

# **„Kuh“- und „umweltassoziierte“ Mastitiserreger – Klassische Nachweismethoden, Vorkommen, Resistenzentwicklung, Therapieansätze –\***

Klaus Fehlings

Fachabteilung Eutergesundheitsdienst  
und Milchhygiene  
des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V.

\* Gefördert aus Mitteln des Freistaates Bayern durch das Bayerische Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten  
sowie die Bayerische Tierseuchenkasse

# Antibiotika einschränken?

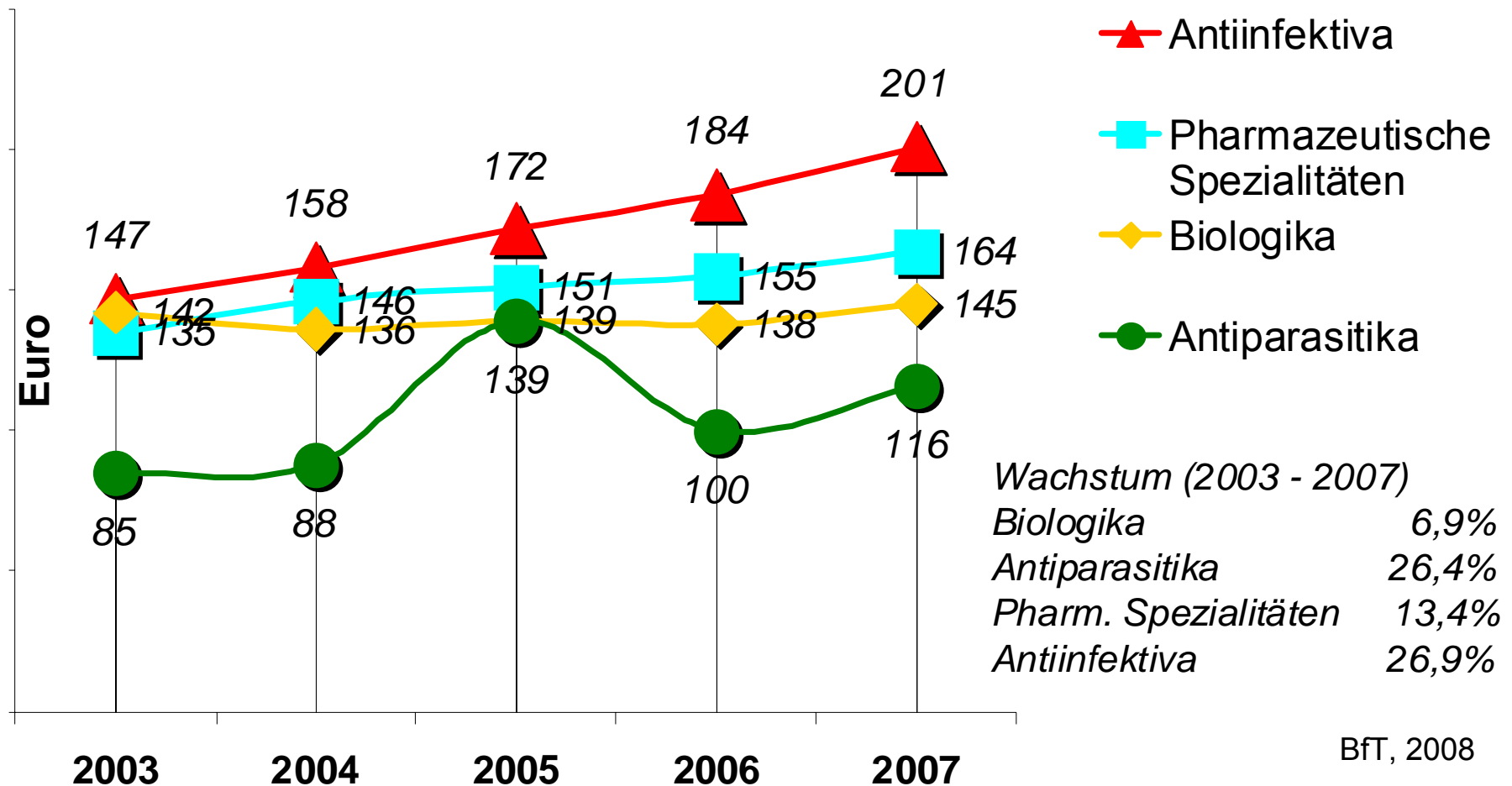
◆ Die EU will den Einsatz von Antibiotika als Tierarzneimittel beschränken, um die Ausbreitung von Resistenzen zu vermeiden. Dazu wird derzeit ein Bericht verfasst.

Bundeslandwirtschaftsminister Horst Seehofer kritisierte die Pläne der EU. Er

befürchte, dass auf die Betriebe damit ein deutlich höherer Hygieneaufwand zukommt. Seine Amtskollegen aus den Nachbarländern stören sich daran offenbar nicht. Sie plädierten sogar ausdrücklich für Einschränkungen und mehr Kontrollen.

top agrar, 07/2008

# Tierarzneimittelmarkt in Deutschland



# **„Kuh“- und „umweltassoziierte“ Mastitiserreger**

**– Klassische Nachweismethoden, Vorkommen,  
Resistenzentwicklung, Therapieansätze –**

- I. Diagnostik**
- II. Mastitiserreger**
- III. Resistenzteste**
- IV. Empfehlungen für die Praxis**

**„Die exakte klinische Untersuchung  
ist die Grundlage  
tierärztlichen Handelns“  
- Götze -**

# Fachgerechte Mastitisiagnostik

- Exakte klinische Untersuchung
- Stallproben
- Labordiagnostik
  - Erregernachweis aus Viertelanfangsgemelkproben
  - Nachweis entzündlicher Veränderungen
- Diagnostik auf Einzeltierebene
- Diagnostik auf Herdenbasis
- Diagnostik unter AMV-Bedingungen

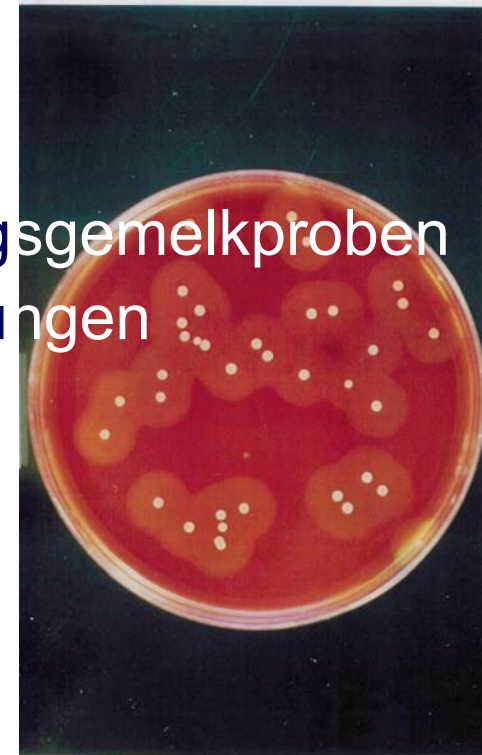
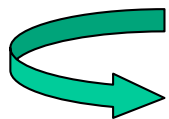


Foto: TGD



Einhaltung der GVP gemäß den Leitsätzen der Antibiotika Leitlinien (2002)  
*„Tierärztliche Kompetenz und Krankheitsdiagnose nach den Leitsätzen von Götze“*

