

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Wiederkäuer,

Klinische Abteilung für Wiederkäuermedizin

(Leiter: Univ. Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Dipl. ECBHM)

**Phänotypische Charakterisierung von *Streptococcus agalactiae*
Isolaten aus aseptisch gewonnenen Viertelgemelksproben aus
österreichischen Milchviehbetrieben**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Anna Freytag

Wien, im Dezember 2022

Betreuer:

Univ. Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Dipl. ECBHM

Mitbetreuende Assistentinnen:

Dr. med. vet. Cassandra Eibl

Dr. med. vet. Martina Baumgartner

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin,
Universitätsklinik für Wiederkäuer, Klinische Abteilung für Wiederkäuermedizin,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	4
2.1. Gattungsmerkmale der Streptokokken	4
2.2. Anzüchtung und Differenzierung	5
2.3. Die <i>Streptococcus agalactiae</i> Mastitis des Rindes.....	10
3. Material und Methoden	19
3.1. <i>S. agalactiae</i> -Isolate	19
3.2. Koloniemorphologische und Biochemische Charakterisierung	20
3.3. Antibiotische Resistenztestung.....	24
4. Ergebnisse.....	29
4.1. Isolate: Sammlung, Herkunft, Klinik	29
4.2. Morphologische und Biochemische Eigenschaften.....	31
4.2.1. Koloniemorphologie.....	31
4.2.2. CAMP-Test.....	31
4.2.3. Differentialnährböden für Gram-positive, Katalase-negative Kokken.....	31
4.2.4. Cefinase-Aktivität.....	32
4.2.5. Charakterisierung und Bestätigung mittels API®RAPID ID 32 STREP.....	32
4.2.6. Serologische Charakterisierung	33
4.3. Phänotypische Resistenzbestimmung.....	34
4.3.1. Agardiffusionstest.....	34
4.3.2. Mikrodilutionsverfahren.....	37
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung	46
7. Summary.....	47
8. Abkürzungsverzeichnis	48
9. Literaturverzeichnis.....	49
10. Abbildungsverzeichnis	55
11. Tabellenverzeichnis.....	55
12. Danksagung	56
13. Appendix	57

1. Einleitung

Der sogenannte „gelbe Galt“ ist eine hochkontagiöse Mastitis des Rindes, welcher ätiologisch das Gram-positive und Katalase-negative Bakterium *Streptococcus (S.) agalactiae* zugrunde liegt (Winter 2009). Koloniemorphologisch zeigen sich *S. agalactiae* als betahämolysierende, Äskulin-negative Kokken der Lancefieldgruppe B, welche eine erregertypische positive Reaktion im CAMP Test vorweisen (Murray et al. 1999, Neumeister et al. 2009, Winter 2009, Huber-Schlenstedt et al. 2018). Der Erreger zählt beim Rind zu den euterassozierten Mastitiserregern. Den Hauptübertragungsweg stellt die Melkung dar (Keefe 1997, Winter 2009, Huber-Schlenstedt et al. 2018). Infektionen mit *S. agalactiae* treten als akute oder chronische katarrhalische Mastitiden auf. Bei subklinischem Verlauf fallen hohe Zellzahlen auf, während akute klinische Mastitiden zusätzlich zu den möglichen hohen Zellzahlen mit kurzzeitigem Fieber, Euterschwellung sowie wässrigem Milchsekret mit Beimengung von Flocken einhergehen. Das chronische Stadium ist durch Induration und Atrophie der betroffenen Drüsenviertel gekennzeichnet (Mweu et al. 2012). Aufgrund der hohen Kontagiösität kann die Anzahl infizierter Kühe innerhalb der Betriebe hoch sein (Piepers et al. 2007, Winter 2009). In der Humanmedizin ist *S. agalactiae* ein Bakterium der residenten Flora des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes erwachsener Menschen (Bliss et al. 2002, van der Mee-Marquet et al. 2008), das jedoch bei Neugeborenen eine Hauptursache für die Entstehung von Bakteriämien und Meningitiden darstellt (Schuchat 1998, Verani et al. 2010).

In der Veterinärmedizin änderte sich die Bedeutung von *S. agalactiae* im Laufe der Zeit drastisch. In einer frühen Untersuchung der New Hampshire (USA) Agricultural Experiment Station konnte 1940 bei 573 (84,2 %) von 680 Kühen mit Mastitis *S. agalactiae* nachgewiesen werden (Slanetz und Naghski 1940). Dänische Milchviehherden verzeichneten von 1950 bis 1960 eine *S. agalactiae*-Prävalenz zwischen 20 und 30 %. Derart hohe Prävalenzen wurden auch in anderen Ländern wie England und den USA beobachtet (Stableforth 1950, Plastringe 1958). Aufgrund strenger Überwachungspläne und der Durchführung von flächendeckenden Eradikationsprogrammen sank die Prävalenz in Dänemark 1979 auf 1,9 % (Jensen 1980, Andersen et al. 2003) und blieb während der 1980er und 1990er auf diesem Niveau (Agger et al. 1994, Andersen et al. 2003). Auch in England und im Bundesstaat New York wurden der

Literatur zufolge wirksame Eradikationsmaßnahmen etabliert und erfolgreich angewendet (Hodges 1955, Mylrea et al. 1977). Allgemein gilt als wichtigste Maßnahme für den Eradikationserfolg die Einführung intramammärer antibiotischer Therapien, inklusive des antibiotischen Trockenstellens (Tyler et al. 1992), sowie die konsequente Anwendung von Hygienemaßnahmen (Neave et al. 1969).

Seit 2000 wird jedoch in den skandinavischen Ländern wieder ein stetiger Anstieg der Prävalenz beschrieben, welcher 2008 in Dänemark in einer Herdprävalenz von 5,8 % gipfelte (Katholm und Rattenborg 2009). Auch in Australien (22 % positive Proben aus 22 Betrieben) und im Bundesstaat New York (31 % positive Proben aus 48 Betrieben) konnten in den Jahren 2003 und 2004 hohe Prävalenzen detektiert werden (Phuektes et al. 2003, Zadoks et al. 2004). Bei einer Sequenztypisierung zur genotypischen Charakterisierung der Isolate, wurden 2009 aus 111 Isolaten von dänischen Milchtankproben die Sequenztypen (ST)1 (28 %) und 23 (23 %) als häufigste Stämme identifiziert. Interessanterweise wurden diese Stämme bislang vor allem im Zusammenhang mit Infektionen beim Menschen beschrieben (Zadoks et al. 2011). Dadurch konnte das Vorkommen von *S. agalactiae*-Stämmen, welche wirtsspezifisch für Mensch und Rind sind, nachgewiesen werden (Jones et al. 2003, Zadoks et al. 2011, Lyhs et al. 2016). Im Herbst 2018 wurde der ST1 erstmals in einem österreichischen Milchviehbetrieb bei 14 von 47 Kühen nachgewiesen. Besonders auffällig war, dass der gefundene Stamm Resistenzen gegenüber Pirlimycin, Clindamycin, Erythromycin und Tetrazyklin zeigte (Wald et al. 2020). Dieses Resistenzmuster entspricht jenem, welches der Literatur zufolge bei Sequenztypen, die von Mensch und Rind geteilt werden, auftritt (Dogan et al. 2005, Hernandez et al. 2021).

Seit einigen Jahren wird in der Literatur diskutiert, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen dem gegenwärtigen Anstieg der Prävalenz und dem Auftreten von *S. agalactiae*-Stämmen, welche wirtsspezifisch für Rind und Mensch sind, gibt. Überlegungen sind hierbei, ob es eventuell einen Übersprung vom Menschen auf das Tier gab oder eine der beiden Spezies (Mensch oder Rind) als *S. agalactiae*-Reservoir für die jeweils andere Spezies fungiert. Jene *S. agalactiae*-Stämme, welche sowohl den Menschen als auch das Rind infizieren, wurden in der Literatur bereits mittels Sequenztypisierung und Resistenzmuster näher charakterisiert (Bisharat et al. 2004).

Bisher gibt es keine Daten über die Charakteristik und Verteilung von unterschiedlichen, in österreichischen Milchviehbetrieben vorkommenden *S. agalactiae*-Stämmen. Somit können bisher auch keine detaillierteren Aussagen über das weitere Vorkommen und die Verbreitung von potenziell humanassoziierten *S. agalactiae*-Stämmen in österreichischen Milchviehherden getroffen werden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit erfolgte die phänotypische und biochemische Analyse von *S. agalactiae*-Isolaten aus Viertelgemelksproben, welche von österreichischen Milchviehbetrieben an das diagnostische Labor der Klinik für Wiederkäuer, die AGES Graz, das Qualitätslabor Gmünd, die AGES Linz oder das TGD Labor Ried im Innkreis zur Routinediagnostik geschickt wurden. Die Untersuchung der Isolate umfasste die Beschreibung der Koloniemorphologie und des Hämolyseverhaltens, eine serologische und biochemische Charakterisierung (Äskulinaktivität, Zuordnung zur Lancefieldgruppe, CAMP-Reaktion, API®RAPID ID 32 STREP) sowie die Überprüfung des Resistenzverhaltens gegenüber ausgewählten veterinär- und humanmedizinisch relevanten antibiotischen Wirkstoffen.

In dieser Diplomarbeit wurden folgende zwei Hypothesen geprüft:

1. Die gesammelten *S. agalactiae*-Isolate aus den einzelnen Betrieben verhalten sich unterschiedlich hinsichtlich ihrer phänotypischen Eigenschaften sowie ihres Resistenzverhaltens gegenüber ausgewählten antibiotischen Wirkstoffen.
2. Aufgrund eines charakteristischen Resistenzverhaltens ergeben sich bei Isolaten aus verschiedenen österreichischen Betrieben Hinweise auf das Auftreten humanassoziierten Stämme.

2. Literaturübersicht

2.1. Gattungsmerkmale der Streptokokken

Bei den Vertretern der Familie der *Streptococcaceae* handelt es sich um Gram-positive, nicht sporenbildende, Katalase-negative und unbewegliche Kokken. Im Grampräparat ordnen sich die Bakterien paarig an oder legen sich in langen Ketten aneinander (griech.: *Streptos* = Kette). Nachdem bei der Taxonomie des Genus *Streptococcus* aufgrund molekularbiologischer Fortschritte viele Änderungen durchgeführt wurden, werden heute bei der Familie der *Streptococcaceae* drei Genera (*Lactococcus*, *Lactovum*, *Streptococcus*) unterschieden (Schleifer und Klipper-Bälz 1987, Neumeister et al. 2009). Der Genus *Streptococcus* beinhaltet derzeit ca. 60 Spezies (Neumeister et al. 2009). Zunächst erfolgte die Einteilung der Streptokokken rein morphologisch aufgrund ihres Hämolyseverhaltens (Brown 1919). Rebecca Lancefield teilte die β -hämolysierenden Streptokokken erstmals in serologische Gruppen ein. Diese Unterteilung beruht auf dem Zellwand-Polysaccharid (C-Substanz; C=Carbohydrate) der β -hämolysierenden Streptokokken (Lancefield 1928). Die Klassifizierung wurde dann durch Charakterisierung unterschiedlicher Stoffwechseleigenschaften ergänzt. Diese ist jedoch zur Differenzierung von Spezies innerhalb der Gruppen häufig nicht ausreichend, weshalb die eindeutige Identifizierung erst durch den Einsatz moderner biochemischer oder molekularbiologischer Verfahren (API, Sequenztypisierung) erfolgte (Schleifer und Klipper-Bälz 1987, Neumeister et al. 2009).

2.2. Anzucht und Differenzierung

Koloniemorphologie und biochemische Eigenschaften

Auf Columbiaagar, angereichert mit Schafblut wächst *S. agalactiae* in zarten, durchscheinenden Kolonien mit einer Größe von bis zu einem Millimeter und kann unterschiedliche Hämolyseformen ausbilden (Selbitz und Alber 2015, Huber-Schlenstedt et al. 2018). Bei der β -Hämolyse kommt es durch die vollständige Lyse des Hämoglobins zur Bildung eines breiten, klaren, relativ scharf begrenzten, durchsichtigen Hämolysehofes um die Kolonien. Die α -Hämolyse wird auch als vergrünende Hämolyse bezeichnet, da das Hämoglobin zu Methämoglobin, welches ein grünes Erscheinungsbild hat, umgebaut wird. Der Begriff γ -Hämolyse beschreibt das Fehlen einer Hämolyse und wird in der neueren Literatur nicht mehr verwendet (Brown 1919, Selbitz und Alber 2015, Huber-Schlenstedt et al. 2018).

Katalase-Reaktion

Die Katalase-Reaktion dient zur Differenzierung zwischen Streptokokken und Staphylokokken. Wie alle Streptokokken ist *S. agalactiae* Katalase-negativ (Neumeister et al. 2009, Huber-Schlenstedt et al. 2018). Neben den Streptokokken zeigt einzig auch *Trueperella pyogenes* eine negative Katalase-Reaktion, während es bei allen übrigen Bakterienspezies zu einer positiven Reaktion im Katalase-Test kommt (Selbitz 2015). Für die praktische Prüfung der Katalase-Reaktion wird eine 3 % Wasserstoffperoxidlösung mit einer Kolonie vermengt, welche von einer Reinkultur abgenommen wird. Bei einer positiven Reaktion kommt es zu einer Gasbildung, welche in Form kleiner Bläschen makroskopisch sichtbar wird (Neumeister et al. 2009).

Äskulin-Spaltung

Eine weitere Charakterisierung der Streptokokken erfolgt über die Äskulin-Spaltung. Diese wird durch Kultivierung von Bakterien auf äskulinhaltigen (und damit unter UV-Licht fluoreszierenden) Nährböden überprüft. Die Äskulin-Prüfung zeigt, ob der Erreger über das Enzym β -Glukosidase verfügt, welches Äskulin in nicht fluoreszierendes (braunes) Äskuletin und Glukose spaltet (Neumeister et al. 2009, Huber-Schlenstedt et al. 2018). Bei einer Schwarzverfärbung des Nährbodens rund um die beimpfte Stelle ist eine Äskulin-Spaltung erfolgt und die Reaktion ist als positiv zu werten. Dieser schwarze Niederschlag ist auf die Bildung eines Komplexes von Äskuletin mit Eisenionen zurückzuführen (Neumeister et al. 2009). Neben Enterokokken sind auch *Streptococcus uberis* und viele Laktokokken Äskulin-positiv. Im Gegensatz dazu gehören *S. agalactiae* und *Streptococcus (S.) dysgalactiae* zu den Äskulin-negativen Kokken (Piepers et al. 2007).

Lancefield-Gruppenbestimmung

Basierend auf den jeweiligen gruppenspezifischen Antigenen, können Streptokokken mittels kommerziellen Testsystemen den Lancefieldgruppen A, B, C, D oder G zugeordnet werden (Huber-Schlenstedt et al. 2018). Dabei werden die gruppenspezifischen Oberflächenantigene mit Latexagglutination nachgewiesen. Für einen Latexagglutinationstest werden feine Latexpartikel, welche mit Antikörpern benetzt sind, verwendet. Bei Vermengung von Koloniematerial mit der jeweiligen Testlösung (A, B, C, D oder G) kommt es zur Agglutination der spezifischen Oberflächenantigene der Kokken mit den jeweiligen Antikörpern auf den Latexpartikeln. Sobald die Bildung kleiner Verklumpungen makroskopisch sichtbar wird, ist die Reaktion positiv (Neumeister et al. 2009). Demnach gehört *S. agalactiae* aufgrund der exprimierten Oberflächenantigene der Lancefieldgruppe B an (Neumeister et al. 2009, Huber-Schlenstedt et al. 2018).

CAMP-Test

Für die Identifizierung und Bestätigung von *S. agalactiae* ist neben dem Nachweis des Gruppen-Antigens B ein positiver CAMP-Test wichtig (Brown et al. 1974, Huber-Schlenstedt et al. 2018). Die Abkürzung CAMP setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der Namen der Entdecker des Phänomens zusammen: Christie, Atkins, und Munch-Peterson (Brown et al. 1974). Mittels dieses Tests kann *S. agalactiae* (CAMP-positiv) beispielsweise von *S. dysgalactiae* abgegrenzt werden (Piepers et al. 2007). Der CAMP-Faktor ist ein Protein, das von allen Streptokokken der Lancefieldgruppe B synthetisiert wird. Im Test werden die zu prüfenden Streptokokkenkolonien auf einer Blutagarplatte senkrecht zu einem *Staphylococcus aureus*-Stamm ausgestrichen. *Staphylococcus aureus* bildet ein β -Hämolysin, welches eine breite Zone mit unvollständiger Hämolyse zeigt. Diese schwache Hämolysezone wird bei gleichzeitigem Vorkommen des CAMP-Faktors von *S. agalactiae* verstärkt und es entsteht zwischen den beiden senkrecht zueinander aufgetragenen Impfstreichen eine halbmond- bzw. keilförmige vollständige Hämolysezone des *Staphylococcus aureus*-Stammes.

API®RAPID ID 32 STREP

Die Abkürzung API®RAPID ID 32 STREP (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) steht für Application Programming Interface. Mittels dieses standardisierten Systems können Bakterien wie Streptokokken und Enterokokken auf Basis von 32 enzymatischen Reaktionen und einer zugehörigen online Datenbank identifiziert werden (Jensen et al. 1999). Die 32 Reaktionen und das jeweils zugehörige erwartete Ergebnis, welches zur Identifizierung von *S. agalactiae* dient, ist in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Die Tabelle zeigt die 32 untersuchten Substrate, welche von Isolaten, die das jeweilige Enzym besitzen verstoffwechselt werden können. Aufgrund der vorhandenen oder fehlenden Verstoffwechslung einzelner Substrate können *S. agalactiae* identifiziert werden.

