

## Mastitis-Identifikation mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay

### Eigenschaften von PathoProof

- Der Test weist Bakterien-DNA von 11 verschiedenen Erregern bzw. Erregergruppen sowie das beta-lactamase Gen für Penizillinresistenz (*blaZ*) bei Staphylokokken mittels Real-time-PCR nach und quantifiziert diese gleichzeitig.
- Da der Test die Bakterien-DNA identifiziert, spielt es keine Rolle, ob die Bakterien leben oder nicht. Deshalb können die Proben konserviert werden (Bronopol).
- Steril und nicht-steril gewonnene Proben (Viertels-, Euter- und Tankproben) sind möglich.
- Der Test dauert nur drei bis vier Stunden.
- Die Sensitivität des Tests ist 100 cfu/ml Milch (colony forming units, Kolonie bildenden Einheiten). Die Spezifität ist 100%.
- Nachweisbare Erreger:
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Coagulase negative staphylococci (CNS, Staphlococcus sp.)*
  - *Streptococcus agalactiae*
  - *Streptococcus dysgalactiae*
  - *Streptococcus uberis*
  - *Escherichia coli*
  - *Corynebacterium bovis*
  - *Enterococcus faecalis, E. faecium*
  - *Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca*
  - *Serratia marcescens*
  - *Arcanobacterium pyogenes, Peptostreptococcus indolicus*
  - *Sowie das beta-lactamase Gen für Penizillinresistenz (blaZ) (nur relevant für Staph. aureus und Staph. sp.)*
- Diese Erreger decken über 95% der klinischen und subklinischen Mastitisfälle ab (Makovec & Ruegg 2003; Pitkälä et al. 2004; Tenhagen et al. 2006; Koivula et al. 2007).

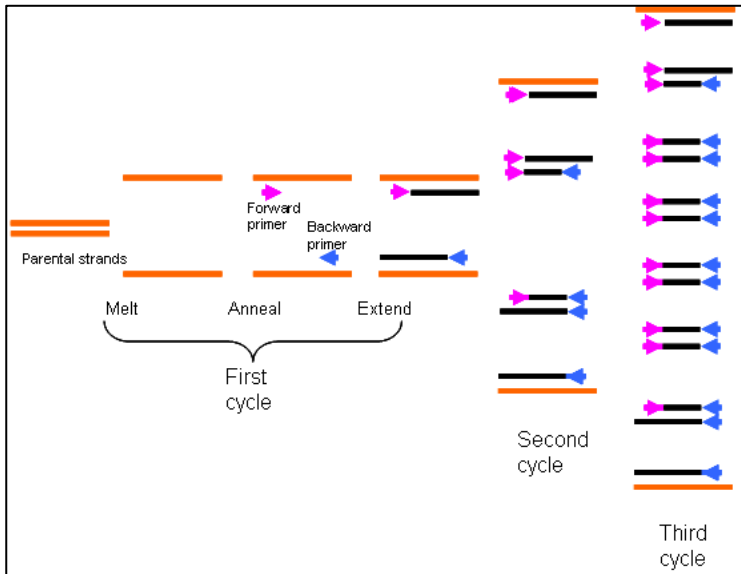
### Real-time-PCR

Mittels Real-time-PCR werden erregerspezifische DNA-Sequenzen vervielfältigt und ihre Menge wird gemessen.

Nach der Extraktion der Bakterien-DNA aus den Zellen startet der PCR-Vorgang mit dem ersten Vervielfältigungs-Zyklus (Amplifikation), wie er auf nachstehender Grafik dargestellt ist:

