

Ergebnisse der Mastitis Identifikation mittels PathoProof® Mastitis PCR Assay aus Proben der Milchleistungsprüfung

Einleitung

Der PathoProof® Mastitis PCR Assay weist Bakterien DNA von 11 verschiedenen Erregern bzw. Erregergruppen sowie das β -Lactamase Gen für Penizillinresistenz (blaZ) bei Staphylokokken mittels real-time PCR nach und quantifiziert diese gleichzeitig. Sensitivität und Spezifität des PathoProof® Mastitis PCR Assays sind sehr hoch (Pitkälä et al. 2007; Taponen et al. 2009, Koskinen et al. 2009; Koskinen et al. 2010 und Bexiga et al. 2011). Da der Test die Bakterien-DNA identifiziert, spielt es keine Rolle, ob Bakterien leben oder nicht. Deshalb können Proben unmittelbar nach Entnahme z.B. mit Bronopol konserviert werden. Dies bietet den Vorteil, dass zwischen Probenentnahme und Probenanalyse kein Bakterienwachstum erfolgen kann. Zwischen Juni 2009 und November 2010 wurden mehr als 5'000 Proben aus der Milchleistungsprüfung (MLP) von fast 500 Milchproduzenten untersucht. Der vorliegende Kurzbericht fasst die Ergebnisse zusammen und soll Hilfestellung zur Interpretation der Ergebnisse aus MLP Proben liefern.

Material und Methoden

Die zwischen Juni 2009 und November 2010 untersuchten MLP Proben stammten von knapp 500 Betrieben im Einzugsgebiet von swissherdbook. Die Anzahl Untersuchungen pro Betrieb lagen in einem Bereich von 1 bis 88. Der grösste Teil der Proben stammte von Tieren mit einer Zellzahl von $\geq 200'000$ /mL. Es lagen aber auch eine stattliche Anzahl Proben von Tieren mit tiefer Zellzahl vor aus Betrieben, wo der gesamte Bestand untersucht wurde. Sämtliche MLP Proben waren konserviert und wurden bei Suisselab mit dem PathoProof® Mastitis PCR Assay untersucht^a.

Resultate

Die Zusammensetzung der Zellzahlen und die Prävalenzen der 11 verschiedenen Erreger bzw. Erregergruppen sowie des β -Lactamase Gens für Penizillinresistenz (blaZ) bei Staphylokokken sind in folgenden beiden Abbildungen dargestellt:

Abb. 1 Anzahl Proben nach Zellzahlkategorie

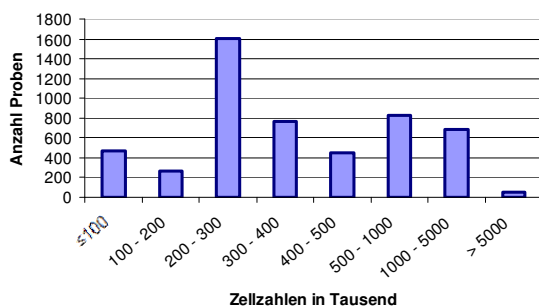
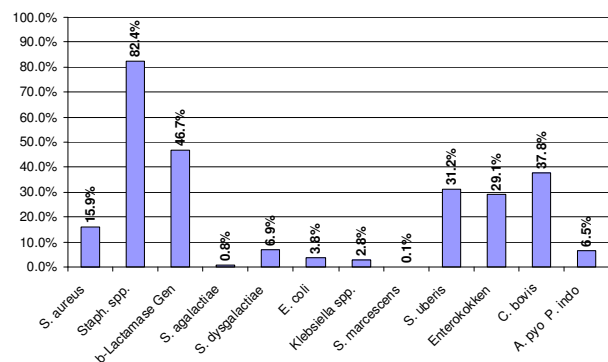


Abb. 2 Prävalenz der Erreger bzw. Erregergruppen



Mit über 80%, respektive knapp 40% waren die Prävalenzen für *Staph. spp.* und für *Corynebacterium bovis* sehr hoch. Für die folgenden beiden Abbildungen zum Zusammenhang von Zellzahl und prozentualer Anteil negativer Proben einerseits und Anzahl Erreger pro Probe andererseits wurden sie deshalb z.T. weggelassen.

