacka P, Myllyniemi A-L, Koskinen MT. 2007. Comparison of Tests for Detection of beta-Lactamase-Producing Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:2031–2033.

Reyher KK, Haine D, Dohoo IR, Revie CW. 2012. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens - A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 95:6483–6502.

Riekerink RO, Barkema HW, Stryhn H. 2007. The Effect of Season on Somatic Cell Count and the incidence of Clinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90:1704–1715.

RIS. Erzeuger-Rahmenbedingungen-Verordnung.

<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20009330> (Zugriff 15.02.2021)

Sampimon OC, Barkema HW, Berends IM, Sol J, Lam TJ. 2009. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 134:37–44.

Sampimon O, Van den Borne BHP, Santman-Berends I, Barkema HW, Lam T. 2010. Effect of coagulase-negative staphylococci on somatic cell count in Dutch dairy herds. *Journal of Dairy Research*, 77:318–324.

Sargeant JM, Leslie KE, Shirley JE, Pulkrabek BJ, Lim GH. 2001. Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 84:2018–2024.

Sargeant JM, Schukken YH, Leslie KE. 1998. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: Progress and outlook. *Journal of Dairy Science*, 81:1545–1554.

Sawant AA., Gillespie BE, Oliver SP, 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Veterinary Microbiology*, 134: 73–81.

Schepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA. 1997. Estimation of Variance Components for Somatic Cell Counts to Determine Thresholds for Uninfected Quarters. *Journal of Dairy Science*, 80:1833–1840.

Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34:579–596.

Schulz J. 2003. Milchhygiene und Eutergesundheit: Eutergesundheit beim Rind. In: Fahr R-D, Von Lengerken G, Hrsg. *Milcherzeugung: Grundlage-Prozesse-Qualitätssicherung*. Erste Aufl. Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag, 469–496.

Schwarz D, Diesterbeck US, Failing K, König S, Brügemann K, Zschöck M, Wolter W, Czerny C-P. 2010. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany - A longitudinal study. *Journal of Dairy Science*, 93:5716–5728.

Spittel S, Hoedemaker M. 2012. Mastitis diagnosis in dairy cows using PathoProof real-time polymerase chain reaction assay in comparison with conventional bacterial culture in a Northern German field study. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 125, 11/12:494–502.

Stampa F, Brunotte-Schütte G, Kalchreuter S. 2006. *Handbuch Mastitis*. Osnabrück: Kamlage Verlag.

Supré K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Vaneechoutte M, Piepers S, Vlieghe S. 2011. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*, 94: 2329–2340.

Suriyasathaporn W, Schukken YH, Nielsen M, Brand A. 2000. Low Somatic Cell Count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 83:1248–1255

Taponen S, Pyörälä S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as a cause of bovine mastitis - Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134: 29–36.

Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen MT, Pyörälä S. 2009. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*, 92:2610–2617.

Thermo Scientific Protocol Book PathoProof Complete-16 kit. 2015.

<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D14910-02-PathoProof%20Complete-16%20IFU.pdf> (Zugriff: 15.02.2021)

Tomazi T, Gonçalves JL, Barreiro JR, Arcari MA, Dos Santos MV. 2015. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *Journal of Dairy Science*, 98: 3071–3078.

Tröger F. 2003. Milchgewinnung. In: Fahr R-D, Von Lengerken G, Hrsg. *Milcherzeugung: Grundlage-Prozesse-Qualitätssicherung*. Erste Aufl. Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag, 367–445.

Wald R, Lichtmannsberger K, Urbantke V, Hess C, Spargser J, Baumgartner M. 2020. Nachweis von *Streptococcus agalactiae* Sequenztyp 1 in einem österreichischen Milchviehbetrieb – Ein Fallbericht. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 107:147–155.

Winter P, Hrsg. 2009. *Praktischer Leitfaden Mastitis: Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand*. Erste Aufl. Stuttgart: Parey.

Yang F, Wang Q, Wang X, Wang L, Xiao M, Xinpu L, Luo J, Zhang S, Li H. 2015. Prevalence of blaZ-Gen gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 39:634–636.

Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in Staphylococci. Science, 291:1962–1964.



## 11 Abbildungsverzeichnis

Abb 1: Mittlere ZZ mit STABW der SG der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung; <sup>abcd</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ) .....	33
Abb 2: Mittlere ZZ mit STABW der TAM der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung; <sup>ab</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ) .....	33
Abb 3: Veränderungen der ZZ bei keinem Pathogennachweis; <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Staphylococcus</i> spp. + blaZ-Gen; <i>C. bovis</i> .....	52
Abb 4: Veränderungen der ZZ und des bce der Pathogene bei Vorhandensein von <i>S. uberis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. und <i>C. bovis</i> in den Kombinationen: Nur <i>C. bovis</i> ; <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>S. uberis</i> ; <i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>S. uberis</i> .....	53
Abb 5: Veränderungen der ZZ und des bce der Pathogene bei Vorhandensein von <i>C. bovis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. und <i>S. dysgalactiae</i> in den Kombinationen: Nur <i>C. bovis</i> ; <i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>S. dysgalactiae</i> .....	54
Abb 6: Veränderungen der ZZ und des bce der Pathogene durch das Vorhandensein von <i>C. bovis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. und <i>Enterococcus</i> spp. in den Kombinationen: Nur <i>C. bovis</i> ; <i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Enterococcus</i> spp. ....	55

