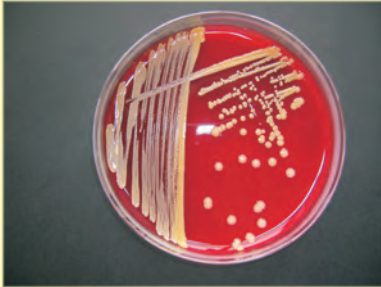


UNTERSUCHUNG ZU VORKOMMEN UND BEDEUTUNG VON KOAGULASE-NEGATIVEN STAPHYLOKOKKEN IN VIERTELGEMELKSPROBEN



CORNELIA CASSEL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Untersuchung zu Vorkommen und Bedeutung von koagulase-negativen
Staphylokokken in Viertelgemelksproben**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

CORNELIA CASSEL
Tierärztin aus Bremen

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber
Prof. emer. Dr. Dr. h.c. mult. H. Bostedt

Tag der Disputation: 29.05.2009

**In Liebe
meinen Eltern**

Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Die Erstellung dieser Dissertation wurde unterstützt vom „Hessischen Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.“, dessen nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditiertes Zentrallabor für Milchuntersuchungen die unentgeltliche Bestimmung der somatischen Zellzahlen in den Viertelgemelksproben übernahm.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | LITERATUR | 2 |
| 2.1 | Milcherzeugung in Deutschland | 2 |
| 2.1.1 | Entwicklung und heutige Situation der Milchviehhaltung | 2 |
| 2.1.2 | Rechtliche Grundlagen der Milcherzeugung | 3 |
| 2.2 | Mastitis beim Rind | 4 |
| 2.2.1 | Klinische und subklinische Mastitis | 6 |
| 2.2.2 | Der somatische Zellgehalt als Parameter der Eutergesundheit | 7 |
| 2.2.3 | Mastitiserreger | 8 |
| 2.3 | Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) | 9 |
| 2.3.1 | Taxonomische Einordnung der KNS | 9 |
| 2.3.2 | Vorkommen und Bedeutung von KNS beim Menschen | 13 |
| 2.3.3 | Vorkommen und Bedeutung von KNS als Mastitiserreger | 15 |
| 2.3.4 | Mikrobiologische Differenzierung der KNS | 22 |
| 2.3.5 | Differenzierung von KNS mit kommerziellen Testsystemen | 27 |
| 2.4 | Antimikrobielle Therapie und Resistenzsituation bei KNS | 30 |
| 2.5 | Sensitivitätsprüfungen von Erregern gegenüber Chemotherapeutika | 32 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 34 |
| 3.1 | Materialien | 34 |
| 3.1.1 | Probenmaterial | 34 |
| 3.1.2 | Nährmedien und Zusätze | 36 |
| 3.1.3 | Chemikalien, Biochemika und Reagenzien | 36 |
| 3.1.4 | Geräte und sonstige Materialien | 37 |
| 3.1.5 | Antibiotikatestplättchen | 38 |
| 3.1.6 | Bakterienreferenzstämme | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2 | Methoden | 40 |
| 3.2.1 | Probennahme | 40 |
| 3.2.2 | Durchführung des California-Mastitis-Tests (CMT) | 40 |
| 3.2.3 | Mikrobiologische Untersuchung der Viertelgemelksproben | 41 |
| 3.2.3.1 | Isolierung und Differenzierung häufig vorkommender Mastitiserreger in Viertelgemelksproben | 41 |
| 3.2.3.1.1 | Durchführung der Differenzierungstests zum KOH-, Katalase- und Oxidaseverhalten | 42 |
| 3.2.3.1.2 | Differenzierung der Gattung <i>Staphylococcus</i> | 43 |
| 3.2.3.1.3 | Differenzierung der Gattungen <i>Streptococcus</i> und <i>Enterococcus</i> | 44 |
| 3.2.3.1.4 | Differenzierung von Corynebakterien | 44 |
| 3.2.3.1.5 | Differenzierung gram-negativer Erreger | 44 |
| 3.2.3.1.6 | Differenzierung der Gattung <i>Proteus</i> | 45 |
| 3.2.3.1.7 | Differenzierung von Hefen | 45 |
| 3.2.3.2 | Differenzierung zwischen den Gattungen <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> und <i>Kocuria</i> | 46 |
| 3.2.3.3 | Differenzierung der KNS-Spezies | 46 |
| 3.2.3.3.1 | Bestimmung der Sensitivität gegenüber Novobiocin | 47 |
| 3.2.3.3.2 | Differenzierung der novobiocin-sensiblen KNS | 47 |
| 3.2.3.3.3 | Differenzierung der novobiocin-resistenten KNS | 50 |
| 3.2.3.4 | Differenzierung mit dem api [®] Staph-System | 51 |
| 3.2.4 | Konservierung der Isolate | 52 |
| 3.2.5 | Zytologische Untersuchung der Viertelgemelksproben | 53 |
| 3.2.6 | Durchführung des Antibiotikasensitivitätsverhaltens als Agardiffusionstest | 53 |
| 4 | ERGEBNISSE | 55 |
| 4.1 | Ergebnisse der zytologischen Untersuchung | 55 |
| 4.2 | Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung | 56 |
| 4.2.1 | Ergebnisse der Untersuchung auf Mastitiserreger | 56 |
| 4.2.2 | Ergebnisse der Untersuchung und Differenzierung der KNS | 59 |
| 4.2.3 | Vergleich der Haltungform (Laufstallhaltung bzw. Anbindehaltung) bezüglich des Spektrums nachgewiesener KNS-Spezies | 62 |
| 4.3.4 | Vergleich zwischen Erstlaktierenden und älteren Kühen bezüglich KNS-Vorkommenshäufigkeit | 63 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.3 | Zusammenhänge zwischen KNS-Spezies und somatischer Zellzahl | 63 |
| 4.4 | Keimdichte (Intensität) der KNS-Spezies in Viertelgemelksproben | 72 |
| 4.5 | Vergleich der vereinfachten biochemischen Differenzierung und der biochemischen Differenzierung mittels api [®] Staph-System | 74 |
| 4.6 | Ergebnisse der Antibiotikasensitivitätstests | 75 |
| 5 | DISKUSSION | 78 |
| 5.1 | Allgemein | 78 |
| 5.2 | Somatischer Zellgehalt in Viertelgemelksproben | 79 |
| 5.3 | Mastitiserreger in Milch aus unauffälligen Eutervierteln | 80 |
| 5.4 | KNS und KNS-Spezies in Viertelgemelksproben | 80 |
| 5.5 | Einfluss von KNS auf die somatische Zellzahl | 82 |
| 5.6 | Differenzierungsmethoden für KNS | 83 |
| 5.7 | Wirksamkeit handelsüblicher Trockenstellerpräparate und Resistenzsituation der KNS | 84 |
| 5.8 | Schlussfolgerungen | 85 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 87 |
| 7 | SUMMARY | 89 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 91 |
| 9 | ANHANG | 106 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabelle 1 | Grenzwerte für die Gütebewertung der Anlieferungsmilch nach der Milch-Güteverordnung | 4 |
| Tabelle 2 | Entwicklung der taxonomischen Differenzierung der Gattung <i>Staphylococcus</i> zwischen 1964 und 1983 (nach WATTS, 1985) | 11 |
| Tabelle 3 | Untersuchungen zum Vorkommen von KNS in Kuhmilch. Die Untersuchungen beinhalten verschiedenes Probenmaterial aus klinischen und subklinischen Mastitiden sowie aus unauffälligen Vierteln. | 17 |
| Tabelle 4 | Untersuchungen zur relativen Vorkommenshäufigkeit einzelner KNS-Spezies in Kuhmilch | 18 |
| Tabelle 5 | Literaturangaben zu biochemischen Merkmalen zur Differenzierung zwischen Staphylokokken und „Mikrokokken“ | 23 |
| Tabelle 6 | Zusammenstellung einiger vereinfachter Differenzierungsschemata für KNS | 26 |
| Tabelle 7 | Vergleich kommerzieller Identifizierungssysteme für Staphylokokken | 28 |
| Tabelle 8 | Anzahl der von verschiedenen Herstellern angebotenen Trockenstellerpräparate, aufgeschlüsselt nach enthaltenem antimikrobiellen Wirkstoff laut LILA LISTE 2006/2007 | 31 |
| Tabelle 9 | Übersicht über die Landwirtschaftsbetriebe | 35 |
| Tabelle 10 | Übersicht über die verwendeten Referenzstämme | 39 |
| Tabelle 11 | Beurteilung des California-Mastitis-Tests | 41 |
| Tabelle 12 | Übersicht über die Beurteilung der Intensität des Koloniewachstums (Keimdichte) auf Blutagar | 42 |
| Tabelle 13 | Differenzierung coliformer Erreger | 45 |
| Tabelle 14 | Übersicht über die zur Differenzierung der novobiocin-sensiblen KNS untersuchten Merkmale | 49 |
| Tabelle 15 | Übersicht über die zur Differenzierung der novobiocin-resistenten KNS untersuchten Merkmale | 51 |
| Tabelle 16 | Bewertungsschlüssel für Hemmhofdurchmesser im Agardiffusionstest zur Resistenzprüfung | 54 |
| Tabelle 17 | Nach Betrieb differenzierende Darstellung der Anzahl bakteriologisch positiver Viertelgemelksproben sowie die jeweils nachgewiesenen Keimgruppen | 57 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabelle 18 | Übersicht über die aus Viertelgemelksproben isolierten KNS-Spezies, differenziert nach Betrieb | 61 |
| Tabelle 19 | Absoluter bzw. prozentualer Anteil KNS-positiver Viertel in Laufstallhaltungen und Anbindehaltungen, differenziert nach KNS-Spezies | 62 |
| Tabelle 20 | Vergleich von Erstlaktierenden und Kühen hinsichtlich der Häufigkeit positiver KNS-Befunde, bezogen auf die Viertelanzahl pro Tier | 63 |
| Tabelle 21 | Vorkommen von KNS-Spezies in Viertelgemelksproben mit verschiedenen Zellzahlkategorien | 64 |
| Tabelle 22 | Absolute Anzahlen von 1216 Viertelgemelksproben mit positivem mikrobiologischen Befund in verschiedenen Zellzahlkategorien und absoluter sowie prozentualer Anteil von 427 Proben, die einen alleinigen KNS-Befund aufwiesen | 66 |
| Tabelle 23 | Vergleich des 25., 50. und 75. Perzentils der Zellzahlwerte von Viertelgemelksproben, die für einzelne KNS-Spezies positiv waren | 70 |
| Tabelle 24 | Prozentuale Verteilung der Intensitäten in verschiedenen Zellzahlkategorien | 73 |
| Tabelle 25 | Intensität der gesamten KNS in Bezug zur Zellzahl | 73 |
| Tabelle 26 | Intensität von <i>S. chromogenes</i> in Bezug zur Zellzahl | 73 |
| Tabelle 27 | Übersicht über Wahrscheinlichkeitsangaben zur Speziesidentifizierung des api [®] Staph-Systems für die KNS, bei denen übereinstimmende Identifizierung im vereinfachten biochemischen Differenzierungssystem und dem api [®] Staph-System festgestellt worden war | 75 |
| Tabelle 28 | Überblick über die resistent reagierenden Isolate der Betriebe | 77 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|---------------------|--|----|
| Abbildung 1 | Zukünftige taxonomische Stellung der Staphylokokken nach GARRITY et al. (2005) und derzeit existierende Spezies der Gattung <i>Staphylococcus</i> nach EUZÉBY (2007) | 13 |
| Abbildung 2 | Teilergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von Viertelgemelksproben aus dem Jahresbericht 2005 des Landesbetriebs Hessisches Landeslabor | 16 |
| Abbildung 3 | Prozentualer Anteil der 1.720 geprüften Viertelgemelksproben in den verschiedenen Zellzahlklassen | 55 |
| Abbildung 4 | Vergleich der Häufigkeit verschiedener Keimgruppen in Viertelgemelksproben aus Betrieben mit Zellzahlen in der Anlieferungsmilch von < 200.000 Z/ml bzw. von \geq 200.000 Z/ml | 58 |
| Abbildung 5 | Häufigkeit des Nachweises verschiedener aus Viertelgemelksproben isolierten KNS-Spezies (n = 874) | 59 |
| Abbildung 6 | Vergleich der Verteilung der Zellzahlwerte in Viertelgemelksproben mit positivem mikrobiologischen Befund bzw. mit negativem mikrobiologischen Befund | 65 |
| Abbildung 7 | Zellzahlverhältnisse der Viertel mit novobiocin-sensiblen KNS | 67 |
| Abbildung 8 | Zellzahlverhältnisse der Viertel mit novobiocin-resistenten KNS | 68 |
| Abbildung 9 | Zusammenfassende Darstellung des Zusammenhangs eines Nachweises novobiocin-sensibler (A) bzw. novobiocin-resistenter (B) KNS und der Einstufung in eine bestimmte Zellzahlklasse | 69 |
| Abbildung 10 | Vergleich des 25., 50., 75. und 90. Perzents der somatischen Zellzahlen von Viertelgemelksproben mit verschiedenem mikrobiologischen Befund | 71 |
| Abbildung 11 | Vergleich der Zellzahlen in Viertelgemelksproben mit negativem mikrobiologischen Befund (n = 504) und der Viertelgemelksproben mit alleinigem Befund einer KNS-Spezies (n = 427) | 72 |
| Abbildung 12 | Penicillin G-Resistenz der KNS-Spezies | 76 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------|---|
| ABI | Amtsblatt |
| AC | Arabinose-Cellobiose |
| ADR | Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter |
| ÄNS | äskulin-negative Streptokokken |
| ÄPS | äskulin-positive Streptokokken |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AVID | Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik |
| B. | Betrieb |
| BGBI | Bundesgesetzblatt |
| BgVV | Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (heute aufgeteilt und umbenannt) |
| BLS | Boxenlaufstall |
| BMELV | Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft |
| CASO | Caseinpepton-Sojamehlpepton |
| CCM | Czech Collection of Microorganisms |
| ch | <i>Staphylococcus chromogenes</i> |
| CMT | California-Mastitis-Test |
| co | <i>Staphylococcus cohnii</i> |
| Co. | Corynebakterien |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| DVG | Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft |
| E.c. | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ep | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| et al. | et alii (und Mitarbeiter) |
| g | Gramm |
| h | hora (Stunde) |
| ha | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| He. | Hefen |
| HHD | Hemmhofdurchmesser |
| ho | <i>Staphylococcus hominis</i> |
| HVL | Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V. |
| hy | <i>Staphylococcus hyicus</i> |
| IBR | Infektiöse Bovine Rhinotracheitis |
| IDF | International Dairy Federation |
| Int. | Intensität |
| IPV | Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis |
| J | Journal |
| JLU | Justus-Liebig-Universität |
| Kal. | Kalbin |
| KbE | Kolonie bildende Einheit |
| kg | Kilogramm |
| Kl. | <i>Klebsiella</i> Spezies |
| km | Kilometer |
| KNS | koagulase-negative Staphylokokken |
| k.w. | kein mikrobiologisches Wachstum |

| | |
|--------|--|
| l | Liter |
| le | <i>Staphylococcus lentus</i> |
| MBK | minimale bakterizide Konzentration |
| mg | Milligramm |
| MHK | minimale Hemmkonzentration |
| Mio. | Millionen |
| M./K. | <i>Micrococcus</i> und <i>Kocuria</i> Spezies |
| MKS | Maul- und Klauenseuche |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MUG | Methylumbelliferyl-Glucuronid |
| n | Anzahl der Werte |
| ni | nicht identifiziert |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| NCTC | National Collection of Type Cultures |
| NNIS | National Nosocomial Infection Survey |
| NOSEC | simplified test for novobiocin-sensitive CNS (THORBERG und BRÄNDSTRÖM, 2000) |
| PBP2' | zusätzlich Penicillin bindendes Protein |
| PCR | Poly Chain Reaction |
| Pr. | <i>Proteus</i> Spezies |
| Ps. | <i>Pseudomonas</i> Spezies |
| QMPS | Quality Milk Promotion Service |
| S. | <i>Staphylococcus</i> |
| sa | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| S.a. | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| sc | <i>Staphylococcus sciuri</i> |
| Sc. | <i>Streptococcus</i> |
| SEA | Staphylococcal enterotoxin A |
| SEC | Staphylococcal enterotoxin C |
| si | <i>Staphylococcus simulans</i> |
| SIM | Sulfid-Indol-Motility |
| spp. | Spezies |
| TM | Trehalose-Mannitol |
| TMR | Totale Mischraktion |
| TSST-1 | Toxic Shock Syndrom Toxin-1 |
| UV | Ultraviolett |
| V. | Viertel |
| VAG | Viertelanfangsgemelk |
| VGP | Viertelgemelksprobe |
| vs. | versus |
| wa | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| xy | <i>Staphylococcus xylosus</i> |
| Z | Zellen |
| ZMP | Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle GmbH |
| ZZ | somatische Zellzahl |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |

1 EINLEITUNG

Die Milchviehhaltung in Deutschland ist nach wie vor von starken Konzentrationsprozessen geprägt. Die Anzahl der Milchvieh haltenden Betriebe geht stetig zurück, die durchschnittliche Tieranzahl der noch verbliebenen Betriebe steigt. Auch bei den Molkereien sind Konzentrationsprozesse zu beobachten. Eine wichtige Ursache hierfür ist der Preisdruck, dem sowohl die Urproduktion als auch die Be- und Verarbeitung von Milch unterliegen.

Die Mastitis des Rindes ist ungeachtet dieser Entwicklungen weiter eine der bedeutendsten Erkrankungen in Milchviehherden, wobei sich allerdings aufgrund veränderter Betriebs- und Tierhaltungsbedingungen Verschiebungen der Ausbildungsform (subklinisch vs. klinisch) und des Erregerspektrums ergeben haben. Die subklinische Mastitis stellt heute einen der wichtigsten Verlustfaktoren für den Milcherzeuger dar. Das Erregerspektrum, das heute das Mastitisgeschehen dominiert, hat sich gewandelt. Waren bis vor ein paar Jahrzehnten noch *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* die Hauptproblemkeime, so werden heute immer häufiger die sogenannten Umweltkeime aus Viertelgemelksproben isoliert, insbesondere die koagulase-negativen Staphylokokken (KNS).

Die Gruppe der koagulase-negativen Staphylokokken wird weltweit sehr häufig in Viertelgemelksproben nachgewiesen. Über ihre Bedeutung für die Eutergesundheit wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert. Oftmals werden die Erreger in diesem Zusammenhang pauschal als „minor pathogens“ bezeichnet. Die KNS werden häufig nur als Gruppe betrachtet, andere Autoren betonen die Notwendigkeit einer differenzierenden Betrachtungsweise.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, KNS und Eutergesundheit bei Rindern aus Betrieben mit relativ niedrigen Zellzahlen in Relation zu setzen. Dazu wurde die Vorkommenshäufigkeit von KNS im Verhältnis zu anderen Mastitiserregern in mittelhessischen Betrieben erfasst, die KNS-Spezies wurden differenziert und die Ergebnisse in Bezug zu den ermittelten Zellgehalten gesetzt.

Da die Therapie subklinischer Mastitiden hauptsächlich in der Trockenstehperiode erfolgt, wurden repräsentative Isolate auf ihre Sensitivität gegenüber den in kommerziell erhältlichen Trockenstellern enthaltenen Antibiotika geprüft.

2 LITERATUR

2.1 Milcherzeugung in Deutschland

2.1.1 Entwicklung und heutige Situation der Milchviehhaltung

In den vergangenen Jahrzehnten ist sowohl bei den milcherzeugenden landwirtschaftlichen Betrieben als auch bei den Molkereien der Konzentrationsprozess stetig weiter fortgeschritten. So wurden im Jahr 2000 in der Bundesrepublik Deutschland noch 135.100 Milcherzeugerbetriebe gezählt (HAMANN und FEHLINGS, 2002), im Jahr 2007 waren es nur noch 102.000 Betriebe (ANONYM, 2008).

Da sich die Milchleistung pro Tier im gleichen Zeitraum nur relativ wenig erhöht hat, sind die Herdendurchschnittsgrößen in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen. NEUMANN et al. (1977) gaben für das Bundesland Schleswig-Holstein für das Jahr 1955 eine durchschnittliche Bestandsgröße von acht Milchkühen an. Bis zum Jahr 1976 war dieser Wert auf 22 Tiere gestiegen, wobei der Bundesdurchschnitt erst bei ca. neun Kühen lag. HAMANN und FEHLINGS (2002) gaben für das Jahr 2000 als Wert für die Herdendurchschnittsgröße in Deutschland 34 Milchkühe an. Im Jahr 2007 lag dieser Wert bereits bei ca. 40 Tieren. Es besteht nach wie vor ein deutlicher Unterschied zwischen den alten und den neuen Bundesländern. In den neuen Bundesländern liegt die durchschnittliche Herdengröße um einen Faktor von vier höher als in den alten Bundesländern (BMELV, 2005). Die Milchkuhhaltung in Deutschland ist damit deutlich kleiner strukturiert als die der wichtigsten europäischen Konkurrenten, wobei sich dieses Bild in den nächsten Jahren jedoch ändern dürfte (BMELV, 2005).

Mit der Anzahl der milcherzeugenden Betriebe und einer nach wie vor feststellbaren Leistungssteigerung ist auch die Gesamtanzahl der Milchkühe in Deutschland gesunken, allerdings vergleichsweise wenig. Für das Jahr 2001 gaben HAMANN und FEHLINGS (2002) nach Angaben der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR) noch 4,6 Mio. Tiere an. Für das Jahr 2006 nannte die ADR (2007) eine Abnahme der Gesamtzahl an Milchkühen auf gerundete 4,1 Mio. In Hessen spiegelt sich die Situation analog wider, wie sie auch auf Bundesebene festgestellt wurde. Im Jahr 2008 waren in Hessen noch durchschnittlich 3.289 Milchviehbetriebe in der Milchgüte-Prüfung erfasst (HVL, 2008).

Bei sinkenden Betriebs- und Milchkuhanzahlen stieg die Durchschnittsleistung pro Tier über die Jahrzehnte stark an, wobei sich dieser Trend in den letzten Jahren etwas abgeflacht hat. Im Jahr

1952 lag in der Region Gießen die durchschnittliche Milchleistung pro Kuh und Jahr bei 2.000-2.500 kg; der Bundesdurchschnitt lag bei 2.720 kg, und der höchste Wert, den eine Milchkuh in diesem Jahr erzielte, betrug 4.687 kg Milch (RUHR-STICKSTOFF-AKTIENGESELLSCHAFT, 1955). Seither hat sich die Milchleistung mehr als verdoppelt. Das BMELV (2005) gab für die Jahre 2000 bis 2003 eine durchschnittliche Milchmengensteigerung um 7 % auf 6.537 kg an.

Kaum Veränderungen ließen sich beim ausgezahlten Milchpreis beobachten, der de facto seit einem Jahrzehnt stagniert, mit geringen „Ausschlägen nach oben“. Nach Angaben der ZMP (ANONYM, 2007b) betrug der Milchauszahlungspreis in Deutschland bei 3,7 % Fett und 3,8 % Eiweiß 1999 im Durchschnitt 28,50 Cent/kg, stieg bis 2001 auf 32,70 Cent/kg an und fiel danach bis 2006 auf 27,35 Cent/kg Milch. In der zweiten Jahreshälfte 2007 war ein stark gestiegener durchschnittlicher Auszahlungspreis mit teilweise mehr als 50 Cent/kg Milch zu beobachten. Seit Mitte 2008 sinken die Preise jedoch wieder.

2.1.2 Rechtliche Grundlagen der Milcherzeugung

Kuhmilch wird primär als Lebensmittel produziert. In der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 Art. 2 wird der Begriff „Lebensmittel“ definiert als „Stoffe oder Erzeugnisse, die dazu bestimmt sind oder von denen nach vernünftigem Ermessen erwartet werden kann, dass sie im verarbeiteten, teilweise verarbeiteten oder unverarbeiteten Zustand von Menschen aufgenommen werden“. Dies bedingt im Sinne des gesundheitlichen Verbraucherschutzes hygienische Mindestanforderungen sowohl an die milchliefernden Tiere als auch an die Rohmilch.

In der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 Anhang III Abschnitt IX wurde unter anderem festgelegt, dass Rohmilch von Tieren stammen muss, deren allgemeiner Gesundheitszustand gut ist und die insbesondere nicht an einer sichtbaren Euterentzündung leiden. Weiterhin wurde festgelegt, dass rohe Kuhmilch mindestens die folgenden Kriterien erfüllen muss: Die Keimzahl bei 30 °C pro ml darf den Wert von 100.000 im über zwei Monate ermittelten geometrischen Mittelwert bei mindestens zwei Probennahmen je Monat nicht überschreiten. Der Wert für somatische Zellen darf den Grenzwert von 400.000 pro ml nicht überschreiten. Dabei wird der geometrische Mittelwert über drei Monate bei mindestens einer Probennahme pro Monat herangezogen. Nach der Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güteverordnung) werden Untersuchungsparameter und Untersuchungshäufigkeit von Anlieferungsmilch festgelegt. So müssen monatlich mindestens drei Proben zur Feststellung des

Fettgehaltes, drei Proben zur Untersuchung des Eiweißgehaltes, zwei Untersuchungen auf die bakteriologische Beschaffenheit und ebenfalls zwei Untersuchungen auf Hemmstoffe durchgeführt werden. Weiterhin ist mindestens zweimal pro Monat der Gehalt an somatischen Zellen zu bestimmen. Der Gefrierpunkt ist mindestens einmal im Monat zu untersuchen. Nach § 3 wird der Keimgehalt herangezogen, um die Anlieferungsmilch in Klasse 1 bzw. 2 einzuteilen. Die anderen Parameter werden bei der Vergütung der abgelieferten Milch berücksichtigt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Grenzwerte für die Gütebewertung der Anlieferungsmilch nach der Milch-Güteverordnung

| Gütemerkmal | Einstufung bei | Auswirkung auf den Auszahlungspreis |
|--------------------|---------------------------------|--|
| Keimgehalt pro ml | S-Klasse $\leq 50\ 000$ | Molkereiabhängiger Zuschlag |
| | Gütekategorie 1 $\leq 100\ 000$ | kein Abzug |
| | Gütekategorie 2 $> 100\ 000$ | Abzug von mindestens 2 Cent/kg |
| Zellgehalt pro ml | S- Klasse $\leq 300\ 000$ | Molkereiabhängiger Zuschlag |
| | $\leq 400\ 000$ | kein Abzug |
| | $> 400\ 000$ | Abzug von mindestens 1 Cent/kg |
| Hemmstoffe | positives Untersuchungsergebnis | Abzug von 5 Cent/kg je Feststellung |

2.2 Mastitis beim Rind

Um eine Erkrankung feststellen zu können, muss der „gesunde“ oder „normale“ Zustand bekannt sein. Beim gesunden Tier ist das Euterparenchym praktisch keimfrei; die Zahl der somatischen Zellen in der Milch ist gering. Die Synthese der Milch während der Laktationsperiode erfolgt, ausreichende Nährstoffversorgung vorausgesetzt, in Abhängigkeit von den intramammären Druckverhältnissen in biochemisch relativ gleichmäßiger Zusammensetzung. Bei der Mastitis des Rindes handelt es sich um eine Faktorenkrankheit, bei der die Komponenten Wirt, Erreger und Umwelt bestimmen, ob es zu einem Mastitisgeschehen kommt oder nicht (TOLLE et al., 1977). Die Mastitis (Euterentzündung) ist definiert als eine entzündliche Reaktion des Eutergewebes auf bakteriologische, chemische, thermische oder mechanische Verletzungen. Sie kann infektiös durch Mikroorganismen oder nicht infektiös durch physikalische Verletzungen

der Drüse bedingt sein. Die entzündliche Reaktion beinhaltet einen Anstieg an Blutprotein und weißen Blutzellen im Eutergewebe und in der Milch. Zweck dieser Reaktion ist die Elimination der Noxe, die Reparatur des geschädigten Gewebes und die Wiederherstellung der normalen Funktion (Anonym, 2001), wobei allerdings Milchleistung und Milchezusammensetzung beeinträchtigt werden. Die verminderte Milchleistung und die eingeschränkte Verwertungsmöglichkeit der Milch von Kühen mit Mastitis führen zu großen wirtschaftlichen Verlusten und sind nach wie vor die „teuerste“ Erkrankung im Bereich der Milchviehhaltung (TOLLE et al., 1977; KIELWEIN, 1994; OWENS et al., 1997; SHIM et al., 2004; CREMONESI et al., 2006). Ungefähr 70 % der Verluste durch Mastitiserkrankungen beruhen auf Milchminderproduktion (ANONYM, 2007a), wobei auch hier die subklinische Mastitis im Vordergrund steht.

Die Bedeutung der Färsenmastitis ist in diesem Kontext von weltweit steigender Bedeutung, und insbesondere KNS werden hierbei als die wichtigsten Erreger angesehen (FOX, 2009). ZIEGER (2007) schätzte für eine klinische Färsenmastitis einen wirtschaftlichen Gesamtverlust von 209 Euro, so dass nach Aussage dieses Autors bei der derzeitigen Situation jedes Jungrind „im Vorhinein mit 55 Euro belastet ist“. Ähnliche Zahlen gaben HUIJPS et al. (2009) an. Eine durch KNS ausgelöste Färsenmastitis führt in der folgenden Laktationsperiode zu einer Minderproduktion von 150 kg Milch. Der entsprechende „Verlust“ bei *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* liegt bei 425 kg, bei einer Mastitis durch *Streptococcus* (*Sc.*) spp. bei rund 300 kg Milch. TIMMS und SCHULTZ (1987) gaben für die USA noch höhere Werte für die Milchminderproduktion an. Nach ihren Angaben gaben mit KNS infizierte Kühe pro Tag im Durchschnitt 2,9 kg weniger Milch. Für die Gesamtlaktation summierte sich dieser Wert zu einem Milchverlust von über 800 kg. HAMANN und FEHLINGS (2002) legten für das Jahr 2000 mit einer durchschnittlichen Milchleistung von 6.050 kg/Kuh und Jahr und einem Milchauszahlungspreis von 30,00 Cent/kg einen Einkommensverlust zwischen 2.454 und 4.908 Euro bei einem durchschnittlichen Erzeugerbetrieb (33,8 Kühe) durch Mastitis bedingte Milchminderproduktion dar. Weiterhin schätzten sie die finanzielle Einbuße pro gehaltener Kuh durch Mastitis auf 150 Euro. Bei einem Gesamtkuhbestand von 4,6 Mio. wurde der gesamtwirtschaftliche Schaden auf 1,4 Milliarden Euro veranschlagt.

2.2.1 Klinische und subklinische Mastitis

Weltweit wird in Anlehnung an Veröffentlichungen des internationalen Milchwirtschaftsverbandes (International Dairy Federation, IDF) die Eutergesundheit von Kühen nach ähnlichen Kriterien beurteilt. Normale Sekretion findet sich bei gesunden Eutervierteln, die äußerlich keine pathologischen Veränderungen zeigen, deren Milch frei von euterpathogenen Mikroorganismen ist und deren Zellgehalt im Normalbereich liegt. Eine latente Euterinfektion liegt vor, wenn der Zellgehalt im Normalbereich liegt, jedoch Mastitiserreger nachgewiesen werden können (KIELWEIN, 1994; HAMANN und FEHLINGS, 2002).

Die Mastitis lässt sich in die subklinische und die klinische Mastitis unterteilen. Die subklinische Mastitis ist der dauerhafteste und am weitesten verbreitete Krankheitskomplex beim Rind und wurde bereits vor Jahrzehnten als die „Berufskrankheit“ der Milchkuh bezeichnet (TOLLE et al., 1977). Bei der subklinischen Mastitis zeigt das Euter keine typischen Entzündungssymptome wie Wärme, Schmerzhaftigkeit oder Umfangsvermehrung. Der Zellgehalt ist jedoch erhöht, die stoffliche Zusammensetzung der Milch kann bereits verändert sein, und es können in der Regel Mastitiserreger nachgewiesen werden (KIELWEIN, 1994; HAMANN und FEHLINGS, 2002). HARMON (1994) beschrieb, dass eine Mastitiserkrankung zu reduzierter Milchproduktion und einer Verminderung von Laktose, α -Lactalbumin und Fett in der Milch führt. Die Verlustfaktoren der subklinischen Mastitis lagen nach TOLLE (1977) neben der Minderung der Milchleistung und Beeinträchtigung der Milchezusammensetzung auch in der Beeinflussung der technologischen Verwertbarkeit und der Beeinträchtigung der hygienischen Wertigkeit der Anlieferungsmilch.

In Abgrenzung zur subklinischen Mastitis wird jede sichtbare krankhafte Veränderung des Eutersekrets bzw. Euters als klinische Mastitis bezeichnet. Die klinische Mastitis kann zusätzlich nach der Intensität ihres Auftretens in geringgradig, mittel- und hochgradig unterteilt werden. Die geringgradige klinische Mastitis äußert sich hauptsächlich im Auftreten von Flocken, insbesondere im Vorgemelk, während das Euter noch keine klinischen Symptome zeigt. Bei der mittel- bis hochgradigen klinischen Mastitis zeigt das Euter deutliche Entzündungsanzeichen, die Milch ist makroskopisch verändert, und die Tiere zeigen häufig Fieber. Zusätzlich kann man eine Mastitiserkrankung nach ihrer zeitlichen Dauer als subakut, akut und chronisch bezeichnen (HAMANN und FEHLINGS, 2002). Nach TOLLE et al. (1977) sind die größten Schadenskomponenten bei der klinischen Mastitis der Milchgeldverlust, die möglicherweise

dauerhafte Beeinträchtigung der Milchleistung, die zusätzlichen Kosten für die Behandlung und die erhöhte arbeitswirtschaftliche Belastung.

2.2.2 Der somatische Zellgehalt als Parameter der Eutergesundheit

Die primäre biologische Bedeutung der somatischen Zellen der Milch liegt in ihrer Beteiligung an der Infektabwehr der Milchdrüse (HAMANN, 1992). Bei „normalen“ Zellgehalten finden sich in der Kuhmilch überwiegend Epithelzellen. Der somatische Zellgehalt der Milch ist insbesondere bei klinischen Mastitiden überwiegend von neutrophilen Granulozyten geprägt (KURZHALS et al., 1985; HAMANN, 1992). Nach HARMON (1994) ist der Infektionszustand der Milchdrüse der entscheidende Faktor für die Höhe der Zellzahl. Es können jedoch auch nicht infektiöse Einflüsse Veränderungen des Zellbildes auslösen (HAMANN und REICHMUTH, 1990).

Die Bestimmung der Zellzahl ist bei Kühen schon seit langem eine der wichtigsten Methoden zur Milchuntersuchung bezüglich der Beurteilung ihrer Beschaffenheit. Die absolute Zellzahl ist ein wesentliches Kriterium für die Einstufung des Gesundheitszustandes des Rindereuters und damit auch für die Qualität der Milch (TOLLE et al., 1966; ZEIDLER et al., 1968; SCHOBER et al., 1963). Nach Ansicht einiger Autoren wird jedoch die Bedeutung der somatischen Zellzahl eventuell auch überschätzt, wenn man außer Acht lässt, dass eine höhere Milchleistung auch einen verdünnenden Effekt auf die Zellzahl haben kann (GREEN et al., 2006).

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Methoden entwickelt, mit denen die Zellzahl der Milch bestimmt werden kann. PRESCOTT und BREED (1910) entwickelten bereits im frühen zwanzigsten Jahrhundert eine mikroskopische Methode zur Zellzahlbestimmung. Eine weitere Entwicklung stellte die elektronische Zählung mit Hilfe des Coulter-Counter dar (TOLLE et al., 1966). Heute hat sich die fluoreszenzoptische Zählmethode durchgesetzt (WENDT et al., 1998).

Bis in die siebziger Jahre wurde ein Zellzahlwert von 500.000 /ml als Grenze zwischen normaler und gestörter Euterfunktion angesehen. Dieser Grenzwert wurde auch offiziell von der International Dairy Federation (IDF) vertreten (ZEIDLER et al., 1968; DOGGWEILER und HESS, 1983; KLASTRUP, 1985). Andere Autoren plädierten jedoch bereits früh für niedrigere Werte, z.B. von 100.000 Z/ml (SEELEMANN, 1964; DOGGWEILER und HESS, 1983). Dagegen ist die von der ehemaligen Milchverordnung und Milchgüteverordnung gezogene

Zellzahlgrenze von 400.000 /ml lediglich als ein für Anlieferungsmilch mindestens zu erreichendes Güte Merkmal zu werten, das nichts über die Eutergesundheit des Einzeltieres aussagt (HAMANN, 1992). Gesunde Euter weisen sehr viel niedrigere Zellzahlwerte auf. So stellten DOGGWEILER und HESS (1983) bei gesunden Erstlaktierenden Durchschnittszellzahlen von 20.000 /ml fest. Das Laktationsstadium selbst hat auch einen Einfluss auf die Höhe der Zellzahl, wobei diese zum Laktationsende hin natürlicherweise ansteigt (SEELEMANN, 1964; DOGGWEILER und HESS, 1983; JONES et al., 1984).

Zur Vermeidung hoher Tankmilchzellzahlen ist insbesondere ein gutes Betriebsmanagement wichtig. Dies sollte Desinfektion nach dem Melken, Trockenstellen, eine gute Melkpraxis, Behandlung klinischer Mastitiden mit Antibiotika sowie das Aussortieren von Problemkühen enthalten (BARKEMA et al., 1998).

Die somatische Zellzahl der Anlieferungsmilch für die Käseherstellung ist, wenn die Milch nicht standardisiert wird, auch ein brauchbarer Indikator für die spätere Käsezusammensetzung, da mit steigenden Zellzahlen auch die Inhaltsstoffe quantitativ und teilweise sogar qualitativ Veränderungen unterworfen sind. Während Fett und Eiweißgehalt parallel mit steigender Zellzahl abnehmen, nimmt der Wassergehalt zu. Erhöhte Zellzahlen korrelieren mit unerwünschten Effekten bei der Käseherstellung (POLITIS und NG-KWAI-HANG, 1988a). Insgesamt führt eine erhöhte Zellzahl in der Milch indirekt über die veränderte Milchezusammensetzung zu einer geringeren Käseausbeute (POLITIS und NG-KWAI-HANG, 1988b).

2.2.3 Mastitiserreger

Bakterielle Mastitiserreger werden typischerweise in kuhassoziierte oder auch kontagiöse Mastitiserreger einerseits sowie umweltassoziierte Mastitiserreger andererseits eingeteilt (DVG, 2000; MAKOVEC und RUEGG, 2003b; OLIVER et al., 2004). Zur ersten Gruppe gehören *S. aureus*, *Sc. agalactiae* sowie *Sc. dysgalactiae*. Zur zweiten Gruppe gehören z.B. *Sc. uberis*, Enterokokken und *E. coli* (DVG, 2000). Die KNS werden häufig in eine gesonderte dritte Gruppe eingeteilt, die als opportunistische Hautbesiedler beschrieben werden. In den letzten Jahren ist eine Verschiebung der Mastitiserreger zu den umweltassoziierten und den die Zitzenhaut opportunistisch besiedelnden Keimen zu beobachten (HAMANN und FEHLINGS,

2002). Weltweit sind mit großem Abstand in Ländern mit hochentwickelter Milchproduktion die KNS als Mastitiserreger auf dem Vormarsch (PYÖRÄLÄ und TAPONEN, 2009).

Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Mikroorganismen als mögliche Mastitiserreger bekannt (DVG, 2000). Dazu gehören *Arcanobacterium pyogenes*, Hefen, Prototheken, Nokardien, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* und *Serratia* spp., *Proteus* spp. und *Pseudomonas aeruginosa*. WENDT et al. (1998) führten weiterhin Mykobakterien, Chlamydien, Mykoplasmen und *Aspergillus* spp. als Mastitiserreger an. Beschränkt man sich bei der Betrachtung einer Mastitis nicht nur auf aus Milch nachweisbare Erreger, sondern betrachtet bei den Eutergesundheitsstörungen ebenso die Euterhaut, so sind hier auch die Viren der MKS, IBR/IPV, Pocken und Papillomatose sowie die Parasiten Mikrofilarien und Räude-Milben zu nennen (WENDT et al., 1998).

Die bakteriellen Mastitiserreger werden auch häufig in „major pathogens“ und „minor pathogens“ unterteilt. Zur ersten Gruppe zählten GREEN et al. (2002) *Sc. agalactiae*, *Sc. uberis*, *Sc. dysgalactiae*, koagulase-positive Staphylokokken, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. und *Arcanobacterium pyogenes*. Zur zweiten Gruppe wurden *Corynebacterium* spp. und koagulase-negative Staphylokokken gezählt.

Erreger können auf exogenem Weg über den Zitzenkanal, endogen auf hämatogenem oder lymphogenem oder auf perkutanem Weg in die Milchdrüse gelangen. Dem exogenen Weg über den Zitzenkanal kommt dabei die größte Bedeutung zu. Die kuhassoziierten Erreger werden dabei hauptsächlich während des Melkvorganges verbreitet, während die Infektion mit umweltassoziierten Erregern vermehrt in der Zwischenmelkzeit stattfindet (HAMANN und FEHLINGS, 2002).

2.3 Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)

2.3.1 Taxonomische Einordnung der KNS

Koagulase-negative Staphylokokken wurden im BERGEY'S MANUAL zum ersten Mal in der siebten Auflage von 1957 beschrieben (PULVERER et al., 1987). Bei der Gattung *Staphylococcus* handelt es sich um gram-positive Kokken, deren Durchmesser 0,5 bis 1,5 µm beträgt. Sie können einzeln, in Paaren, Tetraden, kurzen Ketten oder aber in der namensgebenden typischen Traubenform auftreten. Staphylokokken sind nicht beweglich, bilden

keine Sporen, sind meistens Katalase-positiv und fakultativ anaerob (KLOOS und LAMBE, JR., 1991).

Die Taxonomie und Nomenklatur der Staphylokokken ist seither einem steten Wandel und ständiger Weiterentwicklung unterworfen gewesen (Tabelle 2). BAIRD-PARKER (1963) beschrieb *S. aureus* als einzig generell akzeptierte Spezies, während die anderen Staphylokokken keinen echten Speziescharakter hätten, und schlug eine Unterteilung der Staphylokokken in sechs Untergruppen vor. BROWN et al. (1967) sahen die Untergruppe I von BAIRD-PARKER (1963) entsprechend *S. aureus* und die Untergruppen II-VI ähnlich *S. epidermidis*. Sie hielten eine weitere Unterteilung von *S. epidermidis*, vor allem nach proteolytischem Verhalten, für sinnvoll.

Über die Einordnung von *S. hyicus* zu den koagulase-positiven oder den koagulase-negativen Staphylokokken herrschte lange Zeit eine kontroverse Ansicht. KLOOS und WOLFSHOHL (1982) ordneten *S. hyicus* zusammen mit *S. aureus* und *S. intermedius* noch den koagulase-positiven Staphylokokken zu. Dies vermutlich, da 46 % bis 58 % der Isolate eine positive Koagulasereaktion zeigten. Danach setzte sich jedoch die Ansicht durch, dass *S. hyicus*, obwohl teilweise koagulase-positiv, besser den KNS zuzuordnen sei (DEVRIESE et al., 1994).

Tabelle 2 gibt einen Überblick der taxonomischen Entwicklung der Gattung *Staphylococcus* in den Jahren 1964 bis 1983.

Tabelle 2: Entwicklung der taxonomischen Differenzierung der Gattung *Staphylococcus* zwischen 1964 und 1983 (nach WATTS, 1985)

| | 1964 | 1974 | 1975 | 1976 | 1978 | 1982 | 1983 |
|--|-------------------------|-------------------------|--|--|--|--|--|
| Koagulase-positive Staph. Untergruppe I (<i>S. aureus</i>) | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> |
| | | | <i>S. intermedius</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. intermedius</i> |
| | | | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i> ^c | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i> | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i> | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i> | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i> |
| Koagulase-negative Staph. Untergruppen II-VI ^d | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
| | | <i>S. cohnii</i> | <i>S. cohnii</i> | <i>S. cohnii</i> | <i>S. cohnii</i> | <i>S. cohnii</i> | <i>S. cohnii</i> |
| <i>Micrococcus</i> Untergruppen 1-7 ^b | | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
| | | <i>S. xylosum</i> | <i>S. xylosum</i> | <i>S. xylosum</i> | <i>S. xylosum</i> | <i>S. xylosum</i> | <i>S. xylosum</i> |
| | | <i>S. warneri</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. warneri</i> |
| | | <i>S. capitis</i> | <i>S. capitis</i> | <i>S. capitis</i> | <i>S. capitis</i> | <i>S. capitis</i> | <i>S. capitis</i> |
| | | <i>S. hominis</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. hominis</i> |
| | | <i>S. simulans</i> | <i>S. simulans</i> | <i>S. simulans</i> | <i>S. simulans</i> | <i>S. simulans</i> | <i>S. simulans</i> |
| | | <i>S. sciuri</i> | <i>S. sciuri</i> | <i>S. sciuri</i> | <i>S. sciuri</i> | <i>S. sciuri</i> | <i>S. sciuri</i> |
| | | | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> | <i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> |
| | | | | <i>S. caseolyticus</i> | <i>S. caseolyticus</i> | <i>S. caseolyticus</i> | <i>S. caseolyticus</i> |
| | | | | <i>S. carnosus</i> | <i>S. carnosus</i> | <i>S. carnosus</i> | <i>S. carnosus</i> |
| | | | | | <i>S. auricularis</i> | <i>S. auricularis</i> | <i>S. auricularis</i> |
| | | | | | <i>S. gallinarum</i> | <i>S. gallinarum</i> | <i>S. gallinarum</i> |
| | | | | <i>S. caprae</i> | <i>S. caprae</i> | <i>S. caprae</i> | |

^a später reklassifiziert als *S. epidermidis* Biotypen 1 – 5

^b spätere Reklassifizierung der *Micrococcus* Untergruppen 1-3 als *S. saprophyticus*

^c koagulase-variabel

PETERS (1992) stellte aufgrund von DNS-rRNS-Hybridisierungs- und 16S-rRNS-Kategorisierungsergebnissen fest, dass die Gattungen *Micrococcus* und *Stomatococcus* einerseits sowie *Staphylococcus* und *Planococcus* andererseits phylogenetisch zwei völlig verschiedenen Linien zuzuordnen seien und daher die taxonomische Zusammenfassung dieser vier Gattungen zur Familie der *Micrococcaceae* in Frage zu stellen sei. Weiterhin wies der Autor auf den hohen Grad der genetischen Verwandtschaft zwischen *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* (koagulasevariabel) und *S. chromogenes* (koagulase-negativ) hin. Der Autor sah es als gerechtfertigt an, die novobiocin-sensiblen KNS als *S. epidermidis*-Gruppe und die novobiocin-resistenten KNS als *S. saprophyticus*-Gruppe zu bezeichnen.

Nach BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume one and two (GARRITY et al., 2001; GARRITY et al., 2005) ist die lange bestehende Familie der *Micrococcaceae*, bestehend aus den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus* und *Stomatococcus*, aufgelöst worden. Die neue taxonomische Zuordnung der Staphylokokken ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Differenzierung vieler Spezies der Gattung *Staphylococcus* gestaltet sich jedoch nach wie vor schwierig.

| | |
|----------|--|
| Stamm: | <i>Firmicutes</i> |
| Klasse: | <i>Bacilli</i> |
| Ordnung: | <i>Bacillales</i> |
| Familie: | <i>Staphylococcaceae</i> |
| Gattung: | <i>Staphylococcus</i> |
| Spezies: | <i>Staphylococcus arlettae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus auricularis</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Staphylococcus caprae</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus caseolyticus</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>Staphylococcus condimenti</i> , <i>Staphylococcus delphini</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Staphylococcus felis</i> , <i>Staphylococcus fleurettii</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus hyicus</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Staphylococcus kloosii</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Staphylococcus lutrae</i> , <i>Staphylococcus muscae</i> , <i>Staphylococcus nepalensis</i> , <i>Staphylococcus pasteurii</i> , <i>Staphylococcus pettenkoferi</i> , <i>Staphylococcus piscifermentans</i> , <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> , <i>Staphylococcus pulvereri</i> , <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Staphylococcus schleiferi</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Staphylococcus simiae</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus succinus</i> , <i>Staphylococcus vitulinus</i> , <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> |

Abbildung 1: Zukünftige taxonomische Stellung der Staphylokokken nach GARRITY et al. (2005) und derzeit existierende Spezies der Gattung *Staphylococcus* nach EUZÉBY (2007); Spezies von Relevanz für Mastitisdiagnostik im Fettdruck

2.3.2 Vorkommen und Bedeutung von KNS beim Menschen

Staphylokokken sind normalerweise opportunistische Hautbesiedler, die Infektionen hervorrufen, wenn sie die Abwehr der Haut durch Verletzungen, Nadeleinstiche oder nach chirurgischen Eingriffen überwinden können (KLOOS und BANNERMAN, 1994; HEIKENS et al., 2005). KNS wurden aus vielfältigem Probenmaterial isoliert. IWANTSCHIEFF et al. (1985) untersuchten KNS-Isolate, die zum überwiegenden Teil aus Urin, Blut, Pharynx- und Nasenabstrichen, Vaginalabstrichen, Wundinfektionen und intravenösen Kathetern isoliert worden waren. KNS können lebensbedrohliche Infektionen bei Intensivpatienten, Frühgeborenen, Krebs- und Transplantationspatienten auslösen (KLOOS und BANNERMAN, 1994). Sie sind heute zu einer der Hauptursachen nosokomialer Infektionen geworden (FREBOURG et al., 2000; PIETTE und VERSCHRAEGEN, 2009)

Früher wurden KNS vor allem als „Kontaminanten“ und weniger als Krankheitserreger gesehen. Heute wird ihnen größere Bedeutung beigemessen (KLOOS und SCHLEIFER, 1975; ALMEIDA und JORGENSEN, 1982; PETERS, 1992). KASTNER (1999) wies auf die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen Kontamination, Kolonisation und Infektion bei KNS hin. Die Autorin teilte durch KNS ausgelöste Krankheitsbilder in Fremdkörper-assoziierte und solche ohne Fremdkörperbeteiligung ein. Zur ersten Gruppe zählte sie Endokarditis nach Klappenersatz, Lokalinfectionen bei Gefäß- und Gelenkprothesen sowie Liquorshunts. Weiterhin bestehe die Gefahr von Infektionen bei Hämodialyseshunts, Herzschrittmachern, Gefäßkathetern, Katheter-assoziiierter Sepsis und Beatmungspneumonie bei Frühgeborenen. In der zweiten Gruppe nannte die Autorin Endokarditis, Osteomyelitis, Sepsis, Harnwegsinfekte, Endophthalmitis, postoperative Wundinfektionen, Otitis media und das „Toxic shock Syndrom“.

Bereits CRASS und BERGDOLL (1986) berichteten über KNS, die zum Teil von Patienten mit nachgewiesenem „Toxic Shock Syndrom“ isoliert worden waren und bei denen die Bildung von „Toxic Shock Syndrome Toxin 1“ (TSST-1) und den eigentlich von *S. aureus* bekannten Enterotoxinen A (SEA) und C (SEC) nachgewiesen wurde. Sie berichteten weiter von einem Fall von Lebensmittelvergiftung, bei dem koagulase-negative Staphylokokken, die TSST-1 und SEA produzierten, aus Hühnerfleisch nachgewiesen wurden.

Nach ARCHER und CLIMO (1994) handelte es sich bei den meisten nosokomialen Infektionen mit KNS in Krankenhäusern der USA um *S. epidermidis*. Auch HEIKENS et al. (2005) beschrieben *S. epidermidis* als den häufigsten infektiösen KNS im Humanmedizinbereich. *S. saprophyticus* ist als Erreger von Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen bekannt (PETERS, 1992; HEIKENS et al., 2005).

Nach Daten des National Nosocomial Infection Survey (NNIS) hat sich die Resistenzlage zwischen 1980 bis 1989 verschlechtert, der Anteil von gegenüber Methicillin, Oxacillin oder Nafcillin resistenten Stämmen stieg von 20 % auf 60 % (ARCHER und CLIMO, 1994). KASTNER (1999) beschrieb die Empfindlichkeitslage von KNS gegenüber Penicillin unter 20 %, für Methicillin / Oxacillin unter 50 % für Europa und USA, 50-70 % für Gentamicin, über 90 % für Gyrasehemmer und fast 100 % für Teicoplanin und Vancomycin.

2.3.3 Vorkommen und Bedeutung von KNS als Mastitiserreger

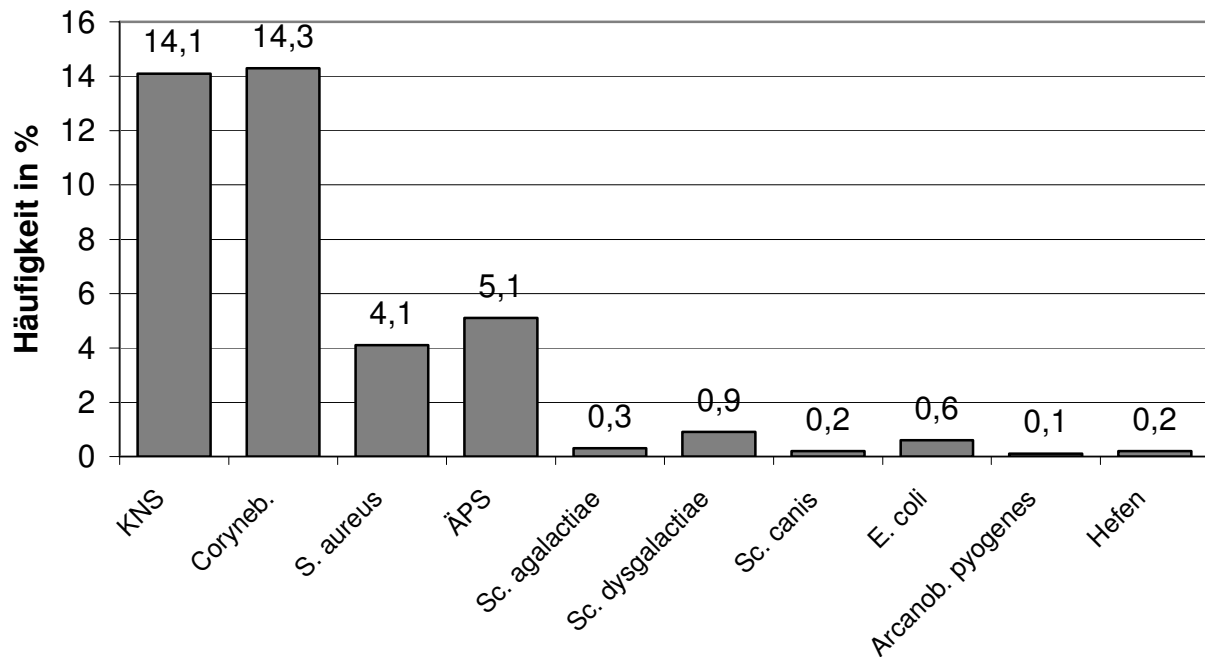
In den sechziger Jahren wurde die Gattung *Staphylococcus* noch generell als nur sporadisch Euterentzündungen verursachend den „echten“ oder „spezifischen“ Mastitiserregern wie *Sc. agalactiae*, *Sc. dysgalactiae* und auch *Sc. uberis* gegenübergestellt. Für die Klinik wurde den Staphylokokken eine untergeordnete Bedeutung zugewiesen (OBIGER, 1962).

Während die Bedeutung von *S. aureus* als Mastitiserreger heute allgemein anerkannt ist, wird die Bedeutung der KNS als Mastitiserreger nach wie vor sehr kontrovers diskutiert. So bezeichneten GENTILINI et al. (2002) KNS als wichtige „minor pathogens“, während SERIEYS (1985) die KNS zusammen mit *Corynebacterium bovis* nur als „minor pathogens“ einstuft. HAMANN (1992) zählte KNS zu den typischen Mastitiserregern, und schon POUTREL (1984) beurteilte KNS als Auslöser echter Euterinfektionen.

Unbestritten aber werden KNS weltweit als Ursache subklinischer Mastitiden nachgewiesen, und oftmals werden sie bei Erstlaktierenden auch bei klinischen Mastitisfällen isoliert (DEVRIESE et al., 1994). In vielen Ländern sind sie heute die prädominante Gruppe unter den Mastitiserregern (WAAGE et al., 1999; PITKÄLÄ et al., 2004). Oftmals werden KNS zusammen mit *Corynebacterium bovis* aus Viertelgemelksproben isoliert (PITKÄLÄ et al., 2004).

Abbildung 2 zeigt am Beispiel von Daten des Landesbetriebs Hessisches Landeslabor, mit welcher Häufigkeit KNS im Vergleich zu anderen Mastitiserregern aus Viertelgemelksproben isoliert wurden.

Das Vorkommen von *S. aureus* und anderen Staphylokokken Spezies in Viertelgemelksproben von Erstlaktierenden um den Geburtszeitpunkt wurde bereits von SOBIRAJ et al. (1988) beschrieben. In einer Reihe von kürzlich publizierten Arbeiten wird der Bedeutung von KNS im Zusammenhang mit Färsenmastitis breiter Raum gegeben. Während SCHUKKEN et al. (2009) aufgrund des Fehlens „echter“ ökonomischer Risiken (Milchminderleistung) KNS im Normalfall als unproblematisch darstellen, sind einige andere Autoren der Ansicht, dass KNS als „emerging mastitis pathogens“ angesehen werden müssen (FOX, 2009; PYÖRÄLÄ und TAPONEN, 2009; TAPONEN und PYÖRÄLÄ, 2009)



Coryneb. = *Corynebacterium* spp, ÄPS = äskulin-positive Streptokokken, Arcanob. = *Arcanobacterium*

Abbildung 2: Teilergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von Viertelgemelksproben aus dem Jahresbericht 2005 des Landesbetriebs Hessisches Landeslabor (LHL); es wurden insgesamt 72.364 nicht näher spezifizierte Viertelgemelksproben untersucht.

In fast allen Untersuchungen zu KNS im Zusammenhang mit subklinischen Mastitiden wurden die novobiocin-sensiblen Spezies als die dominierende Gruppe isoliert (DEVRIESE et al., 2002). DEVRIESE und DE KEYSER (1980) fanden in einer Studie die novobiocin-resistenten Spezies *S. xylosus* und *S. sciuri* sowie die novobiocin-sensible Spezies *S. haemolyticus* vermehrt an der Zitzenhaut und Zitzenkuppe, während *S. epidermidis*, *S. hyicus* subsp. *chromogenes* und *S. simulans* vermehrt aus der Milch isoliert wurden. Später bezeichneten DEVRIESE et al. (1994) *S. xylosus* als die eigentlich einzig bedeutsame novobiocin-resistente KNS-Spezies. BROWN et al. (1967) fanden *S. epidermidis* als häufigsten Erreger in einer Versuchsherde mit Erstlaktierenden der Rasse Holstein-Friesian.

Bezüglich der Pathogenität der nachgewiesenen KNS-Spezies fand JARP (1991) nur geringe Unterschiede und stufte die Bedeutung der einzelnen Spezies insgesamt als weniger wichtig für die Entstehung eines Mastitisgeschehens ein.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht zur Häufigkeit des Vorkommens von KNS in Viertelgemelksproben bei Kühen. In Tabelle 4 ist eine nach Spezies differenzierte Aufstellung zu KNS in Milchproben dargestellt.

Tabelle 3: Untersuchungen zum Vorkommen von KNS in Kuhmilch. Die Untersuchungen beinhalten verschiedenes Probenmaterial aus klinischen und subklinischen Mastitiden sowie aus unauffälligen Vierteln.

| Autor | Jahr | Land | n | % positiv mit KNS |
|----------------------|-------------|-------------|--------------------------|---|
| SMITH et al. | 1985 | USA | k.A. | 9,0 % (Viertel) |
| HARMON et al. | 1986 | USA | 156 Kühe | 13,1 % (Viertel)* |
| FOX et al. | 1995 | USA | 2.435 | 27,1 % (Viertel) |
| KIRK et al. | 1996 | USA | 339 Erst- laktierende | 39,0 % (Erstlaktierende) |
| WAAGE et al. | 1999 | Norwegen | 1.349 | 12,8 % (Viertel) |
| GENTILINI et al. | 2002 | Argentinien | 900 | 13,6 % (Viertel) |
| MAKOVEC und RUEGG | 2003b | USA | 77.172 | 13,2 % (Viertel) |
| TAPONEN et al. | 2003 | Finnland | 117 | 23,9 % (Viertel)* |
| JÁNOSI und BALTAY | 2004 | Ungarn | 2.714 | 23,6 % (Viertel)* |
| OLIVER et al. | 2004 | USA | 166 | 19,9 % (Viertel)* |
| PITKÄLÄ et al. | 2004 | Finnland | 12.661 | 16,6 % (Viertel) |
| BORM et al. | 2006 | USA | 561 Erst- laktierende | 25,4 % (Viertel)* |
| TENHAGEN et al. | 2006 | Deutschland | 9.910 | 9,1 % (Viertel) |
| SAMPIMON et al. | 2007 | Niederlande | k.A. | 42,2 % (subklinische Mastitis) |
| | | | k.A. | 14,1 % (klinische Mastitis) |
| SCHUKKEN et al. | 2009 | USA | 352.614 | 15 % (klinische und subklinische Mastitis) |
| SAMIPMON et al. | 2009 | Niederlande | 4.220 | 34,4 % (Kühe) 10,8 % (Viertel) |

n = Anzahl untersuchter Viertelgemelksproben

k.A. = keine Angabe

* Daten wurden mathematisch modifiziert

Tabelle 4: Untersuchungen zur relativen Vorkommenshäufigkeit einzelner KNS-Spezies in Kuhmilch

| Autor | Jahr | Land | % Anteil KNS-Spezies | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|-------------|----------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|------|------|-------------------|
| | | | ch [■] | ep [■] | hae [■] | ho [■] | hy [■] | si [■] | wa [■] | co [#] | le [#] | sa [#] | sc [#] | xy [#] | spp. | | | |
| JONES et al. | 1984 | USA | - | 23,4 ^a | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TRINIDAD et al. | 1990 | USA | 43,1 | 0,4 | - | 0,7 | 24,3 | 0,7 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | 1,1 | 0,4 |
| JARP | 1991 | Norwegen | 16,2 | 0,7 | 10,1 | 0,7 | 15,5 | 44,6 | 0,7 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | 7,4 | 3,4 ¹ |
| WATTS et al.* | 1995 | USA | 51,5 | 2,3 | 1,7 | 19,2 | 10,5 | 2,8 | 2,6 | - | - | - | 0,9 | 0,5 | 0,5 | 7,6 | 7,6 | 0,3 ² |
| WAAGE et al. | 1999 | Norwegen | 14,8 | - | 2,0 | - | 14,8 | 53,7 | 1,3 | - | - | - | - | 0,7 | 0,7 | 2,7 | 2,7 | 10,0 ³ |
| LÜTHJE und SCHWARZ* | 2006 | Deutschland | 33,2 | 11,7 | 9,4 | 0,7 | - | 23,2 | 4,4 | 0,7 | - | - | 1,0 | 2,7 | 2,7 | 9,4 | 9,4 | 3,6 ⁴ |
| TAPONEN et al.* | 2006 | Finnland | 23,3 | 1,5 | 3,0 | 0,8 | 8,3 | 43,6 | 4,5 | - | - | 0,8 | - | 1,5 | - | - | - | 12,9 ⁵ |
| SAMPIMON et al. | 2007 | Niederlande | 41,7 | 7,4 | 7,4 | - | 5,6 | 10,2 | - | - | - | - | 4,6 | - | - | 15,7 | 15,7 | 7,4 ⁶ |

* Daten wurden teilweise mathematisch modifiziert; ■ novobiocin-sensible KNS-Spezies: ch = *S. chromogenes*, ep = *S. epidermidis*, hae = *S. haemolyticus*, ho = *S. hominis*, hy = *S. lyticus*, si = *S. simulans*, wa = *S. warneri*; # novobiocin-resistente KNS-Spezies: co = *S. cohnii*, le = *S. lentus*, sa = *S. saprophyticus*, sc = *S. sciuri*, xy = *S. xylosum*; spp. = weitere KNS-Spezies; ^a es wurde nur für *S. epidermidis* ein Wert genannt; ¹ *S. carnosus*; ² 0,2 % *S. capitis*, 0,1 % *S. spp.*; ³ 1,3 % *S. capitis*, 0,7 % *S. suricularis*, 8,0 % *S. spp.*; ⁴ 2,0 % *S. equorum*, 0,7 % *S. capitis*, je 0,3 % *S. caprae*, *S. arlettae* und *S. gallinarum*; ⁵ 0,8 % *S. equorum*, 0,8 % *S. capitis*, 11,3 % unspezifizierte KNS; ⁶ *S. capitis*

Bereits in den achtziger Jahren zeigten Untersuchungen, dass es Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen von KNS in Eutervierteln und mäßig erhöhten Zellzahlen gab. Es wurden Durchschnittswerte für die Zellzahlen von mit KNS infizierten Vierteln zwischen 193.000 Z/ml und 303.000 Z/ml festgestellt (SMITH und HAGSTAD, 1985; NICKERSON und BODDIE, 1994; SHELDRAKE et al., 1983). DE HAAS et al. (2002) untersuchten in einer Studie zur klinischen Mastitis den Effekt von verschiedenen Pathogenen auf die somatische Zellzahl während der Laktation. Bei Erstlaktierenden waren 7,3 % und bei älteren Kühen 3,5 % der klinischen Mastitisfälle mit KNS verbunden. Rund 50 % der durch KNS verursachten klinischen Mastitiden bei Erstlaktierenden traten bis zum sechsten Tag nach Laktationsbeginn auf. Bei der Betrachtung nicht erkrankter Viertel (ohne klinische und subklinische Mastitis) über die ganze Laktation stellten sie fest, dass bei Erstlaktierenden die Viertel im Durchschnitt Zellzahlen zwischen 57.000 Z/ml (Frühlaktation) und 82.000 Z/ml (Spätlaktation) aufwiesen. Ältere Kühe zeigten zu Beginn der Laktation vergleichbare Zellzahlwerte wie die Erstlaktierenden; zum Ende der Laktation stiegen die Zellzahlwerte aber stärker an. Es zeigte sich, dass einer durch *S. aureus* ausgelösten Mastitis bereits eine Vorphase mit erhöhter Zellzahl vorausging. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei durch KNS ausgelösten Mastitiden. Dabei erhöhten KNS die Zellzahlen bei Erstlaktierenden in der Vorphase stärker als *S. aureus*. Bei *E. coli*-Mastitiden wurde eine solche Vorphase nicht beobachtet. Die bestehen bleibende Erhöhung der Zellzahlen durch KNS nach Abklingen der klinischen Mastitis war niedriger als bei *S. aureus*, jedoch höher als bei *E. coli*. DE VliegHER et al. (2004a) stellten bei einer Studie an belgischen Erstlaktierenden in der Frühlaktation eine negative Korrelation zwischen der Zellzahl und den Tagen in Milch fest, woraus sie eine zumindest teilweise Spontanheilung für KNS-infizierte Viertel herleiteten. Obwohl mit KNS infizierte Euterviertel geringere Zellzahlerhöhungen bedingten als andere Euterpathogene, stuften JÁNOSI und BALTAJ (2004) den Einfluss der KNS aufgrund der Häufigkeit ihres Vorkommens als bedeutend ein. KIRK et al. (1996) dagegen meinten, dass subklinische Infektionen, vor allem mit KNS, keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche Zellzahl oder die Milchproduktion bis zur Mitte der Laktation hätten.

Der Einfluss von KNS auf die Zellzahlen der Tankmilch ist schwieriger zu bestimmen als für Viertelgemelksproben. Nur wenige Autoren beschäftigten sich mit diesem Aspekt. JAYARAO et al. (2004) beschrieben für Tankmilchproben, die einen Zellzahlwert von über 200.000 Z/ml aufwiesen, eine fünffach höhere Wahrscheinlichkeit hoher KNS-Werte (über 500 Kbe/ml). BARKEMA et al. (1998) stellten eine höhere KNS-Häufigkeit bei klinischen Mastitisfällen in Betrieben fest, die Tankmilchzellzahlen bis 250.000 Z/ml hatten. In Betrieben, bei denen die Tankmilchzellzahlen zwischen 251.000 und 400.000 Z/ml lagen, war die Vorkommenshäufigkeit im

Vergleich geringer. Dagegen haben KNS nach Ansicht von SCHUKKEN et al. (2007) nur in sehr wenigen Betrieben einen bedeutenden Effekt auf die Erhöhung der Zellzahl in der Tankmilch.

Um Studien bezüglich ihrer Aussagen über den Einfluss von KNS auf die Zellzahl vergleichen zu können, ist es notwendig, den betrachteten Keimzahlen Beachtung zu schenken. DEVRIESE und DE KEYSER (1980) untersuchten den Zusammenhang zwischen Keimzahl und Zellzahl für Keimzahlen von KNS von unter 10 KbE/ml bis zu über 1.000 KbE/ml. Auch bei niedrigen Konzentrationen stellten sie zum Teil deutlich erhöhte Ergebnisse im CMT fest. BARKEMA et al. (1998) unterschieden in einer Studie, ab welcher Keimzahl Mastitiserreger als positiver Befund in die Untersuchung einbezogen wurden. Während für *S. aureus* und *Sc. agalactiae* bereits ab Keimzahlen von 100 KbE/ml von einer Infektion gesprochen wurde und den Umweltpathogenen *E. coli*, *Streptococcus* spp. (außer *Sc. agalactiae*), *Klebsiella* und *Pseudomonas* spp. bei über 200 KbE/ml Bedeutung zugemessen wurde, wurden *Corynebacterium bovis* und KNS erst ab 1.000 KbE/ml als relevant angesehen.

Im Vergleich sind Erstlaktierende häufiger von KNS-Infektionen betroffen als ältere Kühe. Oftmals sind die Euter bereits vor der ersten Geburt mit KNS infiziert (Färsenmastitis) (BARKEMA et al., 2006; BORM et al., 2006; TENHAGEN et al., 2006). Bei Erstlaktierenden sind im Vergleich auch öfter mehr Viertel eines Tieres betroffen als bei älteren Kühen (TAPONEN et al., 2006). Bezüglich der Staphylokokken Spezies stellten NICKERSON et al. (1995) in einer Studie an Erstlaktierenden in absteigender Häufigkeit *S. chromogenes*, *S. hyicus* und *S. aureus* fest. In den ersten drei Monaten nach dem Abkalben zeigten Viertel mit *S. chromogenes* im Durchschnitt Zellzahlen von 168.000 Z/ml, bei *S. hyicus* lag der Zellzahlwert bei 193.000 Z/ml und bei *S. aureus* bei 578.000 Z/ml. Auch DE VliegHER et al. (2003) beschrieben *S. chromogenes* als die häufigste KNS-Spezies in Milchproben von Erstlaktierenden.

KNS werden regelmäßig auch als Auslöser klinischer Mastitiden isoliert. (BARKEMA et al., 1999; NICKERSON et al., 1995; SAMPIMON et al., 2007). Dabei scheinen vor allem *S. chromogenes* und *S. hyicus* eine dominierende Rolle zu spielen (NICKERSON et al., 1995; SAMPIMON et al., 2007).

Bereits in den siebziger Jahren gab es die Vermutung, dass koagulase-negative Mikrokokken und *Corynebacterium bovis* eine Schutzwirkung gegenüber anderen Euterpathogenen haben könnten

(TOLLE et al., 1977). NICKERSON und BODDIE (1994) stellten in einer Studie fest, dass uninfizierte Viertel im Durchschnitt fast dreimal öfter mit *S. aureus* infiziert wurden als Viertel, die zuvor mit KNS infiziert waren. Auch andere Autoren stellten niedrigere Infektionsraten mit weiteren Euterpathogenen fest, wenn aus den Vierteln oder an den Zitzenkuppen KNS isoliert werden konnten. Besondere Bedeutung kam hier wiederum *S. chromogenes* zu (MATTHEWS et al., 1991; MATTHEWS et al., 1990a; DE VliegHER et al., 2003). In einer *in vitro* Studie legten DE VliegHER et al. (2004b) dar, dass *S. chromogenes*, die von Zitzenkuppen von Erstlaktierenden stammten, im Labor das Wachstum von mehreren *S. aureus* und Streptokokken-Stämmen zu hemmen vermochten, nicht jedoch von *E. coli*. Als Ursache vermuteten sie die Produktion eines antagonistischen Stoffes, z.B. eines Bakterizids. Die größere Wirkung gegen *S. aureus* und Streptokokken erklärten sie mit der generell besseren Wirkung von Bakteriziden gegen näher verwandte Bakterien. Besonders von *S. epidermidis* sind bereits mehrere Bakterizide isoliert worden. Die Bildung von antibakteriellen Substanzen wurde jedoch auch bei *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* und *S. arlettae* nachgewiesen (NASCIMENTO et al., 2005).

Auf zellbiologischer Ebene wurde für KNS die Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion nachgewiesen. Ebenso wie für *S. aureus* und *Sc. dysgalactiae* wird auch bei den KNS eine aktive Beteiligung der Wirtszellen in Form von Actin-Mikrofilamenten vermutet (ALMEIDA und OLIVER, 1995; ALMEIDA et al., 1996; ALMEIDA und OLIVER, 2001; ANAYA-LÓPEZ et al., 2006). Eine Zellfilmbildung durch KNS, wie sie von der Oberfläche medizinischer Produkte im humanmedizinischen Bereich bekannt ist, konnte im Euter bisher nicht nachgewiesen werden (GENTILINI et al., 2002). Trotzdem nannten OLIVEIRA et al. (2006) die Identifizierung von Zellfilme produzierenden Staphylokokken als Bestandteil eines zukünftigen Mastitismanagements, da diese oftmals therapieresistenter sind. ZHANG und MADDOX (2000) beschrieben, dass *S. chromogenes* in klinischen Beobachtungen oftmals virulenter auftrat als andere KNS-Spezies. Sie hielten es für möglich, dass eine Protease dafür verantwortlich ist, die Euterepithelzellen und Blutgefäßepithelzellen schädigt und dadurch Flüssigkeitsverschiebungen und Einwanderung neutrophiler Granulozyten ins Eutergewebe ermöglicht.

2.3.4 Mikrobiologische Differenzierung der KNS

Bis heute gibt es hinsichtlich der Differenzierung innerhalb der Staphylokokken, aber bereits auch bei der Abgrenzung zu den Gattungen *Micrococcus* und *Kocuria*, in der Routineuntersuchung erhebliche Schwierigkeiten. Die DVG (2000) empfiehlt zur Abgrenzung zwischen Staphylokokken und Mikrokokken den Furazolidon-Agar nach VON RHEINBABEN und HADLOK (1981) zu verwenden. Mikrokokken sind furazolidon-resistent, Staphylokokken dagegen sind sensibel. Eine weitere Auflistung von Merkmalen, die zur Differenzierung zwischen Staphylokokken und Mikrokokken vorgeschlagen wurden, zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Literaturangaben zu biochemischen Merkmalen zur Differenzierung zwischen Staphylokokken und „Mikrokokken“

| Autor | Jahr | verwendetes und / oder geprüftes Merkmal | Merkmalsausprägung bei Staphylokokken |
|---------------------------------|-------------|---|--|
| BAIRD-PARKER | 1963 | Säurebildung aus Glucose anaerob | positiv |
| CURRY und BOROVIAN | 1976 | Wachstum auf FTO-Agar (50 µg/ml) | Wachstum wird gehemmt |
| VARALDO et al. | 1979 | Bakteriolytische Aktivität | positiv |
| VON RHEINBABEN und HADLOK | 1981 | Wachstum auf Furazolidon-Pepton-Agar (20, 30, 50 µg/ml) | Wachstum wird gehemmt |
| FALLER und SCHLEIFER | 1981 | modifizierter Oxidasetest und modifizierter Benzidinetest | negativ, außer <i>S. sciuri</i> |
| GUNN et al. | 1981 | 1) Dextrosefermentation 2) Fakultativ anaerobes Wachstum in halbflüssigem Thioglycolate-Agar 3) Lysostaphinempfindlichkeit | 1) positiv (99,3 %)* 2) positiv (86 %) 3) empfindlich (83 %) |
| POUTREL und CAFFIN | 1981 | Lysostaphin Disk Test 10 µg | empfindlich |
| FALK und GUERING | 1983 | Taxo A Bacitracin Disk | resistent |
| BAKER | 1984 | 1) modifizierter Oxidasetest 2) Furazolidonempfindlichkeit 3) Lysostaphinempfindlichkeit | 1) negativ (99 %) 2) empfindlich (99 %) 3) empfindlich (82 %) |
| BAKER et al. | 1986 | Bacitracin Disk 0,04 U | resistent (94,6 %) |
| GEARY und STEVENS | 1986 | 1) Schneller Lysostaphin-Test 2) Säureproduktion aus Glycerol in Anwesenheit von Erythromycin | 1) empfindlich 2) positiv (99,2 %) |
| HÉBERT et al. | 1988 | 1) Taxo A Bacitracin Test 0,04 U 2) Furazolidon-Disk 100 µg | 1) resistent 2) empfindlich |
| PETERS | 1992 | 1) Guanin-Cytosin-Gehalt der DNS 2) Zellwand > 2 Mol Glycin pro Mol Glutaminsäure im Peptidoglykan Teichonsäure 3) Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase-Typ 4) Cytochrom C | 1) 30 – 35 % 2) positiv 3) Typ I, außer <i>S. sciuri</i> 4) negativ, außer <i>S. sciuri</i> |

* Daten wurden mathematisch modifiziert

Die Staphylokokken werden hauptsächlich durch ihre Fähigkeit, durch das Enzym Koagulase Kaninchen- und / oder Menschenplasma zu koagulieren, in koagulase-positive und koagulase-negative Spezies eingeteilt (MAYR, 1993). Daher sollte vor einer weitergehenden Differenzierung die Zugehörigkeit zur Gruppe der KNS überprüft werden. BERKE und TILTON (1986) beschrieben, dass der Slide-Test 97,5 % von 118 getesteten klinischen *S. aureus*-Isolaten erkannte. Kommerziell erhältliche Testkits zum Testen auf *S. aureus* lieferten teils höhere, teils aber auch niedrigere Raten einer „richtigen“ Identifizierung. Alle kommerziellen Testkits lieferten mit einer gewissen Häufigkeit auch falsch positive Ergebnisse mit koagulase-negativen Staphylokokken.