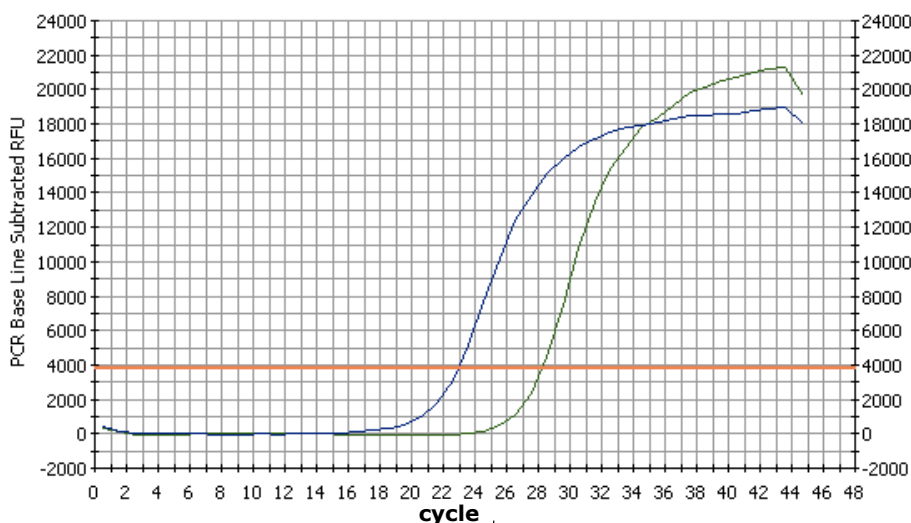
- **Melt:** Die Temperatur wird auf ca. 95°C erhöht, die doppelsträngige DNA wird in die einzelnen Stränge aufgelöst.
- **Anneal:** Die Temperatur wird wieder gesenkt. Die spezifischen Primer binden an die DNA-Sequenzen der entsprechenden Bakterien. Von diesen Stellen ausgehend beginnt die Polymerase, die DNA zu kopieren.
- **Extend:** Die Temperatur wird leicht erhöht, damit die Polymerase schneller arbeitet. Am Ende des Zyklus ist doppelt soviel DNA vorhanden wie zu Beginn.

- Der Zyklus wird nun bis 40 Mal wiederholt, jedes Mal verdoppelt sich die entsprechende DNA-Sequenz. Nach x Zyklen ist  $2^x$  mal soviel DNA vorhanden wie zu Beginn:
  - Nach 10 Zyklen:  $2^{10} \sim 1000$  -fache Amplifikation
  - Nach 20 Zyklen:  $2^{20} \sim 1000\ 000$  -fache Amplifikation
  - Nach 30 Zyklen:  $2^{30} \sim 1000\ 000\ 000$  -fache Amplifikation



Der grosse Vorteil der **Real-time** oder **quantitativen PCR-Methode (qPCR)** ist, dass die Menge DNA unverzüglich während der Vervielfältigungszyklen (real time) gemessen wird. Beigegebene Moleküle binden an die DNA-Stränge und senden dabei ein Fluoreszenz-Signal aus. Die Stärke des Signals korreliert mit der jeweils vorhandenen Menge DNA.

Die Schlüsselvariable in diesem Prozess ist der **Schwellenwert (cycle threshold, ct-value)**, d.h. derjenige Zyklus, an dem eine bestimmte Fluoreszenz-Signalstärke überschritten wird. Je tiefer der Schwellenwert, in desto weniger Zyklen wurde die Menge DNA erreicht, um das entsprechende Signal auszusenden, d.h. desto höher war die Ausgangsmenge DNA.



*Beispiel: Die grüne Probe erreicht den Schwellenwert im 28. Zyklus, die blaue schon im 23. Somit enthielt die blaue Probe zu Beginn  $2^5$  mal mehr der entsprechenden DNA-Sequenz als die grüne (Annahme 100% Effizienz beim Vervielfältigen).*

Mittels Verdünnungsreihen, die von einer bekannten Anzahl Erregergenome ausgehen, kann eine Kurve erstellt werden, die erlaubt, von den Schwellenwerten auf die Anzahl Erregergenome zu schliessen.