# Der California - (Schalm)-Mastitis-Test

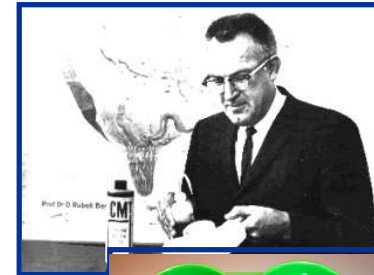
Entwickelt von **Schalm** u. **Norlander** (1957)

Prinzip: **Viskositätsänderung**  
(Präzipitation zellulärer DNS nach  
Zugabe einer oberflächenaktiven Testreagenz)

**Farbveränderung**  
(ph-Indikator; Testreagenz als Farbindikator)

**Semiquantitatives Verfahren**  
= indirekte Zellzahlbestimmung  
(Einteilung in Befundklassen)

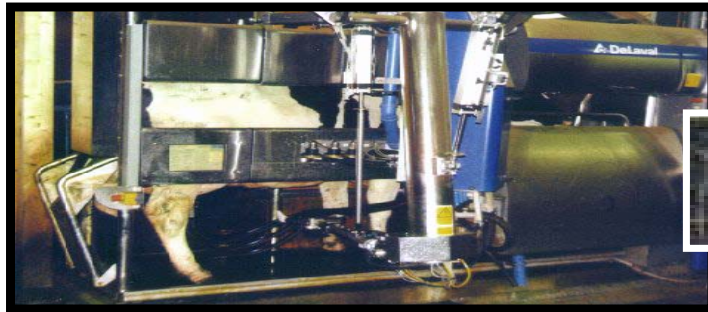
mod. Redetzky und Fehlings, 2003



Übliche SMT-Klassen				
0	1	2	3	4
-	+/-	+	++	+++

<b>EZZ</b>	<b>CMT (SMT)</b>		<b>VAG</b>
[Zellen/ml Milch x 1.000]	Positiv	Negativ	n
≤ 100	<b>31,6%</b>	<b>68,4%</b>	861
	<b>Falsch positiv</b>	<b>Richtig Negativ</b>	<b>„Gesunde“</b>
> 100	<b>95,2%</b>	<b>4,8%</b>	565
	<b>Richtig Positiv</b>	<b>Falsch Negativ</b>	<b>gestörte Sekretion</b>
<b>Davon:</b>			
100 - 200	90,1%	9,9%	182
200 - 300	96,2%	3,8%	104
300 - 400	98,2%	1,8%	55
> 400	98,2%	1,8%	224

# Elektrische Leitfähigkeit (ELF)



5,5	6,4
VL	VR
5,8	5,7
HL	HR

Differenz = 16,4%

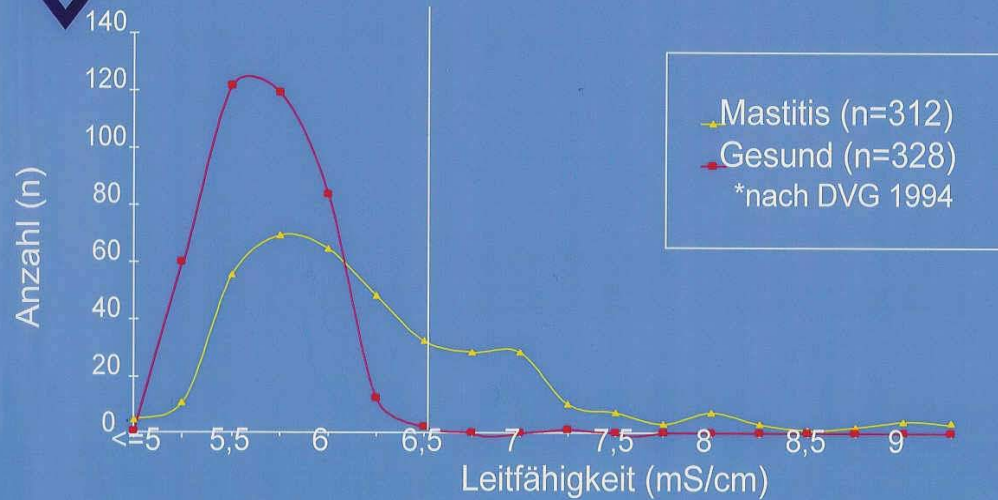
**Verdacht auf Mastitis:**  
**Viertel VR**

mod. Redetzky und Fehlings, 2003

Normbereich:  
4,8 – 6,2 mS/cm

Indikator für die **Eutergesundheit**  
absoluter Grenzwert:  
**> 6,5 mS/cm**

Inter Quarter Ratio:  
Differenz zwischen Vierteln  
mit dem **höchsten** und  
**niedrigsten** Messwert ist **> 15 %**