DEVRIESE und HÁJEK (1980) beschrieben die Komplikation bei der Abgrenzung zwischen *S. aureus*, *S. intermedius* und *S. hyicus* subsp. *hyicus*. Während *S. aureus* sowohl im Koagulase-Test als auch beim Klumpungsfaktor positiv reagierte, reagierte *S. intermedius* im Koagulase-Test ebenfalls positiv, dagegen aber variabel beim Klumpungsfaktor. *S. hyicus* reagierte bezüglich des Klumpungsfaktors negativ, aber variabel im Koagulase-Test. Die Autoren bezeichneten den Klumpungsfaktor-Test als erste Wahl vor dem Koagulase-Test in der Routinediagnostik.

Die Identifizierung der einzelnen Spezies der Gruppe KNS ist schwierig (AKATOV et al., 1981; DEVRIESE et al., 2002). Sie sollte nicht aufgrund von wenigen Reaktionen durchgeführt werden, da es oftmals Variationsbreiten in den einzelnen Spezies gibt. Die Falschidentifizierung ist das größte Problem (THORBERG und BRÄNDSTRÖM, 2000). Es ist allgemeine Meinung, dass es einer Vielzahl von Reaktionen bedarf, um die einzelnen Spezies der KNS differenzieren zu können (BURRIEL und SCOTT, 1998). Beim Vergleichen von Studien sollte beachtet werden, dass verschiedene Identifizierungsraten einzelner Spezies auch das Ergebnis verschiedener Differenzierungsmethoden sein könnten (BIRGERSSON et al., 1992). *Micrococcus kristinae* (nach neuer Nomenklatur *Kocuria kristinae*) wird am häufigsten mit Staphylokokken verwechselt, da diese Spezies in der Lage ist, eine Vielzahl von Kohlenhydraten zu verstoffwechseln (KLOOS und WOLFSHOHL, 1982).

ALMEIDA und JORGENSEN (1982) gaben an, dass die Verwendung eines 5 µg Novobiocin enthaltenden Testplättchens auf Müller-Hinton-Agar eine geeignete Methode ist, die Novobiocinempfindlichkeit koagulase-negativer Staphylokokken zu bestimmen. Isolate mit einem Hemmhofdurchmesser ≥ 16 mm galten als sensibel. GOLDSTEIN et al. (1983) bestätigten diesen Wert.

DEVRIESE et al. (2002) beschrieben den DNase-Test als verlässliches Kriterium zur Identifizierung von *S. chromogenes*, der hier eine doppelt so breite Reaktionszone zeigte wie der gewachsene Impfstich, während *S. aureus* und *S. hyicus* viermal so breite Reaktionszonen zeigten und alle anderen KNS schmalere Zonen oder gar keine aufwiesen. Nach LÄMMLER (1989) kann auch der Nachweis von *S. hyicus*-spezifischem Bakteriolyisin zur Identifizierung von *S. hyicus* herangezogen werden. Außer *S. hyicus* zeigten noch *S. chromogenes*, *S. aureus* und *S. intermedius* schwach positive Reaktionen.

In den Leitlinien der DVG (2000) wird zur weiteren Differenzierung von KNS das nach DEVRIESE et al. (1994) beschriebene Verfahren empfohlen. In der Literatur haben jedoch verschiedene Autoren ganz unterschiedliche Identifizierungsschemata vorgestellt, mit denen die Differenzierung der KNS-Spezies mit wenigen Merkmalen möglich sein soll. Eine Zusammenstellung dieser vorgeschlagenen Reaktionskombinationen zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Zusammenstellung einiger vereinfachter Differenzierungsschemata für KNS

| Autor | Jahr | Verwendete biochemische Merkmale | Weiteres |
|-------------------------|-------------|--|---|
| KLOOS und SCHLEIFER | 1975 | anaerobes Wachstum in Thioglycolat, L(+)-Arabinose, β -D(-)-Fructose, D(+)-Galactose, Hämolyse, Koagulase, Koloniedurchmesser, α -Lactose, Lyso-staphinresistenz, Maltose, D-Mannitol, D(+)-Mannose, D(+)-Melzitose, Nitratreduktion, Novobiocinresistenz, Phosphatase, D(-)-Ribose, Sucrose, D(+)-Trehalose, D(+)-Turanose, Xylitol, D(+)-Xylose | für Staphylokokken menschlichen Ursprungs; einschließlich Abgrenzung <i>S. aureus</i> |
| HÉBERT et al. | 1988 | Adhärenz, Bacitracinresistenz (Taxo A), Furazolidonresistenz, Koagulase, Novobiocinresistenz, Polymixinresistenz, Pyrrolidonyl-Aminopeptidase, synergistische Hämolyse | Abgrenzung koagulase-positiver Staphylokokken |
| WHITE et al. | 1989 | Novobiocin-sensibel: Acetoin, DNase, β -Glucosidase, Phosphatase Novobiocin-resistent: Amygdalin, Arabinose, Saccharose, Xylose | Proben stammten von Erstlaktierende |
| WATTS et al. | 1991 | Arabinose-Cellobiose (AC), Trehalose-Mannitol (TM) | AC zur Abgrenzung novobiocin-sensibler und novobiocin-resistenter KNS, TM zur Differenzierung von <i>S. epidermidis</i> |
| PETERS | 1992 | Novobiocinresistenz Novobiocin-sensibel: Clumping-Faktor, Lactose Maltose, Mannit (anaerob) Ornithindecarboxylase, Phosphatase, Trehalose, Urease Novobiocin-resistent: Saccharose, Xylose | für KNS menschlichen Ursprungs |
| DEVRIESE et al. | 1994 | Deferoxaminresistenz, DNase, Fosfomycinresistenz, Novobiocinresistenz, Protease | nur für novobiocin-sensible KNS, Test auf Delta-Hämolyse kann Proteasetest ersetzen |
| THORBERG und BRÄNDSTRÖM | 2000 | Alkalische Phosphatase, β -CAMP, Calcium-Caseinat, Hämolyse, Trehalose-Mannitol, Vogues-Proskauer, β -Galactosidase | NOSEC = simplified test for novobiocin-sensitive CNS, für Staphylokokken aus bovinen Mastitiden |

2.3.5 Differenzierung von KNS mit kommerziellen Testsystemen

Die kommerziell erhältlichen Differenzierungssysteme haben im Allgemeinen den Nachteil, dass sie anhand humaner Staphylokokkenstämme entwickelt wurden und Staphylokokken bovinen Ursprungs daher oftmals falsch identifizieren (THORBERG und BRÄNDSTRÖM, 2000). BURRIELL und SCOTT (1998) testeten 30 Referenzstämme und 86 Staphylokokkenstämme vergleichend in vier Testsystemen. Die Differenzierungsergebnisse wichen voneinander ab, und die Autoren schlussfolgerten, dass Ergebnisse, die mit verschiedenen Differenzierungsmethoden erzielt wurden, nicht vergleichbar sind. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über die von verschiedenen Autoren festgestellten Zuverlässigkeiten in der Verwendung kommerzieller Testsysteme bei der Differenzierung von KNS.

Da auch die kommerziellen Testsysteme zum Teil keine zuverlässigen Differenzierungen zulassen, sehen manche Autoren den Einsatz der PCR als Möglichkeit, höhere „richtige“ Differenzierungsergebnisse zu erhalten. BES et al. (2000) legten dar, dass eine korrekte Speziesidentifizierung der KNS unerlässlich ist, um Erkenntnisse über die Epidemiologie, die pathologische Bedeutung und Ratschläge zur Praxis zu erlangen. Sie differenzierten 56 Staphylokokken-Isolate sowohl phäno- als auch genotypisch. Während eine phänotypische Identifizierung nur bei 35 Isolaten möglich war und dabei sieben Isolate untypische Reaktionen zeigten, konnten mit der PCR-Methode alle Isolate identifiziert werden. Nach HEIKENS et al. (2005) ist jedoch auch die genotypische Identifizierung der KNS nicht fehlerfrei, und es kann zu Falschidentifizierungen kommen. Auf der PCR basierende Identifizierungsmethoden von Mastitiserregern direkt aus der Milch würden einen deutlichen Zeitvorsprung vor kulturellen mikrobiologischen Methoden bieten. CREMONESI et al. (2006) konnten *S. aureus*, *Sc. agalactiae*, *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis* bis zu einer Keimzahl unter 10 KBE/ml Milch nachweisen. Dabei blieb die Frage offen, ob eine Aussage über die Intensität völlig unerheblich ist, gerade in Beziehung auf „Mischergebnisse“. FREBOURG et al. (2000) unterschieden mittels PCR zwischen pathogenen *S. epidermidis* und kontaminierenden *S. epidermidis*. Bei *S. epidermidis* sind die *ica*-Gen-Cluster für die interzelluläre Adhäsion und das *mecA*-Gen für die Synthese des zusätzlichen Penicillin bindenden Proteins PBP2', das für die Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, bekannt. Der *ica*- und der *mecA*-Genabschnitt wurden vermehrt bei Isolaten aus klinischen Fällen, weniger aus kontaminierenden Stämmen nachgewiesen.

Tabelle 7: Vergleich kommerzieller Identifizierungssysteme für Staphylokokken

| Autor | Jahr | Testsystem | Hersteller | Herkunft | | |
|---------------------|-------|--|-------------------|----------------------------------|---|---|
| | | | | getesteter Staphylokokken | Identifizierungsrate bei Staphylokokken | Sonstiges |
| KLOOS und WOLFSHOHL | 1982 | API Staph-Ident | Analytab Products | human, veterinär, Referenzstämme | 95,0 % | 95 % stimmten mit Ergebnis aus konventioneller Methode überein |
| | 1983 | API Staph-Ident | Analytab Products | human | 92,7 % | 25,7 % der Ergebnisse erforderten zusätzliche Reaktionen, 14 % der erstellten Profile fanden sich nicht im Profilregister, sondern nur in der Api Computerdatensammlung |
| LANGLOIS et al. | 1983 | API Staph-Ident | Analytab Products | bovin | 41,8 % der KNS | 54 % richtige Identifizierungen mit <i>S. aureus</i> |
| BAKER | 1984 | Staph-Ident | Analytab Products | human | 99,0 % | 33 % der Mikrokokken wurden als Staphylokokken differenziert |
| LANGLOIS et al. | 1984 | DMS Staph-Trac System | DMS-Laboratories | bovin | 91,2 % | <i>S. aureus</i> und <i>S. intermedius</i> wird nicht unterschieden |
| WATTS und NICKERSON | 1986 | Staph-Ident | Analytab products | bovin | 80,5 % | |
| HÉBERT et al. | 1988 | Staph-Trac | Analytab products | | 66,1 % | |
| | | API Staph-Ident | Analytab products | human | 93,6 % | alle Mikrokokken wurden als Staphylokokken identifiziert |
| MATTHEWS et al. | 1990b | 1) API Staph-Trac | Analytab products | bovin, | 80,8 % | 1) Identifizierungsrate bei Spezies |
| | | 2) VITEK Gram-Positive Identification card (GPI) | Vitek Systems | Referenzstämme | 44,6 % | zwischen 25 - 100 %, 2) keine <i>S. chromogenes</i> Differenzierung |

| Herkunft | | | | | | |
|-------------------------|-------------|--|--------------------------------|----------------------------------|--|--|
| Autor | Jahr | Testsystem | Hersteller | getesteter Staphylokokken | Identifizierungsrate bei Staphylokokken | Sonstiges |
| WATTS und WASHBURN | 1991 | Staph-Zym | Rosco | bovin, canin | 91,9 % | Identifizierungsraten bei Spezies verschieden |
| THORBERG und BRÄNDSTRÖM | 2000 | 1) Staph-Zym 2) ID 32 Staph | Rosco BioMérieux | bovin | 94,0 % 77,0 % | 1) bei 45 % waren zusätzliche Tests erforderlich |
| HEIKENS et al. | 2005 | Api Staph ID BD Phoenix Automated Microbiology system | BioMérieux Becton Dickinson | human | 85,1 %* 59,6 %* | |

* Daten wurden mathematisch modifiziert

2.4 Antimikrobielle Therapie und Resistenzsituation bei KNS

Durch KNS bedingte subklinische Mastitiden werden oft nicht oder erst zum Trockenstellen antibiotisch therapiert. OLIVER et al. (2004) untersuchten die Wirkung einer verlängerten Ceftiofur Therapie bei subklinischen Mastitiden. Die Heilungsrate bei Infektionen mit KNS lag zwischen 62 % und 86 %, während die Spontanheilung bei 33 % lag. Eine Studie, die TIMMS und SCHULTZ (1984) in den USA durchführten, zeigte dagegen, dass eine Antibiotikabehandlung während der Laktation keine wesentliche Senkung der Zellzahlen herbeiführte. Ebenfalls beschrieben WILSON et al. (1999) für durch KNS ausgelöste subklinische Mastitiden keine wesentlich höheren Heilungsraten bei Einsatz von Antibiotika als bei unbehandelten Vierteln. Als einziges Antibiotikum erzielte Amoxicillin eine nennenswert höhere Wirkung.

BARKEMA et al. (1999) fanden einen positiven Zusammenhang zwischen den Jahren des Trockenstellereinsatzes und der Inzidenzrate klinischer Mastitiden. Sie gaben jedoch gleichfalls zu bedenken, dass das vermehrte Auftreten von Mastitiden ebenfalls den höheren Einsatz von Trockenstellern bedingen könnte. Trockenstellen reduziert die Anzahl der Infektionen mit „minor pathogens“ (HARMON et al., 1986). Die Autoren stellten in einer Studie in den USA eine niedrigere Prävalenz von KNS in Eutern fest, die zuvor mit einem Trockensteller behandelt wurden.

Vermehrt findet sich der Ansatz, Erstlaktierende bereits vor der Abkalbung antibiotisch zu behandeln. BORM et al. (2006) wiesen für durch KNS verursachte Infektionen eine 57,5 % höhere Heilungsrate bei einer Behandlung gegenüber unbehandelten Tieren nach. OLIVER et al. (2003) untersuchten den Einsatz von Laktationsantibiotika mit Cloxacillin und Cefapirin bei Erstlaktierenden prä partum. Es zeigte sich, dass vor dem Kalben behandelte Erstlaktierende während der gesamten Laktation signifikant niedrigere Infektionsraten mit KNS aufwiesen. Diese Tiere produzierten im Vergleich signifikant mehr Milch und hatten signifikant niedrigere Zellzahlen.

Das Trockenstellen laktierender Kühe unter Antibiotikaschutz ist eine wirksame und zugleich ökonomische Methode zur Therapie subklinischer Mastitiden. Ebenfalls wird das Auftreten von klinischen Mastitiden in der Früh-laktation verringert (HOEDEMAKER et al., 2006). PYÖRÄLÄ und TAPONEN (2007) sahen ebenfalls das antibiotische Trockenstellen als eine gute Möglichkeit zur Behandlung persistierender KNS-Infektionen. TENHAGEN et al. (2006)

stellten in einer Studie in Brandenburg fest, dass Cloxacillin das zurzeit am häufigsten in Trockenstellern eingesetzte Antibiotikum ist. Die Tabelle 8 zeigt die laut der LILA LISTE, 2006/2007 (PETRAUSCH, 2006) auf dem deutschen Markt erhältlichen Trockensteller nach ihren antimikrobiellen Wirkstoffen.

Tabelle 8: Anzahl der von verschiedenen Herstellern angebotenen Trockenstellerpräparate, aufgeschlüsselt nach enthaltenem antimikrobiellen Wirkstoff laut LILA LISTE 2006/2007

| antimikrobielle Wirkstoffe | Anzahl der Trockenstellerpräparate |
|---|---|
| Cloxacillin | 12 |
| Oxacillin | 1 |
| Penicillin | 1 |
| Penethacillin, Penicillin, Framycetin (Mischpräparat) | 1 |
| Penicillin, Neomycin (Mischpräparat) | 1 |
| Penicillin, Streptomycin, Nafcillin (Mischpräparat) | 2 |
| Cefazolin | 1 |
| Cefquinom | 1 |
| Cefapirin | 1 |

Die Häufigkeiten von Resistenzen von aus Kuhmilch isolierten KNS gegenüber Antibiotika werden von verschiedenen Autoren unterschiedlich beschrieben. Am häufigsten wird eine Resistenz von KNS gegenüber Penicillin berichtet. GENTILINI et al. (2002) beschrieben 27,6 % resistente Isolate, JARP (1991) 11,5 % (Wert berechnet), jedoch zeigte *S. haemolyticus* eine Resistenzrate von 40 %. SAMPIMON et al. (2007) beschrieben für aus klinischen Mastitisproben isolierte KNS eine Resistenzrate gegenüber Penicillin von 37,4 %. Die Resistenzraten unterschieden sich jedoch bei den einzelnen KNS-Spezies. Für *S. chromogenes* betragen sie 17,8 %, für *S. xylosus* und *S. epidermidis* 62,5 %, für *S. haemolyticus* und *S. capitis* 75 % und für *S. saprophyticus* 100 %. Die Isolate der Spezies *S. simulans* und *S. hyicus* zeigten kein resistentes Verhalten gegenüber Penicillin. Bei einer Studie in Finnland (PITKÄLÄ et al., 2004) betrug die Resistenzrate von KNS gegenüber Penicillin 32 % und bei MAKOVEC und RUEGG (2003a) in den USA 32,6 %.

Die Resistenzrate gegenüber Oxacillin gaben GENTILINI et al. (2002) mit 3,2 % an. SAMPIMON et al. (2007) und PITKÄLÄ et al. (2004) gaben 10,2 % bzw. 9,6 % resistente Stämme an, LÜTHJE und SCHWARZ (2006) lediglich 0,7 %. MAKOVEC und RUEGG (2003a) stellten eine Resistenzrate von 6,8 % gegenüber Cloxacillin fest.

Bezüglich der Resistenzraten gegenüber Ampicillin, Erythromycin und Pirlimycin gaben LÜTHJE und SCHWARZ (2006) 18,1 %, 7,4 % und 6,4 % an, entsprechend beschrieben MAKOVEC und RUEGG (2003a) 30,1 %, 14,9 % und 19,0 %.

DEVRIESE et al. (2002) beschrieben, dass *S. sciuri* intrinsisch bedingt resistent gegenüber Cloxacillin und Lincomycin sei. In ihrer Studie wiesen die Autoren bei drei *S. chromogenes* Isolaten das *linA*-Gen nach, das zusammen mit dem *linA'*-Gen die Monoresistenz bei Staphylokokken gegen Lincomycin bedingt. GENTILINI et al. (2002) wiesen bei einem Oxacillin-resistenten KNS-Isolat das *mecA*-Gen nach. Die Autoren empfahlen, Tiere, bei denen *mecA*-positive KNS festgestellt werden, aus der Herde zu entfernen.

Für den Erfolg einer bakteriologischen Heilung ist aber nicht allein die Empfindlichkeit der Erreger gegenüber dem Antibiotikum verantwortlich. SOL et al. (1994) stellten für *S. aureus*-Infektionen Abhängigkeiten von der Lokalisation, dem Alter der Kuh, den Prozenten der positiven Befunde, der Zellzahl und der Anzahl infizierter Viertel fest.

2.5 Sensitivitätsprüfungen von Erregern gegenüber Chemotherapeutika

Die alleinige Sensitivität eines Erregers in der *in vitro* Sensitivitätsprüfung ist keine Garantie für die Wirksamkeit des Wirkstoffes im Tier. OWENS et al. (1997) wiesen in einer Studie eine Übereinstimmung zwischen den *in vitro* Sensitivitätsprüfungen und den Heilungsraten bei subklinischen Mastitiden bei *Staphylococcus* spp., ausgenommen *S. aureus*, von 71 % nach. Bei *Sc. agalactiae* betrug der Wert 90 %, bei *Sc. uberis* 91 % und bei *Sc. dysgalactiae* 90 %; bei chronischen *S. aureus*-Infektionen zeigte sich eine Übereinstimmung von nur 35 %. Daher hielten die Autoren eine Sensitivitätsprüfung für eine Vorhersage der Wirksamkeit bei neuen Infektionen für sinnvoll, jedoch nicht bei chronischen *S. aureus*-Infektionen. TENHAGEN et al. (2006) gaben weiter zu bedenken, dass unterschiedlich berichtete Resistenzraten auch von unterschiedlichen Methoden herrühren können.

Für die Bestimmung der Erreger-Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In der DIN 58940 werden die Methoden des Agar-Diffusionstests, die Agar-Dilutionsmethode sowie die Makro- und die Mikrodilution beschrieben. Weiterhin ist zwischen der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) zu unterscheiden. Unter der minimalen Hemmkonzentration versteht man die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, die unter definierten *in vitro* Bedingungen die Vermehrung eines getesteten Mikroorganismus innerhalb einer festgelegten Zeitspanne verhindert. Die minimale bakterizide Konzentration bezeichnet die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, die unter *in vitro* Bedingungen ein definiertes Inokulum eines getesteten Bakteriums innerhalb einer festgelegten Zeitspanne um mindestens 99,9 % reduziert.

Der Agar-Diffusionstest erlaubt lediglich eine qualitative Aussage über die Sensitivität eines Erregers, da die Reaktionen in diesem Test lediglich in den drei Kategorien sensibel, intermediär oder resistent angegeben werden. Die Korrelation zwischen den ermittelten Hemmhofdurchmessern und der MHK muss zuvor in einer Regressionsanalyse bestimmt werden. Bei der Agar-Dilutionsmethode wird der Wirkstoff in geometrisch abgestuften Konzentrationen in feste oder halbfeste Agar-Medien eingebracht, und das Inokulum wird auf der Oberfläche aufgetragen. In diesem Test kann die minimale Hemmkonzentration direkt bestimmt werden. Eine direkte Bestimmung ist ebenfalls durch die Makro- und die Mikrodilutionsmethode möglich.

Zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) ist es notwendig, die Abtötungsraten in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration und der Einwirkzeit festzustellen. Dazu werden die jeweiligen K_bE/ml auf geeigneten Agarmedien ermittelt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Probenmaterial

In zwei Zeiträumen (Juni bis Oktober 2005, März bis Juli 2006) wurden insgesamt 1.906 Milchproben in Form von Viertelgemelksproben (Anfangsgemelk) genommen. Diese stammten aus 16 mittelhessischen Landwirtschaftsbetrieben, die in einem Umkreis von 90 km um Gießen lagen. Von diesen Betrieben hielten 13 ihre Milchkühe in Boxenlaufställen, in drei Betrieben wurde ganzjährige Anbindehaltung praktiziert. Es wurden jeweils 30 zufällig ausgewählte Tiere aus jeder Herde beprobt. Unter den 480 Tieren, die insgesamt in die Untersuchung eingingen, befanden sich 114 Milchtiere in der ersten Laktation. Bei der überwiegenden Anzahl der beprobten Tiere handelte es sich um Kühe der Rasse „Deutsche Holstein“. Weiterhin hielten einige Betriebe vereinzelt Kühe der Rassen Fleckvieh, Braunvieh und Jersey. Die Milchkühe aus den mit Boxenlaufställen ausgestatteten Betrieben wurden in Melkständen unterschiedlicher Größe und Ausführung gemolken. Beim kleinsten Melkstand handelte es sich um einen „Doppelzweier-Autotandem-Melkstand“, der größte war ein „Doppelachter-Fischgräten-Melkstand“. In einem Betrieb wurden die Kühe in einem Melkkarussell gemolken. Die Fütterung in den Betrieben setzte sich überwiegend aus Totalen Mischrationen (TMR) oder Teil-TMR-Fütterung kombiniert mit Kraftfuttermitteln über Transponderidentifizierung zusammen. Drei Betriebe gaben Silage als Hauptfutter an. Mit Ausnahme von Betrieb 14 wurde in allen Betrieben nach dem Melken ein Zitzendesinfektionsmittel angewandt (post-dipping). Die Betriebe 3, 6, 8, 9, 11, 12 und 17 verwendeten hierzu ein jodhaltiges Präparat, wobei die Betriebe 6 und 17 die Präparate aufsprühten. In den anderen Betrieben wurden vorwiegend die Zitzenhaut pflegende Dippmittel ohne Jod eingesetzt. Alle Betriebe wandten Trockensteller an, wobei mit Ausnahme der Betriebe 4 und 17 grundsätzlich alle Kühe mit einem antibiotikahaltigen Präparat trockengestellt wurden.

Das monatliche Zellzahlmittel (geometrischer Mittelwert) der Betriebe lag im jeweiligen Probemonat zwischen 107.000 Z/ml und 315.000 Z/ml. Von den beprobten Tieren wurden 14 nur auf drei Vierteln gemolken. Die fehlenden Viertel wurden nicht durch Proben anderer Tiere ersetzt, so dass 1.906 Viertelgemelksproben in die Untersuchung eingingen. Eine Übersicht über die Landwirtschaftsbetriebe zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Übersicht über die Landwirtschaftsbetriebe

| Betrieb | Zellzahl | Zellzahl | Bezahlklasse | Durchschnitt | Anzahl Milchkühe | Haltung / Anzahl Liegeboxen |
|---------|----------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| | Monatsmittel (x1000/ml) | 3-Monatsmittel (x1000/ml) | im Probemonat | Jahresmilchleistung in l pro Kuh | | |
| 2 | 151 | 141 | S | 9.300 | 60 | BLS / 50 |
| 3 | 191 | 199 | S | 8.500 | 279 | BLS / 300 |
| 4 | 277 | 364 | 1 | 7.900 | 65 | BLS / 52 |
| 5 | 315 | 197 | S | 10.000 | 34 | 2-Raumstall |
| 6 | 220 | 238 | S | 10.000 | 93 | BLS / 48 |
| 7 | 304 | 280 | 1 | 8.500 | 86 | BLS / 100 |
| 8 | 249 | 339 | S | 7.700 | 55 | BLS / 37 |
| 9 | 210 | 139 | S | 8.600 | 45 | Anbindehaltung |
| 10 | 285 | 260 | 1 | 8.200 | 39 | Anbindehaltung |
| 11 | 187 | 161 | S | 10.000 | 95 | BLS / 85 |
| 12 | 179 | 180 | S | 8.800 | 150 | BLS / 110 |
| 13 | 203 | 181 | S | 9.300 | 105 | BLS / 140 |
| 14 | 107 | 121 | S | 9.000 | 52 | Anbindehaltung |
| 15 | 215 | 216 | S | 8.500 | 47 | BLS / 56 |
| 16 | 133 | 140 | S | 9.900 | 89 | BLS / 86 |
| 17 | 259 | 249 | S | 6.900 | 50 | BLS / 60 |

BLS = Boxenlaufstall

Die Auswahl der Betriebe erfolgte unter dem Aspekt der Zellzahlmittelwerte der Anlieferungsmilch. Die Betriebe wurden nach dem jeweiligen geometrischen Mittelwert der somatischen Zellzahl, der im Probemonat ermittelt worden war, in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe I beinhaltet Betriebe, die im Probemonat eine durchschnittliche Zellzahl von < 200.000 Z/ml Milch aufwiesen. Dazu gehörten (Tabelle 9) die Betriebe 2, 3, 11, 12, 14 und 16. Zur Gruppe II gehörten die Betriebe 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15 und 17, deren Zellzahlwert im Probemonat \geq 200.000 Z/ml Milch lag. Betrieb 1, der in der Tabelle nicht aufgeführt wird, wurde bei orientierenden Untersuchungen beprobt, in der Gesamtauswertung aber nicht weiter berücksichtigt.

3.1.2 Nährmedien und Zusätze

| | |
|-----------------------------------|--|
| Äskulin | (Merck, Darmstadt, 1.00842.0025) |
| Agar Agar | (Merck, 1.01614.1000) |
| L(+)-Arabinose | (Aldrich, Steinheim, S33407-146) |
| BBL™ Purple Broth Base | (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich, 211558) |
| Calcium-Caseinat-Agar | (Merck, 1.05409.0500) |
| CASO-Bouillon | (Merck, 1.05459.0500) |
| DNase-Testagar | (Merck, 1.10449.0500) |
| Fluorocult® Laurylsulfat-Bouillon | (Merck, 1.12588.0500) |
| Furazolidon | (Sigma, Steinheim, 09095K1574) |
| D(+)-Glucose-Monohydrat | (Merck, 1.08342.1000) |
| Hefeextrakt, granuliert | (Merck, 1.03753.0500) |
| Kälberserum | (Elocin-lab, Mühlheim an der Ruhr, 10400500) |
| D(+)-Mannose | (Sigma, M2069-25G) |
| Malonat-Phenylalanin-Bouillon | (Sifin, Berlin, TN1159) |
| Mueller-Hinton-Agar | (Merck, 1.05437.0500) |
| Natriumchlorid | (Merck, 1.06404.1000) |
| Pepton aus Casein | (Merck, 1.07216.1000) |
| Rose-Bengal-Agar | (Oxoid, Basingstoke, U.K., CM549) |
| Saccharose | (Merck, 1.07687.0250) |
| Schafblut, defibriniert | (Elocin-lab, 300100100) |
| SIM-Nährboden | (Merck, 1.05470.0500) |
| Standard-I-Nähragar | (Merck, 1.07881.0500) |
| Toluidinblau | (Merck, 1.15930.0025) |
| D(+)-Xylose | (Merck, 1.08689.0025) |

3.1.3 Chemikalien, Biochemika und Reagenzien

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| Aceton | (Merck, 1.00013.1000) |
| Aminopeptidase Reagent | (Rosco, Taastrup, Dänemark, 92231) |
| Aqua dest. | |

| | |
|--------------------------------|--|
| Bactident® Oxidase | (Merck, 1.13300.0001) |
| BBL™ Coagulase Plasma mit EDTA | (Becton Dickinson, 240827) |
| Beta-Glucuronidase (PGUA) | (Rosco, 50611) |
| Deferoxamine 250µg | (Rosco, 59611) |
| Desmanol® | (Schülke & Mayr, Norderstedt) |
| Dodecylsulfat Natriumsalz | (Merck, 8.22050.2500) |
| Ethanol | (Merck, 100983) |
| Fosfomycin 70µg | (Rosco, 74212) |
| Harnstoff | (Merck, 1.08488.5000) |
| Kaliumhydroxidplätzchen | (VWR, Darmstadt, 1.05033.0500) |
| KOVÁCS Indolreagenz | (VWR, 1.9293.0100) |
| Methylenblaulösung | (Merck, 1.01287.2500) |
| NIT 1 + NIT 2 | (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich, 70422) |
| Novobiocin 5µg | (Rosco, 76312) |
| ONPG, (Beta-Galactosidase) | (Rosco, 50311) |
| Paraffin | (bioMérieux, 70100) |
| Phenolphthalein | (Sigma, P-9750) |
| Pyrrolidonyl Aminopeptidase | (Rosco, 47011) |
| Raffinose | (Rosco, 53311) |
| VP 1 + VP 2 | (bioMérieux, 70422) |
| Wasserstoffperoxid 3% | (VWR, 1.07210.0250) |
| Zym A + Zym B | (bioMérieux, 70472) |

3.1.4 Geräte und sonstige Materialien

| | |
|----------------------------|--|
| Abzug Holten Lamin Air | (Integra Biosciences, Fernwald) |
| Agarclav | (Integra Biosciences, biomedis Laborservice GmbH) |
| api® Staph | (bioMérieux, 20500) |
| 2 Autoclaven SterVis | (Holzner, Nussloch, bei Heidelberg) |
| 2 Brutschränke B6, Heraeus | (Kendro Laboratory Products, Hanau, 50042301) |
| 1 Brutschrank B12, Heraeus | (Kendro Laboratory Products, 500423079) |

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Dose-it 803 | (IBS Integra Biosciences) |
| Durham Röhrchen | (VWR, 3110180) |
| Fossomatic 5000, Kombi 1 | (Foss Electric, Hillerod, Dänemark) |
| Gummiverschlussstopfen | |
| Heraeus Freeze -80°C | (Kendro Laboratory Products) |
| 5 ml HS-Flasche | (VWR, 548-0057) |
| LYOVAC GT2 | (Steris) |
| McFarland-Standard 6 x 5ml | (bioMerieux, 70900) |
| Mikrowelle Micromat | (AEG) |
| pH-Meter | (WTW-Inolab, Deutschland) |
| Präzisionswaage | (Mettler, P1200) |
| Probenröhrchen 50ml, steril | (Sarstedt, 62.547.254) |
| Stereomikroskop Axioplan | (Zeiss) |
| Sterile Einmalspritzen 20ml, 10ml | (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien) |
| Sterile Wattestäbchen | (Deltalab, Rubí, Spanien) |
| Sterilfilter 2µm | (Schleicher und Schüll, 10462200) |
| Vortex MS1 Minishaker | |

3.1.5 Antibiotikatestplättchen

β-Laktamantibiotika

| | |
|--------------------|---|
| Cefapirin 30 µg | (Intervet, Unterschleißheim, [Mast Diagnostics]) |
| Cefazolin 30 µg | (Mast Diagnostics, Merseyside, U.K.) |
| Cefquinom 10 µg | (Intervet, [Oxoid]) |
| Cloxacillin 5 µg | (Pfizer, Karlsruhe, [Mast Diagnostics]) |
| Penicillin G 10 IE | (Mast Diagnostics) |

Aminoglykosidantibiotika

| | |
|--------------------|--------------------|
| Neomycin 30 µg | (Mast Diagnostics) |
| Streptomycin 25 µg | (Oxoid, Wesel) |

3.1.6 Bakterienreferenzstämme

Die Referenzstämme wurden auf Schafblutagarplatten (Standard-I-Nähragar mit 5 % defibriniertem Schafblut) im Kühlschrank gelagert. Im Abstand von vier Wochen wurden die Stämme subkultiviert (48 h bei 37 °C). Tabelle 10 gibt einen Überblick über die verwendeten Bakterienreferenzstämme.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Referenzstämme

| Referenzorganismus | Bezeichnung | Herkunft |
|-------------------------------------|-------------|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Staphylococcus chromogenes</i> | DSM 20454 | DSMZ GmbH, Braunschweig |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC 14990 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | ATCC 29970 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Staphylococcus hyicus</i> | NCTC 10350 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Staphylococcus lentus</i> | ATCC 49574 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | ATCC 43867 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Staphylococcus sciuri</i> | ATCC 20345 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Staphylococcus simulans</i> | DSM 20322 | DSMZ GmbH, Braunschweig |
| <i>Staphylococcus xylosum</i> | DSM 20266 | DSMZ GmbH, Braunschweig |
| <i>Micrococcus kristinae</i> | ATCC 27570 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Micrococcus luteus</i> | CCM 169 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |
| <i>Micrococcus varians</i> | CCM 884 | Professur für Milchwissenschaften, JLU Gießen |

DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

JLU = Justus-Liebig-Universität

3.2 Methoden

3.2.1 Probennahme

Die Beprobung der Betriebe 2 bis 8 erfolgte von Juni bis Oktober 2005, die Probennahme in den Betrieben 9 bis 17 wurde im Zeitraum März bis Juli 2006 durchgeführt. Jeder Betrieb wurde zur Morgenmelkzeit besucht. Die Euter der Tiere wurden zunächst durch die melkenden Personen, wie im Betrieb üblich, für den Melkvorgang vorbereitet. Danach wurden die Milchproben in Anlehnung an die „Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern“ (DVG, 2000) als Viertelanfängsgemelke (VAG) genommen. Die Zitzenkuppen wurden mit einer 70 %igen Alkohol-Lösung desinfiziert. Zunächst wurden die dem Probennehmer abgewandten Zitzen und anschließend die dem Probennehmer zugewandten desinfiziert. Die Probenentnahme erfolgte in umgekehrter Reihenfolge in sterile Einmalprobenröhrchen mit einem Volumen von 50 ml, die beim Probennehmen möglichst horizontal unter dem Euter gehalten wurden. Die ersten drei Melkstrahlen aus jedem Euterviertel wurden verworfen, um KNS, die sich im Strichkanal befinden könnten, zu entfernen. Zwischen dem Beprobieren von zwei Tieren desinfizierten sich die Probennehmenden die Hände mit Desmanol[®]. Die Milchproben wurden in Kühlboxen mit „Gefrierakkus“ zum Institut transportiert. Dort wurde noch am gleichen Tag mit der mikrobiologischen Untersuchung der Proben begonnen.

3.2.2 Durchführung des California-Mastitis-Tests (CMT)

Die Testflüssigkeit zur Durchführung des California-Mastitis-Tests wurde wie folgt hergestellt: 40 g Natrium-Dodecylsulfat, 240 g Harnstoff und 4 ml Phenolphthaleinlösung (2 %ige ethanolische Lösung) wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen und der pH-Wert am nächsten Tag auf 8,0 eingestellt. Zur Durchführung des Tests wurden ca. 2 ml einer Viertelgemelksprobe in eine CMT-Testschale gegeben und mit der gleichen Menge Testflüssigkeit durch kreisende Bewegung der Testschale vermischt. Natriumdodecylsulfat und Harnstoff zerstören die Zellwände vorhandener somatischer Zellen, und es kommt dadurch zu einer Veränderung des Fließzustandes der gemischten Flüssigkeiten. Die Beurteilung des Tests ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Beurteilung des California-Mastitis-Tests

| Beurteilungsgrad | Visuelle Bewertung (Viskosität) | |
|------------------|---------------------------------|--------------------------|
| | des Testgemisches | Zellzahlbereich |
| – | unverändertes Testgemisch | < 400.000 Z/ml |
| + | Schlieren im Testgemisch | 400.000 – 1.000.000 Z/ml |
| ++ | schleimartiges Testgemisch | 800.000 – 5.000.000 Z/ml |
| +++ | gallertiges Testgemisch | > 3.000.000 Z/ml |

3.2.3 Mikrobiologische Untersuchung der Viertelgemelksproben

Der Inhalt der Probengefäße wurde durch vorsichtiges Schwenken direkt vor der Entnahme gemischt, um eine mögliche Sedation von Erregern aufzuheben. Es wurden jeweils 0,1 ml einer Milchprobe auf einer Blutagarplatte mit Äskulinzusatz ausgespatelt. Die Bebrütung der Platten erfolgte aerob bei 37 °C für 24 und 48 h. Nach diesen Zeiträumen wurden die Platten auf Wachstum kontrolliert und vorhandene Kolonien, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, differenziert. Zusätzlich wurde von jeder Viertelgemelksprobe ein Ösenausstrich (0,01 ml) auf einer Rose-Bengal-Agar-Platte zur Detektion von Hefen angefertigt. Dabei wurden jeweils acht Proben auf einer Platte ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte für 48 h bei 30 °C.