## Resultate

Probenummer	Bakterien/ Bakteriengruppen	Quantität	Proportion	Ct	Zellzahl
TVD-Nummer Name	Enterococcus sp. (including faecalis and faecium) Beta-lactamase gene Staph. sp.	+ + +	> 90%	35.6 36.7 36.3	44
TVD-Nummer Name	Staph. aureus	++		28.4	650

- **Quantität:** ausgehend vom Schwellenwert (ct) werden die Resultate semi-quantitativ ausgewiesen: + (schwacher Befall), ++ (mittlerer B.), +++ (starker B.)
- **Proportion:** der entsprechende Keim hat einen Anteil an der gesamthaft in der Probe nachgewiesenen Keime, der grösser als 90 bzw. 99% ist.
- **Ct:** Cycle threshold/Schwellenwert. Der Schwellenwert entspricht dem PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenz-Signal eine gewisse Stärke überschreitet, d.h. eine gewisse Menge DNA erreicht wird. Je tiefer der Schwellenwert, desto höher war die Anzahl der gesuchten Genome, d.h. die Menge entsprechender Erreger in der Probe. Zwischen Bakteriengenomen und koloniebildenden Einheiten besteht eine lineare Beziehung, die von der Anzahl Genomkopien pro Erreger, der DNA-Extraktionsrate und der Effizienz der Amplifikation abhängt. Deshalb ist eine allgemeine Umrechnung nicht möglich.
- **Zellzahl:** In den Milchleistungsprüfungs-Proben wird die Zellzahl bestimmt.

## Interpretation

- Die Erreger stammen nicht zwingend aus dem Euter, sondern können aus dem Zitzenkanal und bei nicht-sterilen Proben auch aus der Umwelt kommen.
- Bei der Interpretation soll immer die Fragestellung im Auge behalten werden. Zur Interpretation müssen alle weiteren Faktoren (Zellzahl, klinische Symptome, Vorgeschichte der Kuh, Situation in der Herde) einbezogen werden.

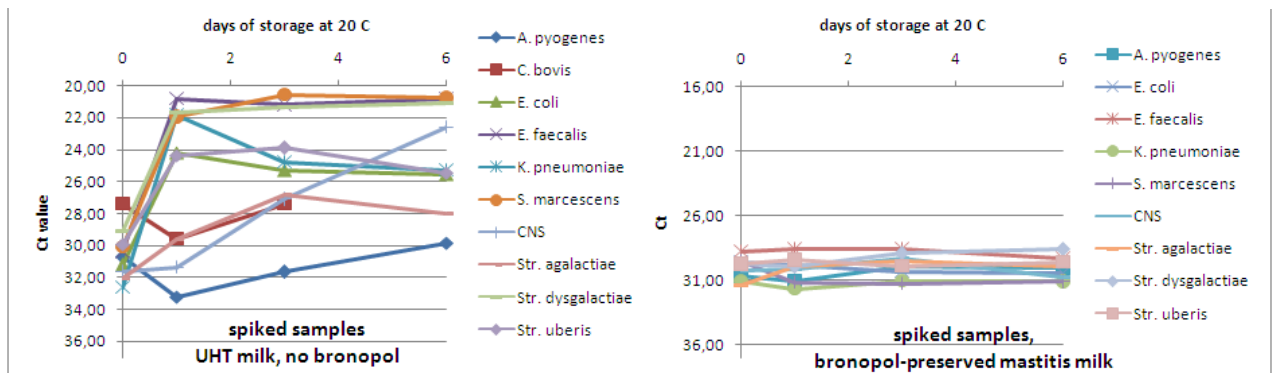
## Proben aus der Milchleistungsprüfung, andere nicht-sterile Proben:

- Die nachgewiesenen Keime können aus dem Euter, dem Zitzenkanal, aber auch von der Zitzenhaut bzw. von Verschmutzungen oder aus dem Melkzeug stammen. Bei ungenügend gereinigten Zitzen können Enterokokken und andere Umwelterreger in die Probe gespült werden.
- Trotzdem ist bei solchen kontaminierten Proben meist eine Aussage möglich, oft herrscht ein Erreger vor (> 90% Anteil in der Probe). Die Fragestellung und alle anderen Faktoren sind in diesen Fällen besonders zu beachten.
- Stark verschmutzte Proben geben einen wichtigen Hinweis auf die Melkhygiene, insbesondere auf die Zitzenreinigung, und damit generell auf das Risiko für Infektionen mit Umwelterregern!