Abb. 3 Anteil negativer Proben nach Zellzahlkategorie

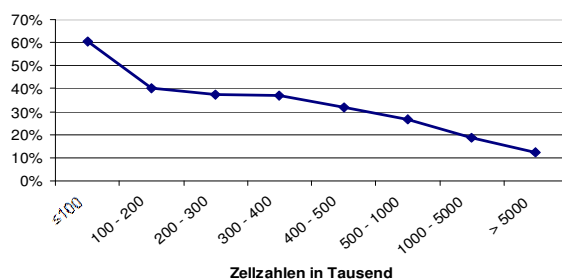
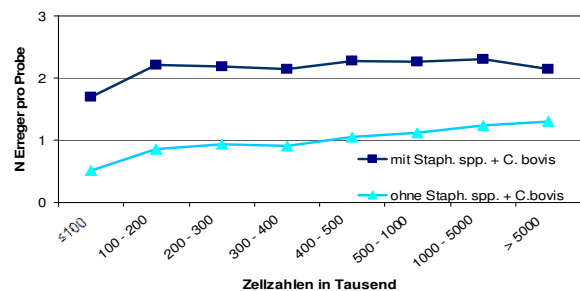


Abb. 4 Anzahl Erreger pro Probe nach Zellzahlkategorie



^a<http://www.suisselab.ch/mid>

Die Prävalenzen der verschiedenen Erreger bzw. Erregergruppen nach Zellzahlkategorie sind in Abbildungen 5 bis 9 und die Korrelation zwischen der Zellzahl (logarithmiert) und dem CT-Wert (je tiefer der CT-Wert, desto mehr Bakterien-DNA war in der MLP Probe enthalten) ist in Tabelle 1 dargestellt.

Abb. 5 Prävalenz *S. aureus* nach Zellzahlkategorie

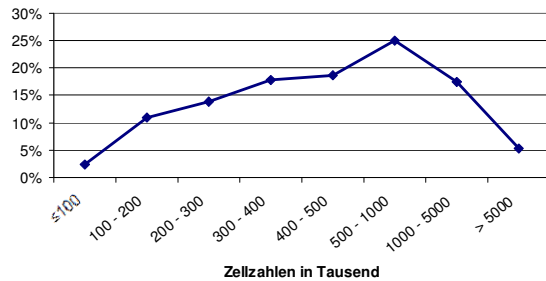


Abb. 6 Prävalenz *S. agalactiae* + *S. dysgalactiae*

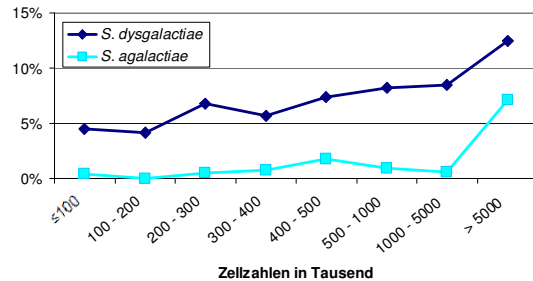


Abb. 7 Prävalenz *Staph. spp.*, *b-Lact-Gen*, *S. uberis*

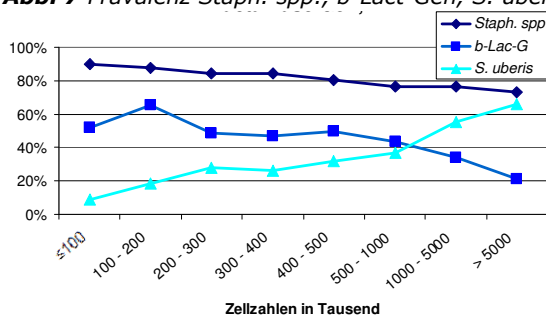


Abb. 8 Prävalenz *C. bovis* + Enterokokken

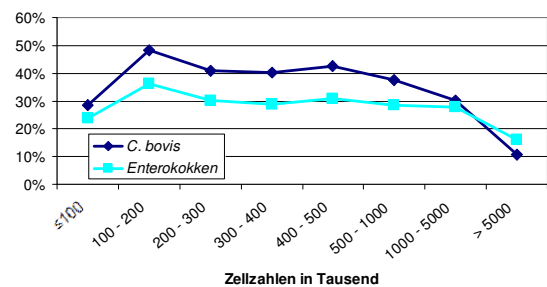
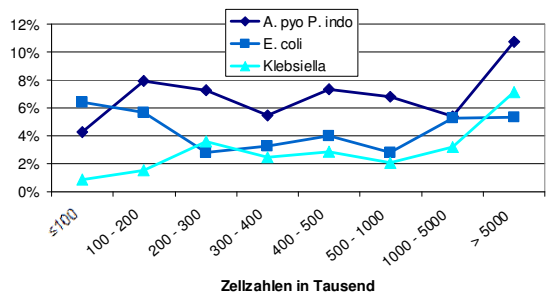