NR	TEST	Reaktionen/Enzyme	% Pos	NR	TEST	Reaktionen/Enzyme	% Pos
1	ADH	ArginineDiHydrolase	100	17	βNAG	N-Acetyl-β-Glucosaminidase	1
2	βGLU	β-GLUosidase	0	18	GTA	Glycyl-Tryptophan-Arylamidase	1
3	βGAR	β -GALactosidas	1	19	HIP	Hydrolyse von HIPurat	99
4	βGUR	β-GluURonidase	50	20	GLYG	GLYkoGen	4
5	αGAL	α-GALactosidase	10	21	PUL	PULlulan	99
6	PAL	Alkalische Phosphatase	99	22	MAL	MALtose	100
7	RIB	RIBose	85	23	MEL	MELibiose	0
8	MAN	MANitol	0	24	MLZ	MeLeZitose	0
9	SOR	SORbitol	1	25	SAC	SACcharose	100
10	LAC	LACtose	30	26	LARA	L-ARabinose	0
11	TRE	TREhalose	74	27	DARL	D-ARabitol	0
12	RAF	RAFfinose	0	28	MβDG	Methyl-βD-Glucopyranosid	90
13	VP	Pyroglutamic acid arylamidase acetoin production (Voges Proskauer reaction)	90	29	TAG	TAGatose	26
14	APPA	Alanyl-Phenylalanyl-Prolin Arylamidase	99	30	βMAN	β-MANosidase	0
15	βGAL	β-GALactosidase	0	31	CDEX	CycloDEXtrin	0
16	PYRA	Pyroglutaminsäure-Arylamidase	1	32	URE	UREase	0

Test = Name der Reaktion auf dem Teststreifen; Reaktion/Enzyme = Enzym, das vorhanden ist, wenn Bakterium jeweiliges Substrat verstoffwechseln kann bzw. jeweilige Reaktion katalysiert wird (Großbuchstaben kennzeichnen die Herkunft der Abkürzung des Reaktionsnamen), % Pos = % der *S. agalactiae* Isolate zeigen positive Reaktionen nach 44 ½ Stunden bei 36 °C (+/-2°C) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

In Abb. 1 sind die biochemischen Eigenschaften und das Identifizierungsschema für Mastitis-relevante Gram-positive und Katalase-negative Kokken zusammengefasst.

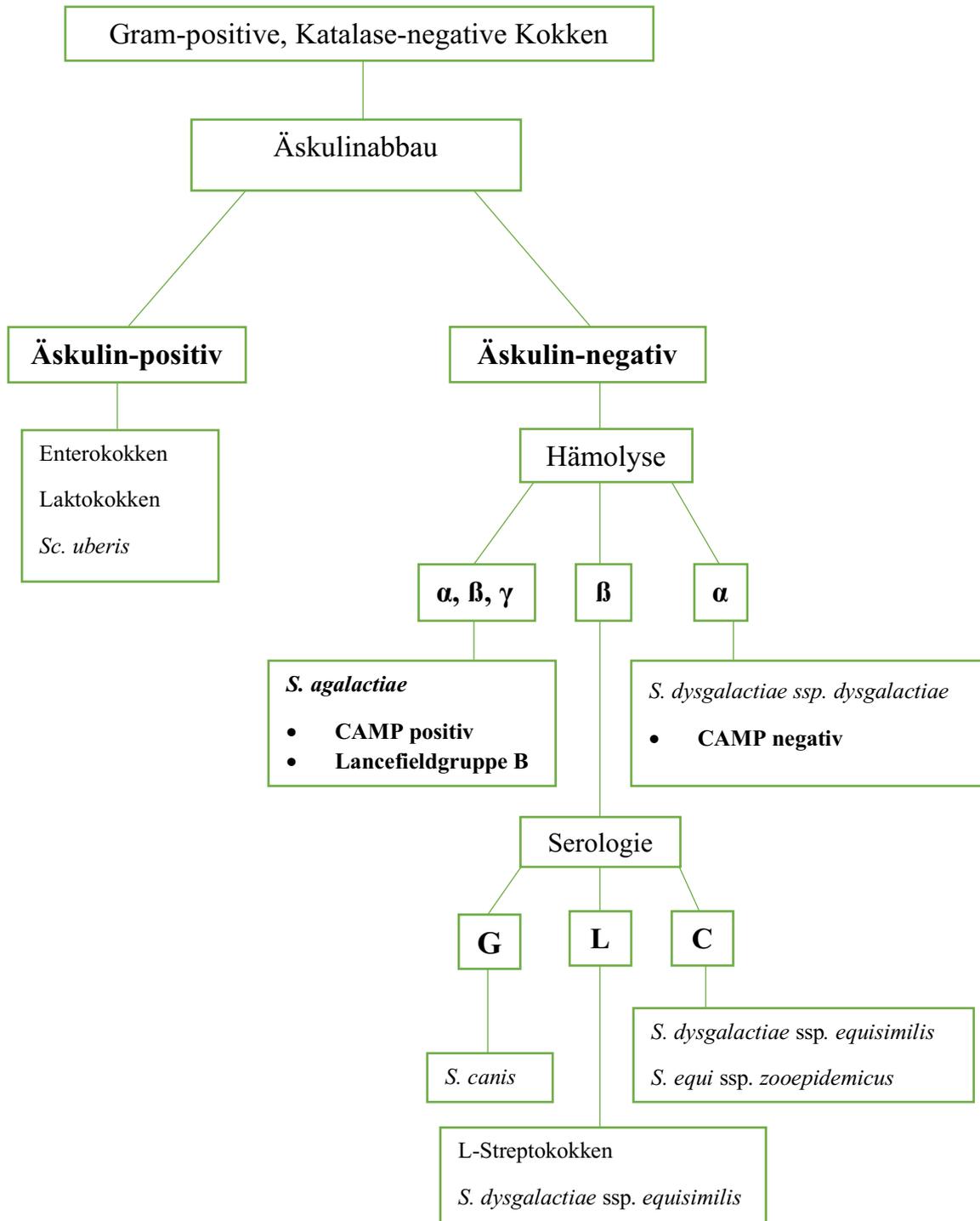


Abb. 1: Differenzierung von Streptokokken (modifiziert nach Huber-Schlenstedt et al. 2018)

2.3. Die *Streptococcus agalactiae* Mastitis des Rindes

Pathogenese der *S. agalactiae*-Mastitis

Mastitis ist nicht nur die häufigste, sondern auch eine der kostenintensivsten infektiösen Erkrankungen in Milchviehbetrieben (Huijps et al. 2008, Keefe 2012). Neben einem negativen Einfluss auf die Produktionseffizienz und die Qualität der Milch, sind vor allem die Beeinträchtigung von Tiergesundheit und Tierwohl wichtige Aspekte dieser Krankheit (Keefe 2012). Die Relevanz von *S. agalactiae* als Mastitiserreger kann auf die hohe Kontagiösität und den starken Einfluss auf die Milchqualität, wie beispielsweise die Zellzahl sowie auf die Milchleistung zurückgeführt werden (Keefe 2012). Die Effekte auf die Milchqualität- und -quantität können mit der Pathogenese von *S. agalactiae*-Mastitiden erklärt werden. Nach einer galaktogenen Infektion mit *S. agalactiae* lagert sich der Keim an die Epithelzellen des Strichkanals, der Milchzisterne, der großen Milchgänge und des milchbildenden Gewebes an (Winter 2009, Baumgärtner und Gruber 2020). Da *S. agalactiae* ein an die Milchdrüse gut adaptiertes Bakterium ist, steht es bei einer subklinischen Infektion mit den Abwehrmechanismen der Kuh im Gleichgewicht. Bei einer Infektion kann es jedoch auch zu einer starken Vermehrung der Streptokokken im Euter kommen und es zeigt sich das klinische Bild einer katarrhalisch-eitrigen Galaktophoritis und Mastitis (Baumgärtner und Gruber 2020). Klinisch wird zunächst ein gerötetes und geschwollenes Euter beobachtet. Dies ist auf eine interstitielle Ödematisierung und Hyperämie zurückzuführen, welche durch die Bakterienbestandteile und die Modifikation des Drüsenepithels entsteht (Baumgärtner und Gruber 2020). Die Entwicklung der *S. agalactiae*-Mastitis verläuft als Prozess einer Invasion und Entzündung der Läppchen des Euters ab. Dies tritt vor allem im ersten Monat der Infektion in einer Serie von wiederkehrenden Invasionen auf, welche immer denselben Ablauf haben. Zunächst kommt es zu einer schnellen Vermehrung von *S. agalactiae* in den Milchgängen. Anschließend passieren die Bakterien die Wand des Milchganges und gelangen in die Lymphgefäße und zu den supramammären Lymphknoten (Constable et al. 2017). Aufgrund der Aktivierung von humoralen und zellulären Immunabwehrmechanismen kommt es zu einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Alveolen (Baumgärtner und Gruber 2020). Nach der initialen Invasion des Gewebes fällt die Milchmenge aufgrund der Zerstörung

der Epithelien in den Drüsen und im Milchgang, welche folglich eine Inhibierung und Stase der Sekretion auslöst, drastisch ab. Selbst wenn die Streptokokkeninfiltration schnell beseitigt wird, kommt es zu einer Fibrosierung des interalveolären Gewebes und einer Involution der Drüsen. Aufgrund der immer wieder auftretenden akuten klinischen Schübe kommt es zu einem schrittweisen Verlust der sekretorischen Funktion aufgrund steigender Fibrosierung des Viertels (Constable et al. 2017).

Entwicklung der *S. agalactiae*-Prävalenz

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist *S. agalactiae* als bedeutender Mastitiserreger in Milchviehherden bekannt. In den 1950er Jahren war *S. agalactiae* der dominierende Mastitiserreger in nordeuropäischen Milchviehherden (Andersen et al. 2003, Mweu et al. 2012). In Dänemark waren schätzungsweise 30–40 % der 184.000 Milchviehbetriebe *S. agalactiae*-positiv (Andersen et al. 2003). Neben den skandinavischen Ländern konnte die hohe Prävalenz auch in vielen anderen Ländern mit intensiver Milchproduktion wie beispielweise in England und den USA beobachtet werden. Beispielsweise waren bei Untersuchungen in Südengland 1950 60 % der Herden und insgesamt 15 % der untersuchten Kühe mit *S. agalactiae* infiziert (Stableforth 1950). In den USA konnte bei einer Studie, welche 1957 in Connecticut durchgeführt wurde bei 541 (45,42 %) Herden von insgesamt 1191 beprobten Herden *S. agalactiae* nachgewiesen werden (Plastridge 1958). In der Literatur werden die fehlende Verwendung von Zitzendippmitteln, keine Anwendung von Trockenstehtherapien, Verwendung von Euterreinigungstüchern für mehrere Tiere anstelle von Einweg-Papierhandtüchern zur Zitzenreinigung und Melksysteme wie Eimermelkanlagen als wichtige Risikofaktoren für diese hohen *S. agalactiae*-Herdprävalenzen genannt (Dargent-Molina et al. 1988). Aufgrund der hohen Prävalenzen kam es weltweit zur Einführung von spezifischen Eradikationsprogrammen. So wurde beispielsweise in Dänemark flächendeckend Tankmilch zur Identifizierung von *S. agalactiae*-positiven Herden beprobt. In positiven Herden wurden anschließend Viertelgemelksproben aller laktierenden Kühe untersucht. Das Protokoll sah die Behandlung infizierter Tiere vor, eine Therapieerfolgskontrolle durch wiederholte Viertelgemelksbeprobung sowie den Ausschluss chronisch infizierter oder therapieresistenter Tiere (Bakken et al 1976, Andersen et al. 2003, Mweu et al. 2012, Jorgensen et al. 2016). Als weiterer wichtiger Aspekt bei der Eradikation wurde auf eine gute Melkhygiene geachtet. Diese

beinhaltet beispielsweise die Zitzendesinfektion vor (Predipping) und nach der Melkung, das Trockenstehmanagement (Verwendung von intramammären Antibiotika-haltigen Euterinjektoren) sowie die Verwendung von Handschuhen beim Melken (Keefe 2012). Aufgrund dieser Maßnahmen konnte eine deutliche Reduktion der Prävalenz bis 1979 auf 2 % registriert werden (Jensen 1980, Andersen et al. 2003, Mweu et al. 2012), welche bis in die 1980er und 1990er auf diesem Niveau blieb (Agger et al. 1994, Andersen et al. 2003).

In England wurde in den 1960er Jahren ein 5-Punkte Plan zur Kontrolle von Mastitiden eingeführt. Dieses Kontrollprogramm wurde im Laufe der Jahre von vielen Ländern mit intensiver Milchproduktion übernommen und trug wesentlich zur Eradikation von *S. agalactiae* aus vielen Milchviehbetrieben in den USA und Europa bei (Hodges 1955, Mylrea et al. 1977).

Die 5 Punkte zur Mastitiskontrolle umfassten folgende Maßnahmen (Ruegg 2017):

1. Behandlung akuter klinischer Mastitiden
2. Zitzendesinfektion nach dem Melken
3. Antibiotische Trockenstelltherapie
4. Merzung chronisch euterkranker Kühe
5. Regelmäßige Melkanlagenwartung

Allerdings kann seit 2000 erneut ein stetiger Anstieg der Herdenprävalenz in mehreren skandinavischen Ländern (Katholm et al. 2012), aber auch weltweit beobachtet werden. Katholm und Rattenborg (2009) konnten eine Herdenprävalenz in Dänemark im Jahre 2008 von 5,8 % detektieren. Eine 2004 durchgeführte Untersuchung von Tankmilchproben aus 48 New Yorker Milchviehherden testete 31 % der Betriebe *S. agalactiae*-positiv (Zadoks et al. 2004). Auch in Australien wurde eine Untersuchung von 176 Tankmilchproben von 42 Herden mittels PCR durchgeführt. Dabei wurde *S. agalactiae* in 22 % der Proben detektiert (Phuektes et al. 2003). Es wird angenommen, dass dieser Umstand unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass *S. agalactiae*, welcher vormals als kuhassoziiertes Erreger angesehen wurde (Keefe 1997), neuen Studien zufolge auch in der Umwelt von Milchkühen gefunden wird. Beispielsweise konnte in einer Studie von Manning et al. (2010) eine *S. agalactiae*-Prävalenz von 4 % in Kotproben von Rindern detektiert werden. Die Entwicklung eines Reservoirs im Gastrointestinaltrakt oder in den Tonsillen von Rindern ist möglicherweise auf die Fütterung

der Kälber mit der Milch infizierter Tiere zurückzuführen (Jorgensen et al. 2016). Die Bedeutung der Kälber als Träger bleibt jedoch unbekannt (Jorgensen et al. 2016).

Umwelt als neues Reservoir

Um die Kontaminationsquellen von *S. agalactiae* in norwegischen Milchviehherden aufzudecken, wurden in einer Studie von Jorgensen et al. (2016) sowohl Milchproben als auch Rektal- und Vaginaltupfer sowie Tupferproben aus dem Stall (z.B. Proben aus den Liegeboxen) entnommen und auf das Vorkommen von *S. agalactiae* untersucht. Das Ziel war es, Wissen für die Optimierung der Eradikationsmaßnahmen zu gewinnen. Die Auswertung der Proben zeigte, dass der Gastrointestinaltrakt der Rinder und der Stall als Reservoir für *S. agalactiae* dienen (Jorgensen et al. 2016). Entgegen der bisherigen Meinung, dass *S. agalactiae* ein rein euterassoziierter Mastitiserreger sei, deutet dieses Erkenntnis auf das Vorkommen zweier Übertragungszyklen hin. Neben dem bereits bekannten kontagiösen Übertragungsweg während des Melkens mit der Melkmaschine, scheint auch eine oro-faecale Übertragung (Manning et al. 2010, Jorgensen et al. 2016), welche hauptsächlich über das Wasser der Tränken erfolgt (Jorgensen et al. 2016), möglich zu sein. Damit und aufgrund des *S. agalactiae*-Nachweises in Rinderkotproben (Manning et al. 2010) ist die allgemeine Meinung, dass *S. agalactiae* ein obligat intramammärer Erreger sei, widerlegt worden. Der Gastrointestinaltrakt von Milchkühen ist häufig Träger von *S. agalactiae*. Demnach ist eine oro-faecale Übertragung von epidemiologischer Bedeutung (Jorgensen et al. 2016).

***S. agalactiae*-Wirtsspezifität**

Zusätzlich gilt es zu beachten, dass auch der Mensch als Eintragsquelle von *S. agalactiae* in die Umgebung von Milchkühen fungieren kann, da die Wirtsspezifität geringer ist als ursprünglich angenommen (Dogan et al. 2005, Lyhs et al. 2016). Die ersten Experimente über die Pathogenität von humanen *S. agalactiae*-Stämmen bei Rindern wurden bereits 1980 durchgeführt. Da damals die molekulare Typisierung der Erreger noch nicht möglich war, wurden Euterviertel von laktierenden Kühen mit humanen *S. agalactiae* infiziert. Daraus resultierten sowohl schwache als auch schwere Verlaufsformen einer *S. agalactiae*-Mastitis. Die Reaktionen der einzelnen Viertel auf den Erregereintrag wurde anhand der Änderung des Milchsekrets detektiert. Eine Isolierung der *S. agalactiae*-Stämme an Tag zwei der Infektion

zeigte, dass die Isolate die gleichen Eigenschaften wie die zuvor eingebrachten Stämme hatten. Demnach konnten die Stämme, welche zur Infektion genutzt wurden, wieder aus dem Euter einer Kuh mit einer klinischen Mastitis rekultiviert werden (Van den Heever und Giesecke 1980). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Anzeichen einer Infektion der Milchdrüse von Rindern bei der Einbringung eines humanpathogenen Stammes rascher als bei der Infektion mit einem bovinen Stamm auftraten. Zusätzlich verursachten humane Isolate vermehrt akute Infektionen und einen höheren Milchverlust als bovine Stämme (Jensen 1982). Die Exkretion von *S. agalactiae* mit der Milch war jedoch höher bei der Infektion mit einem bovinen Erreger. Eine spontane Heilung der Mastitis trat häufiger bei dem Eintrag humanpathogenen *S. agalactiae* auf (Jensen 1982). Die Fähigkeit zur Auslösung einer Mastitis durch die Infektion von Rindern mit humanpathogenen Stämmen konnte damit schon mit diesen frühen Experimenten bewiesen werden (Van den Heever und Giesecke 1980, Jensen 1982).

Neuere Untersuchungsverfahren mittels Genotypisierung von Stämmen machen ein Detektieren von Sequenztypen (ST), welche wirtsspezifisch für Mensch und Rind sind, möglich. Dies zeigen beispielsweise die Ergebnisse einer 2009 durchgeführten Multilocus-Sequenztypisierung (MLST), von 111 Isolaten aus einer Tankmilchüberprüfung in Dänemark. Diese Analyse ergab, dass die häufigsten zwei Sequenztypen ST1 (28 %) und ST23 (23 %) sind (Mweu et al. 2012). Dies ist von großer Wichtigkeit, da diese beiden Sequenztypen bisher primär mit humanen Infektionen assoziiert wurden (Jones et al. 2003, Bisharat et al. 2004). Auch in Tankmilchproben aus Finnland und Schweden konnte 2016 ST1 und ST23 nachgewiesen werden (Lyhs et al. 2016). Im Herbst 2018 wurden in einem Milchviehbetrieb in Österreich *S. agalactiae*-Stämme isoliert, welche Resistenzen gegenüber Pirlimycin, Clindamycin, Erythromycin und Tetrazyklin zeigten (Wald et al. 2020). Dieses Resistenzmuster tritt vor allem bei ST auf, die von Mensch und Rind geteilt werden (Dogan et al. 2005, Hernandez et al. 2021). Aufgrund des humanassoziierten Resistenzmusters wurden die Isolate mittels MLST typisiert und es konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Isolaten aus dem Milchviehbetrieb um den humanen ST1 handelt (Wald et al. 2020). Um die Übertragung von *S. agalactiae* zwischen den Wirtsspezies Rind und Mensch genauer zu charakterisieren, wurden in einer Studie von Lyhs et al. (2016) zeitgleich gesammelte Isolate von Menschen und Rindern aus Finnland und Schweden vergleichend analysiert. Mittels Sequenztypisierung (MLST) wurden drei *S. agalactiae*-Subpopulationen aus den gesammelten

Isolaten von Menschen und Rindern identifiziert. Unter den drei Subpopulationen ist eine Population humanassoziiert, eine rinderassoziiert und eine der Populationen kommt bei beiden Spezies gleichermaßen vor. Diese Population umfasste ST1, 8, 12, 23 und 196 und machte mehr als die Hälfte (54 %) aller untersuchten *S. agalactiae*-Isolate aus. Dies zeigt, dass die Wirtsspezifität von *S. agalactiae* bei Rindern und Menschen geringer ist als ursprünglich gedacht. Darüber hinaus beschreibt Lyhs et al. (2016), dass der einzige Unterschied zwischen bovinen und humanen Stämmen die Fähigkeit zur Laktosefermentation ist, welche auf einem zusätzlichen Genom boviner Isolate kodiert ist. Dies könnte auf eine Adaption an die bovine Milchdrüse zurückzuführen (Lyhs et al. 2016).