3.2.3.1 Isolierung und Differenzierung häufig vorkommender Mastitiserreger in Viertelgemelksproben

Die bebrüteten Blutagarplatten wurden bei festgestelltem Keimwachstum morphologisch bzw. biochemisch auf das Vorkommen von KNS, *Micrococcus* und *Kocuria* spp., *S. aureus*, äskulin-positive und äskulin-negative Streptokokken, Corynebakterien, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. und *Proteus* spp. untersucht bzw. weiter charakterisiert.

Alle Erreger, ausgenommen *Proteus* spp., wurden hinsichtlich der Intensität (Koloniezahl) in den Viertelgemelksproben beurteilt. Die Beurteilung erfolgte nach Tabelle 12. In der weiteren Auswertung wurden nur die ermittelten Intensitäten der KNS berücksichtigt, wobei diese, wie auch alle anderen Mastitiserreger, ab einer Intensität von 1+ aufgenommen wurden.

Tabelle 12: Übersicht über die Beurteilung der Intensität des Koloniewachstums (Keimdichte) auf Blutagar

| Beurteilungsgrad | | |
|-------------------------|--|---------------|
| Keimwachstum | Anzahl gleichartig aussehender Kolonien | KbE/ml |
| ± | 1 bis < 5 | 10 - < 50 |
| 1+ | 5 bis < 10 | 50 - < 100 |
| 2+ | 10 bis < 20 | 100 - < 200 |
| 3+ | ≥ 20 | ≥ 200 |
| 4+ | dicht stehende bis konfluierende Kolonien | v |

KbE = Koloniebildende Einheit

v = verschieden

3.2.3.1.1 Durchführung der Differenzierungstests zum KOH-, Katalase- und Oxidaseverhalten

Diese drei Tests wurden in dieser Arbeit zur Keimdifferenzierung von Mastitiserregern an verschiedenen Stellen der Differenzierungsschemata eingesetzt und werden an dieser Stelle kurz summarisch beschrieben.

KOH-Test

Der KOH-Test ersetzt die routinemäßige Gramfärbung zur Unterscheidung gram-positiver und gram-negativer Erreger. Dabei reagieren gram-positive Keime KOH-negativ, und gram-negative Keime reagieren KOH-positiv. Ein Tropfen 3 %ige Kalilauge wurde auf einen Objektträger gegeben und eine Öse Koloniematerial hineingerieben. Aufgrund des unterschiedlichen Zellwandaufbaus kommt es bei gram-negativen Keimen zur Schleimbildung, die zu fadenziehenden Effekten zwischen Öse und Material auf dem Objektträger führt. Bei gram-positiven Keimen bildet sich eine homogene, nicht fadenziehende Suspension.

Katalase-Test

Zur Abgrenzung zwischen Staphylokokken und Streptokokken wurde der Katalase-Test durchgeführt. Bei diesem Test wird Wasserstoffperoxid bei Vorhandensein des Enzyms Katalase gespalten. Eine Öse Koloniematerial wurde auf einen Objektträger gebracht und ein Tropfen einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugegeben. Die positive Reaktion der

Staphylokokken zeigt sich in sofortiger Schaumbildung. Streptokokken zeigen im Gegensatz dazu keine Reaktion.

Oxidase-Test

Das Oxidaseverhalten wurde mit Bactident[®]-Oxidase-Streifen getestet. Ein positives Oxidaseverhalten zeigte sich nach Aufbringen von Koloniematerial auf das Testfeld in einem blauen bis violetten Farbumschlag innerhalb von 30 Sekunden. Bei diesem Test wird das Vorhandensein der Cytochrom c Oxidase überprüft, die in der mitochondrialen Atmungskette lokalisiert ist.

3.2.3.1.2 Differenzierung der Gattung *Staphylococcus*

Koloniemorphologisch als präsumtive Staphylokokken anzusehende Kolonien wurden nach 24 bzw. 48 h Bebrütungsdauer auf Blutagarplatten mit Äskulinzusatz subkultiviert. Staphylokokken bilden oftmals glatte, undurchsichtige, glänzende, runde und erhabene Kolonien mit einem Durchmesser von 1 bis 3 mm. Jede Staphylokokkenkolonie, die auf der Originalplatte mit mindestens fünf gleichartig aussehenden Kolonien vertreten war, wurde in die Untersuchung aufgenommen. Dies entsprach einer Keimzahl von ≥ 50 KbE/ml. Die weitere Differenzierung dieser Subkulturen erfolgte nach 24 bzw. 48 h Bebrütungsdauer bei 37 °C. Jedes Isolat wurde auf KOH- und Katalaseverhalten getestet.

Weiterhin wurde jedes Isolat auf sein Verhalten im Klumpungstest untersucht. Dieser Test diente zur Abgrenzung zwischen KNS und koagulase-positiven Staphylokokken (*S. aureus*) und wurde als Objektträgerstest durchgeführt. Dazu wurde eine Öse Koloniematerial in einen Tropfen physiologischer NaCl-Lösung auf einem Objektträger hineingerieben, um eine Autoagglutination auszuschließen. Eine weitere Öse Koloniematerial wurde in 10 μ l EDTA-Kaninchenplasma verrieben. Eine deutlich erkennbare Agglutination bei indirekter Beleuchtung wurde als positiv gewertet. Bei einem positiven Ergebnis in Kombination mit der Ausbildung einer β -Hämolyse wurde das Isolat als *S. aureus* identifiziert. Beim Fehlen einer β -Hämolyse kombiniert mit einem positiven Clumping-Faktor-Test, ebenso beim Auftreten einer β -Hämolyse kombiniert mit negativem Clumping-Faktor-Test, wurde zusätzlich der Koagulase-Test durchgeführt. Dabei wurden 150 μ l eines EDTA-stabilisierten Kaninchenplasmas mit einer Kolonie beimpft und die Verfestigung des Plasmas nach 4 und 24 h bewertet. Ein positiver Koagulase-Test führte zur Einordnung *S. aureus*. Alle anderen Isolate wurden vorläufig in die Gruppe der KNS eingestuft.

3.2.3.1.3 Differenzierung der Gattungen *Streptococcus* und *Enterococcus*

Kolonien der Gattung *Streptococcus* wurden anhand ihrer Koloniemorphologie und Hämolyseformen sowie ihres KOH- und Katalaseverhaltens identifiziert. Die weitere Differenzierung erfolgte hinsichtlich der Äskulinspaltung, die unter UV-Licht (360 nm) überprüft wurde. Die Spezies *Streptococcus uberis* und Spezies der Gattung *Enterococcus* können Äskulin spalten. Dagegen spalten *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus agalactiae* Äskulin nicht. Bei nicht vorhandener Äskulinspaltung wurde ein CAMP-Test durchgeführt, um eine Infektion mit *Streptococcus agalactiae* (Erreger des „Gelben Galtes“) auszuschließen. Die Aufnahme der Streptokokken in die Auswertung erfolgte als äskulin-positive (= äskulinspaltende) und äskulin-negative (= nicht äskulinspaltende) Streptokokken (ÄPS bzw. ÄNS).

3.2.3.1.4 Differenzierung von Corynebakterien

Coryneforme Erreger wurden zunächst hinsichtlich ihrer Koloniemorphologie und ihres oft erst nach 48 h auftretenden Wachstums identifiziert. *Corynebacterium bovis* bildet oftmals kleine Kolonien mit einem Durchmesser von 1 mm, die Kolonien von *Corynebacterium ulcerans* haben dagegen oftmals einen Durchmesser von 5 mm. Beide Spezies zeigen eine raue Oberfläche der Kolonien. Stichprobenartig wurden aus jedem Betrieb Methylenblau-Präparate zur Bestätigung angefertigt, in denen sich die typische V-Anordnung der pleomorphen Stäbchen zeigte.

3.2.3.1.5 Differenzierung gram-negativer Erreger

In diese Untersuchung wurden die Spezies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* und die Gruppe der Pseudomonaden einbezogen, die gleichzeitig die wichtigsten gram-negativen Erreger bezüglich der klinischen Mastitis bei Milchkühen darstellen. Verdächtige Kolonien wurden zunächst mittels KOH-Test geprüft. Der anschließend durchgeführte Oxidasetest führte bei positivem Ergebnis zur Diagnose „Pseudomonaden“, bei negativem Oxidasetest wurde eine biochemische Differenzierung angeschlossen. Dabei wurden die Gasbildung, die Spaltung von Methylumbelliferyl-Glucuronid (MUG) und Malonat sowie die Bildung von Indol überprüft. Mit jeder zu testenden Kolonie wurden drei Reagenzgläser beimpft. Das Reagenzglas mit der Laurylsulfat-Bouillon enthielt ein Durham-Röhrchen. Nach 24 h

Bebrütung bei 37 °C wurde an diesem Reagenzglas die Gasbildung und unter UV-Licht die Spaltung von MUG überprüft, die sich in Form von Fluoreszenz zeigte. Die Malonatspaltung wurde ebenfalls nach einer Bebrütung von 24 h bei 37 °C beurteilt. Ein Farbumschlag von blau nach grün-türkis zeigte eine positive Reaktion an. Zum Nachweis der Indolbildung wurde ein Reagenzglas mit SIM (Sulfid-Indol-Motility)-Agar stichbeimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet. Es wurden dann drei Tropfen KOVAC's Reagenz hinzugegeben, und ein sofort auftretender roter Ring zeigte eine positive Reaktion an. Die Beurteilung der einzelnen Reaktionen führte zu den Differenzierungen, wie sie in Tabelle 13 dargestellt sind.

Tabelle 13: Differenzierung coliformer Erreger

| Merkmal | <i>Escherichia coli</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|
| MUG-Spaltung | + | - | - |
| Gasbildung | + | + | + |
| Malonatspaltung | - | + | + |
| Indolbildung | + | + | - |

3.2.3.1.6 Differenzierung der Gattung *Proteus*

Die Erreger der Gattung *Proteus*, *Proteus mirabilis* und *Proteus vulgaris*, wurden primär anhand ihres schwärmenden Koloniewachstums identifiziert. Zur Absicherung wurde eine Stichbeimpfung in SIM-Agar durchgeführt und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Beweglichkeit zeigte sich in schwärmendem Wachstum um den Stichkanal. Gleichzeitig wurde im SIM-Agar die H₂S-Bildung überprüft, die sich in Schwarzfärbung des Agars ausdrückt und für Spezies der Gattung *Proteus* positiv ausfällt.

3.2.3.1.7 Differenzierung von Hefen

Der Nachweis von Hefen erfolgte auf Rose-Bengal-Agar. Das in diesem Agar enthaltene Chloramphenicol hemmt das Wachstum anderer Mastitiserreger. Die Kolonien erscheinen leicht rosa mit einer matten Oberfläche und einem Durchmesser von 2-4 mm. Zur Absicherung der Diagnose wurde von jedem positiven Befund auf Rose-Bengal-Agar ein Methylenblau-Präparat

angefertigt. Die endgültige Identifizierung erfolgte dann anhand der für Hefen typischen großen, ovalen Formen im mikroskopischen Präparat.

3.2.3.2 Differenzierung zwischen den Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus* und *Kocuria*

Die Differenzierung zwischen den Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus* und *Kocuria* wurde auf Furazolidon-Pepton-Agar durchgeführt. Dieser wurde wie folgt hergestellt: 10 g Pepton aus Casein, 1 g Glucose, 5 g Natriumchlorid, 5 g Hefeextrakt und 12 g Agar Agar wurden in 900 ml Aqua dest. suspendiert und bis zum vollständigen Lösen mit einem Magnetrührer gemischt. Anschließend wurde der Agar für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Davon getrennt wurden 0,05 g Furazolidon in 100 ml Aceton gelöst. Diese Lösung wurde dem Agar nach dem Autoklavieren hinzugegeben und bei geöffneter Zufüllöffnung weitere 15 bis 20 min gerührt. Der End-pH-Wert wurde bei 25 °C auf 6,8 bis 7,2 eingestellt. Die von der AVID empfohlene Konzentration von 0,02 g Furazolidon wurde auf 0,05 g erhöht, da orientierende Untersuchungen gezeigt hatten, dass bei einem Zusatz von 0,02 g Furazolidon Staphylokokkenwachstum in einzelnen Fällen noch möglich war. Die Konzentration von 50 µg Furazolidon pro ml Agar ist von VON RHEINBABEN und HADLOK (1981) mit dem gleichen Ergebnis wie die Konzentration von 20 µg/ml getestet worden. Spezies der Gattung *Micrococcus* zeigten auf dem Furazolidon-Agar Wachstum, während Spezies der Gattung *Staphylococcus* kein Wachstum zeigten. Es wurden jeweils acht Isolate auf einer Platte ausgestrichen und für 24 und 48 h bei 37 °C bebrütet. Bei deutlich erkennbarem Keimwachstum wurden die Isolate den Gattungen *Micrococcus* und *Kocuria*, bei nicht nachweisbarem Keimwachstum der Gattung *Staphylococcus* zugeordnet.

3.2.3.3. Differenzierung der KNS-Spezies

Die Differenzierung der einzelnen KNS-Spezies erfolgte in Anlehnung an DEVRIESE et al. (1994) und WHITE et al. (1989). Ergänzt wurden die Differenzierungsschemata durch biochemische Parameter nach THORBERG und BRÄNDSTRÖM (2000) sowie durch weitere biochemische Reaktionen, um die Zuverlässigkeit der Differenzierung zu erhöhen.

3.2.3.3.1 Bestimmung der Sensitivität gegenüber Novobiocin

Alle KNS-Isolate wurden zunächst auf ihre Sensitivität gegenüber Novobiocin getestet. Dazu wurde aus frischem Koloniematerial eine 0,5 McFarland-Suspension hergestellt. Die McFarland-Einheiten geben dabei Trübungen an, die auf dem Trübungsstandard einer Bariumsulfat-Lösung basieren. Der 0,5 McFarland-Standard entspricht einer Suspension von BaCl_2 in H_2SO_4 , wobei 0,05 ml einer BaCl_2 -Lösung mit einem Massenanteil von 1 % in 9,95 ml einer H_2SO_4 -Lösung mit einem Volumenanteil von 10 % gemischt werden (DIN 58940-3, 2002). Von der 0,5 McFarland Bakteriensuspension wurden 0,1 ml auf einer Müller-Hinton-Agarplatte mit dem Durchmesser 5 cm ausgespatelt. Ein mit 5 μg Novobiocin beschicktes Testplättchen wurde in der Mitte der Platte aufgebracht und mit einer sterilen Pinzette angedrückt. Die Bebrütung erfolgte für 24 h bei 37 °C. Zur Auswertung wurde der Hemmhofdurchmesser gemessen. Ein Hemmhofdurchmesser von < 16 mm wurde als novobiocin-resistent gewertet, ein Hemmhofdurchmesser von \geq 16 mm als novobiocin-sensibel.

3.2.3.3.2 Differenzierung der novobiocin-sensiblen KNS

In Anlehnung an die von DEVRIESE et al. (1994) beschriebene und von der DVG (2000) in ihren „Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern“ veröffentlichten Empfehlungen wurden die novobiocin-sensiblen KNS-Isolate weiter auf ihre Sensitivität gegenüber Fosfomycin und Deferoxamin sowie auf ihr Verhalten auf DNase- bzw. Calcium-Caseinat-Agar getestet. Da diese Merkmale allein nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten, wurden zusätzlich alle novobiocin-sensiblen Isolate nach THORBERG und BRÄNDSTRÖM (2000) auf das Vorhandensein von β -Galactosidase und Pyrrolidonyl Aminopeptidase sowie zusätzlich dazu auf β -Glucuronidase getestet.

Sensitivität gegenüber Fosfomycin und Deferoxamin

Aus frischem Koloniematerial wurde eine 0,5 McFarland Suspension in physiologischer NaCl-Lösung hergestellt. Von dieser Lösung wurden 0,1 ml auf einer Müller-Hinton-Agar-Platte ausgespatelt. Ein mit 70 μg Fosfomycin beschicktes und ein mit 250 μg Deferoxamin beschicktes Testplättchen wurden gegenüberliegend auf die Platte aufgebracht und mit einer sterilen Pinzette angedrückt. Die Bebrütung erfolgte für 24 h bei 37 °C. Zur Auswertung wurden die Hemmhofdurchmesser ermittelt. Bei Deferoxamin wurde ein Hemmhofdurchmesser von

< 18 mm als resistent, ein Hemmhofdurchmesser von ≥ 18 mm als sensibel gewertet. Bei Fosfomycin lag der Grenzwert entsprechend bei einem Hemmhofdurchmesser von ≥ 30 mm.

Nachweis von DNase

Der Nachweis des Enzyms DNase erfolgte auf DNase-Testagar. Dieser wurde nach Herstellerangaben angefertigt, zusätzlich wurden 0,1 g Toluidinblau pro Liter Agar zugesetzt. Auf jeder DNase-Platte wurden bis zu vier Isolate getestet. Die Beimpfung mit Koloniematerial erfolgte punktförmig. Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 72 h. Bei Vorhandensein des Enzyms DNase wird die im Nährboden enthaltene DNA gespalten, und es kommt zu einer Farbveränderung um die beimpfte Stelle. Sowohl Farbveränderungen in der Intensität des Blautons als auch eine Verfärbung ins Gelbliche wurden als positiv gewertet.

Proteolytische Reaktion

Die proteolytische Reaktion wurde nach DEVRIESE et al. (1994) auf Calcium-Caseinat-Agar getestet. Bei Vorhandensein von proteolytischen Enzymen wird das im Nährboden befindliche Casein abgebaut, und das ansonsten trübe Medium zeigt Aufhellungshöfe. Die Platten wurden mit jeweils vier Isolaten, eins pro Plattenviertel, strichförmig beimpft. Nach 24 und 72 h wurden die Durchmesser der Aufhellungshöfe um die Impfstriche gemessen. Als positiv wurden Aufhellungszonen gewertet, die mindestens viermal so breit waren wie die Ausdehnung des Koloniewachstums am Impfstrich.

Nachweis von β -Galactosidase, β -Glucuronidase und Pyrrolidonyl Aminopeptidase

Die Nachweise aller drei Enzyme erfolgten mittels Rosco-Diatabs. Die Durchführung und Auswertung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. In 0,25 ml physiologischer NaCl-Lösung wurde eine Suspension aus Koloniematerial mit einem Trübungsstandard von 4 McFarland oder höher hergestellt. Dieser Suspension wurde jeweils ein Diatab zugegeben. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C. Die Auswertung der β -Galactosidase und der β -Glucuronidase erfolgte nach 24 h. Ein Farbumschlag von farblos nach gelb wurde dabei als positiv beurteilt. Die Bebrütung der Pyrrolidonyl Aminopeptidase erfolgte für zwei Stunden. Es wurden dann jedem Röhrchen drei Tropfen des Aminopeptidase Reagent zugegeben. Ein Farbumschlag nach rot wurde als positiv beurteilt.

Die Gesamtheit der Reaktionen, die für die Differenzierung der novobiocin-sensiblen Isolate durchgeführt wurden, und ihre Beurteilung gibt Tabelle 14 wieder.

Tabelle 14: Übersicht über die zur Differenzierung der novobiocin-sensiblen KNS untersuchten Merkmale

| | Hemmhofgröße | | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | Deferoxamin ¹ | Fosfomycin ¹ | DNase ¹ | Calcium-Caseinat ¹ | β-Gal ² | β-Gur ² | PyrA ² |
| <i>S. chromogenes</i> | < 18 mm | ≥ 30 mm | v | + | v (14%) | - (0%) | v (26%) |
| <i>S. epidermidis</i> | ≥ 18 mm | 24 – 44 mm | - | - | - (1%) | - (0%) | - (1%) |
| <i>S. haemolyticus</i> | < 18 mm | < 30 mm | - | - | - (1%) | v (29%) | + (98%) |
| <i>S. hominis</i> | ≥ 18 mm | 0-25 mm | - | - | - (0%) | - (1%) | - (5%) |
| <i>S. hyicus</i> | < 18 mm | ≥ 30 mm | + | + | - (0%) | + (96%) | - (1%) |
| <i>S. simulans</i> | < 18 mm | ≥ 30 mm | - | - | v (79%) | v (74%) | v (82%) |
| <i>S. warneri</i> | < 18 mm | < 30 mm | - | - | - (0%) | v (67%) | - (1%) |

¹Angabe der Auswertungskriterien nach DEVRIESE et al. (1994)

²Prozentangaben der positiven Reaktionen nach ID 32 Staph, bioMérieux

v = variabel

β-Gal = β-Galactosidase, β-Gur = β-Glucuronidase, PyrA = Pyrrolidonyl Aminopeptidase

Bei diesen Parametern wurde bei einem Anteil positiver Reaktionen von ≤ 10 % das Merkmal als negativ (-), bei einem Anteil von ≥ 90 % positiver Befunde als positiv (+) gewertet.

3.2.3.3.2 Differenzierung der novobiocin-resistenten KNS

Alle novobiocin-resistenten Isolate wurden auf ihr Oxidaseverhalten getestet. Hierbei zeigen *S. lentus* und *S. sciuri* eine positive Reaktion, während *S. cohnii*, *S. saprophyticus* und *S. xylosus* ein negatives Oxidaseverhalten zeigen.

Verstoffwechslung verschiedener Zucker

In Anlehnung an WHITE et al. (1989) wurden die novobiocin-resistenten Isolate auf den Abbau von Xylose, Arabinose, Saccharose und Mannose getestet. Dazu wurde jeweils eine frische 1 %ige Zuckerlösung auf der Basis von Purple Broth Base hergestellt. Es wurde die benötigte Menge Zucker abgewogen und in sterilem Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und der Purple Broth Base zugegeben. Unmittelbar danach wurden die Röhren mit Koloniematerial beimpft und für 72 h bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren vier Tagen Bebrütung bei 37 °C wurde das Ergebnis nochmals überprüft. Ein Umschlag von violett nach gelb zeigte eine positive Reaktion an. Die ursprünglich vorgesehene Bebrütungsdauer von 24 h erwies sich als nicht ausreichend, da zu diesem Zeitpunkt zahlreiche nicht eindeutige Ergebnisse hinsichtlich des Farbumschlags vorlagen.

Verstoffwechslung von Raffinose

Bei positivem Oxidaseverhalten wurde zur Differenzierung zwischen *Staphylococcus sciuri* und *Staphylococcus lentus* die Verstoffwechslung von Raffinose getestet. Hierzu wurden Rosco-Diatabs verwendet, die Durchführung und Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben. Ein Umschlag von himbeerrot nach orange wurde als positive Reaktion beurteilt und führte zum Ergebnis *S. lentus*. Dagegen zeigt *S. sciuri* keine Verstoffwechslung von Raffinose.

Die Gesamtheit der Merkmale, die für die Differenzierung der novobiocin-resistenten Isolate getestet wurden, gibt Tabelle 15 wieder.

Tabelle 15: Übersicht über die zur Differenzierung der novobiocin-resistenten KNS untersuchten Merkmale

| | Xylose ¹ | Arabinose ² | Saccharose ¹ | Mannose ¹ | Oxidase ³ | Raffinose ¹ |
|-------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| <i>S. cohnii</i> | - (0%) | - (0%) | - (2%) | v (66%) | - | |
| <i>S. lentus</i> | + (100%) | v (26%) | + (100%) | + (100%) | + | + (100%) |
| <i>S. saprophyticus</i> | - (0%) | - (0%) | + (96%) | - (2%) | - | |
| <i>S. sciuri</i> | v (16%) | v (60%) | + (95%) | + (99%) | + | - (0%) |
| <i>S. xylosus</i> | v (82%) | v (50%) | v (87%) | + (92%) | - | |

¹ Prozentangaben der positiven Reaktionen nach api[®]Staph, bioMérieux

² Prozentangaben der positiven Reaktionen nach ID 32 Staph, bioMérieux

Bei diesen Parametern wurde bei einem Anteil positiver Reaktionen von ≤ 10 % das Merkmal als negativ (-), bei einem Anteil von ≥ 90 % positiver Befunde als positiv (+) gewertet.

³Angaben aus Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, 1986

v = variabel

3.2.3.4 Differenzierung mit dem api[®]Staph-System

Stichprobenartig wurde von den gewonnenen KNS-Isolaten eine weitere Differenzierung mit dem api[®]Staph-System (bioMérieux) durchgeführt. Testdurchführung und Auswertung erfolgten dabei nach Angaben des Herstellers. Es wurden frische Subkulturen auf Standard-I-Blutagar angelegt und für 24 (teilweise 48) h bei 37 °C bebrütet. Mit diesem frischen Koloniematerial wurde in einer 6 ml Ampulle mit api[®]Staph-Medium eine 0,5 McFarland Keimsuspension hergestellt. Mit dieser Keimsuspension wurden die Probenröhrchen eines Teststreifens unter

Vermeidung von Luftblasenbildung gefüllt. Die Teströhrchen der Arginindihydrolase (ADH) und der Urease (URE) wurden zur Schaffung anaerober Verhältnisse mit Paraffinöl überschichtet. Der Teststreifen wurde in einer mit sterilem Aqua dest. hergestellten feuchten Kammer für 24 h bei 37 °C bebrütet. Vor dem Ablesen der Teststreifen wurde dem Voges Proskauer Teströhrchen je ein Tropfen der Reagenzien VP 1 und VP 2, der Alkalischen Phosphatase je ein Tropfen ZYM A und ZYM B und der Nitrat-zu-Nitrit-Reaktion je ein Tropfen NIT 1 und NIT 2 hinzugefügt. Nach 10 min wurden die Reaktionen abgelesen. Die computergestützte Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Apilab (bioMérieux).

3.2.4 Konservierung der Isolate

Nach der Differenzierung der KNS-Isolate wurden diese in Lyophilisatform aufbewahrt. Hierzu wurden frische Subkulturen angelegt und diese nach Bebrütung für 48 h bei 37 °C bei absoluter Reinheit der Subkultur für den Lyophilisatvorgang verwendet. Eine Kolonie eines Isolates wurde in 3 ml CASO-Bouillon überimpft und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Bei vorhandener Trübung des Röhrcheninhalts am nächsten Tag wurde der Vorgang an einer Sterilbank fortgesetzt. Dort wurden 700 µl der Bakteriensuspension und 700 µl Kälberserum in ein steriles Lyophilisatgläschen, dessen Rand zuvor abgeflammt worden war, pipettiert. Ein ebenfalls abgeflammter Gummistopfen wurde mit einer Pinzette lose als Verschluss auf das Gläschen aufgelegt. In diesem Zustand wurden die Gläschen über Nacht bei – 80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die tiefgefrorenen Gläschen in die Gefriertrocknungsanlage verbracht und nach Herstelleranleitung lyophilisiert. Nach Abschluss des Vorgangs am darauf folgenden Tag wurde jedes Gläschen fest mit einem Metallring verschlossen.

Zur Resuspendierung wurde einem Lyophilisat 1 ml CASO-Bouillon hinzugefügt. Anschließend wurde der Gläscheninhalt mit Hilfe eines Vortex vermischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde auf einer Blutagarplatte mit Äskulinzusatz ein Verdünnungsausstrich angefertigt. Die Bebrütung erfolgte für 24 h bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde der Ausstrich auf Reinheit der Kolonien überprüft. Die Platten wurden dann für weitere 24 h bebrütet, wieder auf Reinheit überprüft und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.5 Zytologische Untersuchung der Viertelgemelksproben

Die Bestimmung der somatischen Zellzahl wurde vom „Hessischen Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.“, Alsfeld (Hessen), in seinem nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditierten Zentrallabor durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach § 64 LFGB, ASU L 01.01-1 1998-09: Zählung somatischer Zellen in Rohmilch (fluoreszenzoptische Zählung). Am Probenentnahmetag wurden 35-45 ml jeder Viertelgemelksprobe in ein Probengefäß des HVL, das Bronopol zur Konservierung enthielt, überführt. Die Untersuchung durch den HVL erfolgte am nächsten Tag. Bei dem vom HVL eingesetzten Gerät handelte es sich um ein Fossomatic 5000 Kombi 1 – Gerät. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Anfärbung der DNS im Zellkern der in der Milch enthaltenen somatischen Zellen und der Erfassung dieser angefärbten Zellkern-DNA im Fluoreszenzmikroskop. Die Erfassung erfolgt dabei über einen elektrischen Impuls, den eine im UV-Licht fluoreszierende Zelle produziert. Es werden insgesamt 3,3 µl Milch ausgezählt, und der endgültige Wert wird als somatische Zellen je ml angegeben.

3.2.6 Durchführung des Antibiotikasensitivitätsverhaltens als Agardiffusionstest

Die Sensitivität ausgewählter KNS-Isolate gegenüber den in Trockenstellerpräparaten enthaltenen Antibiotika wurde in Anlehnung an die Methode, wie sie in der DIN 58940, Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika, beschrieben ist, durchgeführt. Von jeder aus einem Betrieb isolierten KNS-Spezies wurden zehn Prozent der Isolate, mindestens jedoch drei auf ihre Antibiotikasensitivität getestet. Lag nur ein oder zwei Isolate einer KNS-Spezies aus einem Betrieb vor, wurden diese getestet. Die Antibiotika Penicillin G, Cloxacillin, Streptomycin, Neomycin, Cefquinom, Cefapirin und Cefazolin wurden anhand der in der Lila Liste 2006/2007 aufgeführten kommerziell erhältlichen Trockensteller ausgewählt.

Die KNS-Isolate lagen zur Sensitivitätsprüfung in Lyophilisatform vor und wurden, wie unter 3.2.4 beschrieben, revitalisiert. Nach der DIN 58940, Teil 3, Anhang A.1. wurde aus 3 ml einer gepufferten, physiologischen Kochsalzlösung (PBS) eine 0,5 McFarland trübe Bakteriensuspension hergestellt. In Vorversuchen mit dem in Anhang B genannten Kontrollstamm *S. aureus* ATCC 25923 zeigte sich, dass das Ausspateln von 0,05 ml der vorgenannten Suspension zu dem in der DIN-Norm geforderten dicht stehenden

Kolonienwachstum ohne Konfluierung der Kolonien führte. Es wurden jeweils zwei Müller-Hinton-Agar-Platten mit 0,05 ml Suspension ausgespatelt und für 5 bis 15 min stehen gelassen, damit das Kulturmedium einziehen konnte. Auf eine der Agarplatten wurden die Testplättchen der Antibiotika Penicillin G, Streptomycin, Neomycin und Cloxacillin aufgebracht. Auf der zweiten Agar-Platte wurden die Antibiotika Cefquinom, Cefapirin und Cefazolin getestet. Das Aufbringen der Testplättchen erfolgte mit einem Dispenser. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C für 24 h. Die Auswertung erfolgte gemäß den in Tabelle 16 angegebenen Kriterien. Dabei wurden intermediäre Hemmhofdurchmesser als „resistent“ bewertet.

Tabelle 16: Bewertungsschlüssel für Hemmhofdurchmesser im Agardiffusionstest zur Resistenzprüfung

| Wirkstoffmenge der | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Antibiotika- Testplättchen | sensibel HHD in mm | resistent HHD in mm | Referenz |
| Penicillin G 6 µg (10 IE) | ≥ 29 | ≤ 28 | DIN 58940; BgVV, 1998 |
| Cloxacillin 5 µg | ≥ 16 | ≤ 15 | BgVV, 1998 |
| Streptomycin 25 µg | ≥ 17 | ≤ 14 (15-16 interm.) | AVID XII/97; BgVV, 1998 |
| Neomycin 30 µg | ≥ 17 | ≤ 16 | AVID XII/97; BgVV, 1998 |
| Cefquinom 10 µg | ≥ 18 | ≤ 17 | AVID XII/97; BgVV, 1998 |
| Cefapirin 30 µg | ≥ 18 | ≤ 17 | Intervet (NCCLS) |
| Cefazolin 30 µg | ≥ 22 | ≤ 19 (20-21 interm.) | DIN 58940; BgVV, 1998 |

HHD = Hemmhofdurchmesser

interm. = intermediäre Sensitivität

AVID = Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik

BgVV = Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (ist aufgeteilt worden)

NCCLS = National Committee for Clinical Laboratory Standards (USA)

4 ERGEBNISSE

Von den 1.906 gewonnenen Viertelgemelksproben gingen 1.720 in die Endauswertung ein. Es wurden nur solche Proben berücksichtigt, bei denen sowohl ein eindeutiges mikrobiologisches Ergebnis als auch ein somatischer Zellzahlwert ermittelt werden konnte.

4.1 Ergebnisse der zytologischen Untersuchung

Die somatischen Zellzahlwerte der Viertelgemelksproben lagen zu einem großen Anteil unter 100.000 Z/ml. Bei den Betrieben, die im Probemonat ein Zellzahlmittel von < 200.000 Z/ml (Gruppe I) aufwiesen, lagen zwischen 58,9 % und 84,5 % aller Viertel der einzelnen Betriebe unter einem Zellzahlwert von 100.000 Z/ml. Die Viertelgemelksproben aus Betrieben mit einem Zellzahlmittelwert von ≥ 200.000 Z/ml (Gruppe II) im Probemonat lagen zwischen 43,3 % und 84,5 % unter diesem Wert. Bei Betrachtung aller Proben lagen 57,4 % unter einem Zellzahlwert von 50.000 Z/ml, 70,9 % lagen unter 100.000 Z/ml, und 82,0 % lagen unter 200.000 Z/ml. Einen Überblick über die Verteilung der Zellzahlwerte aller Viertelgemelksproben gibt Abbildung 3.

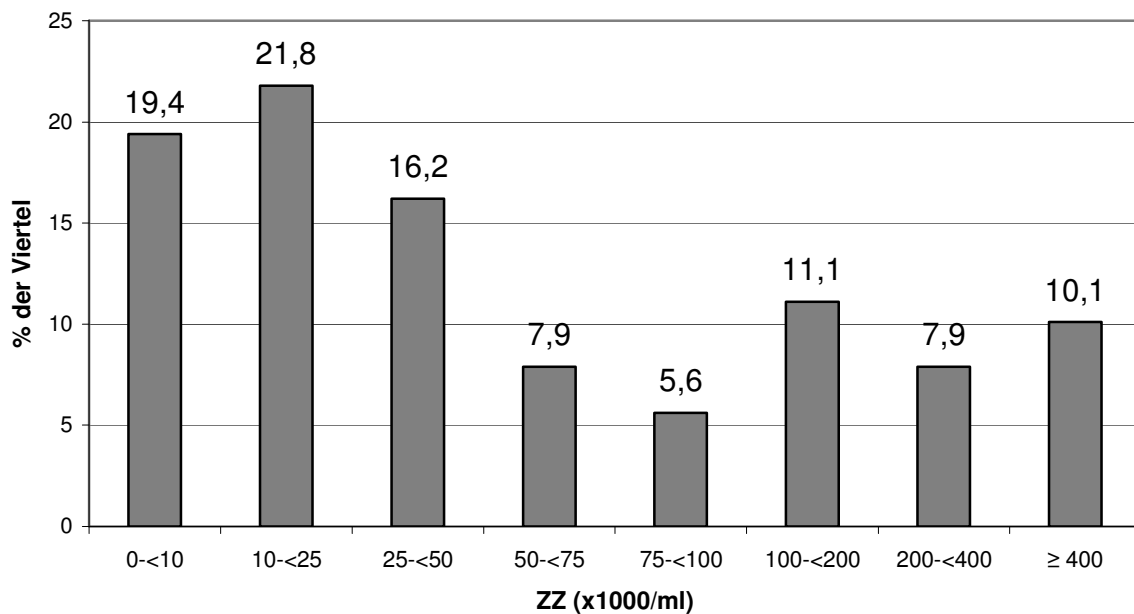


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der 1.720 geprüften Viertelgemelksproben in den verschiedenen Zellzahlklassen

4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung

4.2.1 Ergebnisse der Untersuchung auf Mastitiserreger

Lediglich in 504 Proben von insgesamt 1.720 Proben konnte kein mikrobiologisches Wachstum festgestellt werden. Bei 1.216 Proben zeigte sich mikrobiologisches Wachstum. Dabei waren die Koloniewachstums-Intensitäten von 1+ bis zu 3+ (vgl. Tabelle 12) bei allen Mastitiserregern vertreten. Insgesamt wurden in 791 Viertelgemelksproben KNS nachgewiesen, dies entsprach 45,9 % aller Viertel. Bezogen auf die Tieranzahl waren 77,5 % der 480 in die Untersuchung einbezogenen Kühe auf mindestens einem Viertel KNS-positiv. Spezies der Gattungen *Micrococcus* und *Kocuria* wurden in 128 (7,4 %) der Proben gefunden. *S. aureus* konnte aus 45 (2,6 %) Proben isoliert werden. In 304 (17,7 %) Proben wurden äskulin-positive Streptokokken und in 15 Proben (0,9 %) äskulin-negative Streptokokken gefunden. Corynebakterien fanden sich in 239 (13,9 %) der Proben, *E. coli* in 13 (0,8 %) Proben, Spezies der Gattung *Klebsiella* in 9 (0,5 %) Proben. Hefen wurden aus 41 (2,4 %) der Proben isoliert. Spezies der Gattungen *Pseudomonas* und *Proteus* wurden in jeweils 6 (0,3 %) Proben nachgewiesen. Dabei wurden teilweise Spezies verschiedener Mastitiserreger aus einer Probe isoliert. Fanden sich mehr als drei verschiedene Spezies auf der Blutagarplatte einer Viertelgemelksprobe, so wurde die Probe als potentiell kontaminiert gewertet und nicht in die Auswertung einbezogen. Die Häufigkeit, mit der Spezies oder Spezies eines Genus der Mastitiserreger in den einzelnen Betrieben festgestellt wurden, ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Nach Betrieb differenzierende Darstellung der Anzahl bakteriologisch positiver Viertelgemelksproben sowie die jeweils nachgewiesenen Keimgruppen

| Betrieb* | kein mikrobiol. Wachstum | KNS spp. | <i>Micrococcus/Kocuria</i> spp. | <i>S. aureus</i> | APS | ANS | Corynebakterien | <i>E. coli</i> | <i>Klebsiella</i> spp. | Hefen | <i>Pseudomonas</i> spp. | <i>Proteus</i> spp. |
|-----------------------|--------------------------|----------|---------------------------------|------------------|-----|-----|-----------------|----------------|------------------------|-------|-------------------------|---------------------|
| 2 ¹ (99) | 38 | 41 | 0 | 0 | 8 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 0 | 5 |
| 3 ¹ (93) | 44 | 31 | 1 | 0 | 7 | 0 | 13 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 ² (107) | 57 | 21 | 0 | 2 | 9 | 0 | 19 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 5 ² (95) | 38 | 38 | 1 | 0 | 7 | 0 | 11 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 ² (83) | 18 | 50 | 2 | 0 | 9 | 0 | 26 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| 7 ² (104) | 19 | 42 | 3 | 29 | 8 | 0 | 15 | 1 | 5 | 1 | 3 | 0 |
| 8 ² (115) | 38 | 45 | 4 | 0 | 25 | 0 | 23 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| 9 ² (113) | 14 | 85 | 0 | 3 | 45 | 0 | 20 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10 ² (110) | 21 | 61 | 3 | 0 | 33 | 0 | 18 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 |
| 11 ¹ (115) | 44 | 54 | 12 | 1 | 10 | 0 | 7 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 |
| 12 ¹ (112) | 39 | 38 | 15 | 2 | 15 | 70 | 18 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 ² (116) | 51 | 31 | 23 | 0 | 19 | 8 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 ¹ (116) | 15 | 78 | 4 | 2 | 21 | 0 | 18 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 |
| 15 ² (113) | 29 | 49 | 22 | 4 | 43 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 ¹ (116) | 20 | 92 | 1 | 1 | 6 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 ² (112) | 19 | 34 | 37 | 1 | 39 | 0 | 8 | 1 | 0 | 5 | 0 | 0 |

* Die Zahlen in Klammern in der Spalte Betrieb geben die Anzahl der in die Auswertung einbezogenen Viertelgemelksproben aus dem Betrieb an.