Abb. 9 Prävalenz *A. pyo./P.indolicus.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*



Tab. 1 Korrelation CT-Wert mit Zellzahl (log)

Erreger	r ^b	p-Wert
<i>S. aureus</i>	- 0.35	< 0.001
<i>S. agalactiae</i>	- 0.48	= 0.002
<i>S. dysgalactiae</i>	- 0.30	< 0.001
<i>S. uberis</i>	- 0.47	< 0.001
<i>C. bovis</i>	- 0.09	< 0.001
<i>A. pyo. / P. indolicus</i>	- 0.25	< 0.001
<i>E. coli</i>	- 0.13	= 0.073
<i>Staph. spp.</i>	- 0.01	= 0.546
<i>Klebsiella spp.</i>	0.00	= 0.959
Enterokokken	0.08	= 0.003

Die Abbildung 5 zeigt, dass die Prävalenz von *S. aureus* v.a. bei hohen Zellzahlen hoch ist. Bei extrem stark erhöhter Zellzahl sind andere Erreger dominant, wie beispielsweise *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *A. pyo. / P. indolicus* und Klebsiellen (Abb.6, 7, 9). Erreger wie *Staph. spp.*, *C. bovis*, Enterokokken und *E. coli* zeigen keine offensichtlichen Assoziationen mit der Zellzahl (Abb. 7, 8, 9). Tabelle 1 zeigt für *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *C. bovis* und *A. pyo. / P. indolicus* eine positive Korrelation zwischen Erregermenge (je tiefer der CT-Wert, desto höher die Erreger DNA-Menge in der Probe) und Zellzahl. Keine Korrelation zwischen Zellzahl und Erregermenge konnte für *E. coli*, *Staph. spp.* und Klebsiellen gefunden werden, und für die Enterokokken war sie sogar negativ (je mehr Enterokokken DNA, desto tiefer die Zellzahl).

Mittels Clusteranalysen konnte zudem gezeigt werden, dass umweltassoziierte Keime und Hygienekeime öfters gemeinsam in einer Probe auftauchten, als man das bei einer zufälligen Verteilung hätte erwarten können.

^bEine negative Korrelation zw. CT-Wert und Zellzahl bedeutet eine positive Korrelation zw. Erregermenge und Zellzahl. Je tiefer der CT-Wert desto höher die Menge Erreger DNA in der Probe.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Die gefundenen Prävalenzen stimmen grösstenteils recht gut mit aktuellen Schweizer Prävalenzstudien zu Mastitiserregern überein. Die Verhältnisse zwischen den Prävalenzen von *S. aureus*, *S. agalactiae* und *S. dysgalactiae* untereinander sind in den vorliegenden MLP Proben vergleichbar mit den Verhältnissen der Prävalenzen dieser Erreger in Schweizer Durchschnittsbetrieben (Moret-Stalder et al. 2009, Guélat-Brechbühl et al. 2010). Die Prävalenz von *S. uberis* war in den untersuchten MLP Proben aber wesentlich höher, als man das aufgrund der Studie von Guélat-Brechbühl (2010) hätte erwarten dürfen.

Die Assoziationen zwischen der Höhe der Zellzahl und Erregern wie *S. aureus*, den verschiedenen Streptokokken, den Klebsiellen und dem *A. pyogenes* / *P. indolicus* Komplex zeigen die erwarteten Muster auf.

Generell gilt, dass die nachgewiesenen Erreger nicht zwingend aus dem Euter stammen müssen, sondern auch aus dem Zitzenkanal, der Umwelt, oder bei MLP Proben auch von der Zitzenhaut, Verschmutzungen oder aus dem Melkzeug stammen können. Bei der Interpretation muss immer die Fragestellung im Auge behalten werden. Zur Interpretation müssen alle weiteren Faktoren (Zellzahl, klinische Symptome, Vorgeschichte der Kuh, Situation in der Herde, Melktechnik, Melkarbeit und Melkhygiene) miteinbezogen werden. Es versteht sich also von selbst, dass der Nachweis von Mastitiserregern mittels PathoProof® Mastitis PCR Assay alleine keine Bestandesdiagnose erlaubt. Diagnostik mittels PathoProof® Mastitis PCR Assay aus MLP Proben kann aber sehr wertvolle Beiträge zur Früherkennung von Mastitis im Betrieb liefern und als wertvolle Interpretationshilfe bei der Abklärung von Mastitisproblembetrieben herbeigezogen werden.