***S. agalactiae* beim Menschen**

Im Gegensatz zum Rind, wo die Mastitis, unabhängig von der Herkunft des Erregers (bovin oder human) die einzige Erkrankung ist, welcher ätiologisch *S. agalactiae* zugrunde liegt (Keefe 1997), zeigt sich der Erreger in der Humanmedizin sowohl als harmloser Kolonisierer von Schleimhäuten bei Erwachsenen, als auch als gefährliches Pathogen bei Neugeborenen und immunsupprimierten Personen (Bliss et al. 2002, Van der Mee-Marquet et al. 2008). Die Untersuchungen von 249 Menschen beider Geschlechter zeigte, dass 27 % der Frauen und 32 % der Männer, altersunabhängig *S. agalactiae*-Träger sind. Die Lokalisation mit der höchsten Prävalenz war dabei der Genitaltrakt (23 % Frauen und 21 % Männer), aber auch auf der Haut (2 %), im Rachen (4 %) und in der Rektalregion (14 %) wurde *S. agalactiae* nachgewiesen (Van der Mee-Marquet et al. 2008). Eine andere Studie untersuchte Proben von 289 Männern und nicht schwangeren Frauen. Daraus resultierte eine *S. agalactiae*-Prävalenz an einer oder mehr als einer Körperstelle von 34 % bei den Frauen und 31 % bei den Männern (Bliss et al. 2002). Bei schwangeren Frauen kann *S. agalactiae* jedoch Auslöser von Harnwegsinfektionen, lebensbedrohlichen Septikämien und Meningitiden sein (Schuchat 1998). Überdies ist *S. agalactiae* bei Neugeborenen sowohl für sogenannte „early-onset“- als auch für „late-onset“-Erkrankungen verantwortlich. Bei „early-onset“-Infektionen mit *S. agalactiae* findet die Übertragung des Erregers vom Genitaltrakt der Mutter auf das Neugeborene intrapartum statt. Daher treten „early-onset“-Erkrankungen in den ersten Lebenstagen auf. Rund 80 % der Säuglingsinfektionen mit *S. agalactiae* sind „early-onset“-Erkrankungen (Schuchat 1998). Zu den „early-onset“-Erkrankungen zählen hauptsächlich Bakteriämien (89 %) mit oder ohne

Pneumonie. Meningitiden kommen in ca. 10 % der Fälle vor (Schuchat 1998, Verani et al. 2010). „Late-onset“-Erkrankungen treten bei Säuglingen im Alter von einer Woche bis zu drei Monaten auf (Schucht 1998). Diese „late-onset“-Erkrankungen können beispielsweise durch eine maternale Mastitis, welche *S. agalactiae* auch beim Menschen herbeiführen kann, ausgelöst werden (Zimmermann et al. 2017). Bei der molekulargenetischen Identifizierung der isolierten Stämme einer Mutter und ihres Babys konnte gezeigt werden, dass beide Isolate ident waren, sich jedoch von Stämmen anderer Mutter-Baby-Paare unterschieden. Laut Bingen et al. (1992) bestätigt dies die Übertragung von *S. agalactiae* von der Mutter auf ihr Baby.

Neue Eradikationsmaßnahmen für *S. agalactiae*-infizierte Milchviehherden

Da *S. agalactiae* sowohl im Kot von Rindern als auch in Proben aus dem Stall, wie beispielsweise den Tränken detektiert werden konnte, kann der Erreger nicht mehr als rein kuhassoziiert angesehen werden (Manning et al. 2010, Jorgensen et al. 2016). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es sich bei *S. agalactiae* Isolaten von Rindern zum Teil um humanassoziierte Stämme handelt. Daher gilt der Mensch als mögliche Eintragsquelle von *S. agalactiae* in Milchviehbetriebe (Dogan et al. 2005, Mweu et al. 2012, Lyhs et al. 2016, Wald et al. 2020). Aus diesem Grund muss bei den Eradikationsmaßnahmen sowohl die kontagiöse (innerhalb einer Spezies sowie speziesübergreifend), als auch die umweltassoziierte Übertragung berücksichtigt werden. Zur Verhinderung der kontagiösen Übertragung ist die Biosicherheit innerhalb einer Herde aber auch zwischen mehreren Herden ein wichtiger Kontrollpunkt zur Eliminierung von *S. agalactiae*. Diese inkludiert die konsequente Zitendesinfektion, das Trockenstehmanagement sowie die Verwendung von Handschuhen beim Melken (Keefe 2012). Um das Erregerreservoir in positiven Betrieben zu beseitigen, sollten Tiere, welche bei einer Kontrolluntersuchung nach Therapieende weiterhin *S. agalactiae* positiv sind, gemerzt werden (Krömker 2007). In aktuellen Untersuchungen wurde beschrieben, dass die Eradikation in manchen Betrieben nur mit zusätzlichen Hygienemaßnahmen, wie beispielsweise der häufigeren Nutzung des Mistschrappers, dem Säubern der Tränken, einer automatischen Melkanlage sowie dem Verhindern der Futterkontamination durch kotverschmutzte Stiefel, erfolgreich war. Dabei handelt es sich um Maßnahmen, welche durch eine verbesserte Stallhygiene den hohen Keimdruck in der Umgebung verhindern (Jorgensen et al. 2016).

Antibiotikaresistenzen boviner *S. agalactiae* Stämme

Obwohl *S. agalactiae* grundsätzlich gut auf antibiotische Therapien anspricht, kam es zu einer Resistenzentwicklung gegenüber bestimmten Wirkstoffen (Tyler et al. 1992). Weltweit durchgeführte Studien zur Resistenzlage von *S. agalactiae* gegenüber länderspezifisch relevanten antibiotischen Wirkstoffen zeigen folgende interessante Ergebnisse. In Argentinien wurde in einer aktuellen Studie von Hernandez et al. (2021) die Resistenzlage von *S. agalactiae*-Stämmen bei Milchkühen mit Mastitis geprüft. Die Isolierung der untersuchten Stämme erfolgte von 2016 bis 2019. Die Testung wurde gegenüber Penicillin, Oxacillin, Kanamycin, Pirlimycin, Tetracyclin sowie den humanmedizinischen Antibiotika Erythromycin, Clindamycin und Levofloxacin durchgeführt. Daraus resultierte, dass 30 % der Isolate mehrfach resistent gegenüber Kanamycin, Clindamycin, Pirlimycin, Erythromycin und Tetracyclin waren. Die Prävalenz der *S. agalactiae*-Isolate, welche nur gegen Kanamycin resistent waren, belief sich auf 58 %. Nur 16 % der Isolate zeigten sich gegenüber allen Antibiotika sensibel (Hernandez et al. 2021). Ähnliche Mehrfachresistenzen zeigten sich in dem österreichischen Milchviehbetrieb, wo alle Feldisolate (n=31) eines Stammes (ST1) gegenüber Pirlimycin, Clindamycin, Erythromycin sowie Tetrazyklin resistent waren. Außerdem waren lediglich 51,5 % der Isolate aus diesem Betrieb gegenüber Kanamycin/Cefalexin sensibel (Wald et al. 2020).

Demgegenüber wurde in einer Studie des Veterinär College Anand, Gujrat, India bei der Untersuchung von 27 *S. agalactiae*-Isolaten die höchste Resistenzrate gegenüber Streptomycin (85,1 %) gefunden. Weitere Resistenzen gegenüber Tetrazyklin (55,5 %), Erythromycin (33,3 %), Co-trimoxazole (11,1 %), Ampicillin (11,1 %), und Enrofloxacin (7,4 %) wurden beschrieben (Jain et al. 2012). Eine hohe Streptomycin-Resistenz konnte überdies auch bei einer Untersuchung von 25 *S. agalactiae* Isolaten von Kühen mit subklinischer Mastitis in der Türkei detektiert werden. Die *S. agalactiae*-Isolate dieser Studie waren resistent gegenüber Streptomycin (100 %), Neomycin (96 %) und Vancomycin (92 %). Überdies zeigten diese *S. agalactiae*-Isolate weiters hohe Resistenzraten gegenüber Ceftiofur (88 %), Oxytetrazyklin (84 %), Lincomycin (80 %), Ampicillin (80 %) und Trimetoprim/Sulfonamid (80 %) (Ikiz et al. 2013).

Weitere interessante Resultate zeigt auch eine Studie aus China. Mittels der Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration wurden die Resistenzen von 55 *S. agalactiae*-Isolaten von Kühen mit Mastitis gegenüber fünf Antibiotika (Tetrazyklin, Gentamicin, Amikacin, Erythromycin und Penicillin) analysiert. Die Isolate zeigten die höchste Resistenz gegenüber Tetrazyklin (72,5 %), gefolgt von Gentamicin (29,4 %) und Amikacin (29,4 %). Die niedrigste Resistenzrate verzeichnete China gegenüber Erythromycin (23,5 %). Auch in dieser Studie zeigten sich alle Isolate gegenüber Penicillin sensibel (Gao et al. 2012).

Bislang konnten keine Resistenzen von *S. agalactiae* gegenüber Penicillin beobachtet werden. Aus diesem Grund bleibt die intramammäre Therapie mit Penicillin das Mittel der Wahl zur Behandlung von Streptokokkenmastitiden (Haenni et al. 2018, Hernandez et al. 2021). Das Vorhandensein von wirksamen Antibiotika ist von großer Bedeutung, da die *S. agalactiae* Mastitis eine sehr niedrige Selbstheilungsrate hat (Keefe 1997).

3. Material und Methoden

3.1. *S. agalactiae*-Isolate

In dieser Studie wurden 62 mastitisassoziierte *S. agalactiae*-Isolate aus unterschiedlichen österreichischen Milchviehbetrieben untersucht. Es wurde pro Betrieb nur ein Isolat in die Studie eingeschlossen, da wie in der Literatur bereits beschrieben (Wald et al. 2020) alle Isolate auf einem Betrieb dem gleichen Stamm angehören. Bei der Auswahl des jeweiligen Isolates eines Betriebes war die Sauberkeit bzw. Freiheit der Probe von Schmutzkeimen das Hauptkriterium. Diese wurden in den Jahren 2009 bis 2021 aus aseptisch gewonnenen Viertelgemelksproben isoliert und in Hirn-Herz Boullion (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit DMSO als Kryoprotektor bei -80 °C konserviert. Um eine möglichst umfangreiche Anzahl an Isolaten aus großen Teilen Österreichs in der Studie bearbeiten zu können, wurden überdies Isolate von den diagnostischen Laboren AGES Graz, Qualitätslabor Gmünd, AGES Linz und TGD Labor Ried im Innkreis an die Veterinärmedizinische Universität Wien geschickt. Bei 31 der 62 Isolate lagen Daten über die Klinik des Tieres, die makroskopische Milchbeurteilung sowie der Einsendungsgrund vor. Diese wurde deskriptiv ausgewertet und die erhaltene prozentuale Prävalenz der jeweiligen Symptome, Milchbilder und Einsendungsgründe interpretiert.

3.2. Kolonimorphologische und Biochemische Charakterisierung

Für die Charakterisierung mussten die kryokonservierten Stämme rekultiviert werden. Dafür wurde mit einer sterilen 5 µl Einmalöse gefrorene Kultur entnommen und auf Columbiaagar (Merck KGaA, Darmstadt) mit Zusatz von 5 % Schafblut ausgestrichen. Die Bebrütung der beimpften Nährmedien erfolgte aerob für 24 h bei 37 °C im Brutschrank.

Strukturmorphologie und Hämolyse

Nach 24 und 48 Stunden wurde die Kolonimorphologie auf dem Blutagar makroskopisch (Größe, Wachstum in Reinkultur, Hämolyseverhalten) beurteilt. Die vorgefundenen Koloniemerkmale der kultivierten *S. agalactiae*-Isolate wurden mit der allgemeinen Beschreibung der Morphologie von Streptokokken auf Schafblutagar verglichen. Zur Bestätigung der Gattungsmerkmale wurden eine Gram-Färbung (Gram-positive Kokken) und ein Katalase-Test (negativ) durchgeführt (Huber-Schlenstedt et al. 2018).

Wachstum auf Galle-Äskulin-Azid-Agar

Zur Abgrenzung von Streptokokken gegenüber Enterokokken und zur Beurteilung der Fähigkeit zur Äskulin-Hydrolyse wurden alle Isolate auf Galle-Äskulin-Azid-Agar (BAA-Agar, Thermoscientific, Waltham, Massachusetts, USA) ausgestrichen und 24 h bei 37 °C inkubiert.

Spaltung von Äskulin

Die Äskulin-Spaltung wurde zusätzlich auf äskulinhaltigem Schafblutagar bestehend aus Columbiaagar Basis + 1 g/l Äskulin (Merck KGaA, Darmstadt) + 50 ml/l Schafblut, überprüft. Dazu wurden die *S. agalactiae*-Isolate mit einer sterilen Impföse aufgetragen und 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Beurteilung der Kolonien erfolgte unter einer UV-Lampe. Dabei wurde darauf geachtet, ob die Fluoreszenz des Agars erhalten blieb (negative Reaktion) oder ob sie aufgrund der Verstoffwechselung von Äskulin zu Äskuletin aufgehoben wurde (positive Reaktion).

Wachstum auf modifiziertem Rambach-Agar

Der modifizierte Rambach-Agar, ein chromogenes Medium wird vom diagnostischen Labor der Klinik zur Diagnostik von *Streptococcus uberis* eingesetzt (Wald et al. 2017). In dieser Studie wurde er zur Charakterisierung der β -Galaktosidasefähigkeit von *S. agalactiae* (β -Galaktosidase-negativ) und damit zur Abgrenzung gegenüber *Streptococcus uberis* (β -Galaktosidase-positiv) verwendet.

Die Isolate wurden auf den modifizierten Rambachagar (Watts et al. 1993) aufgetragen und bei 37 °C für 24 h bebrütet. Bei der Befundung wurde beurteilt, ob die aufgetragene Kolonie in der Lage ist β -Galaktosidase zu exprimieren (blaue Kolonien, zB. *Streptococcus uberis*) bzw. ob die Bakterien in der Lage sind Propylenglykol zu verstoffwechseln (rote (rosa) Kolonien).

Lancefield Gruppenbestimmung

Die Bestimmung der Lancefieldgruppen A, B, C, D und G erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Streptococcal grouping KIT (Oxoid Ltd., Basingstoke). Dazu wurde Koloniematerial mit 200 μ l Extraktionsenzym in einer kleinen Eprovette vermischt. Diese Suspension wurde anschließend bei 37 °C für 15 min inkubiert. Die Agglutination der extrahierten Antigene mit den jeweiligen Antikörpern wurde anschließend auf einem festen Papierstreifen durchgeführt. Dabei wurde pro Isolat ein Streifen verwendet, auf welchen jeweils 1 Tropfen aller Latexreagenzien (A, B, C, D, G) getropft wurde. Zu jedem dieser Tropfen wurde mit einer Einmalpipette das zuvor extrahierte Antigen zugetropft und gut vermischt. Wenn es zu einer Agglutination kommt, wird diese makroskopisch auf dem Papierstreifen sehr deutlich sichtbar und kann gut beurteilt werden.

CAMP-Test

Zur Bestätigung von *S. agalactiae* wurde der CAMP-Test durchgeführt. Dafür wurde mit einer sterilen Impföse ein β -Toxin bildender *Staphylococcus aureus*-Stamm auf Columbiaagar (Merck KGaA, Darmstadt) mit 5 % Schafblutzusatz aufgetragen, sodass der Impfstrich den Agar in 2 Hälften teilt. Anschließend konnten die zu prüfenden *S. agalactiae*-Kolonien sowie ein Referenzstamm als Positivkontrolle abwechselnd links und rechts des *Staphylococcus aureus*-Impfstriches von der Mitte nach außen, senkrecht zu dem *Staphylococcus aureus*-Impfstrich mit einer Öse ausgestrichen werden. Es wurde beim

Auftragen darauf geachtet, dass die Proben den *Staphylococcus aureus*-Impfstrich nicht berühren, sondern im Abstand von ca. 2–3 mm aufgetragen werden. Die beimpften Platten wurden für 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend auf eine etwaige vorhandene halbmondförmige Hämolyseverstärkung, die positive Reaktion beurteilt.

API®RAPID ID 32 STREP

Zunächst wird eine Reinkultur der zu untersuchenden Kolonie auf einer Columbiaagarplatte mit 5 % Schafblutzusatz benötigt. Davon wurde mit einem Wattetupfer etwas Kolonie entnommen und in eine 2 ml Ampulle API®Suspensions-Medium (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) übertragen. Die Trübung dieser hergestellten Suspension sollte dem McFarland-Standard 4 entsprechen (Freney et al. 1992). Von dieser Suspension wurde mit einer Kolbenhubpipette jeweils 55 µl in jede der 32 Vertiefungen des API-Teststreifens (bioMérieux, Marcy l'Etoile) pipettiert. Diese Vertiefungen enthalten jeweils unterschiedliche dehydrierte Medien, welche dann mit der Suspension während einer vierstündigen Inkubation reagieren. Für die Inkubation wurden die Streifen zugedeckt bei 37 °C bebrütet.

