

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Möglichkeiten und Grenzen der Mastitisdiagnostik mittels
MALDI-TOF MS-Analytik und molekularbiologischen
Methoden**

von

Kerstin Sauerbrey

aus Illertissen

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
– Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer –

Mitbetreuung durch
– Dr. Christina Hölzel –

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dipl. ECAR J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Petra Kölle

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1 Mastitis	3
2.1.1 Definition und wirtschaftliche Bedeutung	3
2.1.2 Ursachen	3
2.1.3 Klinische und subklinische Mastitis	4
2.1.4 Diagnostikmöglichkeiten	5
2.2 Mastitiserreger	6
2.2.1 Grampositive Bakterien	7
2.2.1.1 <i>Corynebacterium bovis</i>	7
2.2.1.2 Enterokokken	7
2.2.1.3 Staphylokokken	8
2.2.1.4 Streptokokken	10
2.2.1.5 <i>Trueperella pyogenes</i> (vormals <i>Arcanobacterium pyogenes</i>)	12
2.2.2 Gramnegative Bakterien	13
2.2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	13
2.2.2.2 Klebsiellen	14
2.2.2.3 <i>Serratia marcescens</i>	15
2.2.3 Zellwandlose Bakterien	15
2.2.3.1 <i>Mycoplasma bovis</i>	15
2.2.4 „nicht-bakterielle“ Mastitis-Erreger	16
2.2.4.1 Hefen	16
2.2.4.2 Prototheken	17
2.3 Therapie	18
2.4 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	19
2.5 MALDI-TOF MS Analytik	22
2.5.1 Aufbau und Funktionsweise	22
2.5.2 Datenbanken	24
2.6 PathoProof Mastitis PCR Assay	24
2.6.1 Überblick	24
2.6.2 Die Polymerase-Kettenreaktion	25
2.6.3 Real-Time PCR und Ergebnisse	26

2.7 Die 16S rRNA-Gen-Analyse	27
2.7.1 Überblick	27
2.7.2 Funktionsweise der Sequenzierung mittels Dye-Terminatoren	28
3. Material und Methoden	29
3.1 Probenmaterial	29
3.2 Labormaterial und Geräte	30
3.2.1 Chemikalien und Biochemika.....	30
3.2.2 Antibiotika und Sulfonamide	32
3.2.3 Bakterien-Stämme bzw. Isolate	32
3.2.4 Nährmedien.....	33
3.2.5 Puffer und Lösungen	36
3.2.6 Sonstige Materialien & Kits.....	36
3.2.7 Geräte	39
3.3 Methoden	40
3.3.1 Überblick	40
3.3.2 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	41
3.3.2.1 Anzüchten auf festem Nährboden	41
3.3.2.2 Anzüchten im Anreicherungsmedium.....	41
3.3.2.3 Clumping-Faktor-Test/ Koagulase-Test.....	41
3.3.2.4 Gram-Färbung	42
3.3.2.5 Auswertung.....	42
3.3.2.6 Resistenztest	45
3.3.3 Untersuchung mittels MALDI-TOF MS.....	46
3.3.3.1 Untersuchung der Subkulturen mittels MALDI-TOF MS	46
3.3.3.2 Direkte Untersuchung der Milch mittels MALDI-TOF MS (MALDI Sepsityper™Kit)	48
3.3.3.3 Verbesserung der Datenbank für Mastitis-relevante Erreger	49
3.3.4 Messung von DSM-Stämmen zur Validierung	51
3.4 Untersuchung mittels PCR	52
3.4.1 DNA-Isolation	52
3.4.1.1 DNA-Isolation aus Routineproben	52
3.4.1.2. Vergleich verschiedener Isolationskits für die DNA-Extraktion aus Milch.....	54
3.4.2 Untersuchung der DNA-Proben mittels PCR	57
3.4.2.1 PathoProof Mastitis PCR Assay	57
3.4.2.2 Die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung.....	63