- Der Nachweis von ***S. aureus*** in MLP Proben mittels PathoProof® Mastitis PCR Assay ist in jedem Fall ernst zu nehmen und legt auf alle Fälle eine weitergehende Abklärung des Bestandes in Zusammenarbeit von Tierhalter, Bestandestierarzt und allenfalls Melkberatern oder anderen spezialisierten Beratungseinheiten nahe.
- Der Nachweis der **verschiedenen Streptokokken**, den **Klebsiellen** und dem ***A. pyogenes* / *P. Indolicus*** Komplex in MLP Proben mittels PathoProof® Mastitis PCR Assay muss immer im Zusammenhang mit den Zellzahlen interpretiert werden. Der Nachweis dieser Erreger ist vor allem im Zusammenhang mit stark erhöhter Zellzahl schlüssig. Befindet sich die Zellzahl im tieferen bis mittleren Bereich, könnte es sich auch um Kontaminationen handeln. Eine Ausnahme bildet hier der gelbe Galt (***S. agalactiae***). Dem Nachweis von ***S. agalactiae*** in MLP Proben mittels PathoProof® Mastitis PCR Assay sollte auch bei tieferer Zellzahl nachgegangen werden.
- Das Auftreten von **Umwelterregern** gibt einen wichtigen Hinweis auf Melkhygiene (z.B. Zitzenreinigung) sowie auf die generelle Hygiene im Betrieb.
- Bei MLP Proben scheint der Nachweis von ***Staph. spp.*, Enterokokken** und ***E. coli*** auch bei sehr hoher Zellzahl nicht sehr schlüssig zu sein.
- Bei **mehrfach positiven Ergebnissen** (mehrere Erreger pro Probe) ist als Interpretationshilfe immer zu berücksichtigen, ob es einen vorherrschenden Erreger gibt (> 90% Anteil an der Gesamterreger DNA) und falls ja, welches dieser vorherrschende Erreger ist.
- Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass die **MLP Probe** eine saubere, **aus dem Kreislauf der Verkehrsmilch** genommene Probe ist und dass sie als weiterer Vorteil eine Probe darstellt, welche für das Gesamtmelk **repräsentativ** ist.

Als Schlussfolgerung kann gesagt werden, dass die Auswertung der über 5'000 vorliegenden PathoProof® Mastitis PCR Assay Ergebnisse aus MLP Proben plausible Resultate ergeben. Besonders hervorzuheben sind die Assoziationen zwischen Zellzahl und Prävalenz, resp. zwischen Zellzahl und Menge an Erreger-DNA für relevante, primäre Mastitiserreger, welche in der Schweiz bekanntlich eine grosse Rolle spielen. Bei der Interpretation von PathoProof® Mastitis PCR Assay Ergebnissen sind immer die Zellzahl und bei mehrfach positiven Proben die Information über den vorherrschenden Erreger beizuziehen. **Korrekt interpretiert liefert der PathoProof® Mastitis PCR Assay in MLP Proben eine wichtige und brauchbare Hilfestellung bei der Früherkennung von Mastitisproblemen im Bestand und bei der Abklärung von Mastitis Problembeständen.**

Ausblick

In Zusammenarbeit von Suisselab, Universität Bern und landwirtschaftlichen Forschungsanstalten läuft derzeit eine weitere Studie zur Interpretationshilfe von PathoProof® Mastitis PCR Assay Ergebnissen in aseptisch entnommenen Milchproben (aseptische Tierarztproben). Ende 2011 wird auch über diese Ergebnisse ausführlich informiert werden.

Referenzen

- Bexiga et al. 2011, *Journal of Dairy Research*, 78:49-55
Guélat-Brechbühl et al. 2010, *Veterinary Record*, 167:211-215
Koskinen et al. 2009, *Journal of Dairy Science*, 92:952-959
Koskinen et al. 2010, *Journal of Dairy Science*, 93:5707-5715
Moret-Stalder et al. 2010, *Preventive Veterinary Medicine*, 88:72-76
Pitkälä et al. 2007, *Journal of Clinical Microbiology*, 45:2031-2033
Taponen et al. 2009, *Journal of Dairy Science*, 92:2610-2617