Um die Reaktionen korrekt auswerten zu können wurden nach der Inkubation einzelnen Reaktionen zusätzliche Reagenzien gemäß folgendem Schema zugegeben:

- VP Reaktion: 1 Tropfen VP A (bioMérieux, Marcy l'Etoile) und VP B (bioMérieux, Marcy l'Etoile) Reagenz
- APPA bis GTA Reaktion: 1 Tropfen FB Reagenz (bioMérieux, Marcy l'Etoile)
- HIP Reaktion: 1 Tropfen NIN Reagenz (bioMérieux, Marcy l'Etoile)

Nachdem diese Reagenzien zugetropft wurden, konnten die Farbumschläge in den Vertiefungen nach fünf Minuten beurteilt werden. Die Auswertung erfolgte visuell anhand einer Ablesetabelle, welche in der Anleitung abgebildet ist. Für jede einzelne Reaktion wurde auf einem Ergebnisblatt die positive oder negative Befundung eingetragen. Die Identifizierung der jeweiligen Keime erfolgte mit der apiweb Identifizierungssoftware (bioMérieux, Marcy l'Etoile). Es handelt sich hierbei um eine online Datenbank, welche aufgrund der Kombination von positiven und negativen Reaktionen einer Probe den Keim identifiziert.

Cefinase-Aktivität

Der Cefinase-Test (Mast Group, Liverpool, Großbritannien) ist ein Schnelltest, welcher das Vorhandensein von β -Laktamasen bei isolierten Kulturen überprüft. Der Test besteht aus Filterpapierplättchen, welche mit dem chromogenen Cephalosporin Nitrocefim imprägniert sind. Wenn die Amid-Bindung von Nitrocefim durch β -Laktamasen hydrolysiert wird, kommt es zu einem raschen Farbumschlag von gelb auf rot. Die Cefinase imprägnierten Plättchen wurden mit einer sterilen Pinzette entnommen und in einen Tropfen steriles Wasser getaucht. Mit dem angefeuchteten Plättchen wurde etwas von der zu prüfenden Kultur entnommen. Anschließend wurde ein etwaiger Farbumschlag nach fünf Minuten sowie nach einer Stunde beurteilt.

3.3. Antibiotische Resistenztestung

Zur Bestimmung der antibiotischen Empfindlichkeit von *S. agalactiae* gegenüber ausgewählten Wirkstoffen wurden sowohl ein Agardiffusionstest, als auch ein Mikrodilutionsverfahren (MHK Bestimmung) durchgeführt.

Kirby-Bauer Agardiffusionstest

Die Prüfung des Resistenzverhaltens der verschiedenen Isolate wurde sowohl gegenüber veterinär-, als auch humanmedizinisch relevanten antibiotischen Wirkstoffen durchgeführt. Die getesteten antibiotischen Wirkstoffe sind in Tab. 2 angeführt. Für alle Einzelwirkstoffe wurden die Antibiotika-Plättchen von Mast Group, Liverpool, Großbritannien verwendet. Bei den beiden veterinärmedizinischen Kombinationspräparaten handelt es sich um folgende Wirkstoffe:

- Framycetin 100 µg + Penicillin G 10 Units (Benestermycin[®], Boehringer, Ingelheim, D)
- Cefalexin 15 µg + Kanamycin 30 µg (Ubrolexin[®], Boehringer, Ingelheim, D)

Für die Erstellung standardisierter Antibiogramme wurden von den zu testenden Kolonien Keimsuspensionen der optischen Dichte entsprechend McFarland 0,5 hergestellt und gleichmäßig auf Müller Hinton Agar mit 5 % Schafblut (Merck KGaA, Darmstadt) ausgestrichen (Weinstein 2018). Anschließend wurden die Testplättchen mit definierten Antibiotikakonzentrationen aufgebracht und die beimpften Platten über 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Beurteilung der antibiotischen Empfindlichkeit erfolgte nach Abmessung der Hemmhofdurchmesser (in mm) durch Vergleich mit den in Tab. 2 angegebenen Grenzwerten (Pillar et al. 2009, Pillar et al. 2014, EUCAST 2021, Weinstein et al. 2021).

Tab. 2: Human- und veterinärmedizinisch relevante Wirkstoffe, die mittels Agardiffusionstest geprüft wurden

humanmedizinische Wirkstoffe	Grenzwerte Hemmhofdurchmesser	veterinärmedizinische Wirkstoffe	Grenzwerte Hemmhofdurchmesser
1. Rifampicin 5 µg	S ≥ 21 mm ² R ≤ 15 mm ²	1. Penicillin G 10 Units	S ≥ 24 mm ¹ (S ≥ 19 mm ² R ≤ 19 mm ²)
2. Clindamycin 2 µg	S ≥ 19 mm ¹ I 16–18 mm ¹ R ≤ 15 mm ¹ (S ≥ 17 mm ² R ≤ 17 mm ²)	2. Ampicillin 10 µg	S ≥ 24 mm ¹ (S ≥ 19 mm ² R ≤ 19 mm ²)
3. Linezolid 30 µg	S ≥ 19 mm ² R ≤ 19 mm ² (S ≥ 21 mm ¹)	3. Cefalexin 15 µg + Kanamycin 30 µg	S ≥ 20 mm ³ I 18–19 mm ³ R ≤ 17 mm ³
4. Cefotaxime 30 µg	S ≥ 24 mm ¹ (S ≥ 19 mm ² R ≤ 19 mm ²)	4. Framycetin 100 µg + Penicillin G 10 Units	S ≥ 21 mm ⁴ I 19–20 mm ⁴ R ≤ 18 mm ⁴
5. Erythromycin 15 µg	S ≥ 21 mm ¹ I 16–20 mm ¹ R ≤ 15 mm ¹ (S ≥ 21 mm ² R ≤ 18 mm ²)	5. Tetrazyklin 30 µg	S ≥ 23 mm ¹ I 19–22 mm ¹ R ≤ 18 mm ¹ (S ≥ 23 mm ² R ≤ 20 mm ²)
6. Vancomycin 30 µg	S ≥ 17 mm ¹ (S ≥ 13 mm ² R ≤ 13 mm ²)	6. Cefepime 30 µg	S ≥ 24 mm ¹

¹Weinstein et al. 2021 (CLSI), ²EUCAST 2021, ³Pillar et al. 2009, ⁴Pillar et al 2014, S=sensibel, R=resistent, I=intermediär

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Das Verfahren, welches für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration angewendet wurde, ist die sogenannte „Broth microdilution“- (Mikroverdünnung einer Bouillon) Methode. Dies ist die Referenzmethode für die Sensibilitätsprüfung von schnell wachsenden aeroben Bakterien. Dabei wird die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums bestimmt, welche das Bakterienwachstum zur Gänze hemmt. Diese Konzentration ist die sogenannte minimale Hemmkonzentration (MHK) und wird in mg/L oder in µg/ml angegeben (EUCAST 2021).

Die MHK-Sensibilitätsprüfung wurde mit den MICRONAUT-S Veterinär Platten (Merlin, Bornheim, Deutschland) durchgeführt. Dabei handelt es sich um kommerziell erhältliche Mikrotiterplatten, welche dehydrierte antibiotische Wirkstoffe in aufsteigenden Konzentrationen enthalten. Diese Antibiotika werden durch Zugabe einer standardisierten Bakteriensuspension rehydratisiert (Anleitung Merlin 2016). Die Antibiotikabeladung der Testplatte ist in Tab. 3 aufgelistet.

Zur Herstellung des Inokulums wurden mit einem sterilen Wattetupfer einige wenige Kolonien einer auf Blutagar gewachsenen Reinkultur in 5 ml NaCl (0,9 %) überführt. Um die gewünschte Kulturmenge im Inokulum zu erreichen, muss die Trübung dem McFarland-Standard 0,5 entsprechen. Anschließend wurden 200 µl des Inokulums in 11,5 ml H-Medium pipettiert und gut homogenisiert (Anleitung Merlin 2016). Von der hergestellten Bakteriensuspension wurde manuell mit einer 8-Kanal Pipette je 100 µl in jedes Probenwell der Mikrotiterplatte pipettiert. Pro Platte können je 2 Stämme getestet werden. Anschließend wurden die Testplatten mit einer Folie abgeklebt. Diese soll verhindern, dass die Bakteriensuspension bei der Inkubation austrocknet. Die verschlossenen Mikrotiterplatten wurden bei 37 °C für 24 h bebrütet.

Die Befundung erfolgte visuell. Die Testplatten wurden dafür gegen das Licht gehalten und alle Vertiefungen von unten beurteilt. Zunächst wurde die Wachstumskontrolle in den ersten zwei Vertiefungen (1A und 1B) auf eine etwaige Trübung geprüft. Eine Trübung der Wachstumskontrolle bestätigt, dass die zugegebene Kultur unter den gegebenen Wachstumsbedingungen grundsätzlich in der Lage ist zu wachsen. Anschließend wurde bei den restlichen Wells beurteilt, ob die Kultur durch das jeweilige Antibiotikum in der jeweiligen Konzentration inhibiert wurde oder nicht (nicht inhibiert = Trübung bzw. Sediment = positive Reaktion) (Anleitung Merlin 2016). Für die Auswertung der Sensibilität wurden die Ergebnisse

der visuellen Beurteilung mit den MHK Grenzwerten (Pillar et al. 2009, Feßler et al. 2012, Pillar et al. 2014, EUCAST 2021, Weinstein et al. 2021), welche in Tab. 3 aufgelistet sind, verglichen.

Zusammenfassend wurde die MHK gemäß folgendem Flusschema durchgeführt (Abb. 2):

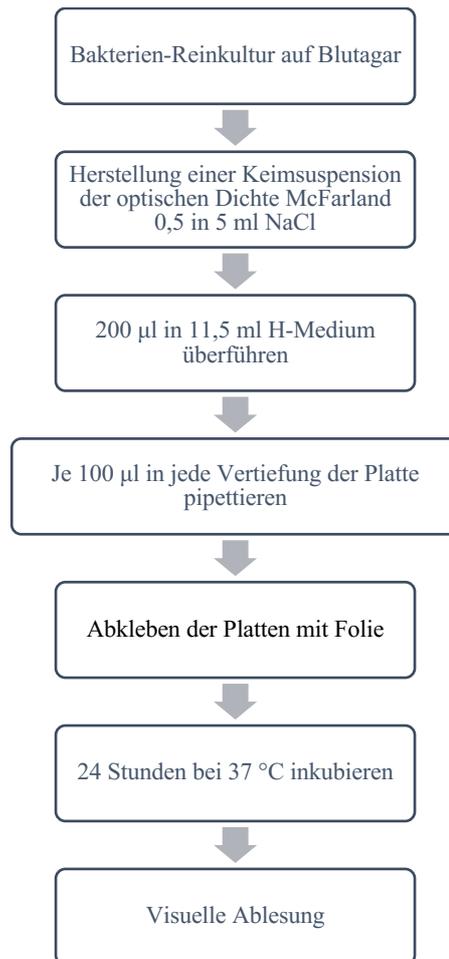


Abb. 2: Flusschema modifiziert nach Merlin (2016)

Tab. 3:MHK Antibiotika und Grenzwerte

Wirkstoff	Grenzwert [$\mu\text{g/ml}$]
Amoxicillin/Clavulansäure	$S \leq 0,125^2$ $R > 0,125^2$
Ampicillin	$S \leq 0,125^2$ $R > 0,125^2$ ($S \leq 0,25^1$)
Cefazolin	$S \leq 0,125^2$ $R > 0,125^2$
Cefoperazon	$S \leq 2^5$ $I = 4^5$ $R \geq 8^5$
Cefquinom	$S \leq 0,125^2$ $R > 0,125^2$
Erythromycin	$S \leq 0,25^{1,2}$ $I = 0,5^{1,2}$ $R \geq 1^1$
Kanamycin/Cefalexin	$S \leq 8^3$ $I = 16^3$ $R \geq 32^3$
Marbofloxacin	
Oxacillin	$S \leq 0,125^2$ $R > 0,125^2$
Penicillin G	$S \leq 0,125^2$ $R > 0,125^2$ ($S \leq 0,12^1$)
Pirlimycin	$S \leq 2^1$ $R \geq 4^1$

¹Weinstein et al. 2021 (CLSI), ²EUCAST 2021, ³Pillar et al. 2009; ⁴Pillar et al 2014, ⁵Feßler et al. 2012;
S=sensibel, R=resistent, I=intermediär

Im Anschluss an den Vergleich mit den Grenzwerten wurde bei beiden Methoden (Agardiffusionstest und MHK Bestimmung) die Anzahl an resistenten (R), intermediären (I) und sensiblen (S) Isolaten in Relation zur Gesamtmenge der getesteten Isolate (n=62) gesetzt und der jeweilige prozentuelle Anteil (R, I, S) für jedes Antibiotikum berechnet.

4. Ergebnisse

4.1. Isolate: Sammlung, Herkunft, Klinik

Bei 31 der 62 getesteten Isolate lagen Daten über die Einsendungsgründe, die Klinik des jeweiligen Tieres sowie die makroskopische Milchbeurteilung vor. Der Schalmtest wurde bei 25 der 31 Proben durchgeführt. Daraus geht hervor, dass die Infektion durch *S. agalactiae* bei knapp 50 % der Kühe mit einer mittel- bzw. hochgradigen Zellzahlerhöhung einherging (gelb bis pflanzartige Konsistenzänderung des Schalm-Milchgemisches). Allerdings fiel der Schalmtest in knapp 20 % der Viertelgemelksproben trotz des Nachweises von *S. agalactiae* negativ aus (keine Schlierenbildung/keine Konsistenzänderung des Schalm-Milchgemisches). Die Sedimentmenge, ein weiterer Parameter der makroskopischen Milchbeurteilung, konnte bei über 90 % der Proben nach dem Zentrifugieren als gering („+“) sowie der Überstand als „normal“ eingestuft werden. Die Sedimentfarbe war bei mehr als der Hälfte der Proben weiß, die übrigen Proben zeigten größtenteils gelbes und nur vereinzelte Proben blutiges Sediment. Granulozyten, als Parameter der mikroskopischen Milchbeurteilung, kamen bei über der Hälfte der Proben gar nicht („-“) oder nur in sehr geringer Menge („(+“) vor. Nur rund ein Achtel der Proben wurden mit einer hochgradigen Granulozytenzahl („+++“) beurteilt. Überdies wiesen weniger als die Hälfte der Proben eine hochgradige („+++“) Keimmenge auf (Tab. 4).

Tab. 4: Zusammenfassung der Befunde der makroskopischen (grobsensorischen) und mikroskopischen (Granulozyten im Sediment nach Gramfärbung) Milchbeurteilung

	nd	-	(+)	+	++	+++
Schalm	19,35 %	19,35 %		12,90 %	16,13 %	32,26 %
Sed. Menge				93,35 %	/	6,45 %
Granulozyten		32,26 %	22,58 %	16,13 %	16,13 %	12,90 %
Keimmenge				29,00 %	32,26 %	38,71 %
Überstand	normal	leicht wässrig				
	96,77 %	3,23 %				
Sed. Farbe	weiß	gelb	blutig			
	54,84 %	38,71 %	6,45 %			

Schalm = California Mastitis Test, Sed. = Sediment, nd = nicht durchgeführt, - Schalm = keine Schlieren, Test negativ; + Schalm = geringgradig erhöhte Zellzahl; ++ Schalm = mittelgradig erhöhte Zellzahl; +++ Schalm = hochgradig erhöhte Zellzahl; Granulozyten: - = 0; (+) = vereinzelt (jedes 2. Gesichtsfeld); + = 5/Gesichtsfeld; ++ = 5-10/Gesichtsfeld; +++ = >10/Gesichtsfeld

Bei der Auswertung der Einsendungsgründe konnten zwei Hauptgründe differenziert werden. Einerseits wurden Proben ausschließlich aufgrund eines erhöhten Zellgehaltes, ohne jegliche weitere klinische Symptomatik, eingesandt. Demgegenüber wurden nahezu gleich viele Proben mit dem Vorbericht einer Zellzahlerhöhung, inklusive klinischer Symptome wie beispielsweise ein erkranktes Viertel, eine Euterschwellung oder eine Milchveränderung an die diagnostischen Labore versandt. Bei einer geringen Anzahl an Proben wurden andere Gründe, wie beispielsweise die Kontrolle vor dem Trockenstellen oder bereits bekannte Keime in einem bestimmten Viertel beschrieben (Abb. 3).

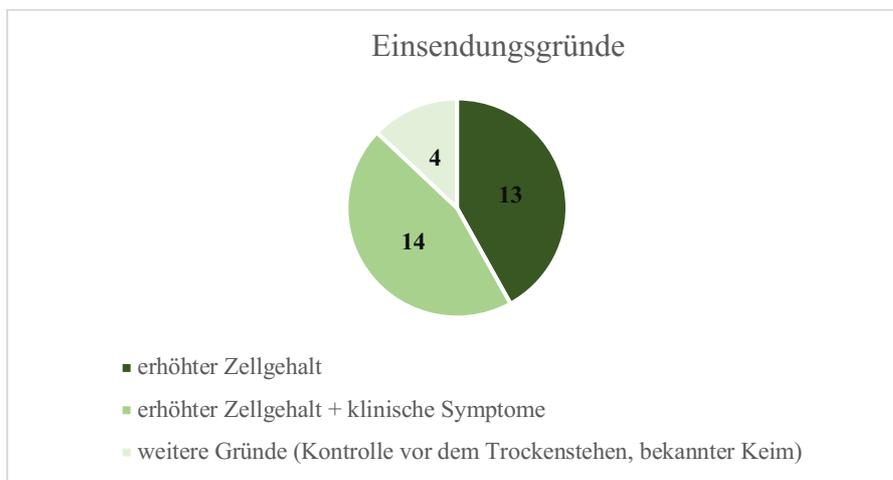


Abb. 3: Auswertung der Einsendegründe auf Basis der Angaben der Probenbegleitschreiben

Eine detaillierte Übersicht über die erhobenen Daten der makroskopischen Milchbeurteilung, der Klinik und der Einsendungsgründe der einzelnen Proben ist in Tab. 5 im Appendix nachzulesen.

4.2. Morphologische und Biochemische Eigenschaften

4.2.1. Koloniemorphologie

Die *S. agalactiae*-Isolate zeigten auf der Columbiaagarplatte mit 5 % Schafblutzusatz folgendes Erscheinungsbild: zarte, kleine, ca. 1 mm große Kolonien, farblos (durchscheinend), flach, matt-glänzend. Die Mehrheit der Isolate (95,16 %; 59 Isolate) zeigten eine β -Hämolyse. Bei den restlichen 4,84 % (drei Isolate) konnte keine Hämolyse beobachtet werden (γ -Hämolyse).

4.2.2. CAMP-Test

Alle Isolate zeigten im CAMP-Test eine halbmond- bzw. keilförmige Verstärkung der Hämolyse des *Staphylococcus aureus*-Stammes (Abb. 4) und wurden somit als CAMP-positiv bewertet.