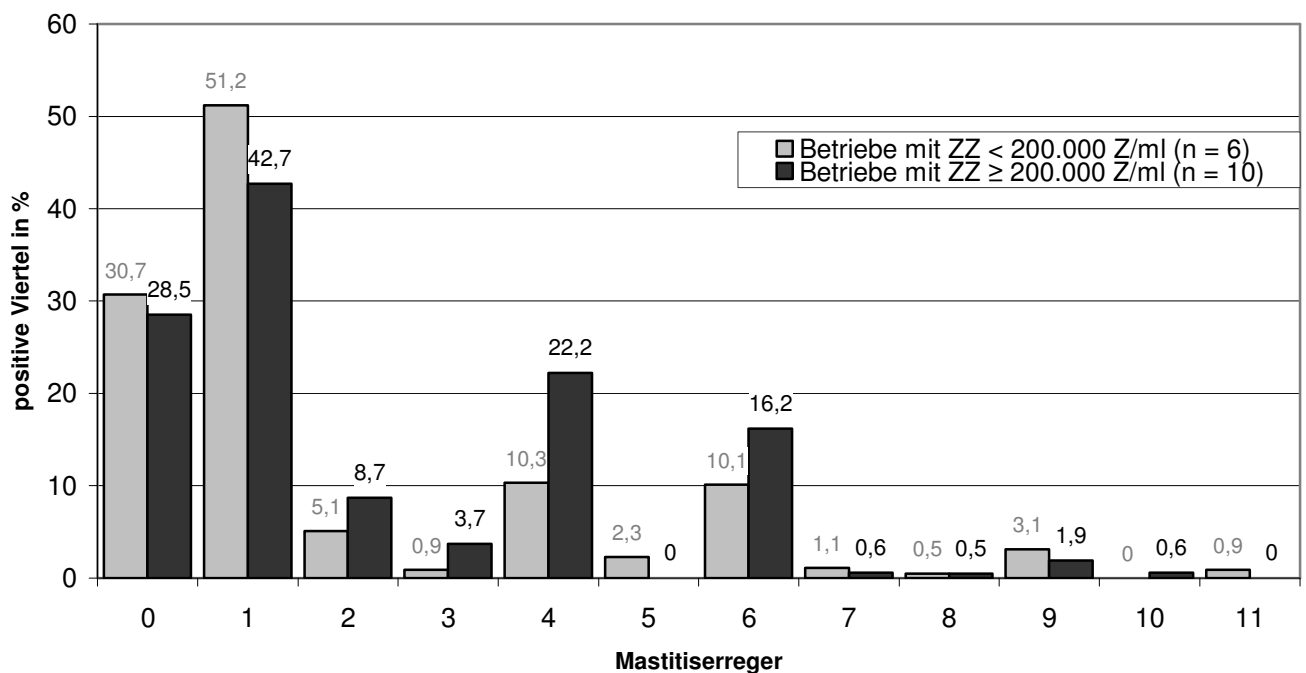
¹Betrieb der Gruppe I

²Betrieb der Gruppe II

APS = äskulin-positive Streptokokken, ANS = äskulin-negative Streptokokken

Bei den *Klebsiella* spp. handelte es sich ausschließlich um *Klebsiella pneumoniae*.

Aus Tabelle 17 ist zu entnehmen, dass KNS in Viertelgemelksproben aus allen Betrieben sehr häufig vorkamen, unabhängig davon, wie hoch die mittlere Zellzahl der Anlieferungsmilch im Probemonat war. Fast alle *S. aureus*-positiven Viertelgemelksproben stammten aus Betrieb 7, der sich damit von dem in den übrigen Betrieben festgestellten Erregerspektrum deutlich unterschied. Die überwiegende Anzahl bakteriologisch positiver Befunde entfiel auf die Gruppen der KNS, der äskulin-positiven Streptokokken und der Corynebakterien. In Proben aus den Betrieben 11, 12, 13, 15 und 17 waren darüber hinaus Spezies der Gattungen *Micrococcus* und *Kocuria* häufig vertreten. Bezüglich der Verteilung der einzelnen Mastitiserreger bzw. Keimgruppen in Abhängigkeit vom Zellzahlmittelwert in der Anlieferungsmilch im Probemonat (< 200.000 Z/ml bzw. \geq 200.000 Z/ml) ergaben sich nur geringe Unterschiede. Allerdings waren in Betrieben mit Zellzahlen von < 200.000 Z/ml KNS häufiger als in Betrieben mit höheren Zellzahlen, während für die meisten anderen Keime bzw. Keimgruppen der umgekehrte Fall häufiger war (Abbildung 4).



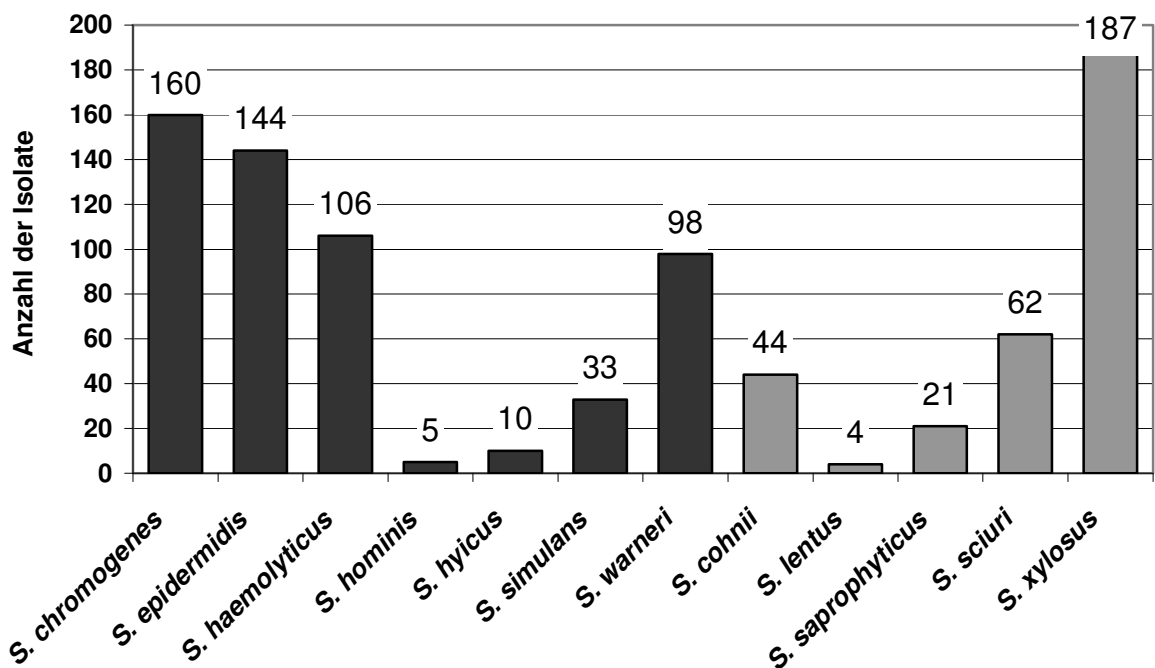
| | | | |
|---|--|----|-------------------------|
| 0 | kein mikrobielles Wachstum nachweisbar | 7 | <i>E. coli</i> |
| 1 | KNS spp. | 8 | <i>Klebsiella</i> spp. |
| 2 | <i>Micrococcus</i> / <i>Kocuria</i> spp. | 9 | Hefen |
| 3 | <i>S. aureus</i> | 10 | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 4 | Äskulin-positive Streptokokken | 11 | <i>Proteus</i> spp. |
| 5 | Äskulin-negative Streptokokken | | |
| 6 | Corynebakterien | | |

Abbildung 4: Vergleich der Häufigkeit verschiedener Keimgruppen in Viertelgemelksproben aus Betrieben mit Zellzahlen in der Anlieferungsmilch von < 200.000 Z/ml bzw. von \geq 200.000 Z/ml

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich auch bei den äskulin-positiven Streptokokken, für die der prozentuale Anteil positiver Viertel bei den Betrieben der Gruppe II mit 22,2 % mehr als doppelt so hoch war wie der Anteil bei den Betrieben der Gruppe I (10,3 %).

4.2.2 Ergebnisse der Untersuchung und Differenzierung der KNS

Insgesamt wurden aus den 1.720 Viertelgemelksproben 909 KNS-Isolate gewonnen. Davon reagierten 582 novobiocin-sensibel, novobiocin-resistent waren 327 Isolate. In der Gruppe der novobiocin-sensiblen Isolate konnten 26 Isolate aufgrund ihres biochemischen Reaktionsmusters nicht eindeutig differenziert werden, von den novobiocin-resistenten Isolaten konnten 9 nicht differenziert werden. In der weiteren Auswertung wurden diese Isolate nicht berücksichtigt, so dass 556 novobiocin-sensible und 318 novobiocin-resistente Isolate blieben. Die Zuordnung dieser Isolate zu den einzelnen KNS-Spezies zeigt Abbildung 5.



dunkelgraue Säulen = novobiocin-sensible Spezies

hellgraue Säulen = novobiocin-resistente Spezies

Abbildung 5: Häufigkeit des Nachweises verschiedener aus Viertelgemelksproben isolierten KNS-Spezies (n = 874)

Die Verteilung der einzelnen KNS-Spezies in den Betrieben ließ keinen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer bestimmten Spezies und dem Zellzahlmittelwert der Anlieferungsmilch erkennen. Eine Aufstellung der absoluten Isolat-Anzahlen der KNS spp. aus den einzelnen Betrieben zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: Übersicht über die aus Viertelgemelkproben isolierten KNS-Spezies, differenziert nach Betrieb

| Nummer des Betriebes | novobiocin-sensibel | | | | | | | novobiocin-resistent | | | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|----------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------|
| | <i>S. chromogenes</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. hyicus</i> | <i>S. simulans</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. colnii</i> | <i>S. lentus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. sciuri</i> | <i>S. xylosus</i> |
| 2 ¹ | 11 | 0 | 14 | 0 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 17 |
| 3 ¹ | 23 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| 4 ² | 10 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 5 ² | 14 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 17 | 6 |
| 6 ² | 35 | 1 | 13 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 ² | 3 | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 12 | 1 | 0 | 0 | 13 | 1 |
| 8 ² | 7 | 5 | 5 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| 9 ² | 4 | 33 | 13 | 0 | 0 | 2 | 22 | 5 | 0 | 3 | 1 | 16 |
| 10 ² | 3 | 41 | 7 | 2 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 3 | 0 | 1 |
| 11 ¹ | 9 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 0 | 1 | 19 | 20 |
| 12 ¹ | 7 | 1 | 7 | 0 | 0 | 5 | 6 | 7 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 13 ² | 8 | 6 | 2 | 0 | 3 | 2 | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 14 ¹ | 1 | 31 | 17 | 3 | 3 | 0 | 9 | 6 | 0 | 6 | 0 | 13 |
| 15 ² | 6 | 12 | 9 | 0 | 0 | 3 | 5 | 10 | 0 | 3 | 1 | 6 |
| 16 ¹ | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 4 | 2 | 6 | 72 |
| 17 ² | 3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 1 | 19 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 |

¹ Betrieb der Gruppe I (Zellzahlmittelwert im Anlieferungsmonat < 200.000 Z/ml)

² Betrieb der Gruppe II (Zellzahlmittelwert im Anlieferungsmonat ≥ 200.000 Z/ml)

4.2.3 Vergleich der Haltungform (Laufstallhaltung bzw. Anbindehaltung) bezüglich des Spektrums nachgewiesener KNS-Spezies

Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, stammte die überwiegende Anzahl der Isolate von *S. epidermidis* aus den Betrieben 9, 10 und 14. Diese drei Betriebe hielten ihre Tiere in Anbindehaltung. Eine Gegenüberstellung der Häufigkeit der einzelnen KNS-Spezies in Betrieben mit Anbindehaltung und Laufstallhaltung zeigt Tabelle 19.

Tabelle 19: Absoluter bzw. prozentualer Anteil KNS-positiver Viertel in Laufstallhaltungen und Anbindehaltungen, differenziert nach KNS-Spezies

| KNS-Spezies | Anzahl (%) der in die Auswertung einbezogenen Viertelgemelksproben von Tieren aus Laufstallhaltungen (n = 1.381) | | Anzahl (%) der in die Auswertung einbezogenen Viertelgemelksproben von Tieren aus Anbindehaltungen (n = 339) | |
|-------------------------|--|--------|--|--------|
| | n | (%) | n | (%) |
| | <i>S. chromogenes</i> | 152 | (11,0) | 8 |
| <i>S. epidermidis</i> | 40 | (2,9) | 105 | (30,9) |
| <i>S. haemolyticus</i> | 69 | (5,0) | 37 | (10,9) |
| <i>S. hominis</i> | 0 | (0) | 5 | (1,5) |
| <i>S. hyicus</i> | 6 | (0,4) | 3 | (0,9) |
| <i>S. simulans</i> | 31 | (2,2) | 2 | (0,6) |
| <i>S. warneri</i> | 63 | (4,6) | 35 | (10,3) |
| <i>S. cohnii</i> | 49 | (3,5) | 15 | (4,4) |
| <i>S. lentus</i> | 4 | (0,3) | 0 | (0) |
| <i>S. saprophyticus</i> | 9 | (0,7) | 12 | (3,5) |
| <i>S. sciuri</i> | 61 | (4,4) | 1 | (0,3) |
| <i>S. xylosus</i> | 152 | (11,0) | 30 | (8,8) |

S. epidermidis wurde stark überwiegend in Anbindehaltung festgestellt. Mit 30,9 % (Anbindehaltung) verglichen mit 2,9 % (Laufstallhaltung) wurde *S. epidermidis* rund zehnmal häufiger in Anbindehaltungen als in Laufstallhaltungen nachgewiesen. Deutliche Unterschiede zeigten sich auch bei *S. chromogenes*, der mit 11 % gegenüber 2,4 % in Laufstallhaltungen ca.

fünffach häufiger gefunden wurde. *S. haemolyticus* und *S. warneri* waren mehr als doppelt so häufig in Anbindehaltungen als in Laufstallhaltungen zu finden. *S. sciuri* wurde mit 4,4 % deutlich häufiger in Laufstallhaltungen isoliert gegenüber 0,3 % in Anbindehaltungen.

4.2.4 Vergleich zwischen Erstlaktierenden und älteren Kühen bezüglich KNS-Vorkommenshäufigkeit

Von den 480 in die Untersuchung einbezogenen Tieren handelte es sich bei 114 Tieren um Erstlaktierende, bei 366 Tieren um Kühe ab der zweiten Laktation. Bei Erstlaktierenden wurden KNS insgesamt häufiger isoliert als bei Kühen. Ebenfalls war auch oft mehr als ein Viertel positiv, während bei den Kühen die Mehrzahl der Tiere auf nur einem Viertel positiv war. Die prozentuale Verteilung ist in Tabelle 20 dargestellt. Erstlaktierende waren in nahezu allen Fällen (92 %) positiv für KNS.

Tabelle 20: Vergleich von Erstlaktierenden und Kühen hinsichtlich der Häufigkeit positiver KNS-Befunde, bezogen auf die Viertelanzahl pro Tier

| | Erstlaktierende (n = 114) | Kühe (n = 366) |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------|
| % der Tiere mit KNS | 92,1 | 72,9 |
| % der Tiere mit KNS in einem Viertel | 26,7 | 40,8 |
| % der Tiere mit KNS in zwei Vierteln | 21 | 29,2 |
| % der Tiere mit KNS in drei Vierteln | 30,5 | 20,6 |
| % der Tiere mit KNS in vier Vierteln | 21,9 | 9,4 |

4.3 Zusammenhänge zwischen KNS-Spezies und somatischer Zellzahl

Von den 874 differenzierten KNS-Isolaten stellten 427 Isolate den jeweils alleinigen Befund in der jeweils zugrunde liegenden Viertelgemelksprobe dar. Bei diesen 427 KNS-Isolaten handelte es sich um folgende Spezies (absolute Anzahl in Klammern):

S. chromogenes (n = 110), *S. epidermidis* (n = 70), *S. haemolyticus* (n = 31), *S. hominis* (n = 1), *S. hyicus* (n = 7), *S. simulans* (n = 15), *S. warneri* (n = 36), *S. cohnii* (n = 11), *S. lentus* (n = 2), *S. saprophyticus* (n = 7), *S. sciuri* (n = 28), *S. xyloso* (n = 109).

Für die Prüfung auf Zusammenhänge zwischen Auftreten einer KNS-Spezies und der somatischen Zellzahl als Parameter für die Eutergesundheit wurden ausschließlich diese 427 KNS-Isolate betrachtet, da nur hier der Einfluss weiterer Mastitiserreger ausgeschlossen werden konnte. In Tabelle 21 werden Zellzahlkategorien für Viertelgemelksproben in Verbindung mit den aus ihnen isolierten KNS spp. dargestellt. Es zeigte sich, dass die Isolate der einzelnen KNS spp. nicht gleichmäßig über alle Zellzahlkategorien verteilt waren. Weiterhin bestanden Unterschiede zwischen den KNS-Spezies.

Tabelle 21: Vorkommen von KNS-Spezies in Viertelgemelksproben mit verschiedenen Zellzahlkategorien

| KNS-Spezies | Zellzahl (x 1000/ml) | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | 0-<10 | 10-<25 | 25-<50 | 50-<75 | 75-<100 | 100-<200 | 200-<400 | ≥ 400 |
| <i>S. chromogenes</i> (n = 110) | 5 (4,5%) | 7 (6,4%) | 10 (9,1%) | 11 (10,0%) | 11 (10%) | 32 (29,1%) | 24 (24,0%) | 10 (9,1%) |
| <i>S. epidermidis</i> (n = 70) | 13 (18,6%) | 12 (17,1%) | 12 (17,1%) | 9 (12,9%) | 6 (8,6%) | 8 (11,1%) | 6 (8,6%) | 4 (5,7%) |
| <i>S. haemolyticus</i> (n = 31) | 5 (16,1%) | 10 (32,3%) | 6 (19,4%) | 2 (6,5%) | 1 (3,2%) | 4 (12,9%) | 1 (3,2%) | 2 (6,5%) |
| <i>S. hominis</i> (n = 1) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| <i>S. hyicus</i> (n = 7) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (14,3%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (28,6%) | 2 (28,6%) | 2 (28,6%) |
| <i>S. simulans</i> (n = 15) | 2 (13,3%) | 1 (6,7%) | 4 (26,7%) | 0 (0%) | 1 (6,7%) | 4 (26,7%) | 1 (6,7%) | 2 (13,3%) |
| <i>S. warneri</i> (n = 36) | 8 (22,2%) | 4 (11,1%) | 9 (25,0%) | 2 (5,6%) | 3 (8,3%) | 3 (8,3%) | 5 (13,9%) | 2 (5,6%) |
| <i>S. cohnii</i> (n = 11) | 2 (18,2%) | 5 (45,5%) | 2 (18,2%) | 1 (9,1%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (9,1%) | 0 (0%) |
| <i>S. lentus</i> (n = 2) | 2 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| <i>S. saprophyticus</i> (n = 7) | 2 (28,6%) | 2 (28,6%) | 2 (28,6%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (14,3%) |
| <i>S. sciuri</i> (n = 28) | 8 (28,6%) | 9 (32,1%) | 2 (7,1%) | 1 (3,6%) | 1 (3,6%) | 4 (14,3%) | 1 (3,6%) | 2 (7,1%) |
| <i>S. xyloso</i> (n = 109) | 31 (28,4%) | 15 (13,8%) | 24 (22,0%) | 5 (4,6%) | 11 (10,1%) | 17 (15,6%) | 3 (2,8%) | 3 (2,8%) |

Aus Tabelle 21 geht hervor, dass Isolate von *S. chromogenes* und von *S. hyicus* vermehrt in Vierteln mit einer Zellzahl von ≥ 100.000 Z/ml gefunden wurden. Bei *S. chromogenes* waren es 62,2 % aller Isolate und bei *S. hyicus* 85,8 %. Um den möglichen Einfluss einer KNS-Gruppe oder einzelner KNS-Spezies auf die somatische Zellzahl zu prüfen, war es nötig, auch die Zellzahlen aus Viertelgemelksproben zu betrachten, die kein mikrobiologisches Wachstum aufwiesen. Abbildung 6 zeigt eine Gegenüberstellung der Zellzahlen der 504 Viertelgemelksproben mit negativem mikrobiologischen Befund mit den 1.216 Proben mit positivem mikrobiologischen Befund.

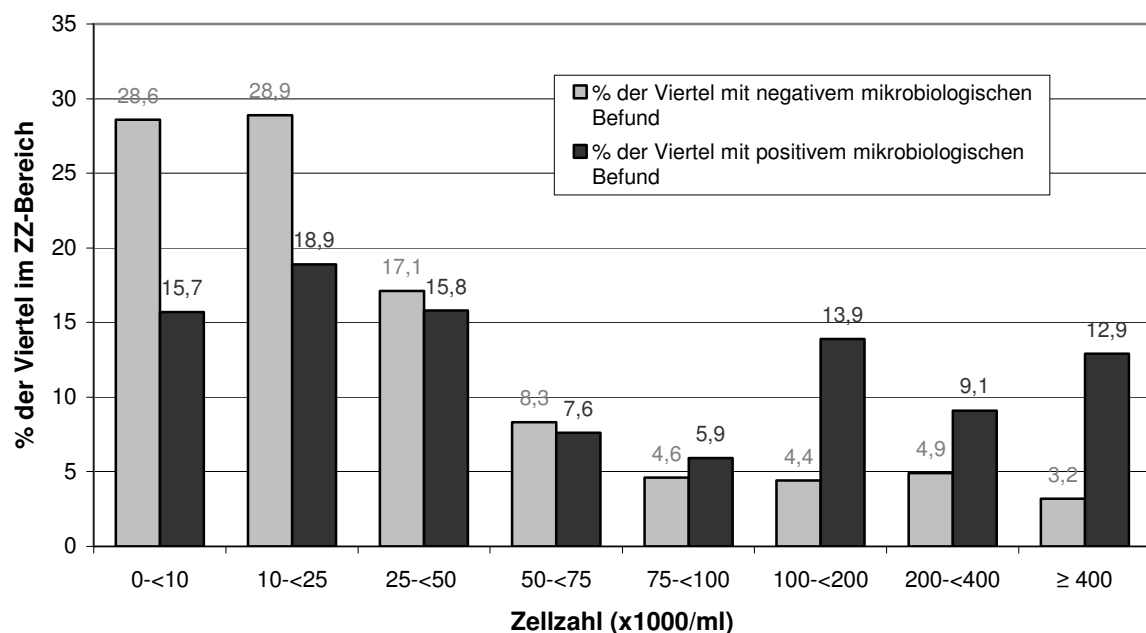


Abbildung 6: Vergleich der Verteilung der Zellzahlwerte in Viertelgemelksproben mit positivem mikrobiologischen Befund bzw. mit negativem mikrobiologischen Befund

Es zeigte sich, dass bei Proben mit negativem mikrobiologischen Befund 87,5 % aller Proben unter einem Zellzahlwert von 100.000 Z/ml lagen. Proben, die einen positiven mikrobiologischen Befund aufwiesen – hier ohne Betrachtung der einzelnen Mastitiserreger und deren Vorkommensintensität – lagen zu 63,9 % unter 100.000 Z/ml. Bei den Vierteln mit über 400.000 Z/ml überwogen solche mit positivem mikrobiologischen Ergebnis (12,9 %) gegenüber mikrobiologisch negativen Vierteln (3,2 %). Betrachtet man Viertelgemelksproben, die einen alleinigen Befund mit einer KNS-Spezies aufwiesen, so ergeben sich die in Tabelle 22 dargestellten prozentualen Anteile.

Tabelle 22: Absolute Anzahlen von 1.216 Viertelgemelksproben mit positivem mikrobiologischen Befund in verschiedenen Zellzahlkategorien und absoluter sowie prozentualer Anteil von 427 Proben, die einen alleinigen KNS-Befund aufwiesen

| | Zellzahl (x 1000 Z/ml) | | | | | | | |
|--|------------------------|--------|--------|--------|---------|----------|----------|-------|
| | 0-<10 | 10-<25 | 25-<50 | 50-<75 | 75-<100 | 100-<200 | 200-<400 | ≥ 400 |
| Alle | | | | | | | | |
| Viertelgemelksproben mit mikrobiologischem Befund (n = 1.216) | 191 | 230 | 192 | 93 | 72 | 170 | 111 | 157 |
| Viertelgemelksproben mit alleinigem KNS-Befund (n = 427) | 78 | 65 | 72 | 32 | 34 | 74 | 44 | 28 |
| Relativer Anteil (%) der KNS-Befunde | 40,8 | 28,3 | 37,5 | 34,4 | 47,2 | 43,5 | 39,6 | 17,8 |

Die verschiedenen KNS-Spezies waren in unterschiedlichem Ausmaß mit erhöhten Zellzahlen assoziiert. Die unter Abbildung 7 und 8 zusammengefassten Netzdiagramme geben eine Übersicht über die einzelnen Spezies. Aus diesen Diagrammen geht jeweils hervor, ob eine bestimmte KNS-Spezies eher mit niedrigen oder eher mit höheren Zellzahlen assoziiert war bzw. ob die Häufigkeit in allen Zellzahlklassen relativ ähnlich war.

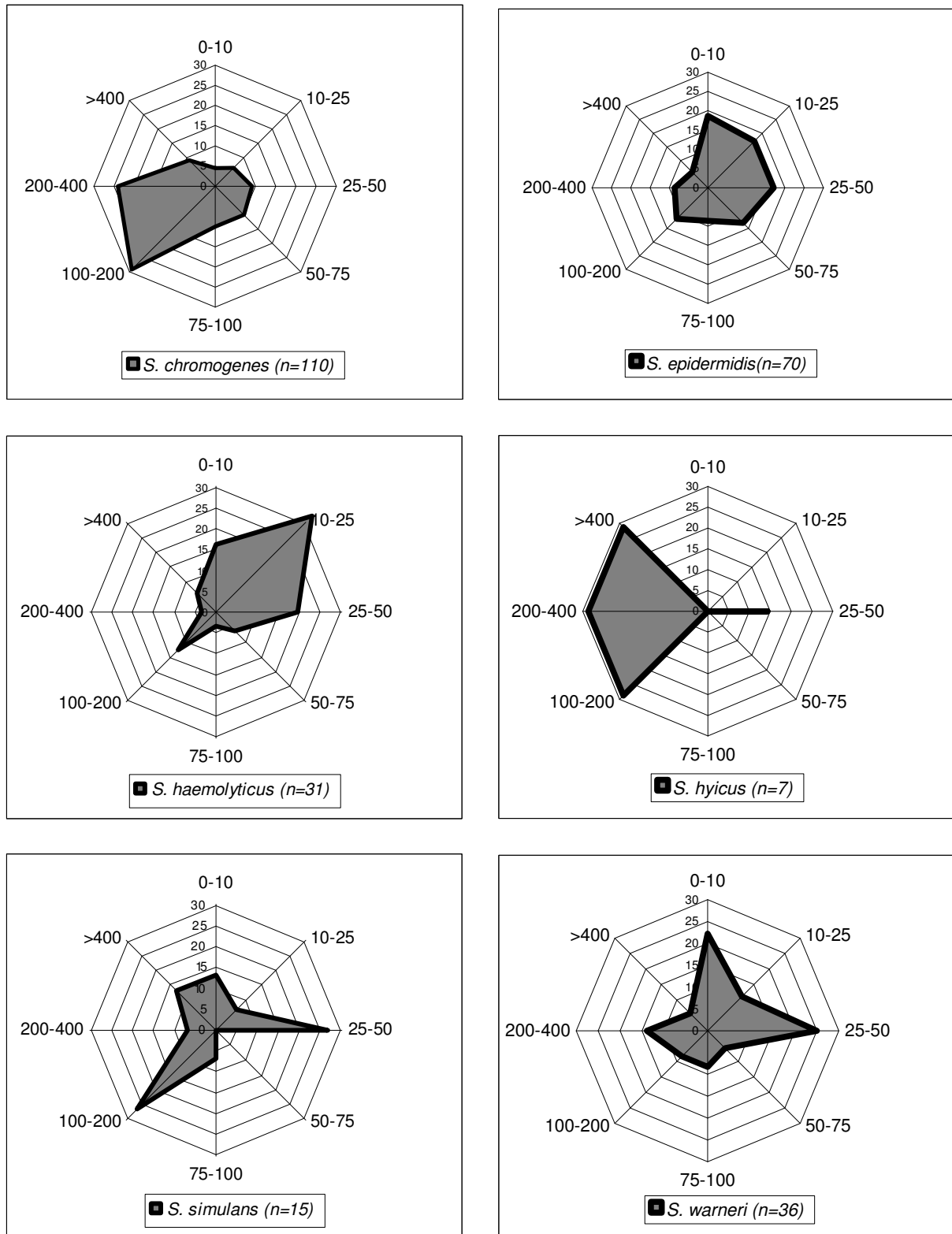


Abbildung 7: Zellzahlverhältnisse der Viertel mit novobiocin-sensiblen KNS. Nicht dargestellt ist *S. hominis* (n = 1). Die Speichen des Netzdiagramms geben die Häufigkeit an, die für die betreffende KNS-Spezies in der jeweiligen Zellzahlklasse ermittelt wurde. Die Eckpunkte geben die jeweilige Zellzahlklasse x 1000 Z/ml an. Die genaue Grenzwertsetzung erfolgte dabei folgendermaßen: 0-<10, 10-<25, 25-<50, 50-<75, 75-<100, 100-<200, 200-<400 und ≥ 400 .

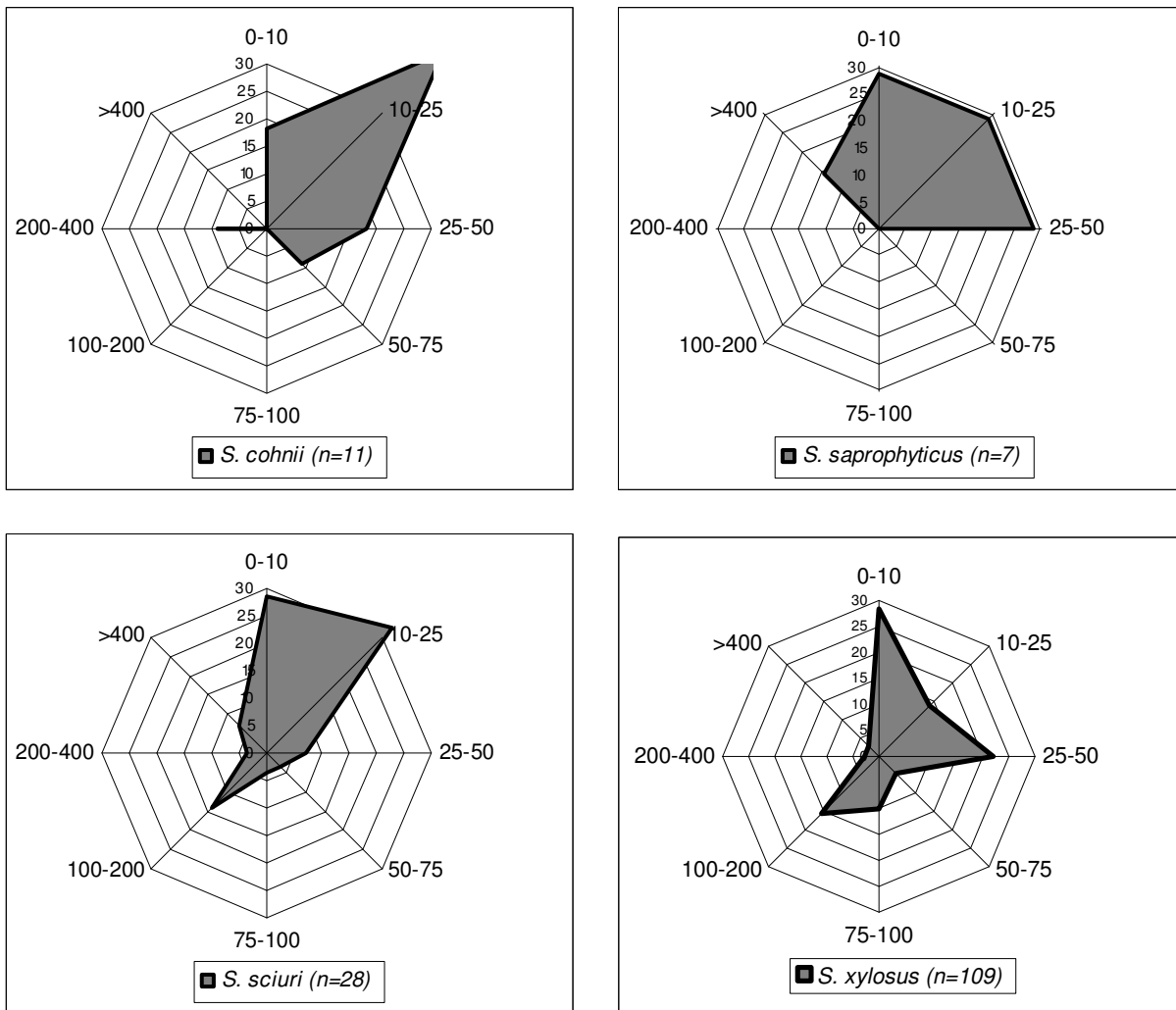


Abbildung 8: Zellzahlverhältnisse der Viertel mit novobiocin-resistenten KNS. Nicht dargestellt ist *S. lentus* (n = 2). Die Speichen des Netzdiagramms geben die Häufigkeit an, die für die betreffende KNS-Spezies in der jeweiligen Zellzahlklasse ermittelt wurde. Die Eckpunkte geben die jeweilige Zellzahlklasse x 1000 Z/ml an. Die genaue Grenzwertsetzung erfolgte dabei folgendermaßen: 0-<10, 10-<25, 25-<50, 50-<75, 75-<100, 100-<200, 200-<400 und ≥ 400 .

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass Unterschiede zwischen den KNS-Spezies in Bezug auf die Häufigkeit ihres Auftretens in verschiedenen Zellzahlkategorien für novobiocin-sensible und novobiocin-resistente Spezies feststellbar waren. Die novobiocin-resistenten Isolate waren zu einem überwiegenden Anteil mit einem Zellzahlbereich von < 100.000 Z/ml assoziiert. Die Gruppe der novobiocin-sensiblen KNS kann wiederum in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zur Gruppe, die wie die novobiocin-resistenten Isolate eher in Vierteln mit niedrigerer Zellzahl vorkommen, gehörten *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* und *S. warneri*. *S. chromogenes* und *S. hyicus* fanden sich dagegen vermehrt in Vierteln mit Zellzahlen von ≥ 100.000 Z/ml. *S. simulans* konnte nicht eindeutig einer der Gruppen zugeordnet werden. Die

zusammenfassende Abbildung 9 (A und B) verdeutlicht die Beziehungen der angeführten Gruppen zu den Zellzahlen.

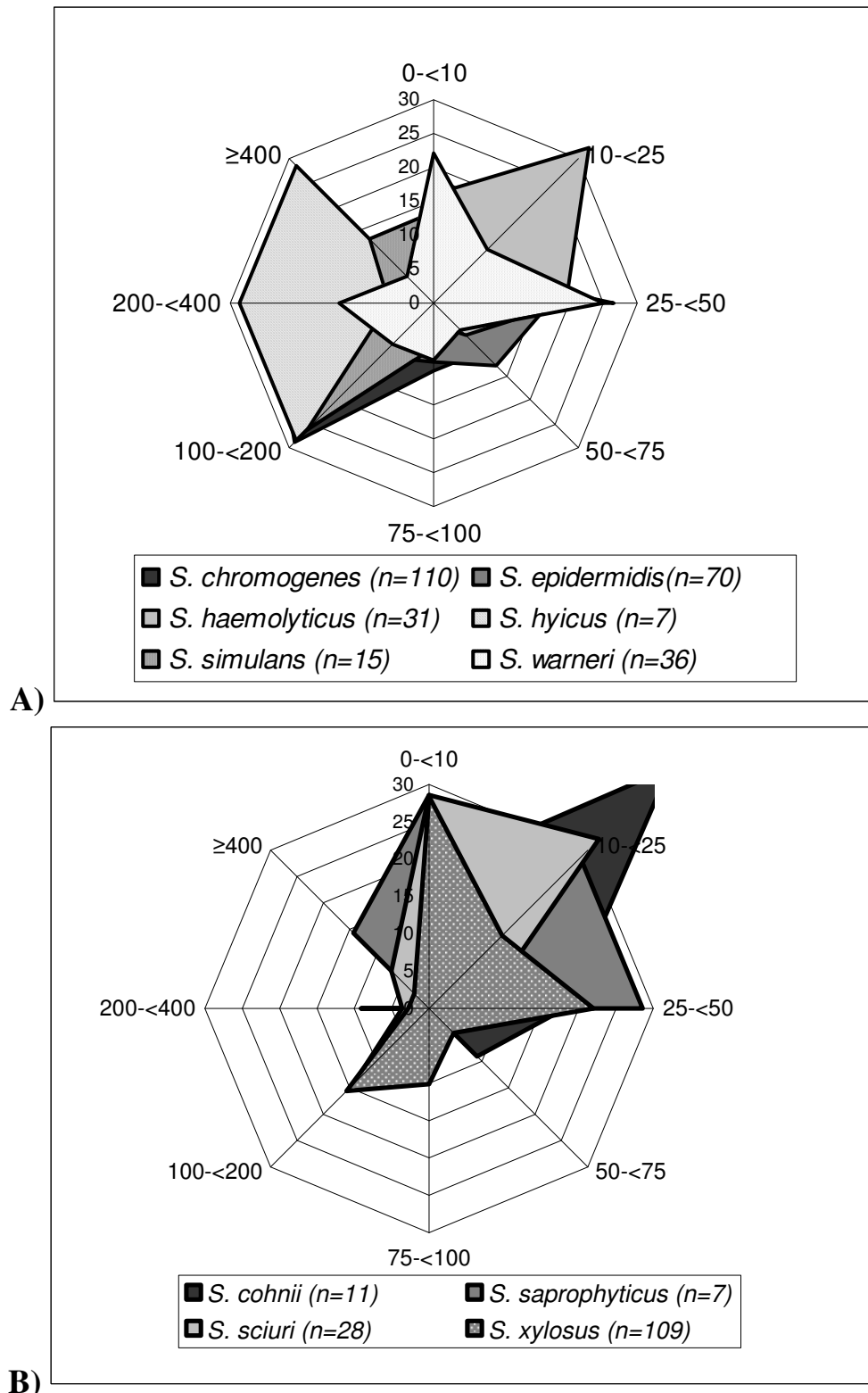


Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung des Zusammenhangs eines Nachweises novobiocin-sensibler (A) bzw. novobiocin-resistenter (B) KNS und der Einstufung in eine bestimmte Zellzahlklasse. Nicht dargestellt ist der novobiocin-sensible *S. hominis* (n = 1) bzw. der novobiocin-resistente *S. lentus* (n = 2). Die Speichen des Netzdiagramms geben die Häufigkeit an, die für die betreffende KNS-Spezies in der jeweiligen Zellzahlklasse ermittelt wurde. Die Eckpunkte geben die jeweilige Zellzahlklasse in 1000 Z/ml an.