4. Ergebnisse.....	73
4.1 Ergebnisse der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung.....	73
4.2 Ergebnisse der MALDI-TOF MS-Analytik.....	76
4.2.1 Validierung.....	76
4.2.1.1 Messung der DSM-Stämme mit MALDI-TOF MS.....	76
4.2.1.2 Verdünnungsreihe mit DSMZ-Stämmen.....	77
4.2.2 Proben aus der Routinediagnostik.....	78
4.2.2.1 Untersuchung der Subkulturen aus der Mastitisiagnostik.....	78
4.2.2.2 Untersuchung von Milchproben ohne Kultivierungsschritt.....	83
4.2.3 Eingelesene Spektren.....	86
4.3 Ergebnisse des PathoProof Mastitis PCR Assay.....	87
4.3.1 Validierung.....	87
4.3.1.1 Messung der DSM-Stämme mit PathoProof Mastitis PCR Assay.....	87
4.3.1.2 Spezifität des PathoProof Mastitis PCR Assay.....	87
4.3.1.3 Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay.....	91
4.3.1.4 Subkulturen aus der Routinediagnostik.....	96
4.3.1.5 Vergleich der manuellen Auswertung mit Norden Lab Mastitis Studio.....	98
4.3.1.6 Vergleich der Ergebnisse von TMO-Proben aus Finnland und Proben aus Deutschland.....	99
4.3.1.7 Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren für das PathoProof Mastitis PCR Assay.....	99
4.3.2 Proben aus der Routinediagnostik.....	100
4.3.2.1 Milchproben aus der Routinediagnostik.....	100
4.3.2.2 Vorkommen des <i>blaZ</i> -Gens.....	104
4.3.2.3 Berechnung von Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit des PathoProof Mastitis PCR Assay anhand der mikrobiologisch-kulturellen Diagnostik als Goldstandard.....	105
4.4 Vergleich der Ergebnisse von mikrobiologisch-kultureller Untersuchung, PathoProof Mastitis PCR Assay und MALDI-TOF MS-Analytik.....	107
4.4.1 Auffälligkeiten beim Vergleich von mikrobiologisch-kultureller Untersuchung und MALDI-TOF MS Analytik.....	110
4.4.2 Auffälligkeiten beim Vergleich von MALDI-TOF MS Analytik und PathoProof Mastitis PCR Assay.....	110
4.5 Ergebnisse der 16S rRNA Gen-Analyse.....	110
5. Diskussion.....	113
5.1 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung.....	113

5.2 MALDI-TOF MS.....	116
5.3 PathoProof Mastitis PCR Assay	121
5.4 Weitere PCR-Verfahren	131
5.5 Die 16S rRNA-Gen-Analyse	133
5.6 Vergleich der Methoden	135
6. Zusammenfassung	137
7. Summary	139
8. Verzeichnisse	140
8.1 Abkürzungsverzeichnis	140
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	143
8.3 Tabellenverzeichnis.....	144
8.4 Literaturverzeichnis	146
9. Anhang	165
10. Danksagung	188