Abb. 4: zeigt einen positiven CAMP-Test von fünf verschiedenen *S. agalactiae*-Isolaten

4.2.3. Differentialnährböden für Gram-positive, Katalase-negative Kokken

Keines der Isolate konnte auf dem Galle-Äskulin-Azid-Agar anwachsen. Demnach wurden alle Isolate von der Galle in ihrem Wachstum gehemmt. Außerdem war bei der Äskulin-Prüfung auf dem gallefreien Agar kein Isolat in der Lage Äskulin zu spalten. Es konnte daher bei jedem Isolat unter der UV-Lampe die erhaltene Fluoreszenz des Agars beobachtet werden. Auch auf dem modifizierten Rambach-Agar färbte sich keine der gewachsenen Kolonien blau. Daher kann gesagt werden, dass keines der Isolate in der Lage ist β -Galaktosidase zu exprimieren.

4.2.4. Cefinase-Aktivität

Bei keinem der befeuchteten und mit *S. agalactiae* beimpften Plättchen konnte eine Rotfärbung beobachtet werden. Daher waren alle 62 Stämme (100 %) Cefinase-negativ (Abb. 5).

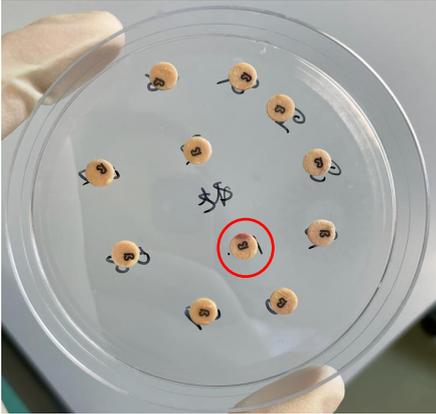


Abb. 5: Cefinase Reaktion; roter Kreis = positiv
Kontrolle mit Rotverfärbung der beimpften Stelle

4.2.5. Charakterisierung und Bestätigung mittels API®RAPID ID 32 STREP

Alle Isolate wurden mittels API®RAPID ID 32 STREP als *S. agalactiae* identifiziert. Bei 59,7 % (n=37) der Proben wurde *S. agalactiae* mit 99,9 % als signifikante Taxa erkannt. Alle als *S. agalactiae* identifizierten Stämme zeigten bei den folgenden Reaktionen die gleichen Ergebnisse:

Positiv: VP, APPA, HIP, MAL

Negativ: BGAR, RAF, BGAL, PyrA, BNAG, GTA, GLYG, MEL, MLZ, LARA, DARL, BMAN

Des Weiteren sind 50 der 62 Isolate (80,65 %) in der Lage Laktose zu fermentieren. Die Ergebnisse aller einzelnen Proben und Reaktionen sind in Tab. 6 und Tab. 7 im Appendix nachzulesen. In Abb. 6 ist ein API®RAPID ID 32 STREP Teststreifen mit den 32 Reaktionen und in Abb. 7 das zugehörige Auswertschema dargestellt.



Abb. 6: Teststreifen mit 32 einzelnen biochemischen Reaktionen

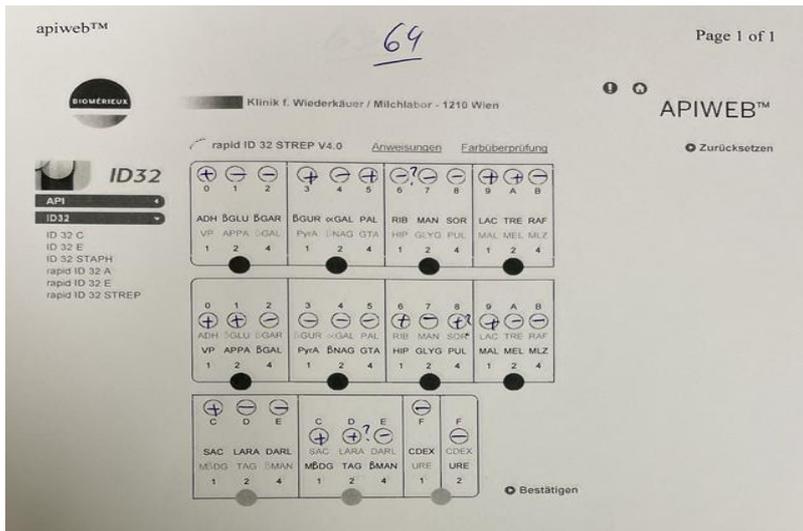


Abb. 7: Auswertung des Teststreifens: positive und negative Ergebnisse werden in die online Datenbank übertragen

4.2.6. Serologische Charakterisierung

Bei allen Isolaten konnte bei der Zugabe des Latex Reagenz Gruppe B (Antikörper gegen das Oberflächenantigen B) eine deutliche Agglutination beobachtet werden (Abb. 8). Dadurch konnten alle Isolate (100 %) als Streptokokken der Lancefieldgruppe B bestätigt werden. Bei der Prüfung der Isolate mit den übrigen Reagenzien (A, C, D, G) wurde bei keinem der Stämme eine Agglutination beobachtet.

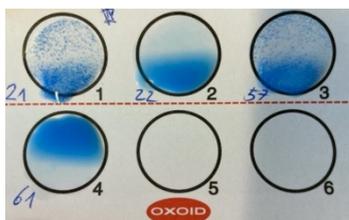


Abb. 8: Latexagglutination: positive (Probe 21 und 57); keine Agglutination: negative Reaktion (22 und 61)

4.3. Phänotypische Resistenzbestimmung

4.3.1. Agardiffusionstest

Wie in Abb. 9 und Abb. 10 dargestellt, waren alle Isolate (100 %; n=62) im Agardiffusionstest gegenüber Penicillin, Ampicillin, Framycetin/Penicillin, Cefepime (Vet AB), Rifampicin, Linezolid und Cefotaxime (Human AB) sensibel. Gegenüber Cefalexin/Kanamycin zeigten sich 59 Isolate (95,16 %) sensibel, zwei waren intermediär und ein Isolat resistent. Eine Tetrazyklin-Resistenz konnte bei 46 Isolaten (74,19 %) beobachtet werden, zwei Isolate (3,23 %) zeigten sich intermediär, während lediglich 14 Isolate (22,58 %) sensibel gegenüber Tetrazyklin waren. Die Empfindlichkeit gegenüber Clindamycin stellte sich mit zwölf resistenten (19,35 %) und 50 sensiblen (80,65 %) Isolaten dar. Auch gegenüber Erythromycin verhielten sich die Isolate mit elf resistenten (17,74 %) und 51 sensiblen (82,26 %) Stämmen ähnlich. Gegenüber Vancomycin wiesen nur vier Isolate (6,45 %) eine Resistenz auf. Die übrigen 58 Isolate (93,55 %) waren gegenüber Vancomycin sensibel. Außerdem zeigten im Agardiffusionstest alle 12 Clindamycin-resistenten Stämme eine zusätzliche Resistenz gegenüber Erythromycin. Die im Appendix zu findenden Tabellen (Tab. 8 und Tab. 10) geben einen Überblick über die Ergebnisse der gemessenen Hemmhofdurchmesser der einzelnen Isolate.

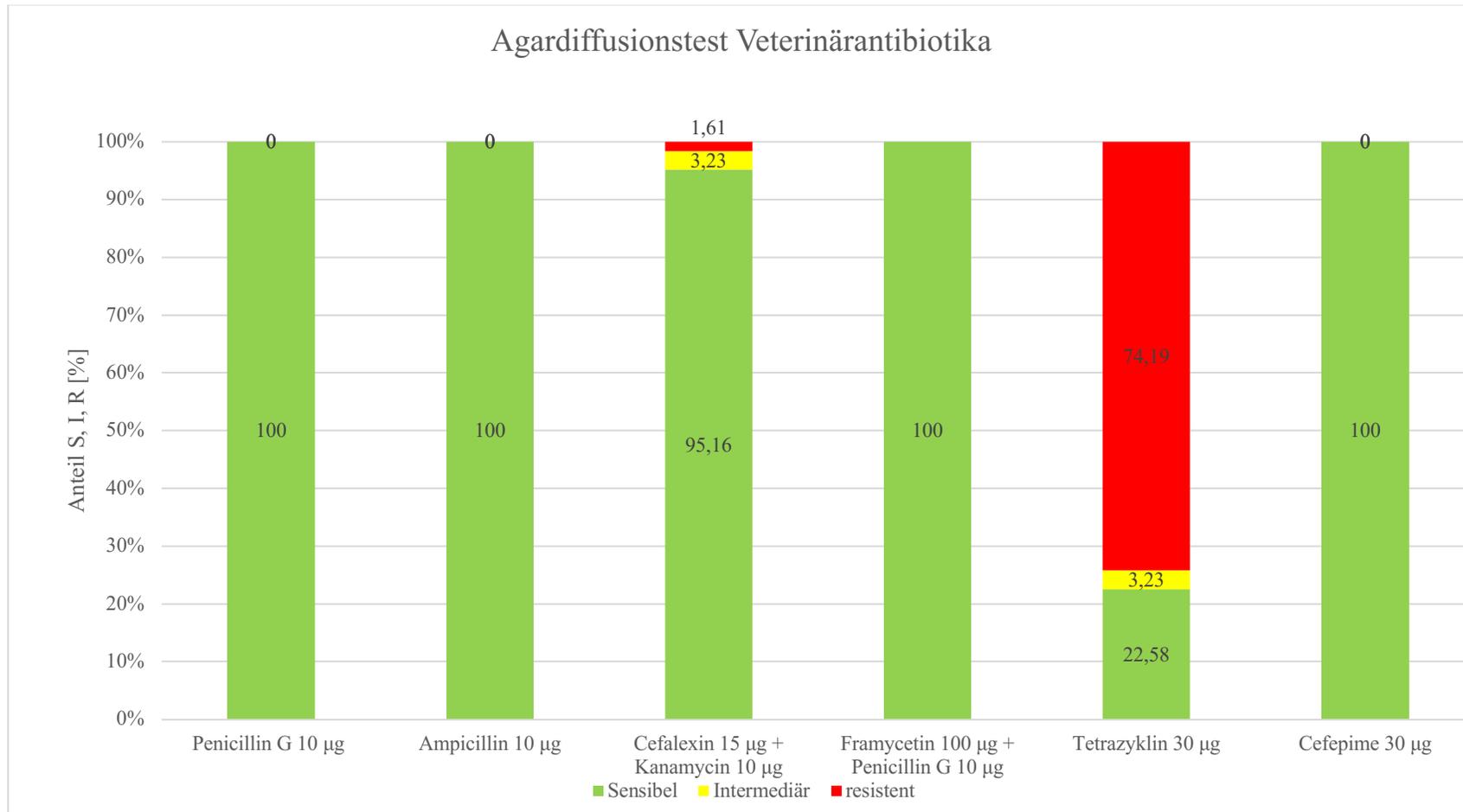


Abb. 9: Auswertung Agardiffusionstest; S=sensibel, R=resistent, I=intermediär

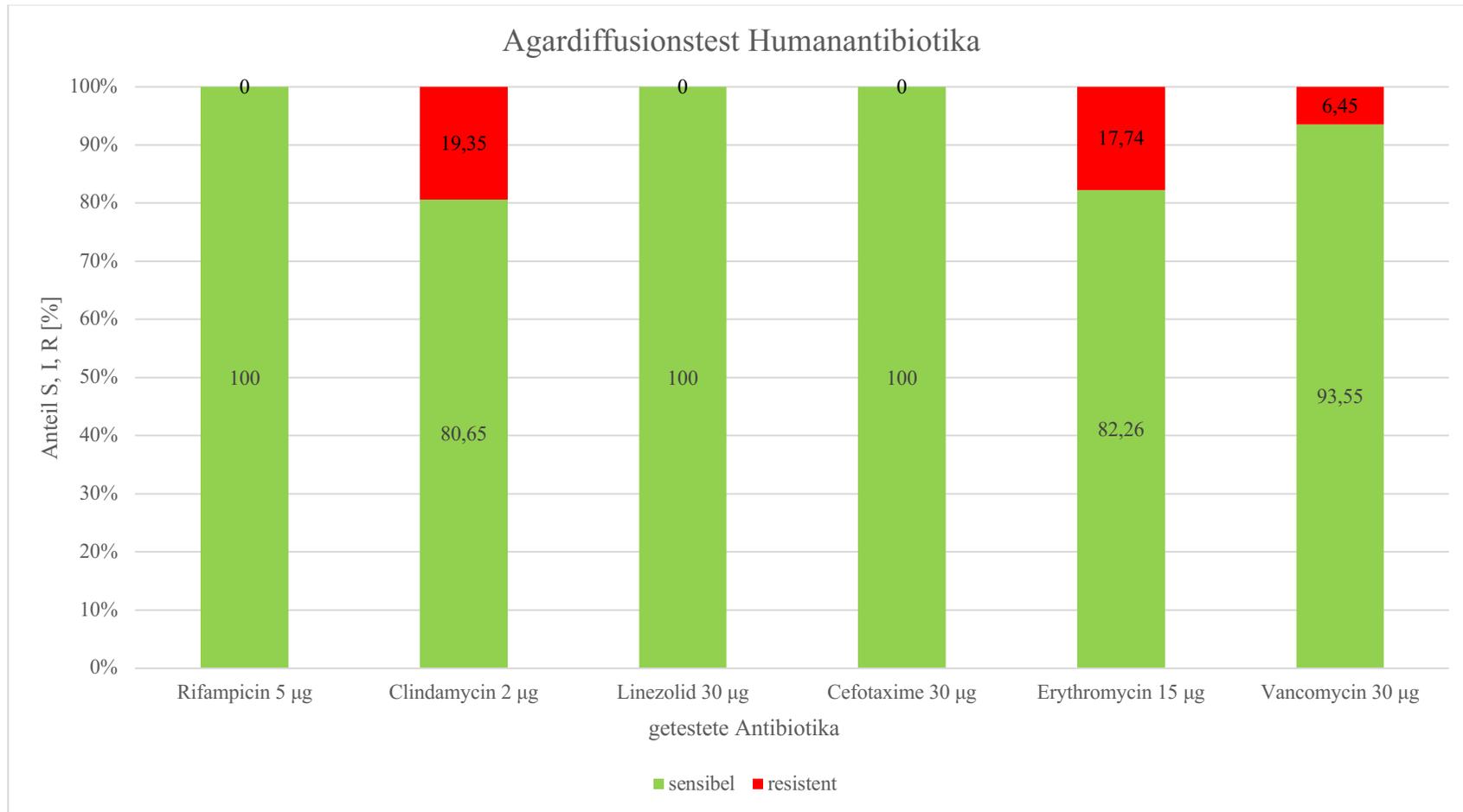


Abb. 10: Auswertung Agardiffusionstest; S=sensibel, R=resistent, I=intermediär

4.3.2. Mikrodilutionsverfahren

Auch im Mikrodilutionsverfahren bestätigte sich, dass alle Isolate sensibel gegenüber Penicillinen (inklusive Aminopenicillin und dem Kombinationspräparat Framycetin/Penicillin) waren. Resistenzen einzelner Stämme wurden hingegen gegenüber Pirlimycin, Erythromycin und Cefalexin/Kanamycin festgestellt. Die Ergebnisse des Mikrodilutionsverfahrens sind in Abb. 11 grafisch dargestellt. Die visuelle Beurteilung der einzelnen Proben (Tab. 8) sowie eine tabellarische Auswertung mit Berechnung der MHK_{50} und MHK_{90} (Tab. 9) sind im Appendix nachzulesen.

Mehrfachresistente Isolate

Außerdem wurden bei mehreren Isolaten Resistenzen gegen drei oder mehrere Antibiotika detektiert. Eine Mehrfachresistenz gegenüber drei Antibiotika (Clindamycin, Erythromycin und Tetrazyklin) konnte bei 62 Isolaten (14,52 %) beobachtet werden. Davon zeigten acht Isolate (12,90 %) zusätzlich eine Resistenz gegenüber Pirlimycin und sind daher gegenüber Clindamycin, Erythromycin Tetrazyklin und Pirlimycin mehrfachresistent. Bei sieben dieser Isolate (11,29 %) wurde außerdem eine intermediäre Reaktion gegenüber Kanamycin/Cefalexin beobachtet.

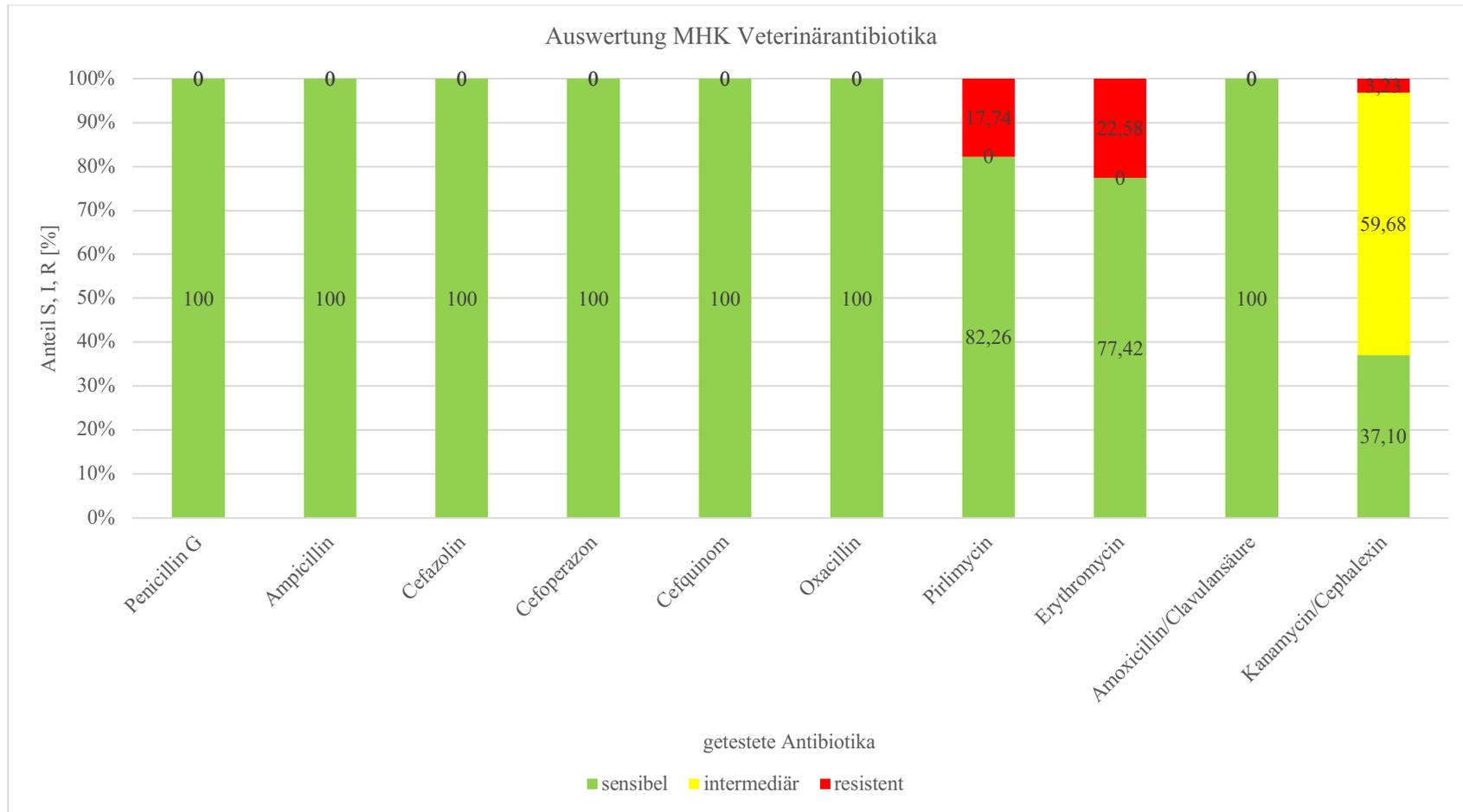


Abb. 11: Auswertung MHK; S=sensibel, R=resistent, I=intermediär

5. Diskussion

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden 62 *S. agalactiae*-Isolate, welche von 2009 bis 2021 gesammelt und kryokonserviert wurden, phänotypisch und biochemisch mit Methoden der konventionellen Bakteriologie untersucht. Zusätzlich wurde das Resistenzverhalten der Isolate gegenüber veterinärmedizinischen und humanmedizinischen antibiotischen Wirkstoffen geprüft.