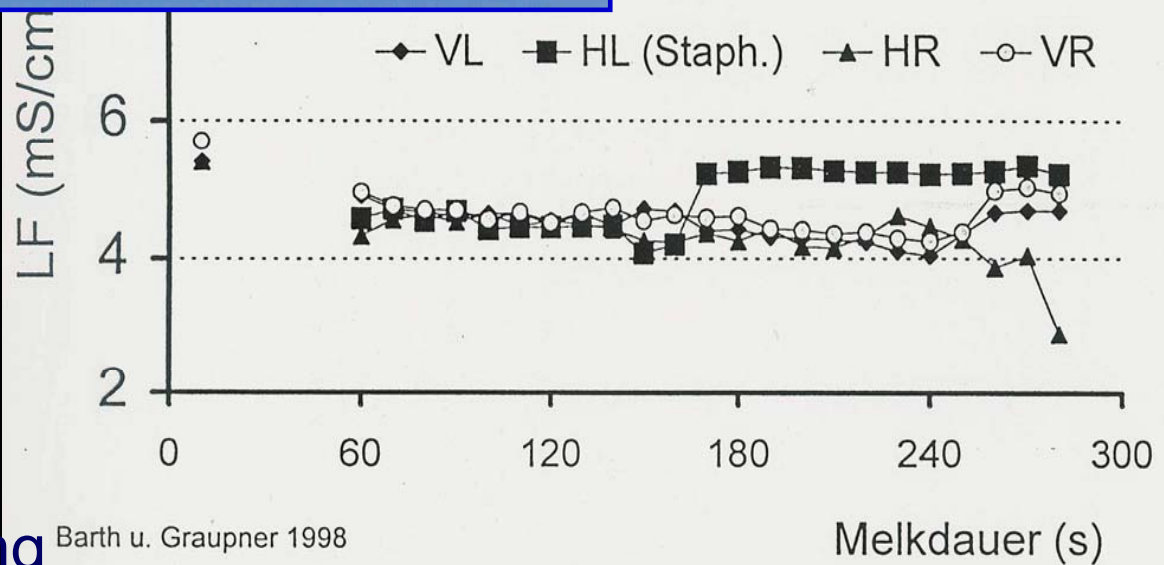


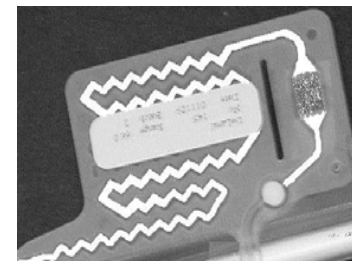
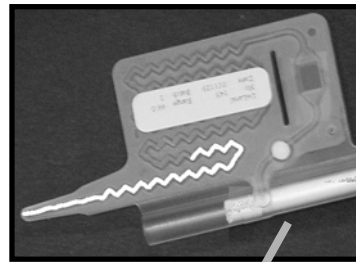
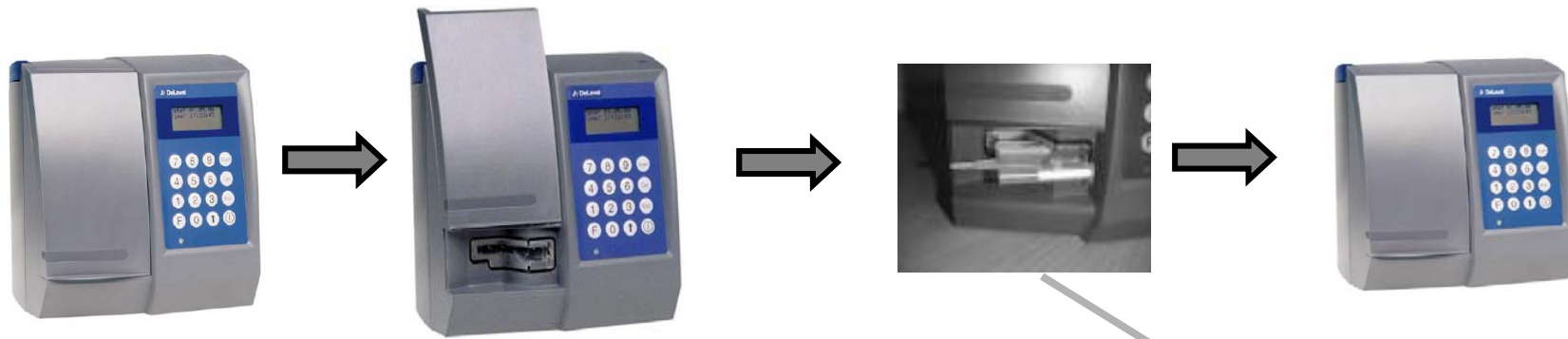
68 % aller mastitiskranken Viertel werden durch die Leitfähigkeit fälschlich als "gesund" beurteilt.

Hamann und Krömker, 2000

**ELF**

- Laktationsstadium
- Rasse
- Gemelksfraktion
- Melkintervall
- Fütterung
- Brunst
- Allgemeinerkrankung

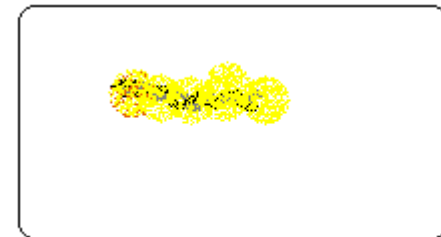
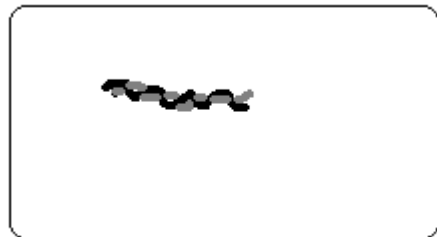
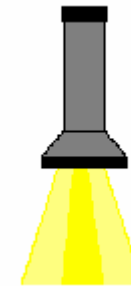




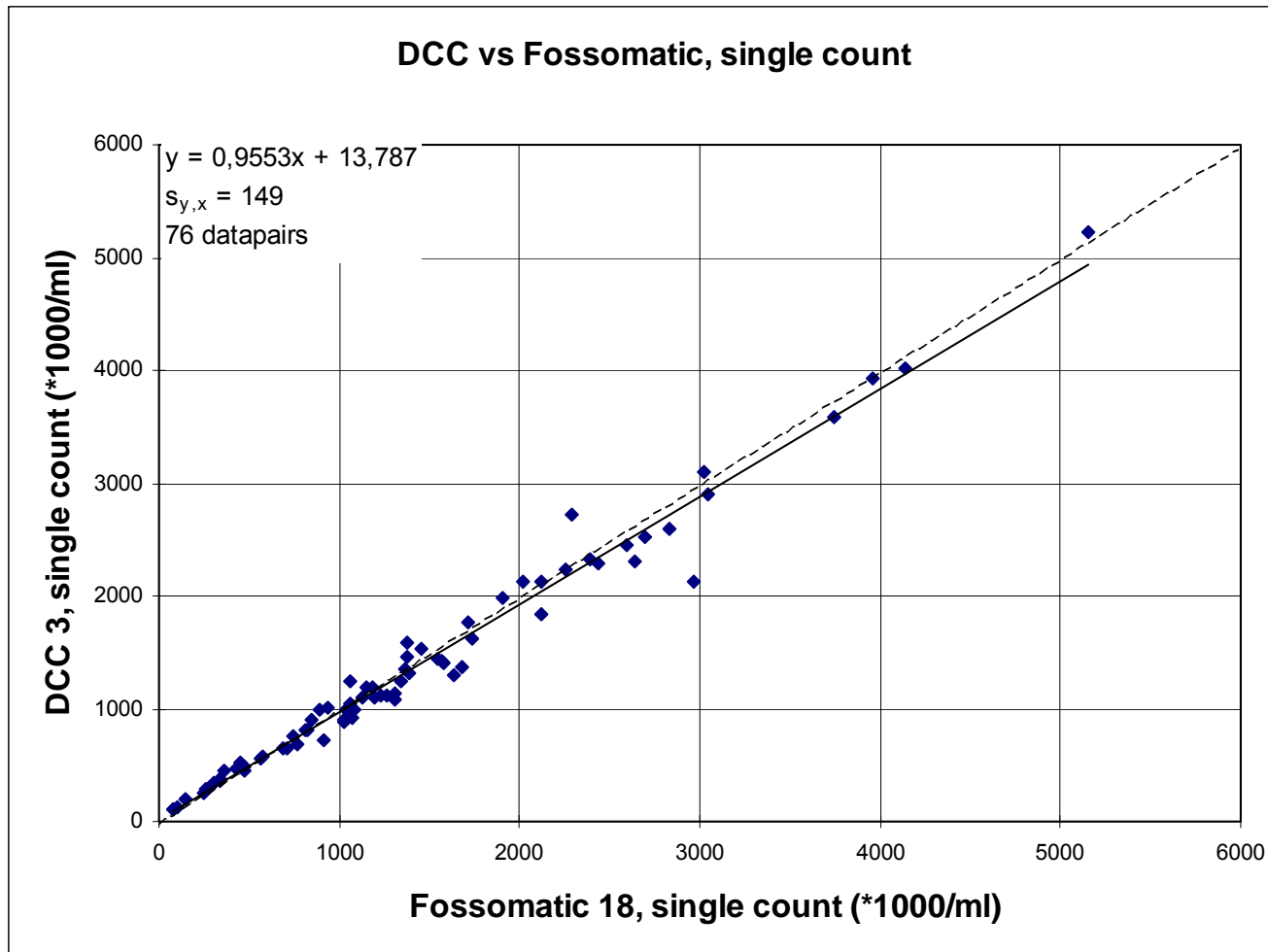
# Direkte Zellzahlbestimmung

Darstellung:

 DeLaval



# DCC - Messungen (DCC 3 vs. Fossomatic)



Darstellung:

 DeLaval

# Mastitisdiagnostik

- Milchproben auf der Euterviertelebene
  - Fraktionsproben
    - Viertelanfangsgemelke
    - Viertelendgemelke
    - Viertelgesamtgemelke