1. Einleitung

Mastitis, eine Entzündung der Milchdrüse, zählt zu den häufigsten Erkrankungen bei Milchkühen und ist für die größten wirtschaftlichen Verluste in Milchviehbetrieben verantwortlich (De Vliegher et al., 2012; Hogeveen et al., 2011). Ursache dieser Erkrankung ist in einer Vielzahl der Fälle eine bakterielle Infektion des Euters, so dass routinemäßig im Rahmen der Diagnostik eine mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung von Gemelksproben zum Nachweis eventuell vorhandener euterpathogener Erreger angewandt wird; die mikrobiologisch-kulturelle Diagnostik gilt bis heute als Goldstandard (Reksen et al., 2006; Riffon et al., 2001). Da eine kulturelle Diagnostik jedoch zeitaufwendig ist und mindestens 24 Stunden in Anspruch nimmt, werden bereits vor der labortechnischen Diagnose sowie der Erstellung eines Antibiogramms, aufgrund der klinisch erkennbaren Symptomatik, Breitbandantibiotika eingesetzt (Keane et al., 2013). Dieses Verfahren wird mittlerweile kritisch betrachtet, da sich - aufgrund des Einsatzes von wenig wirksamen oder für die vorhandenen pathogenen Mikroorganismen unwirksamen Antibiotika - Antibiotikaresistenzen bei den entsprechenden Erregern ausbilden können; zudem besteht die Gefahr, dass bei nicht korrekt eingehaltener Wartezeit Antibiotika-Rückstände in Lebensmitteln enthalten sind (Sordillo, 2011). Neben dem angesprochenen zeitlichen Aspekt ist fehlendes Erregerwachstum in der Mastitisdiagnostik ein großes Problem. Nach Lam et al. (2009) zeigen 10 – 40 % aller Mastitisproben kein Keimwachstum auf festen Kultivierungsmedien. Aufgrund dieser Problematik wird seit einigen Jahren nach alternativen Verfahren zum Nachweis von Mastitiserregern und Antibiotikaresistenzen gesucht. Neben der MALDI-TOF MS-Analytik liegt das Augenmerk dabei vor allem auf PCR-Verfahren. In der vorliegenden Arbeit wurden Mastitisproben in einem externen Labor mittels mikrobiologisch-kultureller Untersuchung, MALDI-TOF MS-Analytik und dem PathoProof Mastitis PCR Assay untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das PathoProof Mastitis PCR Assay kann nach Silvenoinen et al. (2010) 15 wichtige Mastitiserreger sowie das *bla_Z*-Gen (ein bei Staphylokokken verbreitetes Penicillinresistenz-Gen) direkt aus der Milch innerhalb weniger Stunden nachweisen. Mittels MALDI-TOF MS können Keime aus Kulturen innerhalb einiger Minuten identifiziert werden, sofern sie in den dazugehörigen Datenbanken enthalten sind.

Sowohl die MALDI-TOF MS-Analytik als auch die PCR-Verfahren haben somit das Potenzial, Standardverfahren der Mastitisiagnostik zu optimieren oder sogar zu ersetzen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, dieses Potenzial und die Einsatzmöglichkeiten in der Routinediagnostik genauer abzuschätzen.

2. Schrifttum

2.1 Mastitis

2.1.1 Definition und wirtschaftliche Bedeutung

Mastitis ist eine Entzündung der Milchdrüse, die meist als Folge einer bakteriellen Infektion auftritt (Krömker & Friedrich, 2011) und häufig laktierende Säugetiere betrifft (Aitken et al., 2011). Es handelt sich um eine der häufigsten und schädlichsten Erkrankung von Milchkühen (De Vliegher et al., 2012), die meist kurze Zeit nach der Kalbung auftritt (Hillerton & Berry, 2005). Diese kostspielige Erkrankung führt zu wirtschaftlichen Verlusten, die von Betrieb zu Betrieb variieren und für klinische Mastitis durchschnittlich zwischen 61 € und 97 € pro Kuh und Jahr betragen (Hogeveen et al., 2011). Dies wird durch Huijps et al. (2008) bestätigt, die die wirtschaftlichen Verluste durch Mastitis auf 78 € pro Kuh und Jahr schätzten, wobei auch hier eine starke Variation zwischen den Betrieben festgestellt wurde; die Summen lagen zwischen 17 € und 198 € pro Kuh und Jahr (Huijps et al., 2008). Die wirtschaftlichen Verluste setzen sich zusammen aus der reduzierten Milchproduktion und -qualität, den Behandlungskosten, den Wiederbeschaffungskosten für gemerzte Tiere und der eingeschränkten Möglichkeit, Milchprodukte zu vermarkten (Aitken et al., 2011; Akers & Nickerson, 2011). Nach Kirst (2008) stellen Eutererkrankungen den wichtigsten Abgangsgrund dar, 15 – 30 % der Gesamtabgangsrate werden durch Mastitis verursacht.