- Die Wahrscheinlichkeit, dass Erreger übers Melkzeug in relevanten Mengen von einer Kuh auf die Probe der nachfolgend gemolkenen Kuh übertragen werden, ist sehr klein. Der Verdünnungseffekt ist zu gross (Studie CANWest).
- Tankproben eignen sich vor allem für die Überwachung z.B. nach einer Sanierung von euterspezifischen Erregern. Bei positiven Resultaten müssen in einem zweiten Schritt Einzeltierproben analysiert werden.

## Bronopol-konservierte und unkonservierte Proben

Der grosse Vorteil von konservierten Proben ist, dass sich die Erreger im Gegensatz zu unkonservierten Proben zwischen Probenahme und Analyse kaum mehr weiter vermehren (siehe Grafiken). Bei der Interpretation von unkonservierten Proben muss hingegen eine mögliche Vermehrung berücksichtigt werden. Die Erregermengen (ct-Werte) können nicht direkt mit denen von konservierten Proben verglichen werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit soll deshalb wenn möglich mit konservierten Proben gearbeitet werden.



Wachstum von verschiedenen Keimen in unkonservierter und Bronopol-konservierter Milch (Quelle: Finnzymes)

## Euterproben – Viertelsproben

- Bei Euterproben ist zu berücksichtigen, dass die Erreger aus dem kranken Viertel mit der Milch aus den gesunden Viertel verdünnt werden (viermal und höher, da oft weniger Milch im erkrankten Viertel). Die Differenz beträgt bei einer vierfachen Verdünnung mind. zwei PCR-Zyklen.
- Vor-, Gesamt- und Nachgemelksproben sind bezüglich Erregermenge nicht direkt vergleichbar (abhängig von Verteilung des Erregers im Euter).

## Befallsstärke / verschiedene Erreger

- Bei ansteckenden Erregern (Staph. aureus, Str. agalactiae) soll schon bei schwachem Befall reagiert werden. Die nachgewiesenen Erreger stammen aus dem Euter und kaum aus der Umwelt (Verschmutzungen).
- Bei Umwelterregern ist die Interpretation v.a. unsteriler Proben anspruchsvoller. Es müssen zwingend alle andern Faktoren (Zellzahl, klinische Symptome, Vorgeschichte der Kuh, Situation in der gesamten Herde) einbezogen werden.
- Im Zweifelsfall kann es sich lohnen, mit einer sterilen Viertelsprobe zu arbeiten.
- Ein geringer Befall mit koagulase-negativen Staphylokokken erfordert bei gesunden Kühen und tiefer Zellzahl keine sofortigen Massnahmen.
- Bei einem schwachen Befall mit C. bovis besteht ebenfalls kein sofortiger Handlungsbedarf. Allerdings gibt es verschiedene Studien, die einen Befall mit C. bovis auf ungenügendes Zitzendippen bzw. ungenügende Wirkung des Dippens zurückführen.

## Literaturübersicht zur Mastitis-Identifikation mittels Real-time-PCR und zu Mastitiserregern allgemein

### Beschreibung und Validierung von PathoProof:

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

- 100 % Sensitivität und Spezifität für Erreger aus Eutern, 99 % für samples aus Menschen und Haustieren. Erreger stammten aus verschiedensten Ländern
- Sensitivität % = (Anzahl richtig positive / (Anzahl richtig positive + Anzahl falsch negative)) x 100
- Spezifität % = (Anzahl richtig negative / (Anzahl richtig negative + Anzahl falsch positive)) x 100