Vergleicht man das 25., 50. und 75. Perzentil der Zellzahlwerte der Viertel, in denen jeweils nur eine KNS-Spezies nachgewiesen wurde, mit den nachgewiesenen KNS-Spezies, so zeigte sich auch hier, dass *S. chromogenes* und *S. hyicus* mit höheren Zellzahlwerten korrelierten als die anderen KNS-Spezies. Die Perzentilwerte sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Vergleich des 25., 50. und 75. Perzentils der Zellzahlwerte von Viertelgemelksproben, die für einzelne KNS-Spezies positiv waren

| KNS-Spezies | Perzentil der Zellzahl (x 1000/ml) | | |
|--------------------------------|------------------------------------|------|-------|
| | 25 | 50 | 75 |
| <i>S. chromogenes</i> (n=110) | 63 | 121 | 234 |
| <i>S. epidermidis</i> (n=70) | 13,5 | 46 | 111 |
| <i>S. haemolyticus</i> (n= 31) | 14 | 23 | 61 |
| <i>S. hominis</i> (n=1) | - | - | - |
| <i>S. hyicus</i> (n=7) | 156 | 211 | 557 |
| <i>S. simulans</i> (n=15) | 29 | 86 | 180 |
| <i>S. warneri</i> (n=36) | 12,5 | 38,5 | 156,5 |
| <i>S. cohnii</i> (n=11) | 12 | 14 | 33 |
| <i>S. lentus</i> (n=2) | - | - | - |
| <i>S. saprophyticus</i> (n=7) | 6 | 20 | 43 |
| <i>S. sciuri</i> (n=28) | 9 | 18,5 | 89,5 |
| <i>S. xylosus</i> (n=109) | 8 | 31 | 85 |

Aus Tabelle 23 geht hervor, dass bei *S. chromogenes* und *S. hyicus* 25 % der betroffenen Viertel Zellzahlen von über 200.000 Z/ml aufwiesen. Das 75ste Perzentil der Zellzahlwerte von Viertelgemelksproben, in denen *S. epidermidis*, *S. simulans* und *S. warneri* nachgewiesen worden waren, lag bei > 100.000 Z/ml. Alle novobiocin-resistenten Spezies lagen dagegen selbst im 75sten Perzentil < 100.000 Z/ml.

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, erhöhten die KNS im Durchschnitt die Zellzahl im 75. Perzentil um das 2,8fache des Wertes, den die Viertelgemelksproben mit negativem mikrobiologischen Befund aufwiesen. Im 90. Perzentil erhöhte sich die Zellzahl in den Vierteln mit KNS-Befund um das 2,3fache gegenüber bakteriologisch negativen Proben. Betrachtet man

S. chromogenes allein, so lag die Zellzahl im 75. Perzentil um das 4,5fache höher als bei Vierteln ohne mikrobiologischen Befund. Gegenüber der Zellzahl aller KNS-Spezies im Durchschnitt lag *S. chromogenes* im 75. Perzentil um das 1,7fache höher. Im 90. Perzentil lag der Zellzahlwert von Eutervierteln mit *S. chromogenes* 2,8fach über dem von Vierteln ohne mikrobiologischen Befund.

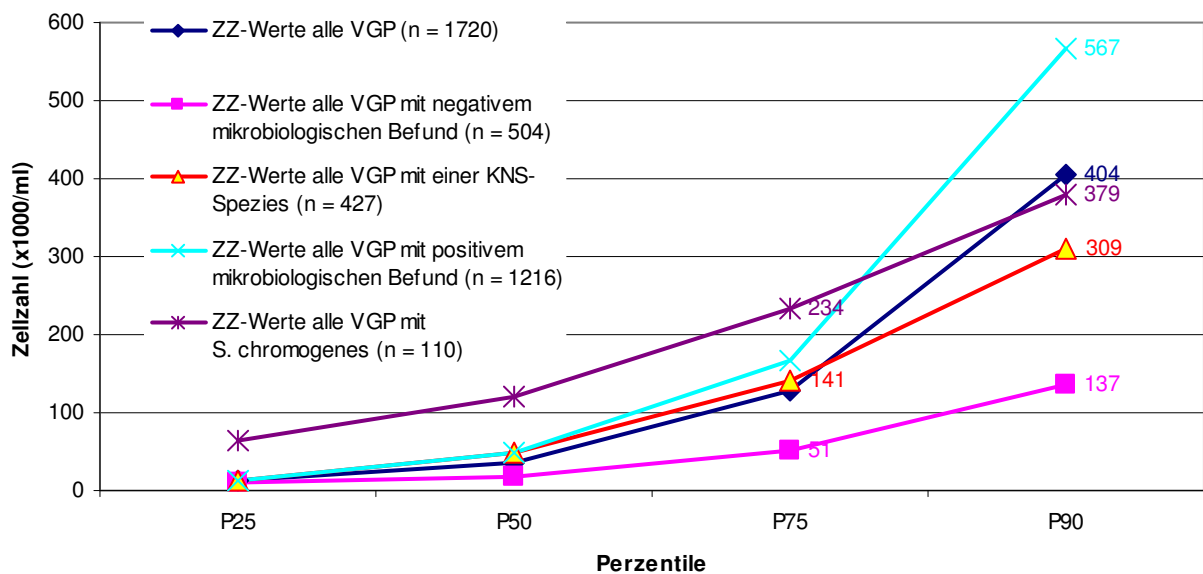


Abbildung 10: Vergleich des 25., 50., 75. und 90. Perzentils der somatischen Zellzahlen von Viertelgemelksproben mit verschiedenem mikrobiologischen Befund

In der in Abbildung 10 verwendeten Skalierung werden durch KNS bedingte erhöhte Zellzahlwerte erst ab dem 75. Perzentil deutlich. Trägt man die Zellzahlen logarithmisch auf und sortiert die Viertel nach ansteigender Zellzahl, so ergibt sich Abbildung 11. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt bei den Vierteln ohne mikrobiologischen Befund 0,61, bei den Vierteln mit einer KNS-Spezies liegt sie bei 1,66. Dies kennzeichnet einen deutlichen Trend zu höheren Zellzahlen durch KNS.

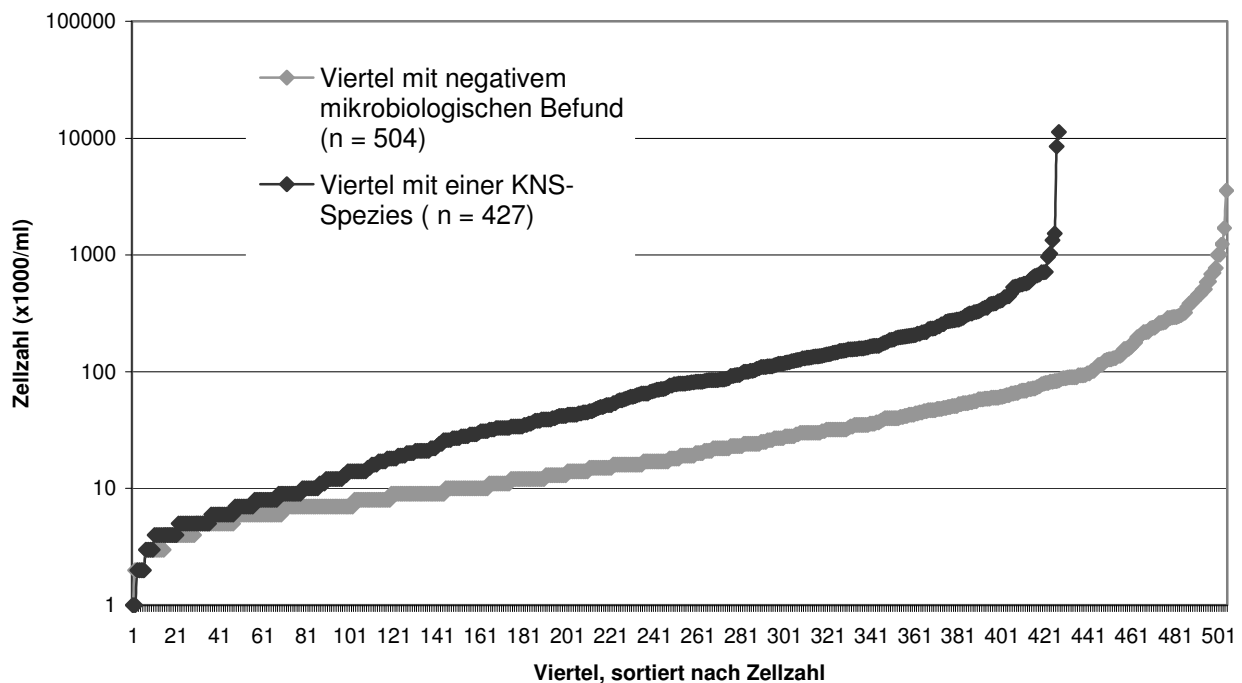


Abbildung 11: Vergleich der Zellzahlen in Viertelgemelksproben mit negativem mikrobiologischen Befund (n=504) und der Viertelgemelksproben mit alleinigem Befund einer KNS-Spezies (n=427)

4.4 Keimdichte (Intensität) der KNS-Spezies in Viertelgemelksproben

Die Betrachtung der Vorkommensintensität bei den KNS-Spezies zeigt, dass eine höhere Intensität (= Koloniezahl in der Erstisolierung) mit einer Tendenz zu höheren Zellzahlwerten einhergeht. Die 427 „alleinigen“ KNS-Befunde in Viertelgemelksproben wurden nach der Intensität, mit der die KNS-Spezies festgestellt worden waren, in vier Gruppen eingeteilt. Die prozentuale Verteilung, mit der KNS mit unterschiedlichen Intensitäten in Vierteln mit verschiedener Zellzahl vorkamen, ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Prozentuale Verteilung der Intensitäten in verschiedenen Zellzahlkategorien

| Intensität | Zellzahl (x1000/ml) | | | | | | | |
|-------------------|---------------------|--------|--------|--------|---------|----------|----------|-------|
| | 0-<10 | 10-<25 | 25-<50 | 50-<75 | 75-<100 | 100-<200 | 200-<400 | ≥ 400 |
| 1+ (n=90) | 27,8 | 23,3 | 11,1 | 11,1 | 6,7 | 7,8 | 11,1 | 5,6 |
| 2+ (n=85) | 25,9 | 23,5 | 21,2 | 2,4 | 8,2 | 10,6 | 5,9 | 2,4 |
| 3+ (n=212) | 13,2 | 10,8 | 18,9 | 7,5 | 9,4 | 21,7 | 10,8 | 7,5 |
| 4+ (n=40) | 7,5 | 2,5 | 10,0 | 10 | 2,5 | 30,0 | 25,0 | 12,5 |

KNS waren insgesamt eher mit den Intensitäten 3+ und 4+ als einziger mikrobiologischer Befund in Viertelgemelksproben nachweisbar, als wenn ihre Intensität lediglich 1+ oder 2+ betrug. Werden die Daten für niedrige KNS-Intensität (1+ und 2+) sowie für hohe KNS-Intensität (3+ und 4+) jeweils gepoolt und diese zwei Teilgruppen mit Zellzahlwerten von < 100.000 Z/ml bzw. ≥ 100.000 Z/ml in Bezug gesetzt, so ergeben sich die in Tabelle 25 gezeigten Verhältnisse. In Tabelle 26 ist diese Beziehung analog nur für *S. chromogenes* dargestellt.

Tabelle 25: Intensität der gesamten KNS in Bezug zur Zellzahl

| Intensität | | % der Viertel mit Zellzahlen von | |
|----------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| | | < 100.000 Z/ml | ≥ 100.000 Z/ml |
| 1+ / 2+ | (n=175) | 80,6 | 19,4 |
| 3+ / 4+ | (n=252) | 55,6 | 44,4 |

Tabelle 26: Intensität von *S. chromogenes* in Bezug zur Zellzahl

| Intensität | | % der Viertel mit Zellzahlen von | |
|----------------|---------------|----------------------------------|----------------|
| | | < 100.000 Z/ml | ≥ 100.000 Z/ml |
| 1+ / 2+ | (n=21) | 61,9 | 38,1 |
| 3+ / 4+ | (n=89) | 34,8 | 65,2 |

Bei den höheren Intensitäten (3+ und 4+) lag somit der prozentuale Anteil der Viertel mit Zellzahlen ≥ 100.000 Z/ml um das 2,3fache höher als bei den Vierteln, die KNS in geringerer Keimdichte (Intensität 1+ und 2+) enthielten. Wie aus Tabelle 25 und Tabelle 26 hervorgeht, liegt *S. chromogenes* auch in Bezug auf diesen Aspekt über dem Durchschnitt aller KNS. Schon bei relativ geringen Keimichten (1+ und 2+) lagen Viertel, die *S. chromogenes* als alleinigen Befund aufwiesen, doppelt so häufig im Zellzahlbereich ≥ 100.000 Z/ml, als für KNS insgesamt festgestellt wurde.

4.5 Vergleich der vereinfachten biochemischen Differenzierung und der biochemischen Differenzierung mittels api[®]Staph-System

In der Gruppe der novobiocin-sensiblen KNS wurde stichprobenartig ein Teil (n = 84) der Isolate vergleichend mit dem api[®]Staph-System differenziert. Dabei stimmten 56 Ergebnisse mit dem Differenzierungsergebnis der vereinfachten Differenzierung überein (d.h. das Ergebnis des Api an erster Stelle war dieselbe Spezies, und die Identifizierung lag bei ≥ 40 % Wahrscheinlichkeit). Bei 28 Isolaten stimmte das Ergebnis nicht überein. Hierbei wiesen jedoch die api[®]Staph-Ergebnisse die nach der vereinfachten biochemischen Differenzierung bestimmten KNS-Spezies in zehn Fällen als zweitwahrscheinlichste Spezies auf. Es wurden grundsätzlich die Ergebnisse der vereinfachten biochemischen Differenzierung in die Auswertung aufgenommen. Lediglich im Betrieb 2 wurden 12 Isolate, die nach der vereinfachten Differenzierung als *S. simulans* bestimmt worden wären, aufgrund mehrfacher api[®]Staph-Ergebnisse letztendlich als *S. haemolyticus* identifiziert. Alle diese 12 Isolate wiesen eine markante Koloniemorphologie in orangener Pigmentierung und ein deutliches Hämolyseverhalten auf. In der Gruppe der novobiocin-resistenten KNS wurden 36 vergleichende Differenzierungen mit dem api[®]Staph-System durchgeführt. Dabei zeigte das Ergebnis in 29 Fällen Übereinstimmung, in sieben Fällen Abweichung. Die Übereinstimmung lag damit bei 80,6 %. Bei einem Isolat wurde im Api-Ergebnis die im vereinfachten Schema differenzierte Art als am zweitwahrscheinlichsten angegeben. Eine vergleichende Übersicht über die novobiocin-sensiblen und die novobiocin-resistenten KNS, ebenso über die einzelnen KNS-Spezies in den Wahrscheinlichkeitsbereichen des api[®]Staph, zeigt Tabelle 27.

Tabelle 27: Übersicht über Wahrscheinlichkeitsangaben zur Speziesidentifizierung des api®Staph-Systems für die KNS, bei denen übereinstimmende Identifizierung im vereinfachten biochemischen Differenzierungssystem und dem api®Staph-System festgestellt wurde

| Anzahl der Apis | Wahrscheinlichkeitsbereich api®Staph in % | | | | | |
|---|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| | ≥90-100 | ≥80-<90 | ≥70-<80 | ≥60-<70 | ≥50-<60 | ≥40-<50 |
| Novobiocin-sensible Isolate (n=56) | 20 | 16 | 12 | 0 | 4 | 4 |
| Novobiocin-resistente Isolate (n=29) | 19 | 3 | 5 | 2 | 0 | 0 |
| <i>S. chromogenes</i> (n=25) | 10 | 8 | 6 | 0 | 0 | 1 |
| <i>S. epidermidis</i> (n=6) | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. haemolyticus</i> (n=11) | 0 | 2 | 4 | 0 | 3 | 2 |
| <i>S. hyicus</i> (n=11) | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. simulans</i> (n=5) | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>S. warneri</i> (n=4) | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>S. cohnii</i> (n=3) | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. lentus</i> (n=1) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. saprophyticus</i> (n=4) | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>S. sciuri</i> (n=5) | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. xylosus</i> (n=16) | 14 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |

Grundsätzlich war die Differenzierung und Identifizierung der novobiocin-resistenten Isolate einfacher als die der novobiocin-sensiblen KNS. Unter den novobiocin-sensiblen KNS ließen sich *S. chromogenes* und *S. hyicus* mit beiden Methoden am zuverlässigsten differenzieren. Dabei fiel auf, dass 84 % der isolierten *S. chromogenes*-Isolate eine positive DNasereaktion zeigten.

4.6 Ergebnisse der Antibiotikasensitivitätstests

Insgesamt wurden 283 KNS-Isolate auf ihr Resistenzverhalten gegenüber den in Trockenstellern enthaltenen Antibiotika Penicillin G, Streptomycin, Neomycin, Cloxacillin, Cefquinom, Cefapirin und Cefazolin getestet. Von diesen 283 Isolaten zeigten 69 (24,4 %) eine Resistenz gegenüber Penicillin G, 21 (7,4 %) reagierten resistent gegenüber Streptomycin, zwei (2,9 %) Isolate verhielten sich gegenüber Neomycin resistent. Ein Isolat, bei dem es sich um *S. xylosus*

handelte, reagierte resistent gegenüber Cloxacillin, wobei der Hemmhofdurchmesser genau bei 15 mm lag. Kein Isolat zeigte eine Resistenz gegenüber den Cephalosporinen Cefquinom, Cefapirin und Cefazolin, wobei nach der DIN 58940 ein gegenüber Cloxacillin (in der DIN selber ist nur Oxacillin angegeben) resistentes Verhalten gleichzeitig eine resistente Einordnung gegenüber allen Cephalosporinen bedingt. Die Häufigkeit von Resistenzen war nicht gleichmäßig über die KNS-Spezies und auch nicht gleichmäßig über die einzelnen Betriebe verteilt. Abbildung 12 zeigt die Häufigkeit einer Resistenz gegenüber Penicillin G für die einzelnen KNS-Spezies.

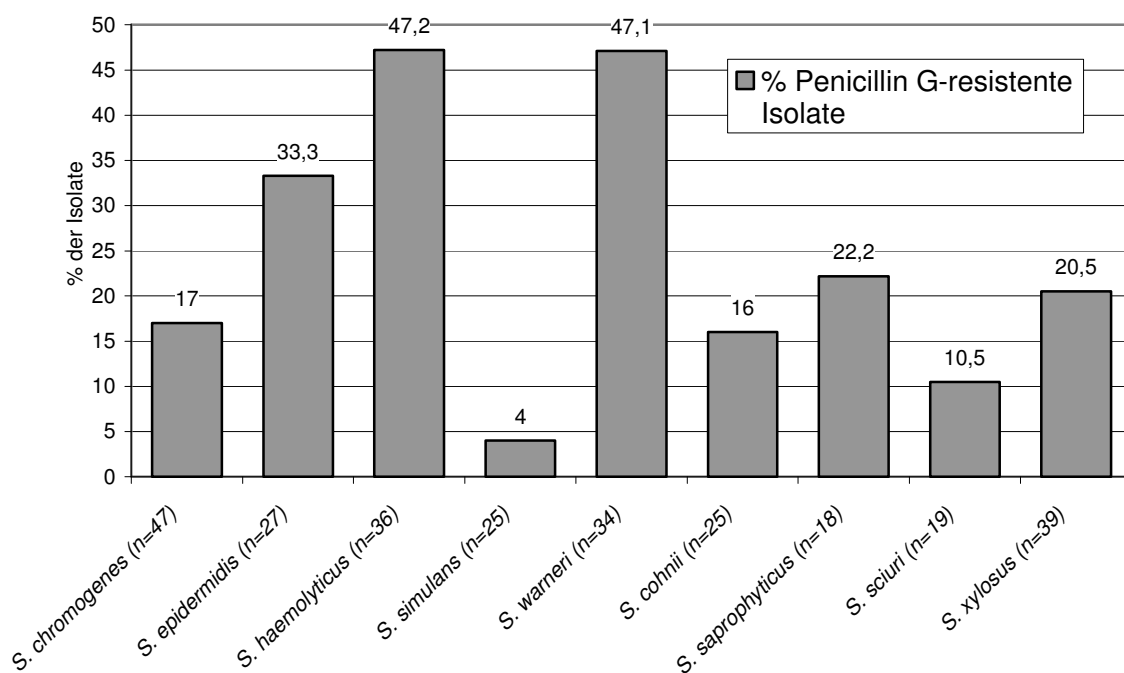


Abbildung 12: Penicillin G-Resistenz der KNS-Spezies. Nicht dargestellt sind *S. hyicus* (n=5) und *S. lentus* (n=3), bei diesen beiden Spezies trat keine Resistenz gegenüber Penicillin G auf.

Die phylogenetisch nah verwandten Spezies *S. haemolyticus* und *S. warneri* wiesen mit 47,2 % und 47,1 % die höchsten Resistenzraten gegenüber Penicillin G auf. Bei Betrachtung der Resistenzhäufigkeit in Abhängigkeit vom Ursprung der KNS (Betrieb) zeigte sich, dass hier erhebliche Unterschiede existierten (Tabelle 28). Die Häufigkeit Penicillin G-resistenter KNS lag je nach Betrieb zwischen 5,9 % und 43,8 %.

Tabelle 28: Überblick über die resistent reagierenden Isolate der Betriebe

| Betrieb | n | Anzahl resistenter Isolate gegen | | | | |
|---------|----|----------------------------------|--------------|----------|-------------|----------------|
| | | Penicillin G | Streptomycin | Neomycin | Cloxacillin | Cephalosporine |
| 2 | 14 | 2 (14,3 %) | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 3 | 12 | 3 (25,0 %) | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 13 | 5 (38,5 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 15 | 3 (20,0 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 11 | 4 (36,4 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 16 | 4 (25,0 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 16 | 7 (43,8 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 24 | 5 (20,8 %) | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 24 | 7 (29,2 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 17 | 1 (5,9 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 18 | 3 (16,7 %) | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 17 | 5 (29,4 %) | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 24 | 5 (20,8 %) | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 23 | 7 (30,4 %) | 7 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 22 | 3 (13,6 %) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 17 | 5 (29,4 %) | 3 | 2 | 0 | 0 |

n = Anzahl der aus dem Betrieb getesteten KNS-Isolate

Die Isolate einer KNS-Spezies eines Betriebes reagierten jedoch nicht grundsätzlich gleich. Es ließen sich in mehreren Betrieben Beispiele finden, in denen das resistente Verhalten in einer Spezies deutlicher hervortrat als in anderen. So reagierten im Betrieb 8 alle drei getesteten *S. haemolyticus*- und *S. warneri*-Isolate resistent gegenüber Penicillin G. Dasselbe Bild zeigte sich beim Betrieb 10. Aus Betrieb 14 reagierten ebenfalls alle drei *S. haemolyticus*-Isolate resistent. Aus Betrieb 15 wiesen die drei getesteten *S. epidermidis*-Isolate eine Resistenz sowohl gegenüber Penicillin G als auch gegenüber Streptomycin auf. Im Betrieb 17 zeigten die drei *S. chromogenes*-Isolate ein resistentes Verhalten gegenüber Penicillin G, wobei zwei dieser Isolate auch gegen Streptomycin resistent reagierten.

5 DISKUSSION

5.1 Allgemein

Die Milchproduktion ist in Deutschland nach wie vor der wichtigste Erwerbszweig in der Landwirtschaft. In den vergangenen Jahrzehnten haben weitreichende Veränderungsprozesse hinsichtlich der Betriebsanzahlen, der durchschnittlich gehaltenen Milchkühe, der jährlichen Milchleistung pro Kuh und der Bezahlung für die Anlieferungsmilch stattgefunden. Im Jahr 2003 lag die Herdendurchschnittsgröße aller deutschen Milchkuhhaltungen bei 36 Tieren (BMELV, 2005).

Die in dieser Studie untersuchten Herden wiesen Tierzahlen zwischen 34 und 279 Tieren auf. Der Herdendurchschnitt dieser 16 Betriebe lag mit 84 Tieren in den Jahren 2005/2006 deutlich über dem Bundesdurchschnitt. Dieser Unterschied ist dadurch bedingt, dass in dieser Studie keine Herden mit weniger als 30 Tieren einbezogen worden waren. Auch die angegebenen Jahresmilchleistungen lagen im Durchschnitt mit 8.800 kg über den von der ADR (2007) beschriebenen 7.933 kg. Bei den beprobten Tieren handelte es sich fast ausschließlich um Kühe der Rasse Deutsche Holstein, während in den Bundesdurchschnitt auch Tiere mit rassebedingter niedrigerer Milchproduktion eingehen.

Diese Leistungen können nur von gesunden Tieren erbracht werden. Obwohl der Milchzahlungspreis im September 2007 auf 38,4 Cent/kg gestiegen war (ANONYM, 2007b), bedeutet jeder Milchverlust weiterhin einen Einkommensverlust für die betroffenen Landwirte. Die Mastitis wird von einer Vielzahl von Autoren als die teuerste Erkrankung im gesamten Milchviehsektor beschrieben. Darunter ist die subklinische Mastitis laut TOLLE (1977) der dauerhafteste und am weitesten verbreitete Krankheitskomplex. Der Autor hielt ebenfalls fest, dass es sich bei der Mastitis des Rindes um eine Faktorenerkrankung handelt.

In anderen Ländern wird den koagulase-negativen Staphylokokken mittlerweile große Bedeutung im Zusammenhang mit subklinischer Mastitis zugesprochen, wie ein kürzlich erschienenes Sonderheft von „Veterinary Microbiology“ demonstriert (DE Vlieghe et al., 2009). Für Deutschland gibt es kaum Untersuchungen hierzu, insbesondere nicht bei „Normalbetrieben“ ohne kritische Situation in Bezug auf Mastitis.

Ziel dieser Arbeit war es, Viertelgemelksproben von „gesunden“ Kühen, die aus typischen mittelhessischen Milchviehhaltungen, jedoch mit möglichst niedriger durchschnittlicher

Tankmilchzellzahl, stammten, auf Mastitiserreger im Allgemeinen und im Besonderen auf KNS spp. zu untersuchen. Dies unter der Annahme, dass mögliche Effekte von KNS im Vergleich zu eutergesunden Tieren vor allem in „guten“ Zellzahl – Betrieben zu beobachten sein müssten, da hier weniger Überlagerung durch andere Mastitiseime zu erwarten war. Zusätzlich zur bakteriologischen Untersuchung wurde in jeder Viertelgemelksprobe die somatische Zellzahl quantitativ bestimmt, um hier einen Zusammenhang zwischen positiven KNS-Befunden und der Eutergesundheit ermitteln zu können.

5.2 Somatischer Zellgehalt in Viertelgemelksproben

Obwohl auch andere Parameter geeignet wären, eine Aussage über den Gesundheitszustand eines Euters oder eines Euterviertels zu treffen, hat sich beim laktierenden Rind weltweit die Betrachtung der somatischen Zellzahl als ausschlaggebendes Kriterium durchgesetzt. Auch in der Verordnung (EG) 853/2004 wird die somatische Zellzahl als wesentliches Qualitätskriterium beibehalten. Es gilt für Anlieferungsmilch eine Grenze von 400.000 Z/ml. Milch, die im geometrischen Mittel über drei Monate über diesem Wert liegt, darf nicht in Verkehr gebracht werden. Dieser Wert ist jedoch primär ein Kompromiss zwischen den Interessen der Milcherzeuger und der Molkerei und hat nichts mit der Eutergesundheit des Einzeltieres gemeinsam. Heute werden 100.000 Z/ml als allgemeiner „Grenzwert“ zwischen „gesund“ und den „Normalbereich verlassend“ angesehen (DOGGWEILER und HESS, 1983; HAMANN, 1992). Die vorliegende Untersuchung bestätigt diese Einstufung. Von allen untersuchten Viertelgemelksproben lagen 70,9 % unter dem Wert von 100.000 Z/ml. Insgesamt lagen aber auch 57,4 % aller Werte unter 50.000 Z/ml. Dies deckt sich mit der Beobachtung von DOGGWEILER und HESS (1983), die einen Zellgehalt von 20.000 Z/ml bei Erstlaktierenden in der Schweiz als normal einstufen. Dies zeigt, dass eine subklinische Mastitis auch bereits bei Werten von unter 100.000 Z/ml stattfinden kann und somit zu der von TOLLE (1977) und von DE GRAAF und DWINGER (1996) beschriebenen Milchminderproduktion sowie Beeinträchtigung der Milchzusammensetzung führen kann. Die Grenze der rechtlichen Bedeutung von 400.000 Z/ml liegt trotz bereits zuvor zu erwartender Milchgeldverluste erheblich höher.

5.3 Mastitiserreger in Milch aus unauffälligen Eutervierteln

Da in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich Milchproben von Tieren genommen wurden, die am Probetag regulär als „gesund“ gemolken wurden und somit keinerlei Erkrankungsanzeichen aufwiesen, war es zu erwarten, dass die Befunde an „major pathogens“ gegenüber den oftmals so genannten „minor pathogens“ deutlich geringer sein würden. GREEN et al. (2002) zählten zur Gruppe der „minor pathogens“ lediglich die KNS sowie *Corynebacterium* spp. So wurden in den untersuchten Proben auch in absteigender prozentualer Häufigkeit folgende Mastitiserreger festgestellt: KNS, äskulin-positive Streptokokken, *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* und *Kocuria* spp., *S. aureus*, Hefen, äskulin-negative Streptokokken, *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Pseudomonas* und *Proteus* spp. Obwohl *Sc. uberis* von GREEN et al. (2002) als „major pathogen“ eingestuft wurde, gehört dieser Erreger gleichzeitig laut HAMANN und FEHLINGS (2002) zusammen mit den Enterokokken und *E. coli* in die Gruppe der umweltassoziierten Mastitiserreger, die seit der erfolgreichen Verdrängung der kuhassoziierten Mastitiserreger eine immer größere Bedeutung erlangen. Es ist wichtig festzuhalten, dass, obwohl in sehr viel geringerer Anzahl, auch „major pathogens“ aus klinisch völlig unauffälligen Vierteln isoliert wurden, dabei waren die Zellzahlen jedoch meistens sehr stark erhöht. Dies verdeutlicht, dass auch bei diesen als stärker pathogen eingestuften Erregern nicht zwangsläufig bei Vorhandensein das Krankheitsbild einer klinischen Mastitis ausgelöst wird. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass trotz aller Bemühungen um optimale Probennahme in einzelnen Fällen eine Sekundärkontamination stattfand; es erscheint jedoch dagegen unwahrscheinlich, dass hier jeweils der Beginn einer Infektion erfasst wurde. Dies bestätigt die Einstufung der Mastitis als Faktorenerkrankung (TOLLE et al., 1977).

5.4 KNS und KNS-Spezies in Viertelgemelksproben

Während die Bedeutung von KNS in der Humanmedizin heute allgemein anerkannt ist (ARCHER und CLIMO, 1994; HEIKENS et al., 2005), wird sie in der Veterinärmedizin in Bezug auf Mastitiserreger sehr kontrovers diskutiert. Einige aktuelle Arbeiten zeigen jedoch, dass sich diese Einschätzung zumindest in solchen Ländern ändert, in denen die „klassischen“ Mastitiserreger (major pathogens) auch im Bereich der subklinischen Mastitis allmählich zurückgedrängt wurden. Hier spielen KNS teilweise als klinische Mastitiserreger, überwiegend

jedoch als subklinische Erreger eine immer bedeutendere Rolle, insbesondere bei der Färsenmastitis (FOX, 2009).

Bei Sichtung der existierenden Literatur fällt auf, dass es kaum Studien aus dem deutschsprachigen Raum zur heutigen Bedeutung von KNS in Milchviehbetrieben gibt. Ein Vergleich der Ergebnisse über das prozentuale Auftreten einzelner KNS spp. in Milchproben unter Verwendung älterer Literatur ist teilweise schwierig, da ständig neue Spezies entdeckt und benannt wurden (Tabelle 2). DEVRIESE et al. (1994) beschrieben KNS als Erreger, die weltweit bei subklinischen Mastitiden isoliert wurden. Ebenso wie bei PITKÄLÄ et al. (2004) stellten die KNS auch in der vorliegenden Untersuchung die am häufigsten isolierten Mastitiserreger dar. Die vorliegende Studie bestätigt ebenfalls, dass die novobiocin-sensiblen KNS die dominierende Gruppe in Viertelgemelksproben darstellen (DEVRIESE et al., 2002). Auch die Beschreibung von DEVRIESE et al. (1994), dass *S. xylosus* die einzig bedeutsame KNS-Spezies in Milchproben ist, kann bestätigt werden. Es ist allerdings zu beachten, dass die Mehrzahl der *S. xylosus*-Isolate aus einem Betrieb stammte.

Auch ein Vergleich weltweiter Studien bezüglich der Vorkommenshäufigkeit von KNS gestaltet sich schwierig, da oftmals verschiedene Grenzkriterien bezüglich der zu beachtenden KbE benutzt wurden. Der Anteil der in dieser Studie ermittelten 45,9 % für KNS-positive Viertel erscheint im Vergleich sehr hoch. GILLESPIE et al. (2009) beispielsweise fanden in einer Untersuchung in den USA in 11,3 % der untersuchten Viertelgemelksproben (n = 12.412) KNS. Für 383 Isolate wurden weitere Untersuchungen zur Speziesidentifizierung durchgeführt. *S. chromogenes* (48 %) überwog deutlich vor *S. hyicus* (26 %). Diese Autoren werteten jedoch nur Proben mit > 5.000 KbE/ml aus, so dass hier bereits ein recht massiver Befall gegeben war. Mit den eigenen Untersuchungen sind diese Daten daher nur bedingt vergleichbar, zeigen aber in jedem Fall die große Bedeutung von *S. chromogenes*. TENHAGEN et al. (2006) gaben in einer anderen Untersuchung nur 9,1 % KNS-positive Befunde an, dabei wurden aber erst Infektionen ab 1.000 KbE/ml erfasst, während die vorliegende Arbeit bereits Infektionen ab 50 KbE/ml mit einbezog. Die Gefahr, teilweise bloße Kontaminationen mit in die Auswertung einbezogen zu haben, ist zwar nicht völlig auszuschließen, steht aber der Abwägung gegenüber, keine Aussage über die Wirkung von KNS in niedrigeren KbE-Bereichen treffen zu können. Die Tabellen 3 und 4 machen deutlich, dass es beim Vergleich von prozentualen Vorkommenshäufigkeiten wichtig ist, genau zu differenzieren, welche Untergruppen und welches Probenmaterial betrachtet wurden. Die Tabelle 3 zeigt deutlich das weltweite häufige Vorkommen von KNS in Milchproben. SAMPIMON et al. (2007) stellten bei 14,1 % der Tiere mit klinischer Mastitis

KNS als Erreger fest. Damit sollten die KNS nicht nur im Rahmen von Zellzahlerhöhungen und subklinischer Mastitis betrachtet werden, sondern als ein ernstzunehmender Faktor innerhalb des Krankheitskomplexes Mastitis. Die Pathogenität der KNS-Spezies bleibt sicherlich weit hinter der von *S. aureus* oder *E. coli* zurück. Durch ihr hohes Vorkommen in den Milchkuhherden Mittelhessens sind sie aber wichtige Erreger, die mit einiger Wahrscheinlichkeit zu einem Mastitisgeschehen führen, wenn sich die Immunitätslage eines Tieres oder gesundheitsrelevante Umweltfaktoren verschlechtern.

Da schon ein Vergleich der KNS als Gruppe schwierig ist, ist ein Vergleich der Vorkommenshäufigkeit einzelner KNS-Spezies aus verschiedenen Studien noch kritischer zu bewerten. Die Tabelle 4 spiegelt nochmals das deutliche Übergewicht der novobiocin-sensiblen KNS wider. Unter diesen dominieren in der angegebenen Literatur *S. chromogenes* und *S. simulans*. Auch in der vorliegenden Studie dominiert *S. chromogenes*. An zweiter Stelle kommt hier jedoch *S. epidermidis*. Der im Vergleich höhere Anteil könnte durch die drei Betriebe mit Anbindehaltung bedingt sein, aus denen die Hauptanzahl der *S. epidermidis*-Isolate stammte.

5.5 Einfluss von KNS auf die somatische Zellzahl

Die summarische Bezeichnung „KNS“ wird bei der Betrachtung eines möglichen Einflusses auf die somatische Zellzahl dem heutigen Wissensstand nicht mehr gerecht. Es ist möglich, wenn teilweise auch aufwändig oder mit Schwierigkeiten verbunden, die einzelnen Spezies zu bestimmen, wobei sicherlich auch in der Taxonomie und der Nomenklatur in Zukunft noch Änderungen zu erwarten sind. Ohne die einzelne KNS-Spezies zu betrachten, wird man insbesondere bei der Färsenmastitis keinen Fortschritt erreichen. Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass es Unterschiede zwischen den KNS-Spezies bezüglich ihres Einflusses auf die Zellzahl gibt. In diesem Zusammenhang fällt besonders *S. chromogenes* auf. Bereits NICKERSON et al. (1995) stellten bei mit *S. chromogenes* infizierten Vierteln von Erstlaktierende eine durchschnittliche Zellzahl von 168.000 Z/ml fest. Bei der nah verwandten Spezies *S. hyicus* wurde ein Wert von 193.000 Z/ml ermittelt. Diese Beobachtungen decken sich mit den vorliegenden Ergebnissen. Die Zellzahlerhöhungen sind bei *S. chromogenes* nicht so hoch wie bei *S. hyicus*, dafür überwiegt die Häufigkeit des Auftretens von *S. chromogenes* eindeutig. Zwar wird nach wie vor über eine Schutzwirkung, speziell von *S. chromogenes*, gegen „major pathogens“ spekuliert (MATTHEWS et al., 1990a), aber auch mäßig erhöhte Zellzahlen,

bedingt durch *S. chromogenes*, sind heutzutage sehr relevant. Untersuchungen von SAMPIMON et al. (2007) und von GILLESPIE et al. (2009) zeigten, dass ein erheblicher Teil aller klinischen Mastitiden, die durch KNS ausgelöst wurden, auf *S. chromogenes* zurückzuführen sind.