2.1.2 Ursachen

Die Entzündung der Milchdrüse kann sowohl nicht-infektiös als auch infektiös bedingt sein. Zu den nicht-infektiösen Auslösern zählen chemische, physikalische oder traumatische Faktoren, häufiger sind jedoch infektiöse Ursachen (Barlow, 2011; Bradley, 2002).

Eine Vielzahl an Organismen kann Mastitis verursachen, darunter grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien, Mykoplasmen und Algen (Sordillo, 2011).

In einer Studie von Tenhagen et al. (2006) wurde festgestellt, dass *Corynebacterium bovis* und koagulase-negative Staphylokokken die vorherrschenden Erreger in Mastitisproben aus Deutschland sind. Von den wichtigen Mastitiserregern, die in der genannten Studie isoliert wurden, war *Staphylococcus aureus* (21,8 %) das dominante kontagiöse Pathogen und *Streptococcus uberis* (3,7 %) der maßgebliche Umwelt-assoziierte Erreger (Tenhagen et al., 2006).

2.1.3 Klinische und subklinische Mastitis

Wenn Bakterien über die Zitzenöffnung in das Euter gelangen, können sie eine entzündliche Reaktion hervorrufen, die sich in einer subklinischen oder klinischen Mastitis manifestiert (De Vliegher et al., 2012). Klinische Mastitis stellt dabei nur die Spitze des Eisberges dar, da subklinische Fälle – obgleich viel häufiger – oft unbemerkt bleiben (O’Grady & Doherty, 2009). Symptome von klinischer Mastitis umfassen typische Anzeichen einer Entzündung wie Schwellung, Rötung und Schmerz (Sordillo, 2011). Der Schweregrad der Mastitis kann fortschreiten und systemische Symptome wie Fieber, Depression, Appetitsverlust, Septikämie und in schweren Fällen sogar den Tod nach sich ziehen (Leigh, 1999; Sordillo, 2011). Die Milch von Kühen mit klinischer Mastitis ist meist verändert und kann Flocken oder Klümpchen enthalten (Smith et al., 2001). Subklinische Mastitis verläuft definitionsgemäß ohne äußerlich wahrnehmbare klinische Anzeichen (Krömker & Bruckmaier, 2007). Aufgrund des Eintritts von Leukozyten erhöht sich jedoch meist die somatische Zellzahl (Sears & McCarthy, 2003a) und es können Bakterien in der Milch festgestellt werden (Hillerton & Berry, 2005). Nach Hillerton & Berry (2005) betrifft diese Form der Mastitis 10 – 15 % der in die Mastitisiagnostik einbezogenen Kühe, jedoch ist diese Zahl aufgrund der fehlenden äußerlichen klinischen Symptome kritisch zu bewerten. Die Mastitisiagnostik anhand zytologisch-mikrobiologischer Befunde wurde in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Mastitis-Diagnostik anhand zytologisch-mikrobiologischer Befunde

(Quelle: DVG e. V. Fachgruppe "Milchhygiene" Sachverständigenausschuss "Subklinische Mastitis", 1994)

Zellgehalt der Milch	Euterpathogene Mikroorganismen	
	-	+
< 100.000 Zellen/ml	Normale Sekretion (NS)	Latente Infektion (LI)
> 100.000 Zellen/ml	Unspezifische Mastitis (US)	Mastitis (M)

Diese Definition gilt für die Untersuchung von Viertelgemelksproben, die zur üblichen Melkzeit aus dem Anfangsgemelk von Kühen in normaler Laktation entnommen werden.