Die Isolate unterscheiden sich in ihrer Herkunft (ein Isolat pro Betrieb) und stammen aus verschiedenen österreichischen Bundesländern. Obwohl es sich bei dieser Studie aufgrund des Studiendesigns und der relativ niedrigen Probenzahl um keine Prävalenzstudie handelt, zeigen die Ergebnisse dennoch erste Tendenzen hinsichtlich des Vorkommens und der Variabilität von *S. agalactiae*-Stämmen in österreichischen Milchviehbetrieben. Im Milchlabor der Klinik für Wiederkäuer wurden in den Jahren 2015 bis 2020 lediglich in 0,6 % (n=177) der bakteriologisch positiven Viertelgemelksproben (n=27.815) Streptokokken der Lancefieldgruppe B nachgewiesen (Wald et al. 2020). Damit können wir für Österreich den in den skandinavischen Ländern beobachteten Anstieg der Prävalenz nicht nachvollziehen. Als Ursache wird in Skandinavien ein höheres Übertragungsrisiko durch zunehmend größere Herden und den steigenden Einsatz automatischer Melksysteme diskutiert (Mweu et al. 2012, Lyhs et al. 2016). Obwohl die österreichische Milchwirtschaft auch einen Anstieg der durchschnittlichen Herdengröße verzeichnet (2015: 17 Milchkühe pro Betrieb; 2021 19,7 Milchkühe pro Betrieb), bleibt die Milchkuhhaltung im Durchschnitt kleinstrukturiert. Im Gegensatz dazu sind Betriebe in Skandinavien, wie beispielsweise in Dänemark weitaus größer strukturiert und zusätzlich stark angewachsen. Während es in Dänemark 2015 noch durchschnittlich 171 Milchkühe pro Betrieb waren, stieg die Zahl bis 2021 auf 231 Milchkühe je Betrieb an (ICAR 2021). Skandinavische Betriebe verzeichnen außerdem einen hohen Einsatz automatischer Melksysteme. In Dänemark wurden im Jahr 2014 bereits bei 25 % der Betriebe ein automatisches Melksystem eingesetzt (Barkema et al. 2015). Auch in Österreich konnte im Jahr 2020 ein Zuwachs automatischer Melksysteme um 20 % beobachtet werden, jedoch ist die Zahl automatischer Systeme mit 1.078 für 27.062 österreichische Milchviehbetriebe (4 % der Betriebe) derzeit weiterhin gering (ZAR 2020). Ein Bericht von

Hovinen und Pyörälä (2011), welcher epidemiologische Studien über Milchviehbetriebe mit und ohne automatischen Melksystemen zusammenfasst besagt, dass automatische Melksysteme allgemein eine Verschlechterung der Euterhygiene mit sich bringen. Dies sei beispielsweise auf eine schlechtere Reinigung oder auf die fehlende Melkreihenfolge zurückzuführen (Jago et al. 2006, Kaihilahti et al. 2007, Hovinen und Pyörälä, 2011). Überdies wurde in einer weiteren Studie von Radtke et al. (2012) gezeigt, dass die *S. agalactiae*-Prävalenz in Betrieben mit automatischen Melksystemen höher ist als in jenen mit herkömmlichen Melksystemen.

Der Einsendungsgrund an die genannten Labore sowie die makroskopische Beurteilung der Proben und die Klinik der jeweiligen Kuh war bei der Hälfte der Proben ersichtlich. Diese verfügbaren Klinikdaten geben an, dass nahezu jeweils gleich vielen Kühe eine reine Zellzahlerhöhung sowie eine Zellzahlerhöhung mit weiteren klinischen Symptomen zeigten. Dieses Auftreten korreliert in etwa mit der Charakterisierung der *S. agalactiae*-Mastitis von Constable et al. (2017), welcher die *S. agalactiae*-Mastitis wie folgt beschreibt: individuelle Wiederholungen zwischen subakuten und akuten Mastitiden sind üblich. Überdies wird auch beschrieben, dass Streptokokken akute klinische Mastitiden hervorrufen, jedoch sei es ihre Hauptrolle subklinische Mastitiden mit Reduktion der Milchmenge und der Milchqualität auszulösen (Constable et al. 2017). Diese, der *S. agalactiae*-Mastitis zugeschriebene Hauptrolle weicht von dem gehäuften Vorkommen der klinischen Ausprägung (bei ca. der Hälfte der Tiere) der für diese Diplomarbeit beobachteten Kühe ab. Da jedoch nur bei der Hälfte (n=31) der Isolate Klinikdaten vorlagen, sollte diese Beobachtung nicht zu stark gewichtet und daher mit einer größeren Anzahl an Daten genauer untersucht werden.

Alle 62 Isolate wurden mit verschiedenen Methoden der Routinediagnostik auf ihre erregertypischen Merkmale untersucht. Kulturmorphologisch zeigten die 62 für diese Diplomarbeit untersuchten Isolate nur β - und γ -Hämolyse. Obwohl nach Huber-Schlenstedt et al. (2018) *S. agalactiae* in drei verschiedenen Hämolyseformen vorkommen kann, wurde bei keinem der untersuchten Isolate eine α -Hämolyse beobachtet. Im Zuge früherer *S. agalactiae*-Untersuchungen wie beispielsweise von Watts (1988) konnten alle drei Formen gefunden werden. Es gilt dabei zu beachten, dass auch bei Watts (1988) die α -Hämolyse am seltensten bzw. kaum vertreten war. Sowohl die Proben von Watts (1988), als auch die Isolate dieser

Diplomarbeit zeigten am häufigsten eine β -Hämolyse. Weiters war bei 100 % der Proben das Ergebnis der α -Skulin-Prüfung negativ, der Nachweis der serologischen Gruppe B sowie der CAMP-Test positiv. Diese Ergebnisse sind der Literatur zufolge erregertypisch und wichtig zur Identifizierung von *S. agalactiae* (Piepers et al. 2007, Huber-Schlenstedt et al. 2018).

Im Zuge der 32 getesteten biochemischen Reaktionen mit der API[®]RAPID ID 32 STREP Methode wurde auch die Fähigkeit zur Laktosefermentation bei allen Isolaten untersucht. Diese war gegenwärtig mit 80,65 % der Isolate geringer als bei den Stämmen älterer Untersuchungen (94,29 %) (Watts 1988). Bei einer vergleichenden Untersuchung humaner und boviner Isolate von Lyhs et al. (2016) konnte die Fähigkeit zur Laktosefermentation, welche auf einem zusätzlichen Genom boviner Isolate kodiert ist, als einziger Unterschied zwischen den Stämmen humaner und boviner Herkunft festgestellt werden. Diese Eigenschaft sei eine Adaption an die bovine Milchdrüse. Daraus ergeben sich Hinweise auf eine mögliche Herkunft (human oder bovin) eines Stammes, welche mit molekulargenetischen Methoden, wie beispielsweise der PCR, bestätigt werden müssen (Lyhs et al. 2016). Auch in einem Fallbericht von Wald et al. 2020, über das Vorkommen des humanassoziierten ST1 in einem österreichischen Milchviehbetrieb, wurde beschrieben, dass 30 der 31 human-assoziierten ST1 Feldisolate nicht in der Lage waren, Laktose zu fermentieren. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei den *S. agalactiae*-Isolaten eventuell nur zu 80,65 % um bovine *S. agalactiae*-Stämme handelt, während die übrigen Isolate möglicherweise humaner Herkunft sind. Im Vergleich waren es bei früheren Untersuchungen (Watts 1988) noch 94,29 % der Stämme, welche Laktose umsetzen konnten und daher möglicherweise bovinen Ursprung hatten.

Im Agardiffusionstest wurden die Veterinärwirkstoffe Penicillin, Ampicillin, Cefalexin/Kanamycin, Framycetin/Penicillin G, Tetrazyklin und Cefepime getestet. Dabei handelt es sich um wichtige Antibiotika zur Behandlung einer durch Gram-positive Kokken ausgelösten bovinen Mastitis. Überdies liegen für diese Antibiotika sowohl Grenzwerte für die Interpretation der Hemmhofdurchmesser (CLSI oder EUCAST), als auch für die Mastitistherapie zugelassene Arzneyspezialitäten vor. Weiters wurden die Resistenzen gegenüber den Wirkstoffen Rifampicin, Clindamycin, Linezolid, Cefotaxime, Erythromycin und Vancomycin ermittelt. Dies sind Antibiotika, welche der Literatur zufolge auch häufig zur

Behandlung von humanen *S. agalactiae*-Infektionen angewendet werden. Beispielsweise wurden Antibiotika wie Vancomycin, Erythromycin, Clindamycin und Cephalosporine der 3. Generation auch in einer Studie zur Prüfung der Antibiotikaresistenzen von *S. agalactiae* bei Neugeborenen in einem Krankenhaus in Äthiopien als gängige Antibiotika genannt und aus diesem Grund für die Resistenzprüfung verwendet (Gizachew et al. 2018).

Die 62 Isolate der vorliegenden Diplomarbeit zeigten im Agardiffusionstest die höchste Resistenzrate (n=46) gegenüber Tetrazyklin. Zur Interpretation dieser und weiterer Resistenzraten ist die Studie von Dogan et al. (2005), welche Antibiotikaresistenzen von *S. agalactiae* der Wirtsspezies Rind und Mensch vergleichend analysierte, zu erwähnen. In dieser Studie wurden 135 Isolate, welche von 2000 bis 2002 von Rindern (n=83) und Menschen (n=52) in New York isoliert wurden, mittels Agardiffusionstest untersucht. Es konnte eine Tetracyclin-Resistenz mit einer viel höheren Prävalenz (84,6 %) bei humanen *S. agalactiae*-Isolaten als bei bovinen Proben (14,5 %) festgestellt werden. Demnach könnte die hohe Tetrazyklin-Resistenzrate von nahezu drei Viertel der Isolate dieser Diplomarbeit ein Hinweis auf einen möglichen humanen Ursprung dieser Stämme sein. Überdies zeigten sich 31 Isolate eines humanassoziierten ST1-Stammes, welcher von 31 Kühen eines österreichischen Milchviehbetriebes isoliert wurde, ebenfalls resistent gegenüber Tetrazyklin (Wald et al. 2020).

Bei knapp einem Fünftel der in dieser Arbeit getesteten Isolate konnte eine Erythromycin-Resistenz beobachtet werden. Auch gegenüber Erythromycin weisen humane *S. agalactiae*-Stämme (26,9 %) eine höhere Resistenzrate als bovine (3,6 %) auf (Dogan et al. 2005). Zusätzlich waren wiederum alle, als ST1 (humanassoziiert) charakterisierten Stämme aus der Untersuchung von Wald et al. (2020) gegen Erythromycin resistent. Daher liegt der Anteil der Erythromycin-resistenten-Isolate dieser Diplomarbeit auch hier näher an den Resistenzraten, welche bei humanen *S. agalactiae* Stämmen beschrieben werden (Dogan et al. 2005, Wald et al. 2020). Zudem konnte eine steigende Prävalenz von Erythromycin-Resistenzen bei humanen Stämmen schon in den 1990er und 2000er Jahren im Rahmen einiger humanmedizinischer Studien über das Vorkommen von Erythromycin-resistenten *S. agalactiae*-Stämmen in Krankenhäusern verschiedener Länder, wie beispielsweise Korea und Spanien beobachtet werden (Uh et al. 2001, Betriu et al. 2003, Uh et al. 2004). Beispielsweise stieg die Prävalenz Erythromycin-resistenter-*S. agalactiae* in einem Krankenhaus in Spanien von 0,8 % (1993) auf

17,4 % (2001) (Betriu et al. 2003). Diese Prävalenz ist nahezu ident mit jener der Erythromycin-resistenten Isolate der vorliegenden Diplomarbeit (knapp ein Fünftel) und bestärkt somit die Hypothese, dass es sich bei den Erythromycin-resistenten-Isolaten aus der bovinen Milchdrüse um Stämme humaner Herkunft handeln könnte. Noch drastischere Resistenzentwicklungen humaner *S. agalactiae* gegenüber Erythromycin zeigt eine von 1990-1998 durchgeführte Untersuchung von humanen *S. agalactiae*-Stämmen in Korea. Diese ergab, dass die Prävalenz von Erythromycin-resistenten-*S. agalactiae* von 1990 bis 1995 noch bei 0% lag, jedoch in den Folgejahren rapide bis auf 26 % (1996) und bis 1998 sogar auf 40 % angestiegen war (Uh et al. 2001).

Neben der Erythromycin-Resistenz tritt auch die Clindamycin-Resistenz, welche bei einem Fünftel der Isolate der vorliegenden Diplomarbeit beobachtet werden konnte, mit einer höheren Prävalenz bei humanen Stämmen auf. Beispielsweise lag die Resistenzrate gegenüber Clindamycin in der bereits zitierten vergleichenden Studie von Dogan et al. (2005) bei den humanen Isolaten bei 7,8 %, während sie bei den bovinen nur etwa 3,6 % betrug. Eine ähnliche Rate zeigt eine Studie von Betriu et al. (2003), welche die Clindamycin-Resistenzentwicklung in einem Krankenhaus in Spanien untersuchte. War die Prävalenz Clindamycin-resistenter Stämme 1993 noch bei 0,8 %, so stieg sie bis 2001 auf 12,1 % (Betriu et al. 2003). Zusätzlich waren alle multiresistenten humanassoziierten ST1 Isolate im Fallbericht des österreichischen Milchviehbetriebes gegen Clindamycin resistent (Wald et al. 2020). Somit deutet der Literatur zufolge auch die bei einem Fünftel der Isolate detektierte Clindamycin-Resistenz auf ein Resistenzmuster humanassoziiertes *S. agalactiae*-Stämme hin. Bei dem Vorkommen boviner Stämme mit Clindamycin-Resistenz, gilt es überdies zu beachten, dass Clindamycin keine Zulassung zur Verwendung bei Lebensmittelliefernden Tieren hat, da es nicht in der Tabelle 1 der Verordnung über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, gelistet ist (Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission 2009). Des weiteren wurde beobachtet, dass alle Clindamycin-resistenten-Stämme der vorliegenden Diplomarbeit auch gegen Erythromycin resistent waren. Gleiche Ergebnisse beschrieb auch Dogan et al. (2005).

Besonders interessante Ergebnisse liefert eine aktuelle Studie von Hernandez et al. 2021, welche die Resistenzlage von *S. agalactiae*-Stämmen bei Milchkühen, während einer

Mastitisbehandlung mit veterinärmedizinischen sowie humanmedizinischen Antibiotika geprüft hat. Dabei zeigten 30 % (12 von 40) der Isolate Mehrfachresistenzen gegenüber den folgenden fünf antibiotischen Wirkstoffen: Kanamycin, Clindamycin, Pirlimycin, Erythromycin und Tetracyclin (Hernandez et al. 2021). Sehr bedeutend ist hierbei, dass es sich bei vier dieser Antibiotika (Clindamycin, Pirlimycin, Erythromycin und Tetracyclin) um genau dieselben handelt, gegen welche sowohl acht mehrfachresistenten Isolate, der im Zuge dieser Diplomarbeit untersuchten Proben, als auch alle Feldisolate des humanassoziierten ST 1 in der Untersuchung von Wald et al. (2020), Resistenzen zeigten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Resistenzen gegenüber Tetrazyklin, Erythromycin und Clindamycin gehäuft bei humanassoziierten Isolaten auftreten. Eine Mehrfachresistenz gegenüber diesen drei antimikrobiellen Wirkstoffen (Tetracyclin, Erythromycin und Clindamycin) konnte auch bei neun der 62 Isolate der Testreihe dieser Diplomarbeit beobachtet werden. Wobei acht dieser neun Isolate eine zusätzliche Resistenz gegenüber Pirlimycin aufwiesen. Da sowohl alle humanassoziierten ST1 Isolate in der Untersuchung von Wald et al. (2020) also auch Isolate von Dogan et al. (2005) und Hernandez et al. (2021) ein ähnliches Resistenzmuster (Tetrazyklin, Clindamycin, Erythromycin und Pirlimycin) zeigten, wird die Hypothese, dass die genannten neun (Mehrfachresistenz gegenüber drei Antibiotika) bzw. acht (Mehrfachresistenz gegenüber vier Antibiotika) Stämme dieser Diplomarbeit humanassoziierte Stämme sind, unterstrichen.

Bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration war die Prävalenz der Erythromycin resistenten Keime etwas höher als im Agardiffusionstest, sie lag jedoch bei beiden Analysen bei rund einem Fünftel. Dieser Unterschied zwischen den Methoden konnte noch deutlicher bei Kanamycin/Cefalexin beobachtet werden. Hier war die Empfindlichkeit im Agardiffusionstest etwa bei 95 %, während sie bei der MHK Bestimmung mit knapp zwei Fünftel deutlich niedriger lag. Bei dieser niedrigen Kanamycin/Cefalexin Empfindlichkeit im Agardiffusionstest gilt es allerdings zu beachten, dass der Großteil der Isolate keine tatsächliche Resistenz, sondern im Vergleich mit den Grenzwerten eine intermediäre Reaktion zeigte. Es bleibt jedoch unklar, warum es zu diesen unterschiedlichen Resistenzraten zwischen den beiden angewendeten Methoden (Agardiffusionstest, MHK-Wert-Bestimmung) kam.