Milchproben für mikrobiologische Untersuchungen

***Grundsätzlich Viertelanfangsgemelke***

DVG, 2000, 2009





## Mastitis- diagnostik

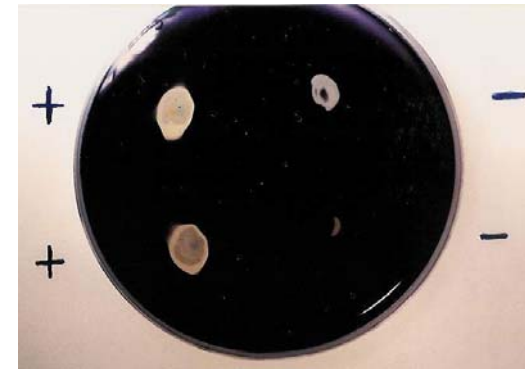


Fotos: Fehlings

- Sterile Probengefäße
- Dicht schließende Verschlüsse
- Reinigungstupfer
  - 70%-iger Alkohol (Ethylalkohol)
- ggf. Konservierungsmittelzusatz
  - z.B. flüssige Borsäure, Lyophilisat

# Methoden

- o Bebrütung auf Agarplatten (Zusatz 10% Blut und 0,1% Äsculin)
- o Bebrütungszeit 36 h bei  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$
- o Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK; Breakpoint-Methode; Mikronaut<sup>®</sup> System, Fa. Merlin)
- o Bestimmung der Penicillinsensibilität mittels des Penicillinase-Reduktionstestes (mod. n. Rosselet)
- o Sensitivitätsprüfung im Agar-Diffusionstest (ADT, Basis DIN-Norm 58.940)

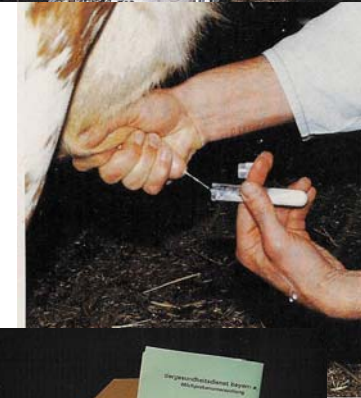
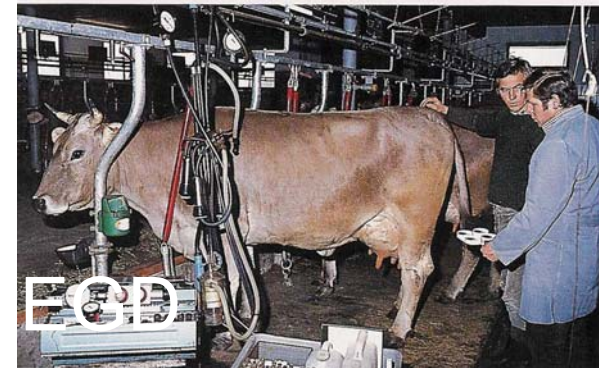


Fotos: TGD, Fehlings



Referenz: Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. DVG, 2000

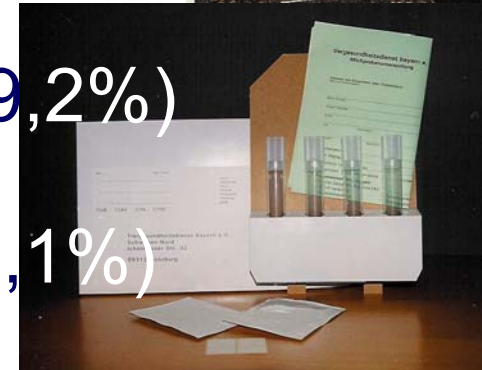
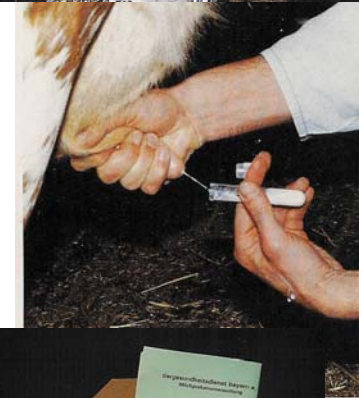
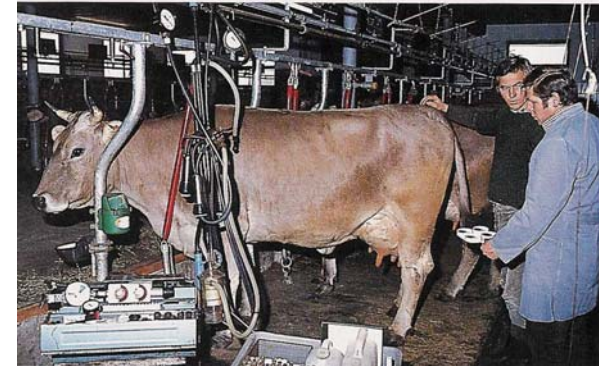
- Untersuchungszeitraum  
2000 - 2008
  - Entnahme durch Techniker des
  - Externe Einsendungen
- 59.486 Bestandsbesuche
  - 908.750 Kühe
  - 4.309.901 Viertelanfangsgemelkproben
  - 640.456 externe Einsendungen
  - 499.088 Penicillinasenachweise
  - 145.078 MHK-Bestimmungen