2.1.4 Diagnostikmöglichkeiten

Als Maßstab für die Eutergesundheit und die Milchqualität wird die somatische Zellzahl weithin akzeptiert; sie repräsentiert sowohl auf Viertel- als auch auf Kuhebene direkt den entzündlichen Status des Euters (Rysanek et al., 2009). Zu den somatischen Zellen zählen polymorphkernige Leukozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und Epithelzellen, die grundsätzlich in jeder Milch zu finden sind (Kirst, 2008). Jedoch enthält Milch aus gesunden Vierteln nur wenige somatische Zellen, darunter hauptsächlich Epithelzellen, während die Milch aus entzündeten Vierteln eine erhöhte Anzahl an somatischen Zellen aufweist, vor allem Zellen der Abwehr (Kirst, 2008). Milch aus gesunden Vierteln enthält weniger als 100.000 Zellen/ml, Milch aus entzündeten Vierteln mehr als 200.000 Zellen/ml (Pyorala, 2003; Ruegg, 2003), wobei nach der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft bereits Zellzahlen von mehr als 100.000 Zellen/ml als unphysiologisch anzusehen sind (Fehlings et al., 2009). Da die direkte Messung der somatischen Zellzahl teuer und nicht immer möglich ist, wird mittels des California Mastitis Test die somatische Zellzahl geschätzt (Lam et al., 2009).

Die bakteriologische Kultivierung wird routinemäßig in der Mastitisdiagnostik angewandt (Reksen et al., 2006) und gilt seit langer Zeit als Goldstandard (Riffon et al., 2001). Meist werden die Kulturen nicht zur Primärdiagnostik der Mastitis, sondern bei bereits – anhand der Zellzahlsteigerung – festgestellter Mastitis nachträglich angelegt, um das Mastitispathogen zu identifizieren und ein Antibogramm von Pathogenen zu erhalten, die nach einer Routinetherapie mit Antibiotika nicht beseitigt wurden (Sears & McCarthy, 2003a).

Auf Viertelgemelkesebene zeigen etwa 10 – 40 % der Milchproben aus Mastitisfällen kein Wachstum (Lam et al., 2009). Außer mit der klassischen Mastitisuntersuchung können Mastitiserreger auch molekularbiologisch nachgewiesen werden (Spohr & Breitenwieser, 2012).

2.2 Mastitiserreger

Bei den Mastitiserregern wird zwischen kuhassoziierten Erregern und umweltassoziierten Erregern unterschieden (Krömker & Bruckmaier, 2007). Zu den kuhassoziierten Mastitiserregern gehören die Keime, die gut an das Überleben in der Milchdrüse adaptiert sind und vor allem während des Melkens übertragen werden (Bradley, 2002; Contreras & Rodriguez, 2011); es handelt sich also um kontagiöse Pathogene (Krömker & Bruckmaier, 2007). Zu diesen zählen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, Mykoplasmen (Contreras & Rodriguez, 2011) und Corynebakterien (De Kruif et al., 2007; Krömker & Bruckmaier, 2007). Während *Streptococcus dysgalactiae* von einigen Autoren zu den kuhassoziierten Erregern gezählt wird (Krömker & Bruckmaier, 2007), berichten andere Autoren von Uneinigkeit über die Gruppenzugehörigkeit dieses Pathogens (De Kruif et al., 2007). Im Gegensatz zu den kuhassoziierten Erregern können umweltassoziierte Erreger häufig – z.B. nach fäkaler Kontamination - im Boden, auf der Weide und auf anderen unbelebten Objekten gefunden werden (Contreras & Rodriguez, 2011). Sie können von der Haut, den Zitzenenden und dem Strichkanal isoliert werden, von wo aus sie Zugang zum Euter haben und so eine Mastitis verursachen können (Contreras & Rodriguez, 2011). Zu diesen Erregern zählen unter anderem Streptokokken (nicht *Streptococcus agalactiae*), coliforme Keime (*Escherichia coli*, Klebsiellen, *Enterobacter* sp.), koagulase-negative Staphylokokken (KNS) und Enterokokken (Contreras & Rodriguez, 2011; Krömker & Bruckmaier, 2007). Des Weiteren gehören *Trueperella pyogenes*, Nocardien, *Bacillus* sp., Hefen und Protothecen zu diesen sog. Umweltpathogenen (Krömker & Bruckmaier, 2007; Smith & Hogan, 2008).

Nachfolgend werden diejenigen Mastitiserreger dargestellt, die im Identifikationsspektrum des PathoProof Mastitis Complete-16 Kit enthalten sind.