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

- Ausführliche Beschreibung der Methode inkl. Verdünnungsserie zum Erstellen der Standardkurve
- Proben von Kühen mit Mastitis (klinische Symptome und NAGase-Aktivität bestätigte Mastitis), die auf Kulturen kein Wachstum zeigten, verwendet.
- Von 79 Proben sind 32 für 1, 2 für 2 Erreger positiv (11 Staph. sp., 10 Str. uberis, 2 Str. disgalactiae, 6 C. bovis, 3 Staph. aureus, 1 E.coli, 1 Enterococcae, 1 Arcanabact. pyogenes)
- Positive Proben enthalten  $10^3 - 10^7$  Genomkopien/ml der entsprechenden Bakterien
- Schliessen daraus, dass alle üblichen Mastitiserreger auf Kulturen kein Wachstum zeigen können, auch wenn sie in bedeutenden Mengen vorhanden sind

**CANWEST DHI und Finnzymes. 2009. Validation of the PathoProof Mastitis PCR Assay for staphylococcus aureus. detection from bronopol-preserved milk recording samples. Confidential.**

- Sterile Euterproben wurden mittels konventionellen Kulturen und PathoProof untersucht, Milchkontroll-Proben der gleichen Tiere (Bronopol-konserviert) mit PathoProof.
- Alle auf Kulturen positiven Proben auch in beiden PCR-Proben bestätigt
- Zusätzliche positive mit PCR gefunden, diese teilweise bei einem 2. Ansatz auf Kulturen bestätigt
- Problematik der Verschleppung über Melkzeug untersucht: Melkreihenfolge erfasst. Differenz der ct (Anzahl PCR-Zyklen) überprüft. 3.3 Zyklen Differenz bedeutet 10% Milch verschleppt, was kaum möglich ist. Verschleppen bis auf einen einzigen Zweifelsfall ausgeschlossen, diese Kuh zeigte aber deutliche Mastitissymptome

**Pitkälä, A., L. Salmikivi, P. Bredbacka, A.-L. Myllyniemi and M. T. Koskinen. 2007. Comparison of tests for detection of  $\beta$ -lactamaseproducing staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2031–2033.**

- Vergleich von 6 emzymbasierten Tests und Pathoproof zum Nachweis von  $\beta$ -lactamaseproduzierenden Staphylokokken, 175 Isolate von S. aureus, S. intermedius und versch. CNS.
- PathoProof und drei andere Tests produzierten keine falsch-positiven Resultate
- PathoProof produzierte als einziger keine falsch-negativen Resultate

**<http://diagnostics.finnzymes.fi/pathoproof>**

### PCR allgemein

- <http://en.wikipedia.org/wiki/QPCR>
- <http://www.primerdesign.co.uk/> ⇒ new to real-time PCR ⇒ Beginner's guide
- <http://www.realtimempcr.dk/principle.html>
- <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

## Weitere PCR-basierte Tests

**Graber, H. U., M. G. Casey, J. Naskova, A. Steiner, and W. Schaeren. 2007. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. *J. Dairy Sci.* 90:4661–4669**

- Detaillierte Beschreibung der entwickelten Methode
- Erklärung der Quantifizierung sowie Verhältnis von Bakterienzahl (staphylococcal cell equivalent/ml) zu koloniebildenden Einheiten (cfu/ml)
- DNA recovery rate: ca. 70 bis über 90 %
- Sensitivität:  $1.15 \times 10^3$  cfu/ml Milch
- Sensitivität: 50.7 bis 507 mal sensitiver als klassische Bakteriologie (bei Proben von 100 bzw. 10 µl)

**Graber, H. U., E. Studer, W. Schaeren, J. Naskova, H. Pfaeffli, T. Kaufmann, M. Kirchhofer and A. Steiner. 2008. A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain reaction–based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Dairy Sci.* 91:1893–1902**

- Zyklische Ausschüttung von Staph. aureus, Sinuskurve (6.5 Tage ansteigend, 6.5 Tage abfallend)
- Es gibt Kühe, bei denen Ausschüttung ansteigt, ohne wieder abzusinken: Versagen des Immunsystems
- Bei tiefer Ausschüttung mit Plattenproben häufig falsch negative Resultate (v. a. da in Routineuntersuchungen nur 10 µl Milch verwendet werden), mit PCR kein Problem, alle erkannt.
- Verhältnis log(SCE/ml) : log(cfu/ml) ca. 200:1.