Fotos: TGD, Fehlings

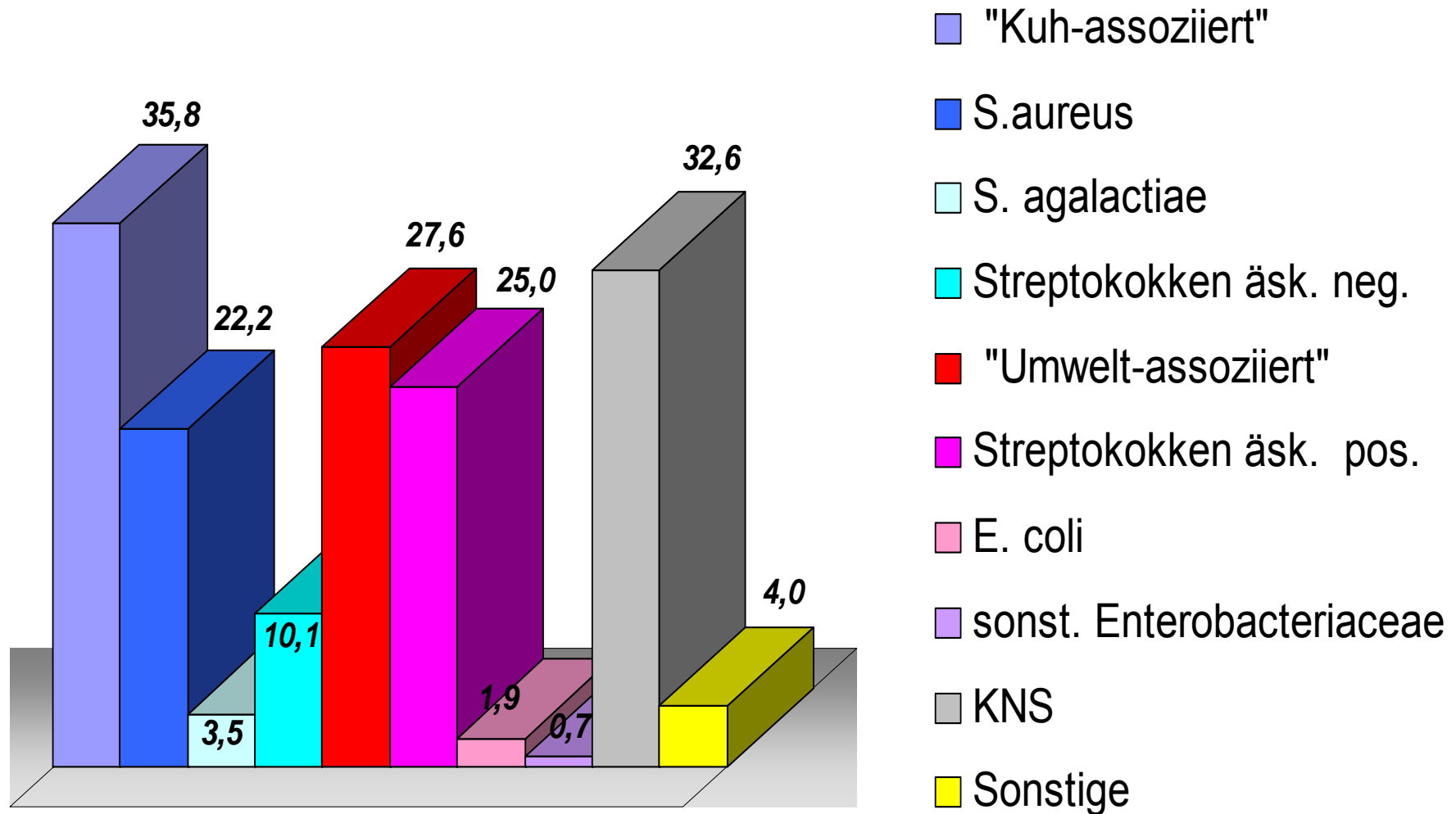
# Material

- Auswertung von 1.341.072 Milchproben
- 527.429 Milchproben waren SMT-positiv (Ø 32,8%)
- 402.719 dieser Proben waren mikrobiologisch positiv (Ø 24,6%)
- Auswertung von 195.738 (ca. 39,2%) Penicillinsensitivitätsprüfungen
- Auswertung von 46.597 (ca. 32,1%) MHK-Bestimmungen

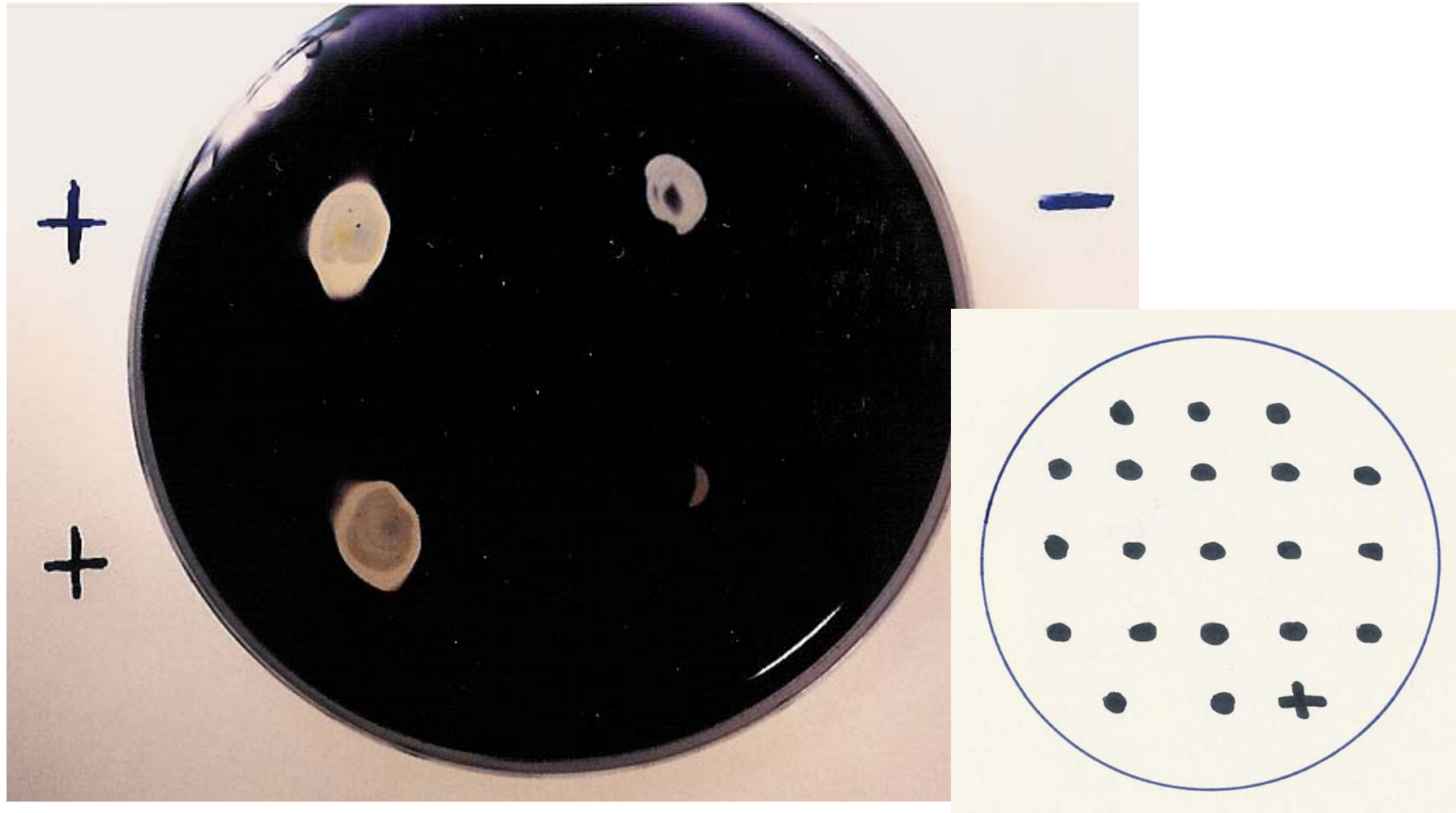


Fotos: TGD, Fehlings

Auswertung mikrobiologischer Untersuchungen in Bayern, 2000 - 2008 (n = 1.341.072)