2.2.1 Grampositive Bakterien

2.2.1.1 *Corynebacterium bovis*

Mikroorganismen des Genus *Corynebacterium* sind grampositive Stäbchen, unregelmäßig geformt, nicht-sporenbildend und Katalase-positiv (Hogan & Committee, 1987; NMC, 2004). Sie können 48 bis zu 96 Stunden Inkubation benötigen, um deutliches Wachstum zu zeigen (Sears & McCarthy, 2003a). Auf Blutagar stellen sie sich als bis zu einem Millimeter große, weiche, graue oder weiße, undurchsichtige, trockene Kolonien dar, die keine Hämolyse hervorrufen (Hogan & Committee, 1987). *Corynebacterium bovis* ist aerob (Whitman et al., 2012). Quellen für *Corynebacterium bovis* sind das infizierte Euter und der Zitzenkanal (Hogan & Committee, 1987). Die Übertragung erfolgt während des Melkens von Tier zu Tier oder über die Melkmaschinen, wenn keine effektive Zitzendesinfektion nach dem Melken erfolgt (NMC, 2004). *Corynebacterium bovis* gilt als hoch kontagiöses Mastitispathogen, das Euterinfektionen mit einem geringem Anstieg der somatischen Zellzahlen und einer geringen Abnahme der Milchproduktion hervorruft (NMC, 2004). Antibiotische Behandlung unter der *Corynebacterium bovis*-Mastitis ist nicht indiziert, jedoch ist das Trockenstellen unter Anwendung antibiotischer Präparate sehr effektiv für die Ausrottung dieser Infektion (Hogan & Committee, 1987).

2.2.1.2 Enterokokken

Enterokokken sind grampositiv, überwiegend fakultativ anaerob und treten alleine, paarweise oder in kurzen Ketten auf (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984). *Enterococcus faecalis* stellt sich auf Blutagar in runden, glatten Kolonien dar, die für gewöhnlich keine Hämolyse hervorrufen; *Enterococcus faecium* erscheint auf Blutagar in runden, glatten, nicht-pigmentierten Kolonien mit gelegentlicher α -Hämolyse (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984). Enterokokken werden nur in geringem Ausmaß als Tierpathogene anerkannt, dennoch gehören sie zu den mit am häufigsten isolierten Erregern aus milden und akuten klinischen Rindermastitisfällen (Werner et al., 2012). Enterokokken sind selten die Grundursache von Mastitis und sind vermutlich nicht in längerfristige Euterinfektionen mit erhöhten Zellzahlen involviert (Katholm et al., 2012). Petersson-Wolfe et al. (2009) fanden in einer Studie heraus, dass die Euterviertel früh laktierender Kühe empfänglicher für eine Infektion mit

Enterococcus faecium waren als die Viertel spät laktierender Kühe (Petersson-Wolfe et al., 2009). Über die Kontrolle und die Epidemiologie von Enterokokken-Mastitis ist bisher wenig bekannt, da der Fokus von Untersuchungen bisher meist auf der Prävalenz dieser Erkrankung lag, jedoch unterscheiden sich in den einzelnen Herden die Isolate boviner Herkunft genetisch von denen aus der Umwelt (Petersson-Wolfe et al., 2008).