In Zukunft wird auch der Frage, ab wann ein KNS-Nachweis als Infektion gelten soll, Bedeutung zugemessen werden müssen. DEVRIESE und DE KEYSER (1980) zeigten, dass auch Keim-Intensitäten von 10 Kbe/ml bereits einen Einfluss auf den Ausgang des CMT-Tests haben können. Dennoch werden KNS oftmals erst ab 1.000 Kbe/ml berücksichtigt (BARKEMA et al., 1998; TENHAGEN et al., 2006), d.h. 10 verdächtige Kolonien bei einem 10 µl-Ösenausstrich. Wäre dies in der vorliegenden Arbeit der Grenzwert gewesen, hätte sich der prozentuale Wert für KNS-positive Viertel stark dem von TENHAGEN et al. (2006) von 9,1 % angenähert. Es wiesen insgesamt 21,6 % der Viertel mit KNS Werte über 200 Kbe/ml auf. Dem steht jedoch gegenüber, dass nach Tabelle 24 fast ein Viertel der KNS, die allein mit einer Intensität zwischen 50 und < 100 Kbe/ml aufgetreten waren, aus Vierteln stammten, die eine Zellzahl von ≥ 100.000 Z/ml aufwiesen. Bei KNS, die allein mit einer Intensität von 100 bis < 200 Kbe/ml aufgetreten waren, lag dieser Wert bei 18,9 %. Der Grenzwert von 1.000 Kbe/ml muss daher als wahrscheinlich zu hoch angesehen werden. KNS sollten bei der Isolation aus Viertelgemelksproben mindestens ab einem Wert von 200 Kbe/ml berücksichtigt werden. Dies würde sie nach der Einteilung, die BARKEMA et al. (1998) wählten, auf eine Stufe mit den Umweltpathogenen *E. coli* und *Streptococcus* spp. (außer *Sc. agalactiae*) stellen.

5.6 Differenzierungsmethoden für KNS

Aufgrund der großen Ähnlichkeiten in der Koloniemorphologie und den eng verwandten biochemischen Reaktionsmustern gestaltet sich die Differenzierung der einzelnen aus Viertelgemelksproben zu isolierenden KNS spp. schwierig (DEVRIESE et al., 2002). Selbst auf Gattungsebene ist die Abgrenzung zu den Gattungen *Micrococcus* und *Kocuria* koloniemorphologisch kaum zu treffen. Besonders *Kocuria kristinae* wird häufig mit Staphylokokken verwechselt (KLOOS und WOLFSHOHL, 1982). Es sollte daher auch in der Praxis wenigstens der Versuch einer Abgrenzung zwischen diesen Gattungen durchgeführt werden. Da die Mastitiserregerdiagnostik möglichst preisgünstig durchgeführt werden muss, würde sich hier die Verwendung des Oxidasetests anbieten (Tabelle 5), auch wenn *S. sciuri* und *S. lentus* ebenfalls oxidase-positiv reagieren. Die Tabelle 6 zeigt, dass verschiedene Autoren versucht haben, verlässliche verkürzte Schemata zur Differenzierung von KNS zu erstellen. Wie

bei dem in dieser Studie verwandten Schema von DEVRIESE et al. (1994) dürfte auch bei den anderen in Tabelle 6 genannten Reaktionskombinationen die Falschidentifizierung das größte Problem bleiben. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie auch weitere Tests zur Speziesidentifizierung herangezogen. Für die Arbeit in einem Routinelabor dürfte keines der vorgeschlagenen Schemata in einer kosteneffizienten Weise durchführbar sein. Auch die Verwendung kommerzieller Testsysteme wird aus Kostengründen, ebenso wie die sicherlich in die Zukunft weisende Identifizierung mittels PCR, nicht praxistauglich sein. Dabei bietet auch die Verwendung von kommerziellen Testsystemen, wie Tabelle 7 und die Ergebnisse dieser Studie zeigen, keine hundertprozentige Sicherheit im Hinblick auf eine korrekte Speziesidentifizierung. Aus der vorliegenden Arbeit geht deutlich hervor, dass den KNS *S. chromogenes* und *S. hyicus* in Bezug auf die Erhöhung der Zellzahl besondere Beachtung zu schenken ist. Da beide Spezies zu einem großen Anteil DNase-positiv sind, könnte es eventuell auch in Routinelabors sinnvoll werden, bei der Diagnose KNS einen DNase-Test durchzuführen, da die durch diese Spezies bedingten Zellzahlerhöhungen bei Betrieben an der Grenze zur S-Klasse oder zur Ablieferungssperre bei gehäuftem Auftreten Bedeutung erlangen könnten. Der breitere Einsatz molekularbiologischer Verfahren verbietet sich momentan allein schon aus Kostengründen. Zudem müssten für diese Methodik noch Widersprüche zur biochemischen Differenzierung geklärt werden, und schließlich müssten praktikable Zielsegmente etabliert werden.

5.7 Wirksamkeit handelsüblicher Trockenstellerpräparate und Resistenzsituation der KNS

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die auf dem deutschen Markt handelsüblichen Trockenstellerpräparate gegen KNS-Infektionen in der Trockenstehphase wirksam sein sollten. Bei allen *in vitro* Tests ist jedoch immer zu bedenken, dass die Wirksamkeit *in vivo* auch durch andere Faktoren beeinflusst wird (SOL et al., 1994). Trotzdem bleibt die Empfindlichkeitsprüfung von Erregern ein wichtiger Schritt, um das wirksamste Antibiotikum in einem Mastitisfall zu bestimmen (LÜTHJE und SCHWARZ, 2006; SAMPIMON et al., 2007). Die bedeutendsten Resistenzraten wiesen KNS gegen Penicillin G auf. In der Literatur finden sich Angaben zwischen 11,5 % (JARP, 1991) und 37,4 % (SAMPIMON et al., 2007). Zu beachten ist bei solchen Vergleichen, dass die Proben oftmals in verschiedenen Ländern, manchmal Kontinenten genommen und untersucht wurden und die beprobten Tiere oftmals einen völlig verschiedenen Gesundheitszustand des Euters aufwiesen. Dennoch fügt sich die in dieser

Studie ermittelte durchschnittliche Resistenzrate gegenüber Penicillin G von 24,4 % in die weltweit erhobenen Ergebnisse ein. In der Literatur finden sich ebenfalls höhere Resistenzraten für *S. haemolyticus*, wie sie auch in dieser Studie festgestellt wurden (JARP, 1991; SAMPIMON et al., 2007). Weiterhin scheint auch die Resistenz gegenüber Oxacillin / Cloxacillin zuzunehmen. Die Ausbreitung des *mecA*-Gens innerhalb der KNS verdient eine erhöhte Beachtung, da in deutschen Milchviehherden vielfach Trockensteller mit dem Wirkstoff Cloxacillin zum Einsatz kommen (TENHAGEN et al., 2006). In dieser Studie konnte allerdings keine Resistenz gegen Cloxacillin nachgewiesen werden; allerdings hat sich auch keine Resistenz von *S. sciuri* gegenüber Cloxacillin ergeben, wie von DEVRIESE et al. (2002) als intrinsisch vorhanden beschrieben wurde. Generell zeigten neuere Untersuchungen, dass auch bei Antibiotikaresistenzen stärker als bisher bei den KNS die individuelle Spezies berücksichtigt werden muss (SAWANT et al., 2009), dass aber KNS grundsätzlich höhere Antibiotikaresistenzen aufweisen als *S. aureus* (TAPONEN und PYÖRÄLÄ, 2009).

5.8 Schlussfolgerungen

KNS wurden aus Viertelgemelksproben von Kühen aus mittelhessischen Betrieben im Vergleich mit anderen Mastitiserregern am häufigsten isoliert, jedoch mit stark schwankender Intensität. Im Sinne einer besseren Vergleichbarkeit von Untersuchungen wäre es wünschenswert, einen einheitlichen Grenzwert für die Unterscheidung zwischen Infektion und Kontamination festzulegen. Dieser Wert könnte bei 200 KBE/ml liegen. Damit würde sich die Häufigkeit von KNS-Befunden drastisch erhöhen, aber die Vorteile wären im Bereich der subklinischen Mastitis stark überwiegend, da bei mäßigen Zellzahlerhöhungen häufiger eine Diagnose stellbar wäre.

Hinsichtlich der identifizierten KNS-Spezies kommt *S. chromogenes*, wie auch in der Literatur beschrieben, die größte Bedeutung zu. Gemäß der Erkenntnis, dass es sich bei der Mastitis des Rindes um eine Faktorenerkrankung handelt, ist die Auswirkung einer Infektion mit KNS sicher nicht immer gleich, der negative Einfluss auf die somatische Zellzahl wird jedoch in dieser wie auch in anderen Studien eindeutig belegt.

Die Empfindlichkeit von KNS gegenüber den antibiotischen Wirkstoffen in Trockenstellerpräparaten ist generell gut. Die Resistenzrate von KNS gegenüber Penicillin G liegt in einem Bereich, wie er auch in anderen Ländern festgestellt wurde. In der Zukunft sollte die Penicillinresistenz ebenso wie die Resistenzentwicklung von KNS gegenüber dem

synthetischen Penicillin Cloxacillin verfolgt werden, da die meisten Kühe mit Präparaten, die Cloxacillin enthalten, trocken gestellt werden.

Die Differenzierung von KNS-Spezies ist weiterhin schwierig, da sie entweder mit einem hohen Arbeitsaufwand oder einer großen Ungenauigkeit einhergeht. Auch ein höherer Kosteneinsatz durch Verwendung kommerzieller Testkits löst dieses Problem nicht zufriedenstellend. Um weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von KNS gewinnen zu können und auch eventuell eine Speziesidentifizierung in der Routinediagnostik möglich zu machen, wären weitere Studien zur praktikablen kostengünstigen Differenzierung wünschenswert. Im Hinblick auf einen der wichtigsten KNS im Zusammenhang mit subklinischer Mastitis, *S. chromogenes*, scheint der Nachweis von DNase vielversprechend zu sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vorkommenshäufigkeit einzelner Spezies koagulase-negativer Staphylokokken (KNS), ihr möglicher Einfluss auf die somatische Zellzahl als Parameter für die Eutergesundheit und ihre Resistenz gegenüber in Trockenstellerpräparaten enthaltenen Antibiotika untersucht. Es wurden jeweils 30 Milchkühe aus 16 mittelhessischen Landwirtschaftsbetrieben einmalig auf Viertelgemelksebene beprobt. Von den Probetrieben hielten 13 Betriebe ihre Kühe in Laufstallhaltungen, in drei Betrieben standen die Kühe in Anbindehaltung. Die Probenentnahme erstreckte sich auf die Zeiträume Juni bis Oktober 2005 und März bis Juli 2006. In den Probemonaten lagen sechs der Betriebe im mittleren Zellzahlwert der Anlieferungsmilch < 200.000 Z/ml Milch (Gruppe I), zehn Betriebe lagen ≥ 200.000 Z/ml (Gruppe II). Von den genommenen Viertelgemelksproben gingen 1.720 in die Auswertung ein.

Die Ermittlung der somatischen Zellzahlen zeigte, dass 57,4 % aller Viertel einen Wert unter 50.000 Z/ml aufwiesen, 70,9 % aller Viertel lagen unter 100.000 Z/ml. In der Kategorie zwischen 100.000 und < 200.000 Z/ml lagen 11,1 %, weitere 7,9 % aller Viertelgemelksproben wiesen einen Wert zwischen 200.000 und < 400.000 Z/ml auf. Bei 10,1 % aller Proben wurde ein Wert von ≥ 400.000 Z/ml gemessen.

Die am häufigsten nachweisbaren Mikroorganismen waren KNS, die aus 45,9 % aller Viertelgemelksproben isoliert werden konnten. Dabei wurde ein KNS-Befund ≥ 50 KbE/ml als positiv gewertet. Äskulin-positive Streptokokken wurden in 17,7 % aller Proben nachgewiesen, Spezies der Gattung *Coryneforme* in 13,9 %, Spezies der Gattungen *Micrococcus* und *Kocuria* in 7,4 %, und Hefen wurden aus 6,3 % der Proben isoliert. *Staphylococcus aureus*, äskulin-negative Streptokokken, *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. traten nur in vereinzelt Proben auf.

Die Differenzierung der einzelnen KNS-Spezies erfolgte in Anlehnung an das Differenzierungsschema nach DEVRIESE et al. (1994). Zusätzlich wurden stichprobenartige „Zweitdifferenzierungen“ mit dem api[®]Staph-System durchgeführt. Die Übereinstimmung der Differenzierungsergebnisse lag bei den novobiocin-resistenten KNS-Spezies bei 80,6 % und bei den novobiocin-sensiblen KNS-Spezies bei 66,6 %. Dabei lagen die Isolate, die im vereinfachten Differenzierungsschema eindeutig identifiziert werden konnten, auch beim api[®]Staph in hohen Wahrscheinlichkeitsbereichen.

Die am häufigsten isolierten KNS-Spezies waren *S. xylosus* (n = 187), *S. chromogenes* (n = 160), *S. epidermidis* (n = 144), *S. haemolyticus* (n = 106) und *S. warneri* (n = 98). Weiterhin wurden *S. sciuri* (n = 62), *S. cohnii* (n = 44), *S. simulans* (n = 33), *S. saprophyticus* (n = 21), *S. hyicus* (n = 10), *S. hominis* (n = 5) und *S. lentus* (n = 4) isoliert. Dabei wurde kein Unterschied zwischen den auftretenden Spezies bei Betriebsgruppe I oder II festgestellt. Auffallend war das deutlich höhere Vorkommen von *S. epidermidis* mit 30,9 % positiver Viertel in den Anbindehaltungen gegenüber 2,9 % in den Laufstallhaltungen und das geringere Vorkommen von *S. chromogenes* mit 2,4 % in den Anbindehaltungen und 11 % in den Laufstallhaltungen. Weiterhin fiel auf, dass Erstlaktierende im Vergleich mit Milchkühen ab der zweiten Laktation häufiger mit KNS infiziert waren und im Vergleich auch mehr Viertel eines Tieres betroffen waren.

Der Einfluss der KNS auf die somatische Zellzahl war bei summarischer Betrachtung nur mäßig. Die Zellzahlen der mit KNS infizierten Viertel lagen jedoch deutlich höher, zumeist doppelt so hoch wie die Zellzahlwerte nicht infizierter Viertel. Der deutlichste Einfluss auf die somatische Zellzahl wurde für *S. chromogenes* festgestellt. Von den Viertelgemelksproben, aus denen *S. chromogenes* als einziger Befund isoliert wurde, lagen 62,2 % bei einem Zellzahlwert ≥ 100.000 Z/ml, immerhin 33,1 % der Viertel lagen ≥ 200.000 Z/ml. Auch *S. hyicus* zeigte einen deutlichen Einfluss auf die somatische Zellzahl, trat im Vergleich zu *S. chromogenes* aber sehr viel seltener auf. Der Einfluss der KNS auf die somatische Zellzahl nahm mit ansteigender Vorkommensintensität (50 KbE/ml bis über 200 KbE/ml) bei den meisten Spezies zu, hier wiederum besonders bei *S. chromogenes*.

Die Ergebnisse des mit ausgewählten Isolaten durchgeführten Resistenztests zeigten, dass alle auf dem deutschen Markt erhältlichen Trockenstellerpräparate gegen KNS wirksam sein sollten. Von den Isolaten wiesen insgesamt 24,4 % eine Resistenz gegen Penicillin G auf, 7,4 % verhielten sich resistent gegen Streptomycin. Die Isolate von *S. haemolyticus* und *S. warneri* zeigten mit 47,2 % bzw. 47,1 % die höchsten speziesspezifischen Resistenzraten gegenüber Penicillin G.

7 SUMMARY

In the present study the prevalence of coagulase-negative staphylococcal (CNS) species, their possible impact on somatic cell counts as a parameter for udder health, and their antimicrobial susceptibility towards antibiotics used in dry cow therapy was studied. Quarter milk samples were taken once from 30 cows, including first lactation cows, from 16 farms in the region of Central Hesse. Of the 16 farms, 13 kept their animals in freestall barns, while on three farms the cows were tied up. The samples were taken in two periods, June - October 2005 and March - July 2006. Bulk milk tank somatic cell counts were $< 200,000$ cells/ml in six farms (group I) and $\geq 200,000$ cells/ml in ten farms (group II) in the relevant months of sample collection. From all quarter milk samples taken a total of 1,720 were used for further study.

The somatic cell counts revealed that 57.4 % of all quarters had a value of under 50,000 cells/ml, 70.9 % of all quarters stayed under 100,000 cells/ml. In the category between 100,000 and $< 200,000$ cells/ml 11.1 % of the quarters were found and 7.9 % showed a value between 200,000 and $< 400,000$ cells/ml. In 10.1 % of all samples the somatic cell count was $\geq 400,000$ cells/ml.

CNS were the most frequently found bacteria, with 45.9 % of all quarter milk samples having a positive result for CNS. A sample was scored CNS-positive when ≥ 50 cfu/ml were found. Aesculin-positive streptococci were identified in 17.7 % of all samples, species of the genus *Corynebacterium* were found in 13.9 %, species of the genera *Micrococcus* and *Kocuria* in 7.4 % and yeasts were isolated from 6.3 % of the samples. Other bacteria identified were *Staphylococcus aureus*, aesculin-negative streptococci, *E. coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp.

CNS species were identified according to the scheme of DEVRIESE et al. (1994). Additionally, selected isolates were identified using the api[®]Staph-system. For novobiocin-resistant CNS both systems showed 80.6 % agreement, for novobiocin-sensitive CNS both systems had 66.6 % agreement. The isolates which were clearly identified in the DEVRIESE scheme were also identified with high percentage of plausibility by the api[®]Staph-system.

The CNS species which were most frequently identified were *S. xylosus* (n = 187), *S. chromogenes* (n = 160), *S. epidermidis* (n = 144), *S. haemolyticus* (n = 106) and *S. warneri* (n = 98). Furthermore *S. sciuri* (n = 62), *S. cohnii* (n = 44), *S. simulans* (n = 33), *S. saprophyticus* (n = 21), *S. hyicus* (n = 10), *S. hominis* (n = 5), and *S. lentus* (n = 4) were identified. There was

no difference between the farms of group I and II concerning the isolated CNS species. It was noticeable that *S. epidermidis* was isolated from 30.9 % of the milk samples from farms on which the cows were kept tied up compared with 2.9 % in the freestall barns. In contrast *S. chromogenes* was isolated from only 2.4 % of quarters of cows from tied pens, but from 11 % of cows from freestall barns. Furthermore, first-calf lactating cows were more often infected with CNS compared with older cows, and more often had more than one quarter infected.

The impact of CNS infection on the somatic cell counts was moderate. However, the somatic cell counts of the quarters which were infected with CNS were higher, often twice as high as the cell counts determined for non-infected quarters. The strongest influence on somatic cell counts was found for *S. chromogenes*. If only *S. chromogenes* was present in a sample 62.2 % of all samples had somatic cell counts of $\geq 100,000$ cells/ml, and 33.1 % had somatic cell counts of $\geq 200,000$ cells/ml. *S. hyicus* also had a distinct impact on the somatic cell counts, but compared to *S. chromogenes* it was rarely found in milk samples. With increasing intensity of the CNS (50 cfu/ml to over 200 cfu/ml), the impact on the somatic cell counts increased for most species, especially for *S. chromogenes*.

The results of the antimicrobial susceptibility tests showed that all antibiotic drugs used in dry cow therapy, available on the German market, should be useful against CNS. Resistance against penicillin G was found to be 24.4 % of all CNS isolates, 7.4 % were resistant against streptomycin. Isolates of *S. haemolyticus* and *S. warneri* were most frequently resistant towards penicillin G, with percentages of resistant isolates of approximately 47 %.

8 LITERATURVERZEICHNIS**ADR (2007):**

Rinderproduktion in der Bundesrepublik Deutschland 2006
Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter, Bonn
<http://www.adr-web.de>

AKATOV, A.K., M.L. KHATENEVER und L.A. DEVRIESE (1981):

Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical sources
In: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg): Staphylococci and staphylococcal infections, Zbl. Bakt. Suppl.
10, S. 153-161
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

ALMEIDA, R.J. und J.H. JORGENSEN (1982):

Use of mueller-hinton agar to determine novobiocin susceptibility of coagulase-negative staphylococci
J. Clin. Microbiol. **16**, 1155-1156

ALMEIDA, R.J. und J.H. JORGENSEN (1983):

Identification of coagulase-negative staphylococci with the API STAPH-IDENT system
J. Clin. Microbiol. **18**, 254-257

ALMEIDA, R.A., K.R. MATTHEWS, E. CIFRIAN, A.J. GUIDRY und S.P. OLIVER (1996):

Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells
J. Dairy Sci. **79**, 1021-1026

ALMEIDA, R.A. und S.P. OLIVER (1995):

Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*
J. Dairy Sci. **78**, 1310-1317

ALMEIDA, R.A. und S.P. OLIVER (2001):

Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells
Microbial Pathogenesis **31**, 205-212

ANAYA-LÓPEZ, J.L., O.E. CONTRERAS-GUZMÁN, A. CÁRABEZ-TREJO, V.M. BAIZABAL-AGUIRRE, J.E. LÓPEZ-MEZA, J.J. VALDEZ-ALARCÓN und A. OCHOA-ZARZOSA (2006):

Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis
Res. Vet. Sci. **81**, 358-361

ANONYM (2001):

Mastitis in dairy cows
<http://animsci.agrnmv.mcgill.ca/courses/450/topics/13.pdf> (-2001-09-17)

ANONYM (2007a):

The value and use of dairy herd improvement somatic cell count
<http://www.nmconline.org/dhiscc.htm> (29.05.2007)

ANONYM (2007b):

Milchzahlungspreise in Deutschland
ZMP Milch Online vom 17. Oktober 2007
<http://www.zmp.de>

ANONYM (2008):

Zahlen und Daten der deutschen Milchindustrie
<http://www.milchindustrie.de> (06.07.2008)

ARCHER, G.L. und M.W. CLIMO (1994):

Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci
Antimicrobial Agents and Chemotherapy **38**, 2231-2237

BAIRD-PARKER, A.C. (1963):

A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests
J. Gen. Microbiol. **30**, 409-427

BAKER, J.S. (1984):

Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci
J. Clin. Microbiol. **19**, 875-879

BAKER, J.S., M.F. HACKETT und D.J. SIMARD (1986):

Variations in bacitracin susceptibility observed in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species
J. Clin. Microbiol. **23**, 963-964

BARKEMA, H.W., Y.H. SCHUKKEN, T.J.G.M. LAM, M.L. BEIBOER, G. BENEDICTUS und A. BRAND (1999):

Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis
J. Dairy Sci. **82**, 1643-1654

BARKEMA, H.W., Y.H. SCHUKKEN, T.J.G.M. LAM, M.L. BEIBOER, H. WILMINK, G. BENEDICTUS und A. BRAND (1998):

Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts
J. Dairy Sci. **81**, 411-419

BARKEMA, H.W., Y.H. SCHUKKEN und R.N. ZADOKS (2006):

The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis
J. Dairy Sci. **89**, 1877-1895

BERKE, A. und R.C. TILTON (1986):

Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*
J. Clin. Microbiol. **23**, 916-919

BES, M., V. GUÉRIN-FAUBLÉE, H. MEUGNIER, J. ETIENNE und J. FRENEY (2000):

Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods
Vet. Microbiol. **71**, 287-294

BIRGERSSON, A., P. JONSSON und O. HOLMBERG (1992):

Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders

Vet. Microbiol. **31**, 181-189

BMELV BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (2005):

Die Unternehmensstruktur der Molkereiwirtschaft in Deutschland

<http://www.bmelv-statistik.de>, ISSN: 0944-9035, S. 19-21

BORM, A.A., L.K. FOX, K.E. LESLIE, J.S. HOGAN, S.M. ANDREW, K.M. MOYES, S.P. OLIVER, Y.H. SCHUKKEN, D.D. HANCOCK, C.T. GASKINS, W.E. OWENS und C. NORMAN (2006):

Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers

J. Dairy Sci. **89**, 2090-2098

BROWN, R.W., O. SANDVIK, R.K. SCHERER und D.L. ROSE (1967):

Differentiation of strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine udders

J. Gen. Microbiol. **47**, 273-287

BURRIEL, A.R. und M. SCOTT (1998):

A comparison of methods used in species identification of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of sheep

The Veterinary Journal **155**, 183-188

CRASS, B.A. und M.S. BERGDOLL (1986):

Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome

J. Clin. Microbiol. **23**, 43-45

CREMONESI, P., B. CASTIGLIONI, G. MALFERRARI, I. BIUNNO, C. VIMERCATI, P. MORONI, S. MORANDI und M. LUZZANA (2006):

Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk

J. Dairy Sci. **89**, 163-169

CURRY, J.C. und G.E. BOROVIAN (1976):

Selective medium for distinguishing micrococci from staphylococci in the clinical laboratory

J. Clin. Microbiol. **4**, 455-457

DE GRAAF, T. und R.H. DWINGER (1996):

Estimation of milk production losses due to sub-clinical mastitis in dairy cattle in Costa Rica

Preventive Veterinary Medicine **26**, 215-222

DE HAAS, Y., H.W. BARKEMA und R.F. VEERKAMP (2002):

The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count

J. Dairy Sci. **85**, 1314-1323

DE VliegHER, S., H. LAEVENS, H.W. BARKEMA, I.R. DOHOO, H. STRYHN, G. OPSOMER und A. DE KRUIF (2004a):

Management practices and heifer characteristics associated with early lactation somatic cell count of Belgian dairy heifers

J. Dairy Sci. **87**, 937-947

DE VliegHER, S., H. LAEVENS, L.A. DEVRIESE, G. OPSOMER, J.L.M. LEROY, H.W. BARKEMA und A. DE KRUIF (2003):

Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation

Vet. Microbiol. **92**, 245-252

DE VliegHER, S., G. OPSOMER, A. VANROLLEGHEM, L.A. DEVRIESE, O.C. SAMPIMON, J. SOL, H.W. BARKEMA, F. HAESBROUCK und A. DE KRUIF (2004b):

In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers

Vet. Microbiol. **101**, 215-221

DE VliegHER, S., R.N. ZADOKS und H.W. BARKEMA (2009):

Heifer and CNS mastitis

Vet. Microbiol. **134**, 1-2

DEVRIESE, L.A., M. BAELE, M. VANEECHOUTTE, A. MARTEL und F. HAESBROUCK (2002):

Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows

Vet. Microbiol. **87**, 175-182

DEVRIESE, L.A. und H. DE KEYSER (1980):

Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows

J. Dairy Res. **47**, 155-158

DEVRIESE, L.A. und V. HÁJEK (1980):

Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals

J. Appl. Bacteriol. **49**, 1-11

DEVRIESE, L.A., H. LAEVENS, F. HAESBROUCK und J. HOMMEZ (1994):

A simple identification scheme for coagulase negative staphylococci from bovine mastitis

Res. Vet. Sci. **57**, 240-244

DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, e.V. (Hrsg.) (2002):

DIN 58940: Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika

in: DIN-Taschenbuch 222 Medizinische Mikrobiologie und Immunologie. Diagnostische Verfahren

Beuth Verlag GmbH, Berlin

DOGGWEILER, R. und E. HESS (1983):

Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter

Milchwissenschaft **38**, 5-8

DVG DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V., SACHVERSTÄNDIGENAUSSCHUSS „SUBKLINISCHE MASTITIS“ DES ARBEITSKREISES EUTERGESUNDHEIT DER FACHGRUPPE MILCHHYGIENE DES ARBEITSGEBIETES LEBENSMITTELHYGIENE (2000):

Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern

Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Gießen

EUZÉBY, J.P. (2007):

List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Staphylococcus*
<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> (27.10.2007)

FALK, D. und S.J. GUERING (1983):

Differentiation of *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. with the taxo A bacitracin disk
J. Clin. Microbiol. **18**, 719-721

FALLER, A. und K.-H. SCHLEIFER (1981):

Modified oxidase and benzidine test for separation of staphylococci from micrococci
J. Clin. Microbiol. **13**, 1031-1035

FOX, L.K. (2009):

Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis
Vet. Microbiol. **134**, 82-88

FOX, L.K., S.T. CHESTER, J.W. HALLBERG, S.C. NICKERSON, J.W. PANKEY und L.D. WEAVER (1995):

Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturition
J. Dairy Sci. **78**, 1619-1628

FREBOURG, N.B., S. LEFEBVRE, S. BAERT und J.-F. LEMELAND (2000):

PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains
J. Clin. Microbiol. **38**, 877-880

GARRITY, G.M., D.R. BOONE und R.W. CASTENHOLZ (Hrsg.) (2001):

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, volume one: The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria, S. 149-153
Springer-Verlag, New York

GARRITY, G.M., D.J. BRENNER, N.R. KRIEG und J.T. STALEY (Hrsg.) (2005):

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, volume two: The proteobacteria, S. 216-217
Springer-Verlag, New York

GEARY, C. und M. STEVENS (1986):

Rapid lysostaphin test to differentiate *Staphylococcus* and *Micrococcus* species
J. Clin. Microbiol. **23**, 1044-1045

GENTILINI, E., G. DENAMIEL, A. BETANCOR, M. REBUELTO, M. RODRIGUEZ FERMEPIN und R.A. DE TORRES (2002):

Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina
J. Dairy Sci. **85**, 1913-1917

GILLESPIE, B.E., S.I. HEADRICK, S. BOONYAYATRA und S.P. OLIVER (2009):

Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds
Vet. Microbiol. **134**, 65-72

GOLDSTEIN, J., R. SCHULMAN, E. KELLEY, G. MCKINLEY und J. FUNG (1983):

Effect of different media on determination of novobiocin resistance for differentiation of coagulase-negative staphylococci

J. Clin. Microbiol. **18**, 592-595

GREEN, M.J., L.E. GREEN, G.F. MEDLEY, Y.H. SCHUKKEN und A.J. BRADLEY (2002):

Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows

J. Dairy Sci. **85**, 2589-2599

GREEN, L.E., Y.H. SCHUKKEN und M.J. GREEN (2006):

On distinguishing cause and consequence: do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count?

Preventive Veterinary Medicine **76**, 74-89

GUNN, B.A., F.L. SINGLETON, E.R. PEELE, R.R. COLWELL, J.K. KEISER und C.O. KAPFER (1981):

Comparison of methods for identifying *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp.

J. Clin. Microbiol. **14**, 195-200

HAMANN, J. (1992):

Mastitisbekämpfung auf der Grundlage zytologischer Befunde der Herdensammelmilch

Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **44**, 327-338

HAMANN, J. und K. FEHLINGS UNTER MITARBEIT DES SACHVERSTÄNDIGENAUSSCHUSSES "SUBKLINISCHE MASTITIS" DES ARBEITSKREISES EUTERGESUNDHEIT DER FACHGRUPPE MILCHHYGIENE DES ARBEITSGEBIETES LEBENSMITTELHYGIENE (2002):

Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem

Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Gießen

HAMANN, J. und J. REICHMUTH (1990):

Exogene Einflüsse auf den Zellgehalt der Milch unter Berücksichtigung des Gesundheitszustandes der Milchdrüse

Milchwissenschaft **45**, 286-290

HARMON, R.J. (1994):

Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts

J. Dairy Sci. **77**, 2103-2112

HARMON, R.J., W.L. CHRIST, R.W. HEMKEN und B.E. LANGLOIS (1986):

Prevalence of minor udder pathogens after intramammary dry treatment

J. Dairy Sci. **69**, 843-849

HÉBERT, G.A., C.G. CROWDER, G.A. HANCOCK, W.R. JARVIS und C. THORNSBERRY (1988):

Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family *Micrococcaceae*

J. Clin. Microbiol. **26**, 1939-1949

HEIKENS, E., A. FLEER, A. PAAUW, A. FLORIJN und A.C. FLUIT (2005):

Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci
J. Clin. Microbiol. **43**, 2286-2290

HOEDEMAKER, M., J. HAMANN und B. BAUMGÄRTNER (2006):

„Zur Antibiotikatherapie von Mastitiden“

http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/29-08-2006-thera-sta_1DO1D2.doc_Schreibgeschuetzt_.pdf (14.06.2007)

HUIJPS, K., S. DE VliegHER, T. LAM und H. HOGEVEEN (2009) :

Cost estimation of heifer mastitis in early lactation by stochastic modelling
Vet. Microbiol. **134**, 121-127

HVL – HESSISCHER VERBAND FÜR LEISTUNGS – UND QUALITÄTSPRÜFUNGEN IN DER TIERZUCHT e.V. (2005):

Jahresbericht 2005

HVL – HESSISCHER VERBAND FÜR LEISTUNGS – UND QUALITÄTSPRÜFUNGEN IN DER TIERZUCHT e.V. (2008):

Jahresbericht 2008

IWANTSCHIEFF, A., E. KÜHNEN und H. BRANDIS (1985):

Species distribution of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical sources
Zbl. Bakt. Hyg. A **260**, 41-50

JÁNOSI, S.Z. und Z.S. BALTAY (2004):

Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California mastitis test and bacteriological status of the udder in dairy cows
Acta Veterinaria Hungarica **52**, 173-183

JARP, J. (1991):

Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis
Vet. Microbiol. **27**, 151-158

JAYARAO, B.M., S.R. PILLAI, A.A. SAWANT, D.R. WOLFGANG und N.V. HEDGE (2004):

Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts
J. Dairy Sci. **87**, 3561-3573

JONES, G.M., R.E. PEARSON, G.A. CLABAUGH und C.W. HEALD (1984):

Relationships between somatic cell counts and milk production
J. Dairy Sci. **67**, 1823-1831

KASTNER, S. (1999):

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)

<http://www.meb.uni-bonn.de/kinder/KNSHYG.htm> (22.06.07)

KIELWEIN, G. (1994):

Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene, S. 62-71
Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

KIRK, J.H., J.C. WRIGHT, S.L. BERRY, J.P. REYNOLDS, J.P. MAAS und A. AHMADI (1996):

Relationships of milk culture status at calving with somatic cell counts and milk production of dairy heifers during early lactation on a Californian dairy
Preventive Veterinary Medicine **28**, 187-198

KLASTRUP, N.O. (1985):

Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **37**, 254-260

KLOOS, W.E. und T.L. BANNERMAN (1994):

Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci
Clinical Microbiology Reviews **7**, 117-140

KLOOS, W.E. und D.W. LAMBE, JR. (1991):

Staphylococcus

In: Balows, A., W.J. Hausler, jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (Hrsg.), Manual of Clinical Microbiology. Fifth edition, S. 222-237
American Society for Microbiology, Washington D.C., USA

KLOOS, W.E. und K.H. SCHLEIFER (1975):

Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species
J. Clin. Microbiol. **1**, 82-88

KLOOS, W.E. und J.F. WOLFSHOHL (1982):

Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system
J. Clin. Microbiol. **16**, 509-516

KURZHALS, P., H. KLIMA und D. MANZ (1985):

Beziehungen zwischen Zellzahl, Zellbild und bakteriologischen Befunden bei der subklinischen Mastitis des Rindes
Milchwissenschaft **40**, 6-9

LÄMMLER, C. (1989):

Characteristic bacteriolytic activities of *Staphylococcus hyicus*
J. Clin. Microbiol. **27**, 1682-1683

LANGLOIS, B.E., R.J. HARMON und K. AKERS (1983):

Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the API Staph-Ident system
J. Clin. Microbiol. **18**, 1212-1219

LANGLOIS, B.E., R.J. HARMON und K. AKERS (1984):

Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the DMS Staph-Trac system
J. Clin. Microbiol. **20**, 227-230

LHL – LANDESBETRIEB HESSISCHES LANDESLABOR (2006):

Wiederkäuergesundheitsdienst, Eutergesundheitsdienst
Jahresbericht 2005, 134

LÜTHJE, P. und S. SCHWARZ (2006):

Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes
J. Antimicrobial Chemotherapy **57**, 966-969

MAKOVEC, J.A. und P.L. RUEGG (2003a):

Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001)
JAVMA **222**, 1582-1589

MAKOVEC, J.A. und P.L. RUEGG (2003b):

Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001
J. Dairy Sci. **86**, 3466-3472

MATTHEWS, K.R., R.J. HARMON und B.E. LANGLOIS (1991):

Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococci infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine
J. Dairy Sci. **74**, 1855-1859

MATTHEWS, K.R., R.J. HARMON und B.A. Smith (1990a):

Protective effect of *Staphylococcus chromogenes* infection against *Staphylococcus aureus* infection in the lactating bovine mammary gland
J. Dairy Sci. **73**, 3457-3462

MATTHEWS, K.R., S.P. OLIVER und S.H. KING (1990b):

Comparison of Vitek gram-positive identification system with API Staph-Trac system for species identification of staphylococci of bovine origin
J. Clin. Microbiol. **28**, 1649-1651

MAYR, A. (Hrsg.) (1993):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 6. Auflage, S. 688
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

NASCIMENTO, J.S, P.C. FAGUNDES, M.A.V.P. BRITO, K.R.N. SANTOS und M.C.F. BASTOS (2005):

Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis
Vet. Microbiol. **106**, 61-71

NEUMANN, H.J., E.-H. UBBEN und A. TOLLE (1977):

Eine neue Strategie der Mastitisbekämpfung in Schleswig-Holstein –Situationsanalyse und Stand der Planung nach 3 Jahren-
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **29**, 105-125

NICKERSON, S.C. und R.L. BODDIE (1994):

Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens
J. Dairy Sci. **77**, 2526-2536

NICKERSON, S.C., W.E. OWENS und R.L. BODDIE (1995):

Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control
J. Dairy Sci. **78**, 1607-1618

OBIGER, G. (1962):

Zur Frage der Infektiosität der Staphylokokken für das Rindereuter
Milchwissenschaft **17**, 550-557

OLIVEIRA, M., R. BEXIGA, S.F. NUNES, C. CARNEIRO, L.M. CAVACO, F. BERNADO und C.L. VILELA (2006):

Biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates
Vet. Microbiol. **118**, 133-140

OLIVER, S.P., B.E. GILLESPIE, S.J. HEADRICK, H. MOOREHEAD, P. LUNN, H.H. DOWLEN, D.L. JOHNSON, K.C. LAMAR, S.T. CHESTER und W.M. MOSELEY (2004):

Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows
J. Dairy Sci. **87**, 2393-2400

OLIVER, S.P., M.J. LEWIS, B.E. GILLESPIE, H.H. DOWLEN, E.C. JAENICKE und R.K. ROBERTS (2003):

Prepartum antibiotic treatment of heifers: milk production, milk quality and economic benefit
J. Dairy Sci. **86**, 1187-1193

OWENS, W.E., C.H. RAY, J.L. WATTS und R.J. YANCEY (1997):

Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis
J. Dairy Sci. **80**, 313-317

PETERS, G. (1992):

Isolierung und Identifizierung von *Micrococcaceae*, insbesondere der Gattung *Staphylococcus*
Zbl. Bakt. **276**, 556-565

PETRAUSCH, R. (Hrsg.) (2006):

LILA LISTE Remedia ad us. vet. Ausgabe 2006/2007
Delta Verlag GmbH, Berlin

PIETTE, A., G. VERSCHRAEGEN (2009):

Role of coagulase-negative staphylococci in human disease
Vet. Microbiol. **134**, 45-54

PITKÄLÄ, A., M. HAVERI, S. PYÖRÄLÄ, V. MYLLYS und T. HONKANEN-BUZALSKI (2004):

Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance
J. Dairy Sci. **87**, 2433-2441

POLITIS, I. und K.F. NG-KWAI-HANG (1988a):

Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency
J. Dairy Sci. **71**, 1711-1719

POLITIS, I. und K.F. NG-KWAI-HANG (1988b):

Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity
J. Dairy Sci. **71**, 1720-1727

POUTREL, B. (1984):

Udder infection of goats by coagulase-negative staphylococci
Vet. Microbiol. **9**, 131-137

POUTREL, B. und J.-P. CAFFIN (1981):

Lysostaphin disk test for routine presumptive identification of staphylococci
J. Clin. Microbiol. **13**, 1023-1025

PRESCOTT, S.C. und R.S. BREED (1910):

The determination of the number of body cells in milk by direct method
J. Inf. Dis. **7**, 632

PULVERER, G., G. PETERS und F. SCHUMACHER-PERDREAU (1987):

Coagulase-negative staphylococci
Zbl. Bakt. Hyg. A **264**, 1-28

PYÖRÄLÄ, S. und S. TAPONEN (2007):

CNS – emerging pathogens

in: Final Program & Abstract Book, Heifer Mastitis Conference 2007, Ghent, Belgien, S. 18-20

PYÖRÄLÄ, S. und S. TAPONEN (2009):

Coagulase-negative staphylococci – emerging mastitis pathogens
Vet. Microbiol. **134**, 3-8

RUHR-STICKSTOFF-AKTIENGESELLSCHAFT (Hrsg.) (1955):

Milcherzeugerstatistik 1952

In: Agrarstatistische Zusammenstellungen des Bundesgebietes, Landwirtschaftsatlas
Ruhr-Stickstoff Aktiengesellschaft, Bochum

SAMPIMON, O.C., H.W. BARKEMA, I.M.G.A. BERENDS, J. SOL und T.J.G.M. LAM (2009):

Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds
Vet. Microbiol. **134**, 37-44

SAMPIMON, O.C., J.C.A. VERNOOLJ, D.J. MEVIUS und J. SOL (2007):

Gevoeligheid voor diverse antibiotica van coagulase negatieve staphylococcen, geïsoleerd uit melkmonsters van Nederlands rundvee
Tijdschr. Diergeneeskd **132**, 200-204

SAWANT, A.A., B.E. GILLESPIE und S.P. OLIVER (2009):

Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk
Vet. Microbiol. **134**, 73-81

SCHÖBER, R., W. CHRIST und I. PRINZ (1963):

Untersuchungen zur California-Mastitis-Reaktion
Milchwissenschaft **18**, 620-623

SCHUKKEN, Y.H., R.N. GONZÁLES, L.L. TIKOFSKY, H.F. SCHULTE, C.G. SANTISTEBAN, F.L. WELCOME, G.J.BENNETT, M.J. ZURAKOWSKI, R.N. ZADOKS (2009):

CNS mastitis: nothing to worry about?
Vet. Microbiol. **134**, 9-14

SCHUKKEN, Y.H. und QMPS STAFF (2007):

CNS mastitis: nothing to worry about
in: Final Program & Abstract Book, Heifer Mastitis Conference 2007, Ghent, Belgien, S. 21-22

SEELEMANN, M. (1964):

Über den Zellgehalt der Milch, seine Feststellung, Bedeutung und Beurteilung
Milchwissenschaft **19**, 182-194

SERIEYS, F. (1985):

Individual cow somatic cell counts. Interpretation for the diagnosis of intramammary infections
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **37**, 298-302

SHELDRAKE, R.F., G.D. MCGREGOR und R.J.T. HOARE (1983):

Somatic cell count, electrical conductivity, and serum albumin concentration for detecting bovine mastitis
J. Dairy Sci. **66**, 548-555

SHIM, E.H., R.D. SHANKS und D.E. MORIN (2004):

Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows
J. Dairy Sci. **87**, 2702-2708

SMITH, R.E. und H.V. HAGSTAD (1985):

Infection of the bovine udder with coagulase-negative staphylococci
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **37**, 611-614

SMITH, K.L., D.A. TODHUNTER und P.S. SCHOENBERGER (1985):

Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention
J. Dairy Sci. 1985, 1531-1553

SOBIRAY, A., H.-U. OSTERTAG, D. PEIP, H. BOSTEDT und G. KIELWEIN (1988):

Klinische und bakteriologische Untersuchungsbefunde zur Mastitishäufigkeit erstmalig laktierender Rinder intra und post partum
Tierärztl. Prax. **16**, 243-249

SOL, J., O.C. SAMPIMON, J.J. SNOEP und Y.H. SCHUKKEN (1994):

Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical staphylococcal mastitis with antibiotics
J. Dairy Sci. **77**, 75-79

TAPONEN, S., K. DREDGE, B. HENRIKSSON, A.-M. PYYHTIÄ, L. SUOJALA, R. JUNNI, K. HEINONEN und S. PYÖRÄLÄ (2003):

Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs. procaine penicillin G plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria – a double blind field study
J. vet. Pharmacol. Therap. **26**, 193-198

TAPONEN, S. und S. PYÖRÄLÄ (2009):

Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – not so different from *Staphylococcus aureus*?