# Penase-Test (mod. n. Rosselet)

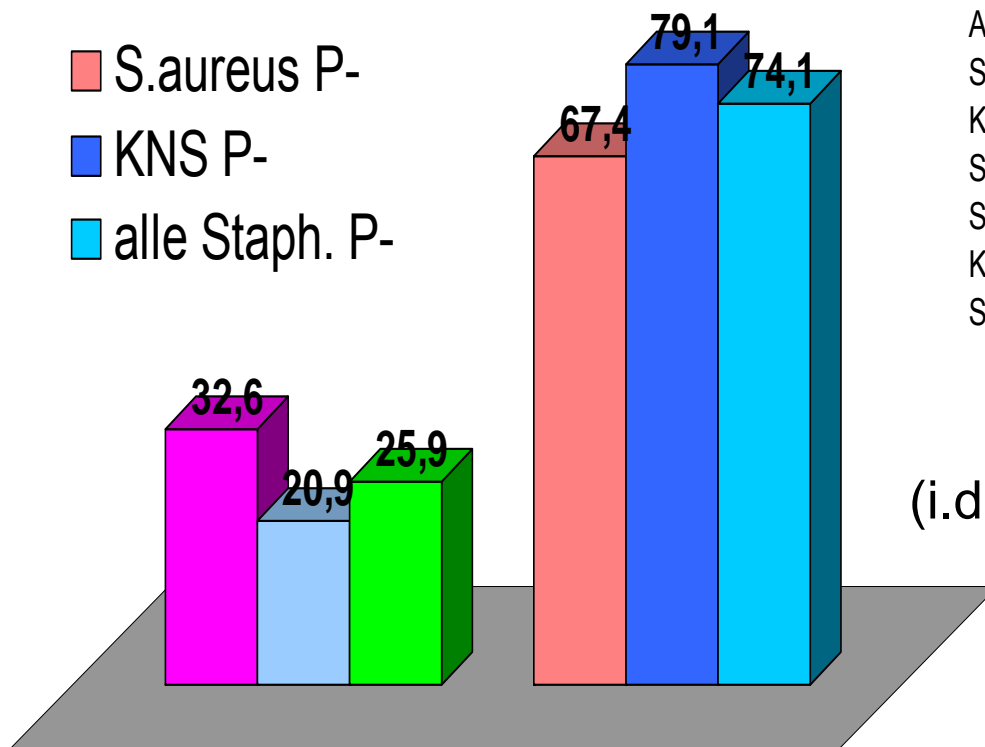


Fotos: TGD

19

- S.aureus P+
- KNS P +
- alle Staph. P+

- S.aureus P-
- KNS P-
- alle Staph. P-



**Penicillinsensibilität:  
Untersuchungen 2008 (n = 411.322)**

Anzahl (n):

Auswertung von 38.920 Untersuchungen

S.aureus Penicillinase pos. 6.682

KNS Penicillinase pos. 5.604

Summe alle Staph. pos. 12.286

S.aureus Penicillinase neg. 13.752

KNS Penicillinase neg. 20.709

Summe alle Staph. neg. 34.461

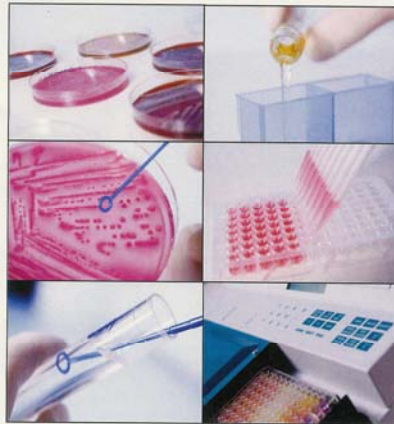
Ø 2000 – 2008 = 71,6%  
(i.d.R. subklinische Mastitiden)



# MHK (System Micronaut)<sup>®</sup>

## MICRONAUT System

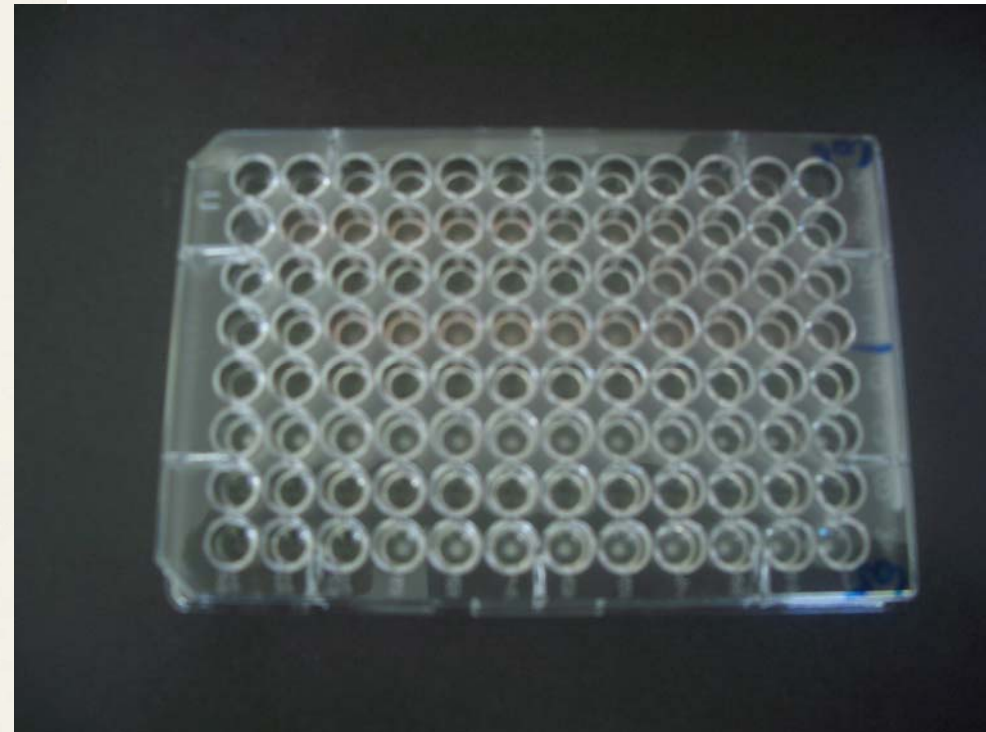
System zur biochemischen Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien und Hefen



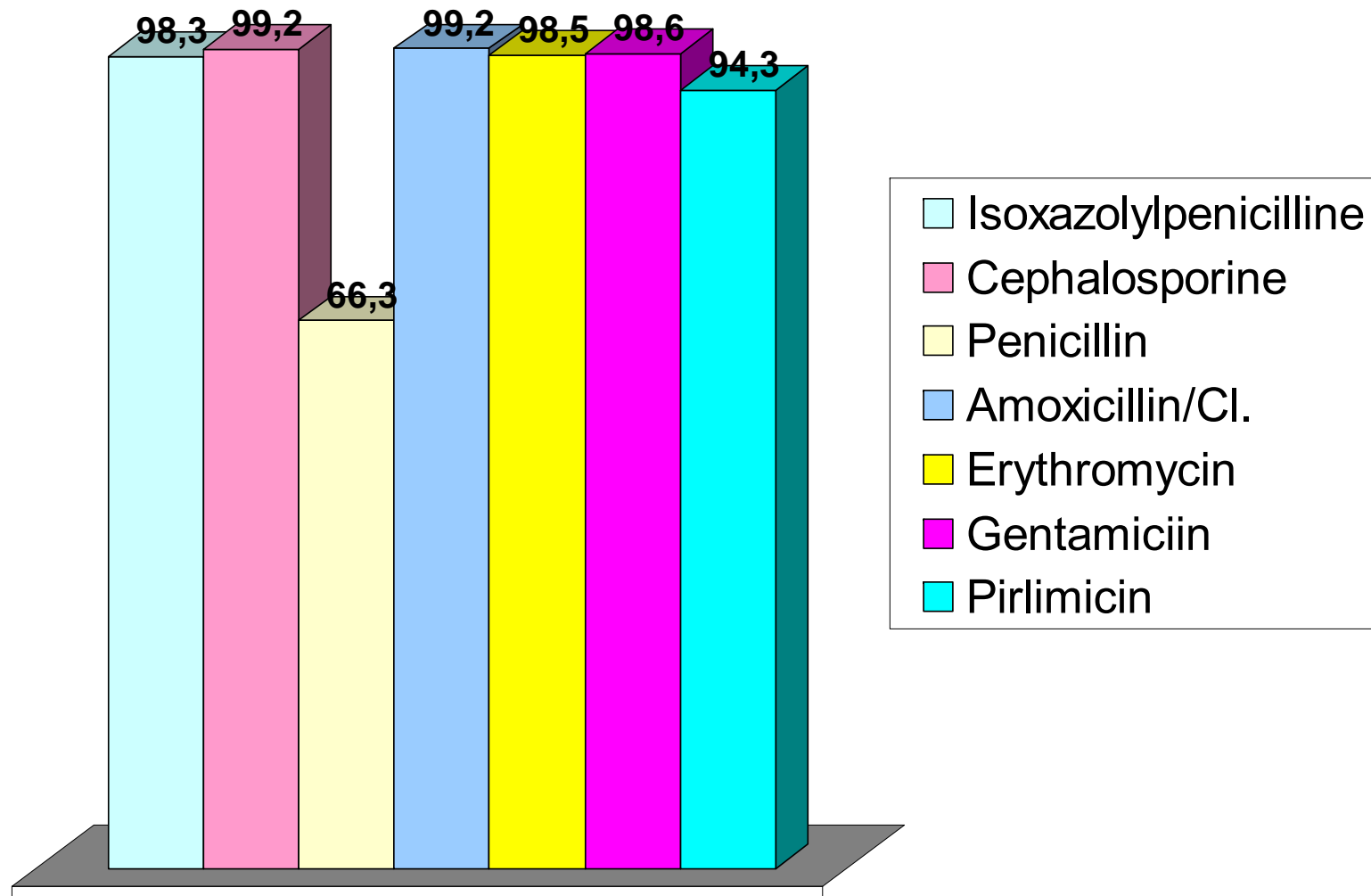
### MICRONAUT:

- ▼ Halbautomatisiertes System zur Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung in Mikrotitrationsplatten
- ▼ Einfache Handhabung
- ▼ Standardisiertes Verfahren
- ▼ Optimierte softwaregesteuerte Ablesung und Auswertung, incl. Expert System
- ▼ Entwickelt für den individuellen Laborgebrauch
- ▼ Hohe Flexibilität

- ▼ Kundenspezifische Antibiogramme. Stellen Sie aus mehr als 130 Antibiotika Ihr individuelles Antibiogramm zusammen
- ▼ Empfindlichkeitstestung nach DIN- oder CLSI (formerly NCCLS) Norm möglich
- ▼ Auswahl aus einer Vielzahl von Standardlayouts, Sonderplatten für spezifische Fragestellungen (z.B. ESBL, MRSA, CF...)



## Empfindlichkeitsprüfung bei S. aureus



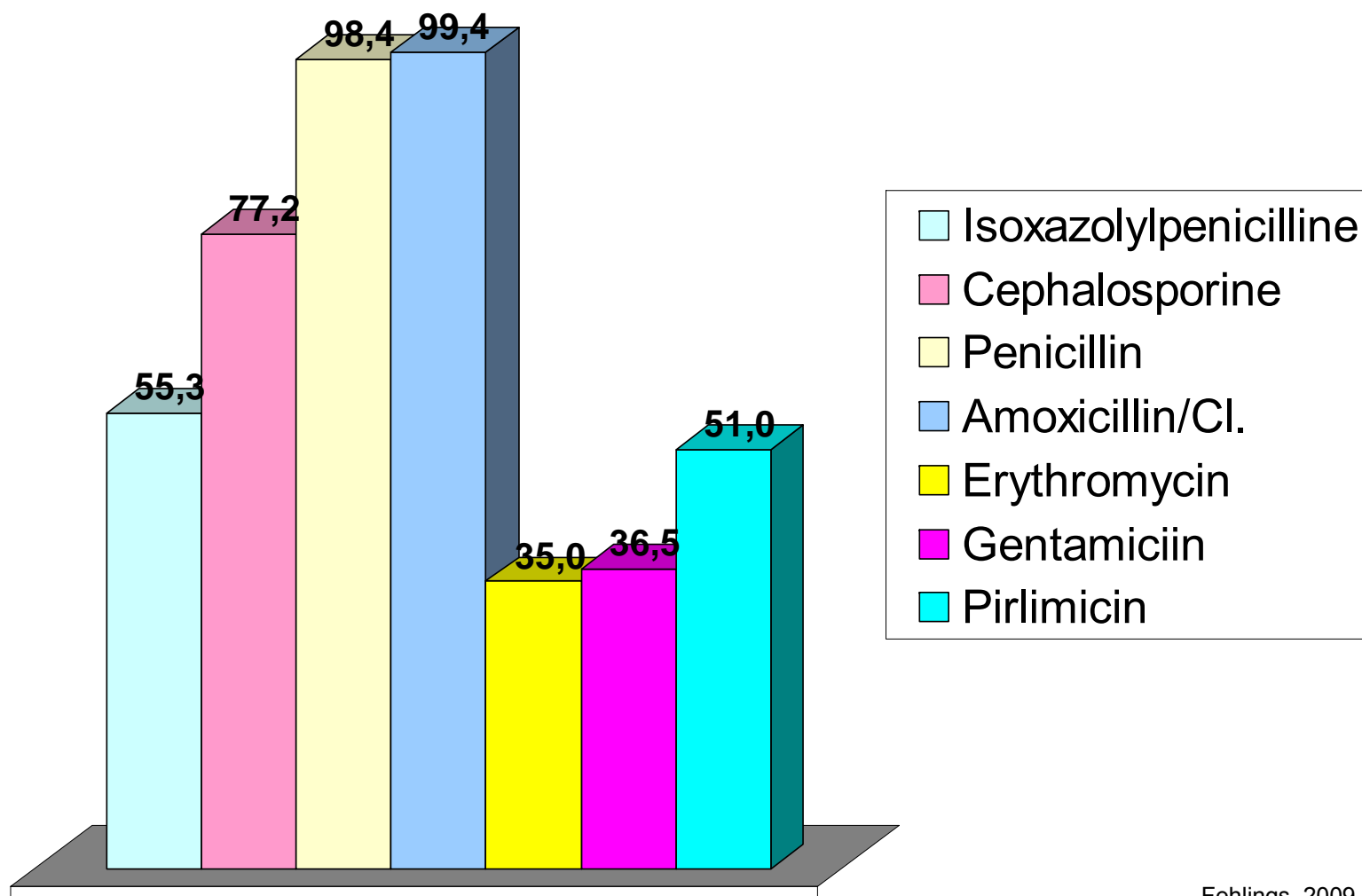
MHK-Auswertung 2008, n = 1.329, Sensitivität (%)