2.2.1.3 Staphylokokken

Staphylokokken erscheinen als große, undurchsichtige, weiße bis gelbe Kolonien; sie sind Katalase-positiv (Sears & McCarthy, 2003a). Im Grampräparat erscheinen sie als Grampositive Kokken (Fehlings et al., 2009). Staphylokokken bilden unterschiedliche Hämolsine: das α -Hämolsin bewirkt eine vollständige Hämolyse und somit eine klare Hämolysezone, während das β -Hämolsin nur eine unvollständige Hämolyse hervorruft, die sich in einer deutlich abgegrenzten Hämolysezone darstellt; δ -Hämolsine produzieren eine sehr schmale, vollständige Hämolysezone (Fehlings et al., 2009). Überdies gibt es Staphylokokken, die keine Hämolsine bilden und somit auch keine Hämolysezone hervorrufen (Fehlings et al., 2009). Während hämolysierende Staphylokokken in der Regel Koagulase-positiv sind, sind Staphylokokken mit sehr schmaler Hämolysezone meist Koagulase-negativ (Fehlings et al., 2009).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus zählt neben den Streptokokken zu den bedeutendsten Mastitiserregern (Bes et al., 2000). *Staphylococcus aureus* kann subklinische und klinische Mastitis mit leichten, aber auch schweren lokalen sowie systemischen Anzeichen hervorrufen (Taponen & Pyorala, 2009). Die Mehrheit der Euterinfektionen mit *Staphylococcus aureus* verläuft jedoch subklinisch (Cederlöf et al., 2012). Es handelt sich um ein kontagiöses Euterpathogen, das sich hauptsächlich beim Melken verbreitet; das Euter mastitiskranker Tiere ist dabei die Hauptquelle der Infektion (Annemüller et al., 1999; Capurro et al., 2010). Die Übertragung erfolgt in erster Linie über die Melkmaschine, Eutertücher oder die Hände des Melkers (Roberson, 1999; Zadoks et al., 2011b). *Staphylococcus aureus* produziert Hämolsine, die das Gewebe zerstören und so eine intrazelluläre Besiedlung durch diesen Erreger möglich machen (Sears & McCarthy, 2003b). Dadurch ist die Erkennung und

Eliminierung dieser Bakterien durch das Immunsystem erschwert, die *Staphylococcus aureus*-Mastitis kann leicht persistieren (Sears & McCarthy, 2003b) und reagiert im Allgemeinen schlecht auf antimikrobielle Behandlung (Taponen & Pyorala, 2009). Die Resistenz gegenüber Penicillinen ist dabei die bekannteste Antibiotikaresistenz von *Staphylococcus aureus* (Barkema et al., 2006). Die Heilungsrate unter Therapie ist aufgrund des tiefen Eindringens in das Eutergewebe mit 50 – 60 % recht gering (Kirst, 2008). Dem entspricht auch eine Untersuchung durch Sol et al. (2000), die eine Heilungsrate von 52 % für eine klinische *Staphylococcus aureus*-Mastitis feststellten, wobei die Heilungsrate für β -Laktamase-negative *Staphylococcus aureus*-Mastitis höher war als für β -Laktamase-positive *Staphylococcus aureus*-Mastitis (Sol et al., 2000)

Koagulase-negative Staphylokokken

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) sind inzwischen die am häufigsten isolierten Bakterien aus Milchproben (Piepers et al., 2010; Pyorala & Taponen, 2009). KNS werden in der Routinediagnostik für gewöhnlich nicht auf Spezieslevel identifiziert, sondern als einheitliche Gruppe behandelt (Bes et al., 2000; Pyorala & Taponen, 2009). Sie können subklinische und klinische Mastitis verursachen; in den meisten Fällen verläuft die entzündliche Reaktion jedoch relativ mild (Waller et al., 2011). Mittlerweile wurden mehr als 15 KNS-Spezies in Verbindung mit Rindermastitis identifiziert (Waller et al., 2011). Waller et al (2011) fanden in klinischen Mastitisfällen vorwiegend *Staphylococcus hyicus*, während in subklinischen Mastitisfällen bevorzugt *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus* zu finden waren. Für die Spezies *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warnerii/pasteuri* und *Staphylococcus xylosus* konnten die Autoren keinen bedeutenden Unterschied zwischen klinischen und subklinischen Fällen feststellen. Nach Piessens et al. (2011) verhielten sich *Staphylococcus chromogenes* und *Staphylococcus epidermidis* wie wirtadaptierte Pathogene, die fähig waren im Euter zu überleben, während *Staphylococcus haemolyticus* und *Staphylococcus simulans* ein beachtliches Reservoir in der Umwelt hatten (Piessens et al., 2011). KNS besiedeln die Haut und gelangen durch den Strichkanal in das Euter (Sears & McCarthy, 2003b).