Vet. Microbiol. **134**, 29-36

TAPONEN, S., H. SIMOJOKI, M. HAVERI, H.D. LARSEN und S. PYÖRÄLÄ (2006):

Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP

Vet. Microbiol. **115**, 199-207

TENHAGEN, B.-A., G. KÖSTER, J. WALLMANN und 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

THORBERG, B.-M. und B. BRÄNDSTRÖM (2000):

Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis

J. Vet. Med. B **47**, 683-691

TIMMS, L.L und L.H. SCHULTZ (1984):

Mastitis therapy for cows with elevated somatic cell counts or clinical mastitis

J. Dairy Sci. **67**, 367-371

TIMMS, L.L. und L.H. SCHULTZ (1987):

Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections

J. Dairy Sci. **70**, 2648-2657

TOLLE, A., W. HEESCHEN und J. HAMANN (1977):

Grundlagen einer systematischen Bekämpfung der subklinischen Mastitis des Rindes

Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **29**, 3-103

TOLLE, A., H. ZEIDLER und W. HEESCHEN (1966):

Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Milchzellen

Milchwissenschaft **21**, 93-98

TRINIDAD, P., S.C. NICKERSON und T.K. ALLEY (1990):

Prevalence of intramammary infections and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers

J. Dairy Sci. **73**, 107-114

VARALDO, P.E., G. GRAZI, G. CISANI und G. SATTA (1979):

Routine separation of staphylococci from micrococci based on bacteriolytic activity production

J. Clin. Microbiol. **9**, 147-148

VERORDNUNG (EG) NR. 178/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES VOM 28. JANUAR 2002 ZUR FESTLEGUNG DER ALLGEMEINEN GRUNDSÄTZE UND ANFORDERUNGEN DES LEBENSMITTELRECHTS, ZUR ERRICHTUNG DER EUROPÄISCHEN BEHÖRDE FÜR LEBENSMITTELSICHERHEIT UND ZUR FESTLEGUNG VON VERFAHREN ZUR LEBENSMITTELSICHERHEIT (2002):

Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 31 S. 1

VERORDNUNG (EG) NR. 853/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES MIT SPEZIFISCHEN HYGIENEVORSCHRIFTEN FÜR LEBENSMITTEL TIERISCHEN URSPRUNGS (2004):

Vom 29. April 2004, Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 139 S. 55, gesamte Vorschrift ber. ABl. Nr. L 226 S. 22, zuletzt geändert durch V (EG) Nr. 1243/2007 vom 24.10.2007 (ABl Nr. L 281/8)

VERORDNUNG ÜBER DIE GÜTEPRÜFUNG UND BEZAHLUNG DER ANLIEFERUNGSMILCH (MILCH – GÜTEVERORDNUNG) (1980):

Vom 9. Juli 1980 (BGBl. I S. 878, 1081), zuletzt geändert durch Artikel 17 der Verordnung vom 8. August 2007 (BGBl. I S. 1816)

VON RHEINBABEN, K.E. und R.M. HADLOK (1981):

Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars
Antonie van Leeuwenhoek **47**, 41-51

WAAGE, S., T. MØRK, A. RØROS, D. AASLAND, A. HUNSHAMAR und S.A. ØDEGAARD (1999):

Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers
J. Dairy Sci. **82**, 712-719

WATTS, J.L. (1985):

Impact of new staphylococcal species descriptions on mastitis research
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. **37**, 549-553

WATTS, J.L. und S.C. NICKERSON (1986):

A comparison of the Staph-Ident and Staph-Trac systems to conventional methods in the identification of staphylococci isolated from bovine udders
Vet. Microbiol. **12**, 179-187

WATTS, J.L., C.H. RAY und P.J. WASHBURN (1991):

A convenient method for the differentiation of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands
J. Dairy Sci. **74**, 426-428

WATTS, J.L., S.A. SALMON, R.J. YANCEY, JR., S.C. NICKERSON, L.J. WEAVER, C. HOLMBERG, J.W. PANKEY und L.K. FOX (1995):

Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers
J. Dairy Sci. **78**, 1637-1648

WATTS, J.L. und P.J. WASHBURN (1991):

Evaluation of the Staph-ZYM system with staphylococci isolated from bovine intramammary infections
J. Clin. Microbiol. **29**, 59-61

WENDT, K., K.-H. LOTTHAMMER, K. FEHLINGS und M. SPOHR (1998):

Handbuch Mastitis
Kluge Verlag GmbH & Co., Osnabrück

WHITE, D.G., R.J. HARMON, J.E.S. MATOS und B.E. LANGLOIS (1989):

Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers

J. Dairy Sci. **72**, 1886-1892

WILSON, D.J., R.N. GONZALES, K.L. CASE, L.L. GARRISON und Y.T. GRÖHN (1999):

Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens

J. Dairy Sci. **82**, 1664-1670

ZEIDLER, H., A. TOLLE und W. HEESCHEN (1968):

Zur Beurteilung zytologisch-bakteriologischer Untersuchungsbefunde im Rahmen der Mastitisdiagnostik

Milchwissenschaft **23**, 674-677

ZHANG, S. und C.W. MADDOX (2000):

Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis

Infection and Immunity **68**, 1102-1108

ZIEGER, P. (2007):

...und in Deutschland schaut man tatenlos zu?

VETimpulse 16. Jahrgang Ausgabe 16, 9

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 2 | 19 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 19 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 19 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 20 | 1 | 8 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 20 | 2 | 4 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 20 | 3 | 4 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 20 | 4 | 6 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 21 | 1 | 11 | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 2 | 21 | 2 | 147 | 1 | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 2 | 21 | 3 | 27 | 1 | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | 21 | 4 | 275 | 1 | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 2 | 22 | 1 | 11 | 1 | | ha / si | 33 | | | | | | | | | | |
| 2 | 22 | 2 | 3 | 1 | | ha / xy | 32 | | | | | | | | | | |
| 2 | 22 | 3 | 5 | 1 | | ha / si | 32 | | | | | | | | | | |
| 2 | 22 | 4 | 97 | 1 | | xy | 3 | | | | | | | | | | |
| 2 | 23 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 23 | 2 | 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 23 | 3 | 12 | | | ha / si | 22 | | | | | | | | | | |
| 2 | 23 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 24 | 1 | 2 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 24 | 2 | 5 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 24 | 3 | 3 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 24 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 25 | 1 | 75 | | | | | | | 1 | | | 1 | | | | |
| 2 | 25 | 2 | 40 | | | xy | 2 | | | | | | | | | | |
| 2 | 25 | 3 | 4876 | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| 2 | 25 | 4 | 6294 | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| 2 | 26 | 1 | 63 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | 26 | 2 | 206 | | | wa | 2 | | | | | | | | | | |
| 2 | 26 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 26 | 4 | 22 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 27 | 1 | 27 | | | xy | 3 | | | | | | | | | | |
| 2 | 27 | 2 | 8 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 27 | 3 | 9 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 27 | 4 | 38 | | | xy | 3 | | | | | | | | | | |
| 2 | 28 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 28 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 28 | 3 | 36 | | | xy | 3 | | | | | | | | | | |
| 2 | 28 | 4 | 296 | | | ha / xy | 21 | | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 6 | 6 | 3 | 33 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 6 | 4 | 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 7 | 1 | 102 | | | ha | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 6 | 7 | 2 | 47 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 6 | 7 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 7 | 4 | 100 | | | ch | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 8 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 8 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 8 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 8 | 4 | 643 | | | ch | 3 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 9 | 1 | 9 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 9 | 2 | 4 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 9 | 3 | 4 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 9 | 4 | 5 | | | ch | 2 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 10 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 10 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 10 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 10 | 4 | 257 | | | ch | 3 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 11 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 11 | 2 | 110 | | | ch | 3 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 11 | 3 | 8 | | | ch | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 11 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 12 | 1 | 22 | | | ha | 2 | | | | | | | | | | |
| 6 | 12 | 2 | 8463 | | | ha | 1 | | | | | | | | | | |
| 6 | 12 | 3 | 154 | | | ha | 3 | | | 1 | | | | | | | |
| 6 | 12 | 4 | 47 | | | ch | 3 | | | | | | | | | 1 | |
| 6 | 13 | 1 | 74 | | | ch | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 13 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 13 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 13 | 4 | 64 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 6 | 14 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 14 | 2 | 8 | | | ch | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 6 | 14 | 3 | 6 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 14 | 4 | 77 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 15 | 1 | 7 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 15 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 15 | 3 | 6 | | | ch | 2 | | | | | | | | 1 | | |
| 6 | 15 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 16 | 1 | 22 | 1 | | ch | 2 | | | | | | | | 1 | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 6 | 26 | 1 | 30 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 26 | 2 | 8 | 1 | | si | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 6 | 26 | 3 | | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 26 | 4 | 10 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 27 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 27 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 27 | 3 | 40 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 27 | 4 | 218 | | | ch | 2 | | | | | | | | | 1 | |
| 6 | 28 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 28 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 28 | 3 | 32 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 28 | 4 | 117 | | | ha | 3 | | | | | | | | | | |
| 6 | 29 | 1 | 45 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 29 | 2 | 111 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 6 | 29 | 3 | 5 | | | ha | 2 | | | | | | | | | | |
| 6 | 29 | 4 | 592 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 30 | 1 | 79 | | | ch | 2 | | | | | | | | | | |
| 6 | 30 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 30 | 3 | 21 | | | ch | 2 | | | | | | | | | | |
| 6 | 30 | 4 | 27 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 1 | 1 | 31 | | | wa | 2 | | | | | | | | | | |
| 7 | 1 | 2 | 6 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 1 | 3 | 12 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 1 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 2 | 1 | 216 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 2 | 2 | 102 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 2 | 3 | 219 | | | ni / sc | 11 | | | | | | | | | | |
| 7 | 2 | 4 | 231 | | | sc | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 3 | 1 | 148 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 3 | 2 | 555 | | | sc | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 3 | 3 | 135 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 7 | 3 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 4 | 1 | 9 | 1 | | wa | 1 | | | | | | | | | | |
| 7 | 4 | 2 | 1246 | 1 | | ha | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 4 | 3 | 19 | 1 | | wa | 3 | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 4 | 4 | 21 | 1 | | ha / wa | 12 | | | | | | | | | | |
| 7 | 5 | 1 | 21 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 5 | 2 | 81 | 1 | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 5 | 3 | 420 | 1 | | | | | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 7 | 5 | 4 | 103 | 1 | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 6 | 1 | 85 | 1 | | wa | 1 | | | | | | | | | | |
| 7 | 6 | 2 | 8 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 6 | 3 | 28 | 1 | | wa | 2 | | | | | | | | | | |
| 7 | 6 | 4 | 7 | 1 | | ha / sc | 11 | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 7 | 1 | 875 | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| 7 | 7 | 2 | 949 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 7 | 3 | 160 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 7 | 4 | 803 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 8 | 1 | 22 | | | ep | 1 | | 1 | | | | | | | | |
| 7 | 8 | 2 | 642 | | | ha | 2 | | 1 | | | | | | | | |
| 7 | 8 | 3 | 67 | | | ep | 2 | | | | | | | | | | |
| 7 | 8 | 4 | 14 | | | ep | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 9 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 9 | 2 | 14 | | | sc | 1 | | | | | | | | | | |
| 7 | 9 | 3 | 23 | | | sc | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| 7 | 9 | 4 | 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 10 | 1 | 128 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 10 | 2 | 204 | | | | | | 1 | | | | | | | | |
| 7 | 10 | 3 | 1944 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 10 | 4 | 802 | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| 7 | 11 | 1 | 69 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 11 | 2 | 90 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 11 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 11 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 12 | 1 | 135 | | | | | | 1 | | | | | | | | |
| 7 | 12 | 2 | 30 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 12 | 3 | 310 | | | | | | 1 | | | | | | | | |
| 7 | 12 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 13 | 1 | | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 13 | 2 | 9 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 13 | 3 | 18 | 1 | | ha | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 13 | 4 | 16 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 14 | 1 | 16 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 14 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 14 | 3 | 37 | | | sc | 1 | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 14 | 4 | 51 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 15 | 1 | 138 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 15 | 2 | 455 | | | | | | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 7 | 15 | 3 | 174 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 15 | 4 | 497 | | | | | | | 1 | | | 1 | | | | |
| 7 | 16 | 1 | 13 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 16 | 2 | 162 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 16 | 3 | 338 | | | | | | | | | | | 1 | | | |
| 7 | 16 | 4 | 460 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 17 | 1 | 212 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 17 | 2 | 153 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 17 | 3 | 220 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 17 | 4 | 144 | | | sc | 1 | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 18 | 1 | 9 | | | sc | 1 | | | | | | | | | | |
| 7 | 18 | 2 | 231 | | | wa | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 18 | 3 | 17 | | | xy | 2 | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 18 | 4 | 43 | | | wa / ch | 33 | | | | | | | | | | |
| 7 | 19 | 1 | 114 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 19 | 2 | 474 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 19 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 19 | 4 | 111 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 7 | 20 | 1 | 10 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 20 | 2 | 10 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 20 | 3 | 9 | 1 | | ep / wa | 11 | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 20 | 4 | 8 | 1 | | ep | 2 | | | | | | | | | | |
| 7 | 21 | 1 | 90 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 21 | 2 | 1087 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 21 | 3 | 234 | | | sc | 1 | | | | | | | | | | |
| 7 | 21 | 4 | 100 | | | sc | 1 | | | | | | | | | | |
| 7 | 22 | 1 | 388 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 22 | 2 | 426 | | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| 7 | 22 | 3 | 289 | | | wa | 3 | | | | | | | | | | |
| 7 | 22 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 23 | 1 | 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 23 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 23 | 3 | 31 | | | sc | 1 | 1 | | | | | | | | | |
| 7 | 23 | 4 | 291 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 24 | 1 | 1726 | | | ha | 3 | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 24 | 2 | 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 24 | 3 | 725 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 7 | 24 | 4 | 1081 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 25 | 1 | 1102 | | | | | | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 8 | 5 | 1 | 10 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 5 | 2 | 9 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 5 | 3 | 9 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 5 | 4 | 11 | 1 | | xy | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | 6 | 1 | 234 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 6 | 2 | 42 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 8 | 6 | 3 | 28 | | | xy | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 6 | 4 | 26 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 7 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 7 | 2 | 86 | | | xy | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | 7 | 3 | 27 | | | xy | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 7 | 4 | 60 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 8 | 1 | 7 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 8 | 2 | 8 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 8 | 3 | 11 | 1 | | xy | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 8 | 4 | 13 | 1 | | xy | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 9 | 1 | 22 | 1 | | xy | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | 9 | 2 | 47 | 1 | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 8 | 9 | 3 | 16 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 9 | 4 | 20 | 1 | | wa | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | 10 | 1 | 149 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 8 | 10 | 2 | 203 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 8 | 10 | 3 | 196 | | | | | | | 1 | | | | | 1 | | |
| 8 | 10 | 4 | 328 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 8 | 11 | 1 | 61 | | | ha | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | 11 | 2 | 4338 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 8 | 11 | 3 | 2005 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 8 | 11 | 4 | 806 | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | |
| 8 | 12 | 1 | 145 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 12 | 2 | 137 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 12 | 3 | 326 | | | xy | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 12 | 4 | 312 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 8 | 13 | 1 | 94 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 13 | 2 | 82 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 13 | 3 | 83 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 8 | 13 | 4 | 7191 | | | ha | 1 | | | 1 | | | | | 1 | | |
| 8 | 14 | 1 | 379 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 8 | 14 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 14 | 3 | 41 | | | | | | | | | | | | 1 | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 8 | 24 | 3 | 10 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 24 | 4 | 30 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 25 | 1 | 2031 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 25 | 2 | 220 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 25 | 3 | 197 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 25 | 4 | 1382 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 26 | 1 | 134 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 8 | 26 | 2 | 134 | | | xy | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 26 | 3 | 254 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 8 | 26 | 4 | 36 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 27 | 1 | 10 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 27 | 2 | 6 | | | xy | 2 | 1 | | | | | | | | | |
| 8 | 27 | 3 | 5 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 27 | 4 | 8 | | | xy | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | 28 | 1 | 648 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 8 | 28 | 2 | 295 | | | xy | 1 | | | | | | | | | 1 | |
| 8 | 28 | 3 | 2090 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 28 | 4 | 398 | | | xy | 1 | | | | | | | | | | |
| 8 | 29 | 1 | 55 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 29 | 2 | 131 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 29 | 3 | 87 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 8 | 29 | 4 | 79 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 30 | 1 | 2337 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 8 | 30 | 2 | 3558 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 30 | 3 | 364 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 8 | 30 | 4 | 503 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 1 | 1 | 8 | | | ep / co | 22 | | | 1 | | | | | | | |
| 9 | 1 | 2 | 3 | | | ep / wa | 11 | | | 1 | | | | | | | |
| 9 | 1 | 3 | 4 | | | ni | 1 | | | | | | | | | | |
| 9 | 1 | 4 | 8 | | | ni / sa | 11 | | | 1 | | | | | | | |
| 9 | 2 | 1 | 702 | | | ep / wa | 32 | | | | | | | | | 1 | |
| 9 | 2 | 2 | 65 | | | ep | 1 | | | | | | | | | 1 | |
| 9 | 2 | 3 | 297 | | | ep / wa | 21 | | | | | | | | | | 1 |
| 9 | 2 | 4 | 78 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 9 | 3 | 1 | 8 | | | wa | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 9 | 3 | 2 | 18 | | | wa | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 9 | 3 | 3 | 12 | | | wa | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 9 | 3 | 4 | 6 | | | ep | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 9 | 4 | 1 | 7 | 1 | | xy | 1 | | | 1 | | | | | | 1 | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 12 | 2 | 1 | 17 | | | wa | 2 | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 12 | 2 | 2 | 15 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 12 | 2 | 3 | 45 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 12 | 2 | 4 | 76 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 12 | 3 | 1 | 11 | | | ha | 2 | 1 | | | | | | | | | |
| 12 | 3 | 2 | 12 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 3 | 3 | 13 | | | ni | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 3 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 4 | 1 | 12 | | | co | 2 | | | | | | | | | | |
| 12 | 4 | 2 | 8 | | | si | 2 | | | | | | | | | | |
| 12 | 4 | 3 | 7 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 4 | 4 | 8 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 12 | 5 | 1 | 17 | | | ha | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 5 | 2 | 667 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 12 | 5 | 3 | 8 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 5 | 4 | 10 | | | sc | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 6 | 1 | 7 | | | ha | 2 | 1 | | | | | | | | | |
| 12 | 6 | 2 | 384 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 12 | 6 | 3 | 4 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 6 | 4 | 164 | | | sc | 3 | | 1 | | | | | | | 1 | |
| 12 | 7 | 1 | 14 | | | co | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 7 | 2 | 14 | | | ha | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 7 | 3 | 8 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 7 | 4 | 11 | | | sc | 2 | | 1 | | | | | | | | |
| 12 | 8 | 1 | 11 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 8 | 2 | 10 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 8 | 3 | 12 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 8 | 4 | 152 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 12 | 9 | 1 | 112 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 12 | 9 | 2 | 9 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 12 | 9 | 3 | 6580 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 12 | 9 | 4 | 130 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 12 | 10 | 1 | 611 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 12 | 10 | 2 | 299 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 3 | 1000 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 4 | 1702 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 11 | 1 | 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 11 | 2 | 10 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 11 | 3 | 8 | | | si | 1 | | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|-----|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 12 | 11 | 4 | 11 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 12 | 1 | 47 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 12 | 2 | 63 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 12 | 3 | 39 | | | si | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 12 | 4 | 29 | | | si | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 13 | 1 | 140 | | | ha | 3 | | | | | | | | | | |
| 12 | 13 | 2 | 38 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 13 | 3 | 11 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 13 | 4 | 913 | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| 12 | 14 | 1 | 177 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 12 | 14 | 2 | 103 | | | ep | 2 | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 12 | 14 | 3 | 36 | | | wa / co | 22 | | | | | | | | | 1 | |
| 12 | 14 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 15 | 1 | 620 | | | co | 2 | 1 | | | | | | | | 1 | |
| 12 | 15 | 2 | 141 | | | ha | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 15 | 3 | 301 | | | co | 2 | | | | | | | | | | |
| 12 | 15 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 16 | 1 | 90 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 16 | 2 | 56 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 12 | 16 | 3 | 15 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 16 | 4 | 48 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 17 | 1 | 42 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 12 | 17 | 2 | 11 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 17 | 3 | 5 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 17 | 4 | 6 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 12 | 18 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 18 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 18 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 18 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 19 | 1 | 7 | | | wa | 2 | | | 1 | | | | | | 1 | |
| 12 | 19 | 2 | 314 | | | ch | 4 | | | | | | | | | | |
| 12 | 19 | 3 | 9 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 12 | 19 | 4 | 160 | | | si | 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 20 | 1 | 14 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 20 | 2 | 10 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 20 | 3 | 33 | | | wa | 2 | | | | | | | | | | |
| 12 | 20 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 21 | 1 | 30 | | | ni | 1 | | | | | | | | | 1 | |
| 12 | 21 | 2 | 5 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|-----|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 14 | 29 | 4 | 4 | 1 | | xy | 2 | | | | | | | | | | |
| 14 | 30 | 1 | 88 | | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| 14 | 30 | 2 | 19 | | | ha / ep | 22 | | | | | | | | | | 1 |
| 14 | 30 | 3 | 80 | | | xy / sa | 22 | | | 1 | | | | | | | 1 |
| 14 | 30 | 4 | 32 | | | co | 2 | | | | | | | | 1 | | |
| 15 | 1 | 1 | 98 | 1 | | ni | 3 | | | | | | | | | | |
| 15 | 1 | 2 | 871 | 1 | | si / xy | 21 | | | | | | | | | | |
| 15 | 1 | 3 | 124 | 1 | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 15 | 1 | 4 | 15 | 1 | | ep | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 2 | 1 | 20 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 2 | 2 | 45 | | | ep | 1 | | | | | | | | | 1 | |
| 15 | 2 | 3 | 33 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | 1 |
| 15 | 2 | 4 | 30 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 3 | 1 | 33 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 3 | 2 | 52 | 1 | | xy | 1 | | | | | | | | | | |
| 15 | 3 | 3 | 54 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 3 | 4 | 29 | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | |
| 15 | 4 | 1 | 20 | | | ep | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 4 | 2 | 51 | | | si | 2 | | | | | | | | | 1 | |
| 15 | 4 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 4 | 4 | 20 | | | ha / ep | 32 | | | | | | | | | | |
| 15 | 5 | 1 | 18 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 5 | 2 | 12 | 1 | | xy | 2 | | | | | | | | | | |
| 15 | 5 | 3 | 20 | 1 | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 15 | 5 | 4 | 21 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 6 | 1 | 172 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 6 | 2 | 152 | | | wa / ha | 32 | | | | | | | | | | |
| 15 | 6 | 3 | 75 | | | wa | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 6 | 4 | 48 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 7 | 1 | 47 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 7 | 2 | 96 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 7 | 3 | 51 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 7 | 4 | 57 | 1 | | wa | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 8 | 1 | 30 | 1 | | ha / co | 12 | | | | | | | | | | |
| 15 | 8 | 2 | 12 | 1 | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 8 | 3 | 202 | 1 | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 15 | 8 | 4 | 5 | 1 | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 9 | 1 | 6 | | | ha | 2 | | | 1 | | | | | | 1 | |
| 15 | 9 | 2 | 22 | | | ep | 1 | | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|-----|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 15 | 9 | 3 | 3 | | | ep | 2 | | | | | | | | 1 | | |
| 15 | 9 | 4 | 71 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 10 | 1 | 13 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 10 | 2 | 69 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 10 | 3 | 14 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 10 | 4 | 10 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 11 | 1 | 102 | | | xy | 3 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 11 | 2 | 111 | | | sc / co | 22 | | | | | | | | | | |
| 15 | 11 | 3 | 32 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 11 | 4 | 129 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 12 | 1 | 16 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 12 | 2 | 6 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 12 | 3 | 43 | | | sa | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 12 | 4 | 7 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 13 | 1 | 19 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 13 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 13 | 3 | 27 | | | wa | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 13 | 4 | 5 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 14 | 1 | 225 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 14 | 2 | 112 | | | ep / sa | 22 | | | | | | | | | | |
| 15 | 14 | 3 | 31 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 15 | 14 | 4 | 48 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 15 | 1 | 180 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 15 | 15 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 15 | 3 | 21 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| 15 | 15 | 4 | 32 | | | ep | 2 | | | | | | | | 1 | | |
| 15 | 16 | 1 | 17 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 16 | 2 | 11 | 1 | | | | | | 1 | | | | | 1 | | |
| 15 | 16 | 3 | 21 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 16 | 4 | 13 | 1 | | wa | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 17 | 1 | 33 | | | co | 2 | | | | | | | | | | |
| 15 | 17 | 2 | 13 | | | ha | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 17 | 3 | 182 | | | ep | 1 | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 17 | 4 | 125 | | | ep | 1 | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 18 | 1 | 10 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 18 | 2 | 11 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 18 | 3 | 53 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 18 | 4 | 14 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 19 | 1 | 8 | | | xy | 2 | | | 1 | | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 15 | 19 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 19 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 19 | 4 | 44 | | | co | 2 | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 20 | 1 | 17 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 20 | 2 | 59 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 20 | 3 | 19 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 20 | 4 | 18 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 21 | 1 | 163 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 21 | 2 | 45 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 21 | 3 | 84 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 21 | 4 | 158 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 15 | 22 | 1 | 6 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 22 | 2 | 4 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 22 | 3 | 5 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 22 | 4 | 12 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 23 | 1 | 22 | | | co | 3 | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 23 | 2 | 33 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 23 | 3 | 57 | | | co | 1 | | | | | | | | | 1 | |
| 15 | 23 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 24 | 1 | 27 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 24 | 2 | 313 | | | xy | 2 | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 24 | 3 | 43 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 24 | 4 | 58 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 15 | 25 | 1 | 7 | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 25 | 2 | 5 | 1 | | ep | 1 | | | | 1 | | | | | 1 | |
| 15 | 25 | 3 | 92 | 1 | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 15 | 25 | 4 | 6 | 1 | | ha | 3 | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 26 | 1 | 17 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 26 | 2 | 2 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 26 | 3 | 1118 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 26 | 4 | 1220 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 15 | 27 | 1 | 61 | | | ch | 3 | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 27 | 2 | 329 | | | ch | 4 | | | | | | | | | | |
| 15 | 27 | 3 | 9 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 27 | 4 | 17 | | | co | 2 | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | 28 | 1 | 304 | | | si | 1 | | | | 1 | | | | | 1 | |
| 15 | 28 | 2 | 10 | | | | | | | | 1 | | | | | 1 | |
| 15 | 28 | 3 | 279 | | | ep | 3 | | | | | | | | | | |
| 15 | 28 | 4 | 496 | | | ep | 2 | | | | 1 | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 16 | 28 | 2 | 2 | | | xy | 3 | | | | | | | | | | |
| 16 | 28 | 3 | 6 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 28 | 4 | 7 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 29 | 1 | 261 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 29 | 2 | 199 | | | xy | 3 | | | | | | | | | | |
| 16 | 29 | 3 | 166 | | | ch | 4 | | | | | | | | | | |
| 16 | 29 | 4 | 217 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 16 | 30 | 1 | 6 | 1 | | le | 3 | | | | | | | | | | |
| 16 | 30 | 2 | 71 | 1 | | xy | 3 | | | | | | | | | 1 | |
| 16 | 30 | 3 | 66 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 30 | 4 | 4 | 1 | | xy | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 1 | 2 | 84 | | | wa | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 1 | 3 | 531 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 1 | 4 | 404 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 2 | 1 | 49 | 1 | | wa | 1 | | | | | | | | | | |
| 17 | 2 | 2 | 6 | 1 | | wa / si | 33 | | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 2 | 3 | 75 | 1 | | sc | 2 | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 2 | 4 | 116 | 1 | | ni | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 3 | 1 | 30 | | | wa | 2 | | | | | | | | | | |
| 17 | 3 | 2 | 41 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 3 | 3 | 23 | | | | | | | | 1 | | | | | 1 | |
| 17 | 3 | 4 | 9 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 4 | 1 | 14 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 4 | 2 | 45 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 4 | 3 | 41 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 4 | 4 | 41 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 5 | 1 | 46 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 5 | 2 | 31 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 5 | 3 | 47 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 5 | 4 | 8 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 6 | 1 | 19 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 6 | 2 | 28 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 6 | 3 | 25 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 6 | 4 | 770 | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| 17 | 7 | 1 | 14 | | | wa / ep | 22 | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 7 | 2 | 15 | | | wa | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 7 | 3 | 33 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 7 | 4 | 1821 | | | | | | | | 1 | | | | | | |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|-----|------|------|---------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 17 | 8 | 1 | 13 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 8 | 2 | 6 | | | wa / ha | 23 | | | | | | | | | | |
| 17 | 8 | 3 | 5 | | | wa | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 8 | 4 | 16 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 9 | 1 | 7 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 9 | 2 | 200 | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 17 | 9 | 3 | 12 | | | ep | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 9 | 4 | 7 | | | ha / co | 13 | | | | | | | | | | |
| 17 | 10 | 1 | 36 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 10 | 2 | 32 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 10 | 3 | 15 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 10 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 11 | 1 | 7 | 1 | | ha | 1 | | | | | | | | | | |
| 17 | 11 | 2 | 18 | 1 | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 11 | 3 | 7 | 1 | | | | | | | | | | | 1 | | |
| 17 | 11 | 4 | 10 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 12 | 1 | 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 12 | 2 | 20 | | | wa | 3 | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 12 | 3 | 5 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 12 | 4 | 4 | | | wa | 3 | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 13 | 1 | 31 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 13 | 2 | 244 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 13 | 3 | 41 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 13 | 4 | 133 | | | co | 2 | 1 | | 1 | | | | | 1 | | |
| 17 | 14 | 1 | 58 | | | ni | 3 | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 14 | 2 | 67 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 14 | 3 | 48 | | | ch | 3 | | | | | | | | | | |
| 17 | 14 | 4 | 22 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 15 | 1 | 31 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 15 | 2 | 50 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 15 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 15 | 4 | 84 | | | ch | 3 | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 16 | 1 | 11 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 17 | 16 | 2 | 99 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 16 | 3 | 14 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 16 | 4 | 54 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 17 | 1 | 23 | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| 17 | 17 | 2 | 13 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 17 | 3 | 22 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | 1 |

| KNS- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|------|------|------|------|-------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. | Kuh | V. | ZZ | Kal. | k.w. | spp. | Int. | M./K. | S.a. | ÄPS | ÄNS | E.c. | Kl. | Ps. | Co. | He. | Pr. |
| 17 | 27 | 3 | 9 | | | ni | 3 | | | | | | | | | | 1 |
| 17 | 27 | 4 | 41 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 28 | 1 | 59 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 17 | 28 | 2 | 837 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 17 | 28 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 28 | 4 | 842 | | | ni | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 29 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 29 | 2 | 93 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 29 | 3 | 130 | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 17 | 29 | 4 | 9771 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 30 | 1 | 266 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 30 | 2 | 1681 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 30 | 3 | 153 | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 17 | 30 | 4 | 12 | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |

B. = Betrieb, Kuh = fortlaufende Tiernummer des Betriebes, V. = Viertel (1 = vorne rechts, 2 = hinten rechts, 3 = vorne links, 4 = hinten links), ZZ = somatische Zellzahl, k.W. = kein mikrobiologisches Wachstum, KNS-spp. = KNS-Spezies (ch = *S. chromogenes*, ep = *S. epidermidis*, ha = *S. haemolyticus*, ho = *S. hominis*, hy = *S. hyicus*, ni = nicht identifiziert; si = *S. simulans*, wa = *S. warneri*, co = *S. cohnii*, le = *S. lentus*, sa = *S. saprophyticus*, sc = *S. sciuri*, xy = *S. xylosum*), Int. = Intensität (angegeben in der Reihenfolge wie unter KNS-spp.), M./K. = *Micrococcus* und *Kocuria* Spezies, S.a. = *S. aureus*, ÄPS = äskulin-positive Streptokokken, ÄNS = äskulin-negative Streptokokken, E.c. = *Escherichia coli*, Kl. = *Klebsiella* Spezies, Ps. = *Pseudomonas* Spezies, Co. = Corynebakterien, He. = Hefen, Pr = *Proteus* Spezies; grau unterlegt = Viertelgemelksproben, die aus unterschiedlichen Gründen nicht in die Auswertung eingingen.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Usleber ganz herzlich für die Überlassung dieses Themas, für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine Unterstützung bei der Anfertigung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Diana Klotz und Frau Cornelia Eichmann, die durch ihre fachliche Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Keuchler und Herrn Vogt danke ich für ihr stets freundliches und hilfreiches Entgegenkommen bei der Kontaktvermittlung zu den Probetrieben.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Zentrallabors für Milchuntersuchungen in Alsfeld, hier besonders Frau Katja Olf.

Allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut; Frau Christa Zeidler danke ich zusätzlich für die souveräne Unterstützung bei allen administrativen Belangen dieser Arbeit.

Allen Betriebsleitern der Milchviehbetriebe möchte ich an dieser Stelle für ihre Teilnahme an dieser Studie und ihre freundliche Unterstützung beim Probennehmen danken.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung in dieser Zeit; meinem Vater Dietbrandt Cassel und meiner Schwester Christine Cassel-Schneider danke ich besonders für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Als bewährter Mitstreiterin während der gesamten Zeit danke ich Frau Charlotte Kurz.

Meinem Freund Michael Haag danke ich für seinen durch absolut nichts zu erschütternden Optimismus, den ich in allen Zeiten stets bewundert habe.

edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5458-X



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 4 5 8 8