## Häufigkeit verschiedener Erreger

Bei der Auswertung der Proben der zufällig ausgewählten Pilotbetriebe von Suisselab irritierte auf den ersten Blick, dass die Frequenzen der positiven Viertel/Tiere gegenüber den ausländischen Screening-Untersuchungen (über alle Tiere einer Herde) viel höher sind. Dies lässt sich jedoch mit den verwendeten Methoden erklären: die bisherigen Screening-Untersuchungen wurden alle mit der Kultur-Methode durchgeführt. Wie Taponen et. al. gezeigt haben, gibt es dabei eine bedeutende Anzahl Proben, die kein Wachstum zeigen, obwohl sie erhebliche Mengen Erreger enthalten. Vergleiche sind auch schwierig, weil bei den Untersuchungen die Schwellenwerte für ein positives Resultat unterschiedlich hoch gesetzt wurden (für Staph. aureus oft bei 100 cfu/ml Milch, bei Umwelterregern bei 400 – 1000 cfu/ml). Die nicht-sterile Probenahme bei den Pilotbetrieben hat ebenfalls einen Einfluss auf das Vorkommen von gewissen Erregern in den Proben. So konnten bei zwei Betrieben, in denen viele Proben mit Enterokokken befallen waren, bei einer zweiten, sterilen Probenahme keine Enterokokken mehr nachgewiesen werden. Dies ist bei der Interpretation ebenfalls zu berücksichtigen.

**Pitkälä, A., M. Haveri, S. Pyöralä, V. Mylly, and T. Honkanen-Buzalski. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 – :Prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433–2441.**

- Herdenscreening
- Grenze für positive Probe: 500 cfu/ml. Verschmutzte Probe wenn > 2 Erreger.
- 2001: 33.5% der Viertelproben sind positiv. 1995: 21%
- 50% der positiven sind Staph. sp., 10% Staph. aureus, 34% C. bovis,
- Penizillinresistenz: 52.1% und 32% für Staph. aureus und CNS.

**Østerås, O., L. Sølverød, and O. Reksen. 2006. Milk culture results in a large Norwegian Survey - effects of season, parity, days in milk, resistance and clustering. *J. Dairy Sci.* 89:1010.**

- Herdenscreening
- Grenzen für pos. Proben: Staph. aureus: > 100 cfu/ml, other major pathogens > 400 cfu/ml, minor pathogens (wenn rein) > 4000 cfu/ml
- 76% negative Viertel
- 22% Kühe mit mind. 1 Viertel Staph. aureus

- Saisonaler Effekt für CNS und Str. dysgalactiae (hoch April, Mai, d.h. späte Stallsaison), Staph. aureus und Str. uberis (hoch Juni, Juli)
- Penizillin G-restistenz: 11% Staph aureus, 36% CNS, 0% Str. disg., 11% Str. uberis.

**Tenhagen, B.-A., G. Köster, J. Wallmann, and W. Heuwieser. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89:2542–2551.**

- Herdenscreening
- 9.1% CNS, 7.3% C. bovis, 5.7% Staph. aureus pro Viertel
- in 30% Herden noch immer Str. agalactiae gefunden (0.7% der Viertel)
- div. Info über Resistenzen

**Olde Riekerink, R. G., H. W. Barkema, D. F. Kelton, and D. T. Scholl. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. J. Dairy Sci. 91:1366–1377.**