Fehlings, 2009

22



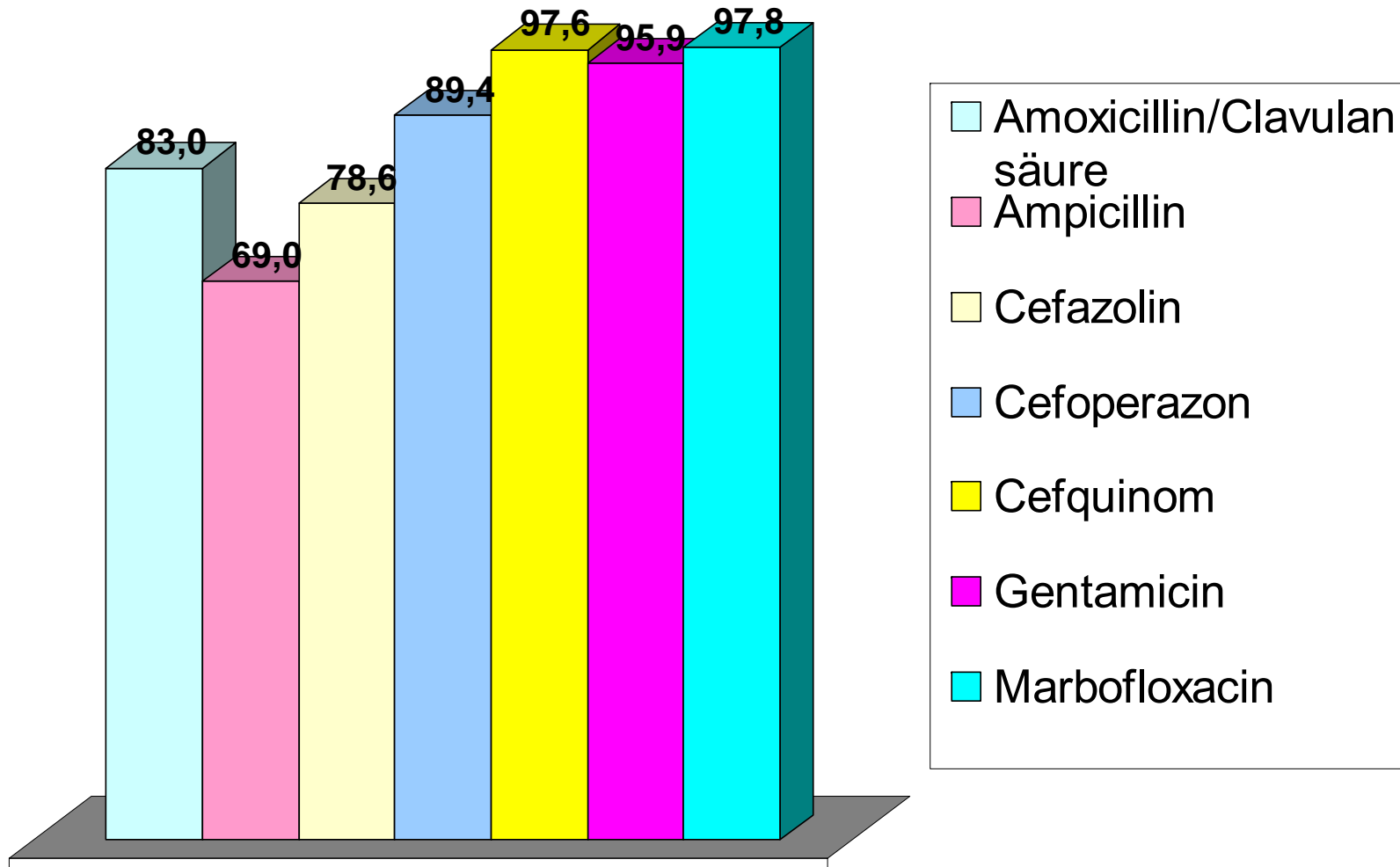
## Empfindlichkeitsprüfung bei äsk. pos. Streptokokken



MHK-Auswertung 2008, n = 1.876, Sensitivität (%)

Fehlings, 2009

# Empfindlichkeitsprüfung bei E. coli



MHK-Auswertung 2008, n = 1.308, Sensitivität (%)

Fehlings, 2009

24



# Empfindlichkeitsprüfungen in der MHK

Mittelwerte der Jahre 2000 – 2008

n = 46.579

	Penicilline	Isoxazolylpenicilline	Cephalosporine*/**	Erythromycin	Gentamicin	Pirlimicin	Amoxicillin/Clavulansäure	Marbofloxacin
	<b>Angaben in %</b>							
<i>S. aureus</i> *	70,7	98,0	98,1	70,8	94,8	93,9	n.g	n.g
äsk. pos. Streptokokken*	74,4	61,5	80,1	46,8	24,3	49,8	n.g	n.g
<i>E. coli</i> **	n.g	n.g	89,6	n.g	81,4	n.g	82,8	98,3

\* Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom/\*\* Cefoperazon, Cefquinom

n.g. = nicht geprüft

Fehlings, 2009  
25



## Anwendungsempfehlungen zur lokalen und parenteralen Therapie unter Berücksichtigung der Entwicklung der Sensitivität und Wirtschaftlichkeit

Erreger	Bei bestehender Sensitivität zu bevorzugende Antibiotika	Hochsensible Antibiotika	
Streptokokken (äsk. pos.) [z.B. <i>S. uberis/faecalis</i> ]	<b>Penicilline</b> <b>Ampicillin</b>	Beta-Lactamantibiotika <sup>1</sup>	<sup>1</sup> Penicilline Aminopenicilline Cephalosporine
Streptokokken (äsk. neg.) [z.B. <i>S. dysgalactiae</i> ]	<b>Penicilline</b>	Beta-Lactamantibiotika <sup>2</sup> Lincosamide	<sup>2</sup> Isoxazolympenicilline Penicilline Cephalosporine
Streptokokken [ <i>S. agalactiae</i> ]	<b>Penicilline</b>	Beta-Lactamantibiotika <sup>3</sup>	<sup>3</sup> Penicilline Isoxazolympenicilline
<i>S. aureus</i> KNS	<b>Isoxazolympenicilline</b> <b>Cephalosporine</b> <b>Penicilline</b>	Beta-Lactamantibiotika <sup>4</sup> Aminoglykoside Lincosamide	<sup>4</sup> Cephalosporine Isoxazolympenicilline Aminopenicilline Penicilline
<i>Enterobacteriaceae</i>	<b>Cephalosporine</b> <b>Marbofloxacin</b>	Chinolone Cephalosporine Aminoglykoside	



## Trends in der Resistenzentwicklung (GERM-Vet Studie 2004/2005\*)

Erreger	hochsensible Wirkstoffe	z.T. resistente Wirkstoffe
<b><i>S. aureus</i></b> (sub- u. klinische Mastitis, n = 411)	Cephalosporine Oxacillin	Penicillin G (19%) Ampicillin (19%)
<b>KNS</b> (klinische Mastitis, n = 143)	Gentamicin (1 - 2%) Erythromycin (15%) Tetracyclin (10%)	β-Lactamantibiotika(30%) (Penicillin, Ampicillin, Oxacillin, Amoxicillin)
<b>KNS</b> (subklinische Mastitis, n = 298)	Penicillin, Oxacillin (1%) Ceftiofur (1%) Erythromycin (7%) Pirlimicin (6%)	Ampicillin (18%)

\* Quelle: GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - BVL, 2008

27



## Trends in der Resistenzentwicklung (GERM-Vet Studie 2004/2005\*)

Erreger	hochsensible Wirkstoffe	z.T. resistente Wirkstoffe
<b><i>Streptococcus uberis</i></b> (n = 349)	Ampicillin (< 10%) Cephalosporine (< 10%) Oxacillin (< 10%)	Penicillin (> 20%) Pirlimicin (> 30%) Tetracyclin (> 40%)
<b><i>E. Coli</i></b> (n = 353)	Cephalosporine (< 10%) Enrofloxacin (< 10%) Amoxicillin/Clavulan- säure (< 10%) Gentamicin (< 10%)	Ampicillin (> 15%) Tetracyclin (> 14%) Trimethoprim (> 14%)

\* Quelle: GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - BVL, 2008



Foto: K. Fehlings