## 12 Tabellenverzeichnis

Tab 1: Häufigkeit der detektierten Pathogene in den 600 positiv getesteten SG-Proben; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H .....	29
Tab 2: Häufigkeit der detektierten Pathogene in den 38 positiv getesteten TAM-Proben; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H .....	29
Tab 3: Mittelwerte und STABW der ZZ der SG, eingeteilt in die ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H) ; 1.–5. Beprobung .....	30
Tab 4: Mittelwerte und STABW der ZZ der TAM, eingeteilt in die ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H); 1.–5. Beprobung .....	30
Tab 5: Mittleres bce der Pathogene und des blaZ-Gens in den SG mit Vergleich zwischen den ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H); 1.–5. Beprobung .....	31
Tab 6: Mittleres bce der Pathogene und des blaZ-Gens in der TAM mit Vergleich zwischen den ZZ-Klassen HZZ (Betrieb A, D, E, G) und NZZ (Betrieb B, C, F, H); 1.–5. Beprobung...	32
Tab 7: Anzahl der SG-Proben nach Betrieben, die positiv auf das jeweilige Pathogen oder das blaZ-Gen getestet wurden; Betrieb A–H; 1.–5. Beprobung .....	34
Tab 8: Anzahl der Pathogennachweise in den SG-Proben der Betriebe A–H, SG-Proben ohne Pathogennachweis, der alleinige Nachweis von den Minor-Pathogenen Staphylococcus spp., Staphylococcus spp. + blaZ-Gen und C. bovis, sowie die Nachweishäufigkeit von Major-Pathogenen in den SG; 1.–5. Beprobung .....	35
Tab 9: MW und STABW des bce der Pathogene und des blaZ-Gens in den SG der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung .....	37
Tab 10: MW und STABW des bce der Pathogene und des blaZ-Gens in der TAM der Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung .....	38
Tab 11: MW und STABW der ZZ der SG in den ZZ-Kategorien 1–5; 1–5 Beprobung; Betrieb A–H .....	39

Tab 12: Anzahl bzw. Anteil der einzelnen Pathogene und des blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien 1–5 der SG; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H .....	40
Tab 13: MW und STABW des bce der in der SG aufgefundenen Pathogene und blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien 1–5; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H .....	41
Tab 14: MW und STABW des bce der in den SG aufgefundenen Staphylococcus spp. und C. bovis bei alleinigem Nachweis in den ZZ-Kategorien 1–5; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H .....	42
Tab 15: MW und STABW der ZZ der TAM in den ZZ-Kategorien < 200.000 Zellen/ml und > 200.000 Zellen/ml; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H .....	43
Tab 16: Anzahl bzw. Anteil der einzelnen Pathogene und des blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien < 200.000/ml und > 200.000/ml der TAM; 1.–5. Beprobung; Betrieb A–H .....	44
Tab 17: MW und STABW des bce der in der TAM aufgefundenen Pathogene und des blaZ-Gens in den ZZ-Kategorien < 200.000 Zellen/ml und > 200.00 Zellen/ml; 1.–5 Beprobung; Betrieb A–H .....	45
Tab 18: Mittlere ZZ und STABW der SG in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	46
Tab 19: Mittlere ZZ und STABW der TAM in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	46
Tab 20: Anteil der Pathogene und des blaZ-Gens in den SG in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	47
Tab 21: Anteil der Pathogene und des blaZ-Gens in der TAM in den Jahreszeiten Frühjahr, Sommer und Winter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	48
Tab 22: MW und STABW der ZZ, je nach Anzahl der aufgefundenen Pathogene in den SG .....	49
Tab 23: Pathogene, deren bce eine Korrelation zur SG-ZZ aufweist.....	50

Tab 24: Pathogene, deren bce eine Korrelation zur TAM-ZZ aufweist .....	50
Tab 25: Korrelation des bce mit der ZZ der SG bei Vorliegen der Pathogene und des blaZ-Gens in den am häufigsten vorkommenden Kombinationen .....	51
Tab 26: ZZ und bce von <i>S. uberis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. und <i>C. bovis</i> in den Kombinationen: Nur <i>C. bovis</i> ; <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>S. uberis</i> ; <i>C. bovis</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>S. uberis</i> . .....	53
Tab 27: Die ZZ der vorkommenden Pathogenkombinationen der SG; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H; ** Werte sind signifikant unterschiedlich zu anderen Werten.....	56
Tab 28: Kombinationen, in denen sich das bce von <i>E. coli</i> unterscheidet. Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung .....	57
Tab 29: Kombinationen, in denen sich das bce von <i>Enterococcus</i> spp. unterscheidet; Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung .....	57
Tab 30: Kombinationen, in denen sich das bce von <i>S. dysgalactiae</i> unterscheidet; Betriebe A– H; 1.–5. Beprobung.....	58
Tab 31: Kombinationen, in denen sich das bce von <i>C. bovis</i> unterscheidet; Betriebe A–H; 1.– 5. Beprobung .....	58
Tab 32: Kombinationen, in denen sich das bce von <i>Staphylococcus</i> spp. unterscheidet; Betriebe A–H; 1.–5. Beprobung .....	59
Tab 33: Korrelation zwischen dem CMT und der gemessenen ZZ der SG in den Betrieben A– H, 1.–5. Beprobung.....	60
Tab 34: Sauberkeit und Trockenheit der Zitzen nach der Reinigung und vor dem Ansetzen des Melkzeugs (S&T: sauber und trocken bzw. NS&T: nicht sauber und trocken); Euterverschmutzung vor dem Ansetzen des Melkzeugs in Schulnoten (1 = sehr sauber); 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	61
Tab 36: Mittlerer Verschmutzungsgrad der Kühe; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	62

Tab 37: Durchschnittlicher Verschmutzungsgrad der Euter; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	62
--	----

Tab 38: Durchschnittlicher Verschmutzungsgrad der Liegeboxen; 1.–5. Beprobung; Betriebe A–H .....	62
---	----