- Proben von Vierteln mit Symptomen von klinischer Mastitis
- 43% negative Kulturen, 10.3% Staph. aureus, 8.4% E. coli, 7.3%, Str. uberis, 5.1% CNS, 4.3% Klebsiella, 4.0% Str. dysgalactiae, 8.6% verschmutzt,
- Erregerhäufigkeit ist von Stallsystem und Region abhängig

**Lago A., S. Godden, R. Bey, K. Leslie, P. Ruegg and R. Dingwell. 2007. Prevalence and etiology of subclinical intramammary infections in fresh cows. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- CAN und USA: 11 Herden, ca. 1000 Kühe, nach Abkalben untersucht, ohne klinische Mastitis, ohne vorgängige Behandlung
- 72% der Kühe mit mind. 1 positivem Viertel
- 37% der Viertel infiziert (Ø 2 pro Kuh)
- 51% der infizierten Viertel mit Staph. sp., 21% Env. Strep., 16% Bacillus spp, 8% Coliforme, 2% Staph. aureus, 2% andere

## Bedeutung und Verhalten koagulase-negativer Staphylokokken (CNS) als Mastitis-Erreger

**Taponen S., Pyörälä S.. 2007. How important is coagulase-negative Staph as a cause of mastitis? . National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- Guter Überblick übers Thema, viele Literaturhinweise
- Früher Staph. sp. / CNS als 'minor pathogens' angesehen
- Viele neue Studien zeigen hohen Anteil an Staph. sp. bei Mastitis (in gut geführten Herden mit hohen Leistungen)
- Rinder oft sehr früh schon befallen
- Mastitis oft subklinisch oder mild klinisch mit mässigem SCC-Anstieg
- Behandlung nur, wenn klinische Symptome
- Wenig Kenntnisse über Arten, diese haben unterschiedliche Eigenschaften (Adhäsion, Biofilm). Identifikation nur beschränkt möglich, Forschungsbedarf
- Penizillin-Restistenz häufig (häufiger als bei Staph. aureus)

**Taponen, S., J. Koort, J. Björkroth, H. Saloniemi, and S. Pyörälä. 2007. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified length polymorphism-based analysis. J. Dairy Sci. 90:3301-3307.**

- Versuchsherde, 82 Kühe, Proben vor/nach Kalben, dann monatlich
- CNS analysiert mit API staph ID und AFLP, Zellzahl
- Persistente Infektion, wenn mind. 3 aufeinanderfolgende Proben positiv
- 63 Infektionen gefunden, 29 persistent, 34 vorübergehend
- Häufigste: Staph chromogenes und simulans
- 72% Übereinstimmung der beiden Tests, über 20% Arten konnten von API nicht korrekt identifiziert werden

- Zellzahl der infizierten Viertel ca. 10 x höher als der gesunden
- Über Virulenz der CNS Arten (warum teilweise klinische Mastitis?) ist kaum etwas bekannt

**Timms L.L., L.H. Schultz. 1987. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. J. Dairy Sci. 70: 2648-2657.**

- Schon 1983 sehr viele CNS-Infektionen
- Bleiben über die Laktation
- Leicht erhöhte Zellzahl im Euter, signifikant erhöht im Viertel
- Tiefere Milchproduktion

**Nickerson, S.C., Ownes W.E., Boddie R.L. 1995. Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control. J. Dairy Sci. 78: 1607 – 1618**

**Myllys, V. 1995. Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. J. Dairy Res. 62:51.**

## Andere Erreger

**Sears, P.M., D. J. Wilson, R. N. Gonzales, D. D. Hancock. 1991. Microbiological results from milk samples obtained from the diagnosis of bovine intramammary infections. J. Dairy Sci. 74, 4183-4188.**

- Proben, die nach dem Melken genommen wurden, sind weniger 'verschmutzt' als Vorgemelksproben.
- 'Verschmutzung' mit CNS und Streptokokken (other than agalactiae) aus Strichkanal
- Weitere Untersuchungen empfohlen