In der vorliegenden Studie konnten keine Resistenzen der Isolate gegenüber Penicillin festgestellt werden. Auch in der weltweiten Literatur sind bislang keine Penicillin-Resistenzen bei *S. agalactiae* beschrieben worden. Daher bleibt Penicillin nach wie vor die Therapie der Wahl zur Behandlung einer *S. agalactiae*-Mastitis (Hernandez et al. 2021).

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden 62 *S. agalactiae*-Isolate aus österreichischen Milchviehbetrieben phänotypisch und biochemisch charakterisiert. Zusätzlich wurden die Resistenzen gegenüber gängigen antibiotischen Wirkstoffen getestet. Dabei wurde pro Betrieb ein Isolat analysiert. Ziel war es, festzustellen ob die Isolate unterschiedlicher Betriebe in ihren phänotypischen sowie biochemischen Eigenschaften differieren und ob sich Unterschiede im Resistenzprofil nachweisen lassen. Besondere Beachtung galt den Resistenzen der Stämme, da bestimmte Resistenzmuster auf eine Beteiligung humanassoziierter Stämme hinweisen. Kulturmorphologisch zeigten die Isolate auf Columbiaagar angereichert mit 5 % Schafblut ein Wachstum in kleinen, gräulich farblosen, flachen Kolonien mit β -Hämolyse und waren Äskulin-negativ. Außerdem fiel der Nachweis des Gruppenantigens B sowie der CAMP-Test für alle Isolate positiv aus. Bei der biochemischen Charakterisierung konnten alle Isolate aufgrund der Ergebnisse von 32 enzymatischen Reaktionen und einer zugehörigen Datenbank als *S. agalactiae* bestätigt werden. Die Fähigkeit zur Laktosefermentation wurde auf dem API-Teststreifen bei 50 der 62 Isolate (80,65 %) nachgewiesen. Unterschiede ergaben sich auch in der Prüfung des Resistenzverhaltens. Alle Isolate waren sensibel gegenüber Penicillin, Ampicillin, Framycetin/Penicillin, Cefepime, Rifampicin, Linezolid und Cefotaxime im Agargeldiffusionstest sowie gegenüber Penicillin, Ampicillin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom, Oxacillin und Amoxicillin/Clavulansäure bei der MHK Bestimmung. Resistenzen konnten im Agargeldiffusionstest bei einigen Isolaten gegenüber Tetrazyklin, Kanamycin/Cefalexin, Clindamycin, Erythromycin und Vancomycin sowie mittels MHK Bestimmung gegenüber Pirlimycin, Erythromycin und Kanamycin+Cefalexin nachgewiesen werden. Bedeutend ist dabei, dass acht der 62 Isolate mehrfachresistent gegenüber den vier Antibiotika Pirlimycin, Clindamycin, Erythromycin sowie Tetrazyklin waren. Damit ergaben sich Hinweise, dass auch in österreichischen Betrieben Infektionen mit Sequenztypen vorkommen, die auf humanassoziierte Stämme hinweisen. Weiterführende Untersuchungen mit molekularen Methoden sind zielführend.

7. Summary

The aim of the study was to characterize 62 *S. agalactiae*-isolates phenotypically, biochemically and to analyze their resistances against common antibiotics. The isolates originated from milk samples that were submitted for routine diagnostic to the diagnostic laboratory of the Clinic for Ruminants at the University of Veterinary Medicine, Vienna and other Austrian mastitis diagnostic laboratories. All samples were tested for their colony morphology, hemolytic patterns on blood agar, catalase test, cultivation on esculin, CAMP-test and were further analyzed by Lancefield serogrouping. For more precise species identification via biochemical characterization a API RAPID ID 32 STREP was performed. Antimicrobial susceptibility testing was assessed using an agar disk diffusion (ADD) and the minimal inhibitory concentration (MIC) was tested for each isolate.

The antimicrobial resistance testing revealed, that all isolates were sensitive against penicillin, ampicillin, framycetin/penicillin, cefepime, rifampicin, linezolid and cefotaxime by means of the agar disc diffusions test and against penicillin, ampicillin, cefazolin, cefoperazon, cefquinom, oxacillin and amoxicillin/clavulanacid in the MIC test. Resistance behavior was observed for tetracyclin, kanamycin+cefalexin, clindamycin, erythromycin and vancomycin (ADD). Furthermore, resistances against pirlimycin, erythromycin and kanamycin+cefalexin were observed in the MIC test. Isolates distinguished regarding their ability to convert lactose and their resistance pattern. According to literature, the ability for lactose-fermentation is a unique characteristic for bovine-associated *S. agalactiae*-strains. In this study just 80,65 % (n=50) strains were lactose positive. Additionally, 12,90 % of the strains were resistant against the four antibiotics pirlimycin, clindamycin, erythromycin and tetracyclin. These particular resistance patterns are often found in human associated strains. These findings can be indicative, that human associated strains can be found in Austrian dairy herds. Further investigations including the use of molecular biological methods should be carried out.

8. Abkürzungsverzeichnis

AGES: österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH

API: Application Programming Interface

BAA: Galle-Äskulin-Azid-Agar

CAMP Reaktion: Christie, Atkins, und Munch-Peterson Reaktion

DMSO: Dimethylsulfoxid

FB Reagenz: Fast Blue BB

I: intermediär

MHK: minimale Hemmkonzentration

MLST: Multilocus-Sequenztypisierung

NIN Reagenz: Ninhydrin Reagenz

R: resistent

S: sensibel

ST: Sequenztyp

TGD: Tiergesundheitsdienst

VP A, VP B Reagenz: Voges-Proskauer Reagenz

9. Literaturverzeichnis

- 1) Agger JF, Priou C, Huda A, Aagaard K. 1994. Risk factors for transmission of *Streptococcus agalactiae* infection between Danish dairy herds: a case control study. *Veterinary research*, 25(2-3):227–234.
- 2) Andersen HJ, Pedersen LH, Aarestrup FM, Chriel M. 2003. Evaluation of the Surveillance Program of *Streptococcus agalactiae* in Danish Dairy Herds. *Journal of Dairy Science*, 86(4):1233–1239.
- 3) Barkema HW, Keyserlingk MAG, Kastelic JP, Lam TJGM, Luby C, Roy JP, LeBlanc SJ, Keefe GP, Kelton DF. 2015. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *Journal of dairy science*, 98:7426–7445.
- 4) Baumgärtner W, Gruber AD. 2020. *Spezielle Pathologie für die Tiermedizin*. 2. Aufl., Stuttgart: Thieme.
- 5) Betriu C, Culebras E, Gomez M, Rodriguez-Avial I, Sanchez BA, Agreda MC, Picazo JJ. 2003. Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3):1112–1114.
- 6) Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Aujard Y, Brahim N, Geslin P, Elion J. 1992. Analysis of DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Extends the Evidence for Breast Milk Transmission in *Streptococcus agalactiae* Late-Onset Neonatal Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 165:569–573.
- 7) bioMérieux. https://www.mediray.co.nz/media/15794/om_biomerieux_test-kits_ot-32600_package_insert-32600.pdf (Zugriff: 15.03.2022).
- 8) Bisharat N, Crook DW, Leigh J, Harding RM, Ward PN, Coffey TJ, Maiden MC, Peto T, Jones N. 2004. Hyperinvasive Neonatal Group B *Streptococcus* Has Arisen from a Bovine Ancestor. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5): 2161–2167.
- 9) Bliss SJ, Manning SD, Tallman P, Baker CJ, Pearlman MD, Marrs CF, Foxman B. 2002. Group B *Streptococcus* Colonization in Male and Nonpregnant Female University Students: A Cross-Sectional Prevalence Study. *Clinical Infectious Diseases*, 34(2):184–190.
- 10) Brown JH. 1919. The use of blood agar for the study of *Streptococci*. *Monographs of the Rockefeller Institute for medical research*, 9: 1–97.
- 11) Brown J, Farnsworth R, Wannamaker LW, Johnson DW. 1974. CAMP Factor of Group B *Streptococci*: Production, Assay, and Neutralization by Sera from Immunized Rabbits and Experimentally Infected Cows. *Infection and Immunity*, 9(2): 377–383.
- 12) Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. 2017. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats: Volume two*. 11. Aufl., St. Louis, Missouri: Elsevier.
- 13) Dargent-Molina P, Scarlett J, Pollock RVH, Erb HN, Sears P. 1988. Herd-level Risk Factors for *Staphylococcus* and *Streptococcus agalactiae* Intramammary Infection. *Preventive Veterinary Medicine*, 6:127–142.

- 14) Dogan B, Schukken YH, Santisteban C, Boor KJ. 2005. Distribution of Serotypes and Antimicrobial Resistance Genes among *Streptococcus agalactiae* Isolates from Bovine and Human Hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12):5899–5906.
- 15) EUCAST – EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. 2021. Breakpoint table for interpretation of MICs and zone diameters, Version 11:45–49.
- 16) EUCAST. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/MIC_testing/Reading_guide_BMD_v_3.0_2021.pdf (Zugriff 17.03.2022).
- 17) Feßler AT, Kaspar H, Lindeman CJ, Stegmann MR, Peters T, Mankertz J, Watts JF, Schwarz S. 2012. A proposal of interpretive criteria for Cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 157: 226-231.
- 18) Freney J, Bland S, Etienne J, Desmonceaux M, Boeufgras JM, Fleurette J. 1992. Description and Evaluation of the Semiautomated 4-Hour Rapid ID 32 Strep Method for Identification of *Streptococci* and Members of Related Genera. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10):2657–2661.
- 19) Gao J, Yu FQ, Luo LP, He JZ, Hou RG, Zhang HQ, Li SM, Su JL, Han B. 2012. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *The Veterinary Journal*, 194:423–424.
- 20) Gizachew M, Tiruneh M, Moges F, Adefris M, Tigabu Z, Tessema B. 2018. Newborn colonization and antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus agalactiae* at the University of Gondar Referral Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatrics*. <https://doi.org/10.1186/s12887-018-1350-1>. (Zugriff: 14.11.2022)
- 21) Haenni M, Lupo A, Madec JY. 2018. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus spp.* *Microbiology Spectrum*, 6(2): ARBA-0008-2017. DOI:10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017 (Zugriff 22.04.2022).
- 22) Hernandez L, Bottini E, Cadona J, Cacciato C, Monteavaro C, Bustamante A, Sanso AM. 2021. Multidrug Resistance and Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates From Dairy Cattle With Mastitis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. DOI 10.3389/fcimb.2021.647324 (Zugriff 22.04.2022).
- 23) Hodges HG. 1955. New York State mastitis research and control program. *Proceedings United States Live Stock Sanitary Association* 1954: 236–243.
- 24) Huber-Schlenstedt R, Knappstein K, Krömker V, Nebel U, Reinecke F, Zschöck M. 2018. Leitlinien zur Labordiagnostik der Mastitis – Probennahme und Mikrobiologische Untersuchung. 3. Aufl., Gießen: Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Service GmbH.
- 25) Huijps K, Lam TJGM, Hogeveen H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75:113–120
- 26) ICAR (International Committee for Animal Recording). 2021. <https://my.icar.org/stats/list> (Zugriff 11.11.2022).
- 27) Ikiz S, Basaran B, Bingöl EB, Cetin Ö, Kasikci G. 2013. Presence and antibiotic susceptibility patterns of contagious mastitis agents (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) isolated from milk of dairy cows with subclinical mastitis. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*, 37(5):569–574.

- 28) Jago JG, Davis KL, Copeman PJ, Woolford MM. 2006. The effect of pre-milking teat-brushing on milk processing time in an automated milking system. *Journal of Dairy Research*, 73:187–192.
- 29) Jain B, Tewari A, Bhandari BB, Jhala MK. 2012. Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. *Veterinarski archiv*, 82(5):423–432.
- 30) Jensen NE. 1980. Distribution of serotypes of group-B *streptococci* in herds and cows within an area of Denmark. *Acta veterinaria Scandinavia*, 21(3):354–366.
- 31) Jensen NE. 1982. Experimental bovine group-B *streptococcal* mastitis induced by strains of human and bovine origin. *Nordisk veterinærmedicin*, 34(12):441–50.
- 32) Jensen TG, Konradsen HB, Bruun B. 1999. Evaluation of the Rapid ID 32 Strep system. *Clinical Microbiology and Infection*, 5:417–423.
- 33) Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, Glaser P, Rusniok C, Crook DWM, Harding RM, Bisharat N, Spratt BG. 2003. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2530–2536.
- 34) Jorgensen HJ, Nordstoga AB, Sviland S, Zadoks RN, Solverod L, Kvitle B, Mork T. 2016. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks?. *Veterinary Microbiology*, 184:64–72.
- 35) Kaihilahti J, Suokannas A, Raussi S. 2007. Observation of Cow Behavior in an Automatic Milking System using Web-based Video Recording Technology. *Biosystems Engineering*, 96(1):91–97.
- 36) Katholm J, Rattenborg E. 2009. Overvågningen af B-streptokok infektion i danske malkekvægsbesætninger. *Dansk Veterinærtidsskrift*, 92(19):24–31.
- 37) Katholm J, Bennedsgard TW, Koskinen MT, Rattenborg E. 2012. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 95:5702–5708.
- 38) Keefe GP. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Canadian Veterinary Journal*, 38:429–437.
- 39) Keefe G. 2012. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28: 203–216.
- 40) Krömker V. 2007. *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene.*, Stuttgart: Parey.
- 41) Lancefield R. 1928. The antigenetic complex of *Streptococcus haemolyticus*: I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *The Journal of experimental medicine*, 47(1):91–103.
- 42) Lyhs U, Kulkas L, Katholm J, Persson Waller K, Saha K, Tomusk RJ, Zadoks RN. 2016. *Streptococcus agalactiae* Serotype IV in Humans and Cattle, Northern Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 22(12):2097–2103.
- 43) Manning DS, Springman AC, Million AD, Milton NR, McNamara SE, Somsel PA, Bartlett P, Davies HD. 2010. Association of Group B *Streptococcus* Colonization and Bovine Exposure: A Prospective Cross-Sectional Cohort Study. DOI: 10.1371/journal.pone.0008795 (Zugriff 22.04.2022).
- 44) Merlin. 2016. MICRONAUT-S Veterinär Anleitung:1–10.

- 61) Stableforth AW. 1950. Bovine mastitis with particular regard to eradication of *Streptococcus agalactiae*. *Veterinary Record*, 62:219–224.
- 62) Tyler JW, Wilson R, Dowling P. 1992. Treatment of Subclinical Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 8(1):17–28.
- 63) Uh Y, Jang IH, Hwang GY, Lee MK, Yoon KJ, Kim HY. 2004. Serotypes and Genotypes of Erythromycin-Resistant Group B *Streptococci* in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7):3306–3308.
- 64) Uh Y, Jang IH, Hwang GY, Yoo KJ, Song W. 2001. Emerging erythromycin resistance among group B *streptococci* in Korea. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 20(1):52–54.
- 65) Van den Heever LW, Giesecke WH. 1980. Experimental induction of bovine mastitis with human strains of group B *Streptococci* (*Streptococcus agalactiae*). *Journal of the south African Veterinary Association*, 80(2):107–109.
- 66) Van der Mee-Marquet N, Fourny L, Arnault L, Domelier AS, Salloum M, Lartigue MF, Quentin R. 2008. Molecular Characterization of Human-Colonizing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Throat, Skin, Anal Margin, and Genital Body Sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9):2906–2911.
- 67) Verani JR, McGee L, Schrag SJ. 2010. Prevention of Perinatal Group B *Streptococcal* Disease: Revised Guidelines from CDC, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports*, 59(RR10):1–32.
- 68) Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. 2009. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:015:0001:0072:DE:PDF> (Zugriff 04.12.2022).
- 69) Wald R, Baumgartner M, Urbantke V, Stessl B, Wittek T. 2017. Diagnostic accuracy of a standardized scheme for identification of *Streptococcus uberis* in quarter milk samples: A comparison between conventional bacteriological examination, modified Rambach agar medium culturing, and 16s rRNA gene sequencing. *Journal of Dairy Science*, 100(2):1459–1466.
- 70) Wald R, Lichtmannsperger K, Urbantke V, Hess C, Spergser J, Baumgartner M. 2020. Nachweis von *Streptococcus agalactiae* Sequenztyp 1 in einem österreichischen Milchviehbetrieb – Ein Fallbericht. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 107:147–155.
- 71) Watts JL, Salmon SA, Yancey Jr RJ. 1993. Use of modified Rambach agar to differentiate *Streptococcus uberis* from other mastitis *streptococci*. *Journal of dairy science*, 76(6):1740–1743.
- 72) Watts JL. 1988. Characterization and Identification of Streptococci Isolated from Bovine Mammary Glands. *Journal of Dairy Science*, 71(6):1616–1624.
- 73) Weinstein MP, Lewis JS, Bobenchik AM, Campeau S, Cullen SK, Galas MF, Gold H, Humphries RM, Kirn TJ, Limbago B, Mathers AJ, Mazzulli T, Richter SS, Satlin M, Schuetz AN, Simner PJ. 2021. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31. Aufl., USA: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).

- 74) Weinstein MP. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 13. Aufl., USA: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).
- 75) Winter P. 2009. Praktischer Leitfaden Mastitis Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand., Stuttgart: Parey
- 76) Zadoks RN, Gonzalez RN, Boor KJ Schukken YH. 2004. Mastitis-Causing *Streptococci* Are Important Contributors to Bacterial Counts in Raw Bulk Tank Milk. *Journal of Food Protection*, 67(12):2644–2650.
- 77) Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16(4):357–72.
- 78) ZAR. 2020. ZAR-Jahresbericht 2020. <http://en.zar.at/Downloads/annual-reports.html> (Zugriff 11.11.2022).
- 79) Zimmermann P, Gwee A, Curtis N. 2017. The controversial role of breast milk in GBS late-onset disease. *Journal of Infection*, 74:34–40.