**Morin D., C. Mallard, L. Fox, J. Roberson, L. Timms, R. Erskine, W. Hurley, P. Constable. 2001. Environmental Streptococcal Mastitis – Findings of a Multi-State Study. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- 7 Herden während 1 Jahr untersucht, Monatliche Milchproben sowie beim Trockenstellen, nach dem Abkalben und bei klinischer Mastitis
- Erst vorläufige Resultate vorgestellt
- Häufigste Erreger: CNS, dann Umweltstreptokokken. CNS verursachten aber weniger klinische Mastitis als die Umweltstreptokokken: 8% bzw. 23% der Infektionen klinisch)
- Viele Ansteckungen mit Umweltstreptokokken geschehen in der Trockenzeit: die beim Trockenstellen positiven werden häufig geheilt, aber viele neue Infektionen bis zum Abkalben

**Watts, J.L., D.E. Lowery, J.F. Teel, S. Rossbach. 2000. Identification of Corynebacterium bovis and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. J. Dairy Sci. 83: 2373-2379.**

- Identifikation von C. bovis ist mit Kulturmethode aufwändig.
- PCR-Methode zur Zeit der Studie zu aufwändig für genaue Identifikation der Coryneformen, aber exakt.

**Zadoks R., Y. Schukken. 2003. Streptococcus uberis: Environmental or contagious pathogen? National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- Umwelterreger oder Ansteckung von Kuh zu Kuh?
- Unterschiedliche Stämme in den Kühen: eher Umwelt
- Str. uberis in Einstreu und Mist gefunden.
- Hinweis: Zeitpunkt der Ansteckung: Galtzeit / Rinder oder während Laktation?
- Gleicher Stamm in allen Kühen: Hinweis auf Übertragung, doch ev. auch Ansteckung an gleicher Quelle.
- Übertragung von Kuh zu Kuh: melken, Milch in Boxen, Fliegen
- Betrachtung nur als Umwelterreger kann Probleme verursachen. Bei Massnahmen immer Übertragung von Kuh zu Kuh auch einbeziehen.

**Hogan J.S. and Smith K.L. 2003. Environmental Streptococcal Mastitis: Facts, fables and fallacies. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.**

- Umweltstreptokokken: häufigste Ansteckung in der Galtzeit.

- Häufig kurze Infektion: Spontanheilung oder Antibiotikabehandlung.
- Studie zeigt: ca. 1/2 der Infektionen ohne klinische Symptome.
- Herkunft: Einstreu (viel im Stroh), v. a. Str. uberis.
- USA: Herden mit nicht-ansteckenden Mastitisproblemen: häufig Tiefstreu, nicht allzu sauber
- Melken: saubere, trockene Zitzen wichtig, ev. vordippen.
- C. bovis: kein Schutz, es gibt sogar Studien, die bei starker C. bovis-Infektion oft als Zweiterreger Str. uberis zeigen.

**Quality Milk Production Services. 2005. Serratia species and Mastitis – QMPS fact sheet. Cornell University, College of Veterinary Medicine and New York State Department of Agriculture and Markets.**

Serratia sp. sind in Boden, Pflanzen, Futter und Wasser zu finden und können zufällige Mastitiserreger sein.

- Serratia wurde auch von Einstreu und Melkständen isoliert.
- Zum Teil konnte Serratia-Mastitis mit dem Wachstum des Erregers in Einstreu oder Zitzentauchbechern (mit quaternären Ammonium-Verbindungen) in Verbindung gebracht werden, z. T. konnte die Quelle des Ausbruchs nicht gefunden werden
- Schlechte Hygiene und beeinträchtigte Zitzenenden werden als Risikofaktoren vermutet.
- Subklinische und klinische Mastitis möglich. Oft nur milde klinische Symptome wie Flocken und verfärbte Milch.
- Oft chronische Infektion mit sporadischen klinischen Symptomen.
- Häufig Antibiotikaresistenzen und deshalb kaum Erfolg bei Behandlungen.
- Vorbeugen: saubere Kühe, sauberes Umfeld und gute Melkhygiene.