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Differenzierung von Streptokokken (modifiziert nach Huber-Schlenstedt et al. 2018)	9
Abb. 2: Flussschema modifiziert nach Merlin (2016)	27
Abb. 3: Auswertung der Einsendegründe auf Basis der Angaben der Probenbegleitschreiben	30
Abb. 4: zeigt einen positiven CAMP-Test von fünf verschiedenen <i>S. agalactiae</i> -Isolaten	31
Abb. 5: Cefinase Reaktion; roter Kreis = positiv Kontrolle mit Rotverfärbung der beimpften Stelle	32
Abb. 6: Teststreifen mit 32 einzelnen biochemischen Reaktionen	33
Abb. 7: Auswertung des Teststreifens: positive und negative Ergebnisse werden in die online Datenbank übertragen	33
Abb. 8: Latexagglutination: positive (Probe 21 und 57); keine Agglutination: negative Reaktion (22 und 61)	33
Abb. 9: Auswertung Agardiffusionstest; S=sensibel, R=resistent, I=intermediär	35
Abb. 10: Auswertung Agardiffusionstest; S=sensibel, R=resistent, I=intermediär	36
Abb. 11: Auswertung MHK; S=sensibel, R=resistent, I=intermediär	38

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die Tabelle zeigt die 32 untersuchten Substrate, welche von Isolaten, die das jeweilige Enzym besitzen verstoffwechselt werden können. Aufgrund der vorhandenen oder fehlenden Verstoffwechslung einzelner Substrate können <i>S. agalactiae</i> identifiziert werden.	8
Tab. 2: Human- und veterinärmedizinisch relevante Wirkstoffe, die mittels Agardiffusionstest geprüft wurden	25
Tab. 3:MHK Antibiotika und Grenzwerte	28
Tab. 4:Zusammenfassung der Befunde der makroskopischen (grobsensorischen) und mikroskopischen (Granulozyten im Sediment nach Gramfärbung) Milchbeurteilung	29
Tab. 5: makroskopische Milchbeurteilung und Einsendungsgründe der Isolate	57
Tab. 6: API Auswertungen ADH-GLYG	59
Tab. 7: API Auswertung PUL-URE, Stamm, % ID	61
Tab. 8: Hemmhofdurchmesser und minimale Hemmkonzentrationen Veterinärwirkstoffe	63
Tab. 9:Auswertung MHK	69
Tab. 10:Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe	70

12. Danksagung

Ein großes Dankeschön gilt Dr. med. vet. Cassandra Eibl für das Angebot zur Erstellung einer Diplomarbeit, die Auswahl des spannenden Themas, die fachliche Unterstützung sowie jede Menge Ratschläge zur Erstellung einer Diplomarbeit. Weiters möchte ich mich bedanken, dass ich jederzeit und mit all meinen Fragen willkommen war und die Zusammenarbeit sehr gut funktioniert hat.

Großer Dank gilt Univ. Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Dipl. ECBHM für die entscheidenden fachlichen und formellen Verbesserungen.

Ich möchte mich herzlich bei dem überaus hilfsbereiten Team des Milchlabors der Klinik für Wiederkäuer für die großartige Unterstützung sowohl bei den Tätigkeiten im Labor, der Bereitstellung des Materials, bei fachlichen Ratschlägen, beim Zurechtfinden in benötigten Computerprogrammen als auch bei allen anderen kleineren und größeren Fragestellungen jeglicher Art bedanken. An dieser Stelle vielen lieben Dank an Dr. med. vet. Martina Baumgartner, DI Verena Urbantke, Lihui Han König und Bettina Löffler. Ich schätze es sehr, dass ihr euch immer sofort all meinen Unklarheiten angenommen habt und mich so nett im Milchlabor aufgenommen habt.

13. Appendix

Zu 31 der 62 Isolate lagen folgende Informationen über die makroskopische Milchuntersuchung und den Einsendungsgrund vor.

Tab. 5: makroskopische Milchbeurteilung und Einsendungsgründe der Isolate

Nr.	Viertel	Schalm	Überstand	Sed. Menge	Sed. Farbe	Granulocyten	Keimmenge	Einsendungsgrund
1	rh	-	normal	+	weiß	-	+	hoher Zellgehalt
2	lv	nd	normal	+	weiß	(+)	+	hoher Zellgehalt
3	lh	+++	normal	+	gelb	+++	++	hoher Zellgehalt
4	rh	+	normal	+	gelb	(+)	+++	erkrankt, hoher Zellgehalt
5	rv	+++	normal	+	weiß	+	+	hoher Zellgehalt
6	rv	+++	normal	+	gelb	++	++	erkrankt, hoher Zellgehalt
7	lv	++	normal	+	weiß	(+)	+++	hoher Zellgehalt
8	rh	-	normal	+	gelb	+	+++	Kontrolle vor Trockenstellen
9	rv	+++	normal	+++	gelb	+++	+++	erkrankt, hoher Zellgehalt
10	lv	-	normal	+	weiß	-	++	rv <i>E. coli</i> , hoher Zellgehalt
11	rv	+	normal	+	weiß	-	+	hoher Zellgehalt
12	lh	nd	leicht wässrig	+++	gelb	+++	+	Sonstige Gründe (lh: <i>E. coli</i> und <i>S. agalactiae</i>)
13	rv	nd	normal	+	gelb	-	+++	hoher Zellgehalt, Kontrolle vor Trockenstellen
14	lh	nd	normal	+	weiß	-	++	hoher Zellgehalt (lh: <i>S. aureus</i> und <i>S. agalactiae</i>)
15	rv	++	normal	+	weiß	+	+++	lv erkrankt, rv erkrankt, hoher Zellgehalt
16	rh	nd	normal	+	blutig	(+)	+++	Kontrolle vor Trockenstellen
17	rh	++	normal	+	weiß	(+)	+++	rh erkrankt, hoher Zellgehalt
18	rh	-	normal	+	weiß	-	++	Kontrolle vor Trockenstellen
19	lh	++	normal	+	gelb	++	+++	hoher Zellgehalt (rh <i>S. agalactiae</i> und <i>S. aureus</i>)
20	lv	++	normal	+	weiß	+	+++	hoher Zellgehalt
21	rv	+++	normal	+	gelb	++	++	lv und rv erkrankt, hoher Zellgehalt
22	rv	aus der Stammsammlung genommen						
23	lv	keine Angaben						
24	rh	-	normal	+	weiß	-	++	hoher Zellgehalt

Nr.	Viertel	Schalm	Überstand	Sed. Menge	Sed. Farbe	Granulocyten	Keimmenge	Einsendungsgrund
25	keine Angaben							
26	rh	+++	normal	+	weiß	(+)	++	rh erkrankt, rv erkrankt, hoher Zellgehalt, Milchveränderung, Schwellung des Euters
27	rh	+++	normal	+	gelb	++	+	hoher Zellgehalt
28	lh	+++	normal	+	weiß	++	++	lh erkrankt, lv erkrankt, hoher Zellgehalt, Milchveränderung
29-32 keine Angaben								
33	rh	-	normal	+	weiß	-	+	hoher Zellgehalt
34	lh	+	normal	+	weiß	-	+	hoher Zellgehalt
35-53 keine Angaben								
54	rh	nd	normal	+	weiß	-	+	lh erkrankt, hoher Zellgehalt, Milchveränderung, Schwellung des Euters
55	rh	+	normal	+	gelb	+	++	hoher Zellgehalt
56-62 keine Angaben								
63	lv	+++	normal	+	blutig	+++	+++	hoher Zellgehalt, Milchveränderung, Schwellung des Euters
64	rv	+++	normal	+	gelb	(+)	+++	hoher Zellgehalt
65	keine Angaben							

Schalm = California Mastitis Test, Sed. = Sediment, nd = nicht durchgeführt, - Schalm = keine Schlieren, Test negativ; + Schalm = geringgradig erhöhte Zellzahl; ++ Schalm = mittelgradig erhöhte Zellzahl; +++ Schalm = hochgradig erhöhte Zellzahl; Granulozyten: - = 0; (+) = vereinzelt (jedes 2. Gesichtsfeld); + = 5/Gesichtsfeld; ++ = 5–10/Gesichtsfeld; +++ = >10/Gesichtsfeld

Tab. 6: API Auswertungen ADH-GLYG

Nr.	ADH	β GLU	β GAR	β GUR	α GAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF	VP	APPA	β GAL	PyrA	β NAG	GTA	HIP	GLYG
1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
4	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
6	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
7	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
8	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
9	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
11	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
12	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
13	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
14	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
15	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
16	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
17	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
18	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
19	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
20	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
21	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
23	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
24	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
25	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
26	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
27	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
28	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
29	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
30	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
31	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
32	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
33	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
34	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
35	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

Tab. 6: API Auswertungen ADH-GLYG

Nr.	ADH	βGLU	βGAR	βGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF	VP	APPA	βGAL	PyrA	βNAG	GTA	HIP	GLYG
36	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
37	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
38	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
39	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
40	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
41	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
42	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
43	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
44	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
45	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
46	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
47	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
48	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
49	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
50	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
51	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
52	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
53	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
54	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
55	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
56	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
58	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
59	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
60	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
62	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
63	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
64	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
65	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

Tab. 7: API Auswertung PUL-URE, Stamm, % ID

Nr.	PUL	MAL	MEL	MLZ	SAC	LARA	DARL	MßDG	TAG	ßMAN	CDEX	URE	Stamm	%ID	Widersprechende Reaktionen
1	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	ADH, PAL
2	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL
3	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, MßDG
4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, MßDG
5	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, URE
6	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	RIB, PUL, MßDG
7	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,2 %	PAL, MßDG
8	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	PAL, RIB, PUL, MßDG
9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	PAL, RIB; SAC, MßDG
10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, MßDG
11	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	PAL, PUL, MßDG
12	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	PAL, MßDG
13	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,7 %	PAL, RIB, PUL, MßDG
14	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	αGAL, PAL, MßDG
15	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,7 %	PAL, RIB, PUL, MßDG
16	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,7 %	PAL, RIB, PUL, MßDG
17	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL
18	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL
19	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, PUL
20	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, PUL
21	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, PUL
23	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,7 %	MßDG
24	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	MßDG
25	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,7 %	RIB, PUL, MßDG
26	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, MßDG
27	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,6 %	PAL, RIB, PUL, MßDG
28	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	RIB, MßDG
29	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	RIB, MßDG
30	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	SOR, MßDG
31	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	RIB, CDEX

Nr.	PUL	MAL	MEL	MLZ	SAC	LARA	DARL	M8DG	TAG	βMAN	CDEX	URE	Stamm	%ID	Widersprechende Reaktionen
32	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,7 %	RIB, PUL, M8DG
33	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,6 %	PAL, RIB, PUL, M8DG
34	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,6 %	PAL, RIB, PUL, M8DG
35	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,1 %	PUL, M8DG
36	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,5 %	PAL, RIB, M8DG
37	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, M8DG
38	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,6 %	ADH, RIB, PUL, M8DG
39	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL
40	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,6 %	PAL, RIB, PUL
41	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,6 %	PAL, RIB, PUL, M8DG
42	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, M8DG
43	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL
44	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL
45	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, M8DG
46	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,1 %	PAL, PUL, M8DG
47	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL
48	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, UL
49	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PAL, RIB, M8DG
50	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	RIB
51	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	-
52	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	RIB, PUL, MAL, M8DG
53	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	RIB, PUL
54	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	RIB, M8DG
55	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	-
56	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	-
58	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	RIB, PUL
59	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	-
60	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	PUL
62	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	-
63	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	αGAL
64	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,9 %	RIB
65	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. agalactiae</i>	99,8 %	RIB, PUL

Isolat	Hemmhofdurchmesser						Minimale Hemmkonzentration										
	PG 10C	AP10C	CFX15/K30	FRA100/ PG10C	T30C	CPM30C	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
65	42	40	30	40	14	40	≤4/2	≤4	≤4	≤2	≤1	>4	16/1,6	1	≤1	≤0,125	>4
	S	S	S	S	R	S											
Grenz- wert	S≥24 ¹ (S≥19 R≤19 ²)	S≥24 ¹ (S≥19 R≤19 ²)	S≥20 ³ I18–19 ³ R≤17 ³	S≥21 ⁴ I19–20 ⁴ R≤18 ⁴	S≥23 ¹ I19–22 ¹ R≤18 ¹ (S≥23 ² R≤20 ²)	S≥24 ¹	S≤0,125 ² R>0,125 ²	S≤0,125 ² R>0,125 ² (S≤0,25 ¹)	S≤0,125 ² R>0,125 ²	S≤2 ⁵ I4 ⁵ R≥8 ⁵	S≤0,125 ² R>0,125 ²	S≤0,25 ^{1,2} I0,5 ^{1,2} R≥1 ¹	S≤8 ³ I16 ³ R≥32 ³		S≤0,125 ² R>0,125 ²	S≤0,125 ² R>0,125 ² (S≤0,12 ¹)	S≤2 ¹ R≥4 ¹

¹Weinstein et al. 2021 (CLSI), ²EUCAST 2021, ³Pillar et al. 2009, ⁴Pillar et al 2014, S=sensibel, R=resistent, I=intermediär

Tab. 9: Auswertung MHK

Auswertung MHK Veterinärwirkstoffe																			
	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	MHK ₉₀	MHK ₅₀	S	I	R	Sens. %	Int. %	Resist. %
PEN	62	0	0	0	0	0	0	0				< 0,125	< 0,125	≤ 0,125 ²		> 0,125 ²	100 %	0 %	0 %
AMP						62	0	0	0			< 4	< 4	a		a	100 %	0 %	0 %
CEZ						62	0	0	0	0		< 4	< 4	a		a	100 %	0 %	0 %
CPZ					62	0	0	0	0			< 2	< 2	2 ⁵	4 ⁵	8 ⁵	100 %	0 %	0 %
CEQ				62	0	0	0	0				< 1	< 1	a		a	100 %	0 %	0 %
OXA				62	0	0	0					< 1	< 1	a		a	100 %	0 %	0 %
PIR				51	0	0	0	11				> 4	< 1	≤ 2 ¹		≥ 4 ¹	82,26 %	0 %	17,74 %
ERY	48	0	0	0	0	1	2	11				> 4	< 0,125	≤ 0,25 ¹	0,5 ^{1,2}	≥ 1 ¹	77,42 %	0 %	22,58 %
AMC						63	0	0	0	0		< 4	< 4	a		a	100 %	0 %	0 %
K/C						7	0	16	37	1	1	16/1,6	16/1,6	8 ³	16 ³	32 ³	37,10 %	59,68 %	3,23 %
MAF		1	0	4	32	25						2	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

¹Weinstein et al. 2021 (CLSI), ²EUCAST 2021, ³Pillar et al. 2009, ⁴Pillar et al 2014, ⁵Feßler et al. 2012; a: Die Empfindlichkeit dieser Wirkstoffe wird von der Empfindlichkeit von Penicillin abgeleitet; PEN=Penicillin G, AMP=Ampicillin, CEZ=Cefazolin, CPZ=Cefoperazon, CEQ=Cefquinom, OXA=Oxacillin, PIR=Pirlimycin, ERY=Erythromycin, AMC=Amoxicillin/Clavulan-säure, K/C= Kanamycin/Cephalexin, MAF = Marbofloxacin; S=sensibel, R=resistent I=intermediär; MHK₉₀=minimale Hemmkonzentration um, 90 % der koloniebildenden Einheiten zu inhibieren, MHK₅₀=minimale Hemmkonzentration um 50 % der koloniebildenden Einheiten zu inhibieren; NA=nicht auswertbar

Tab. 10: Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe

Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe							Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe						
Isolat	Rifampicin 5 µg	Clindamycin 2 µg	Linezolid 30 µg	Cefotaxime 30 µg	Erythromycin 15 µg	Vancomycin 30 µg	Isolat	Rifampicin 5 µg	Clindamycin 2 µg	Linezolid 30 µg	Cefotaxime 30 µg	Erythromycin 15 µg	Vancomycin 30 µg
1	26	28	30	36	28	22	34	24	0	28	36	0	22
	S	S	S	S	S	S		S	R	S	S	R	S
2	24	26	28	34	30	20	35	26	26	28	36	28	22
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
3	26	26	24	32	26	18	36	28	30	28	36	32	20
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
4	26	0	28	34	12	22	37	26	28	30	40	30	24
	S	R	S	S	R	S		S	S	S	S	S	S
5	26	28	28	36	30	24	38	26	34	34	42	30	26
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
6	24	0	20	40	22	12	39	26	28	34	36	32	22
	S	R	S	S	S	R		S	S	S	S	S	S
7	26	26	28	36	30	22	40	28	30	44	38	24	24
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
8	26	26	30	40	32	22	41	26	0	32	38	0	22
	S	S	S	S	S	S		S	R	S	S	R	S
9	24	24	28	34	28	20	42	28	28	30	38	30	22
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
10	24	24	28	34	26	18	43	28	26	28	36	30	24
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
11	30	32	30	40	36	24	44	28	26	28	36	32	22

Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe							Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe						
Isolat	Rifampicin 5 µg	Clindamycin 2 µg	Linezolid 30 µg	Cefotaxime 30 µg	Erythromycin 15µg	Vancomycin 30 µg	Isolat	Rifampicin 5 µg	Clindamycin 2 µg	Linezolid 30 µg	Cefotaxime 30 µg	Erythromycin 15 µg	Vancomycin 30 µg
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
12	26	24	28	36	26	18	45	28	26	28	36	30	22
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
13	26	30	28	32	28	24	46	30	28	30	38	34	24
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
14	24	28	30	34	30	20	47	28	26	30	38	30	20
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
15	28	0	34	40	0	22	48	24	26	28	36	30	20
	S	R	S	S	R	S		S	S	S	S	S	S
16	22	0	26	34	0	18	49	26	28	30	40	30	22
	S	R	S	S	R	S		S	S	S	S	S	S
17	26	26	30	40	32	22	50	26	24	28	40	34	20
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
18	24	26	30	36	30	20	51	28	28	30	36	32	24
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
19	26	26	28	36	30	24	52	26	36	34	42	34	24
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
20	28	24	28	32	30	20	53	24	0	28	36	0	18
	S	S	S	S	S	S		S	R	S	S	R	S
21	30	34	34	44	36	26	54	24	24	28	34	28	18
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
23	24	24	30	36	30	20	55	24	26	30	36	30	24
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S

Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe							Hemmhofdurchmesser Humanwirkstoffe						
Isolat	Rifampicin 5 µg	Clindamycin 2 µg	Linezolid 30 µg	Cefotaxime 30 µg	Erythromycin 15µg	Vancomycin 30 µg	Isolat	Rifampicin 5 µg	Clindamycin 2 µg	Linezolid 30 µg	Cefotaxime 30 µg	Erythromycin 15 µg	Vancomycin 30 µg
24	22	26	34	34	24	16	56	24	28	32	36	28	18
	S	S	S	S	S	R		S	S	S	S	S	S
25	22	26	30	36	30	20							
	S	S	S	S	S	S							
26	28	26	30	34	28	22	58	22	0	28	38	0	20
	S	S	S	S	S	S		S	R	S	S	R	S
26	28	26	30	34	28	22	58	22	0	28	38	0	20
	S	S	S	S	S	S		S	R	S	S	R	S
27	28	0	30	36	0	20	59	22	24	24	32	26	20
	S	R	S	S	R	S		S	S	S	S	S	S
28	26	26	30	38	32	22	60	30	0	32	36	0	22
	S	S	S	S	S	S		S	R	S	S	R	S
29	30	32	34	40	22	26	62	22	26	26	32	24	16
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	R
30	28	26	32	38	32	24	63	22	22	24	34	22	16
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	R
31	30	28	32	36	30	24	64	28	30	30	40	32	22
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S
32	26	24	26	34	30	20	65	24	0	28	42	0	24
	S	S	S	S	S	S		S	R	S	S	R	S
33	30	0	32	40	0	24							
	S	R	S	S	R	S							

S=sensibel, R=resistent, I=intermediär