Sie sind weniger pathogen als *Staphylococcus aureus* und die Infektionen bleiben meist subklinisch, jedoch können KNS auch persistierende Infektionen hervorrufen, die mit einem Anstieg des somatischen Zellgehalts, der Zerstörung des Eutergewebes und einer reduzierten Milchproduktion sowie -qualität einhergehen (Contreras & Rodriguez, 2011; Gillespie et al., 2009; Pyorala, 2008). KNS sprechen gut auf antibiotische Therapie an (Pyorala, 2008), aufgrund der hohen Selbstheilungsrate bei KNS-Mastitis wird jedoch häufig auf eine Therapie verzichtet (Taponen & Pyorala, 2009). Die Epidemiologie ist unklar (Taponen et al., 2008) und auch die Virulenzfaktoren von KNS bleiben schlecht nachvollziehbar (Zuang & Maddox, 2000).

2.2.1.4 Streptokokken

Streptokokken gehören neben den Staphylokokken zu den wichtigsten Ursachen für Mastitis (Fehlings et al., 2009). Streptokokken erscheinen als feine, klare und Katalase-negative Kolonien auf Blutagar, die keine oder unterschiedlich ausgebildete Hämolysezonen aufweisen (Fehlings et al., 2009). Zu denjenigen Streptokokken, die hauptsächlich Mastitis verursachen, gehören *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* und *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (McDonald et al., 2005).

Streptococcus agalactiae

Die Identifizierung von *Streptococcus agalactiae* basiert auf Kolonie- und Hämolyse-Eigenschaften, der CAMP-Reaktion und der fehlenden Aesculinhydrolyse (Sears & McCarthy, 2003a). *Streptococcus agalactiae* gehört zu den Streptokokken der Gruppe B und ist eine grampositive Kokke (Keefe, 1997). *Streptococcus agalactiae* ist ein kontagiöses Mastitispathogen und verursacht meist subklinische Infektionen (Zadoks & Fitzpatrick, 2009). Durch adäquate Anwendung von Penicillin-basierten Antibiotika wurde *Streptococcus agalactiae* aber weitestgehend ausgerottet (Hillerton & Berry, 2005; Piepers et al., 2007; Zadoks & Fitzpatrick, 2009). Das Vorkommen von *Streptococcus agalactiae* ist ein Indiz dafür, dass es in einer Herde erhebliche Probleme gibt, wie den Ankauf infizierter Kühe, das Fehlschlagen der Zitzendesinfektion nach dem Melken und die fehlerhafte Trockenstellung (Edmondson, 2010).

Kühe mit *Streptococcus agalactiae*-Mastitis sollten isoliert und durch Markierungen oder Fußbänder gekennzeichnet werden; alle vier Euterviertel sollten antibiotisch behandelt und durch dreimalige mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung überprüft werden, bevor ein Tier als geheilt deklariert wird (Sears & McCarthy, 2003a). Allgemein ist *Streptococcus agalactiae* sensitiv für eine Vielzahl an kommerziell erhältlichen Präparaten (Keefe, 1997). Dennoch sollten Tiere, die in einer Kontrolluntersuchung - frühestens 14 Tage nach Ende der Antibiotikabehandlung – noch infiziert sind, gemerzt werden (Krömker & Bruckmaier, 2007).

Streptococcus uberis

Streptococcus uberis wird anhand der Koloniemorphologie und der Fähigkeit zur Aesculinhydrolyse identifiziert (Leigh, 1999). Allgemein ist *Streptococcus uberis* eines der wichtigsten umweltassoziierten Mastitispathogene, durchschnittlich ein Drittel aller klinischen Mastitisfälle sollen von diesem Pathogen verursacht werden (Hillerton & Berry, 2005). Euterinfektionen, die von *Streptococcus uberis* verursacht werden, können klinisch oder subklinisch verlaufen und variieren in ihrer Dauer (Zadoks et al., 2003). Laut einer Studie von McDougall et al. (2004) beträgt die Dauer einer *Streptococcus uberis*-Infektion im Mittel 16 Tage (McDougall et al., 2004). Die Infektionen treten vorwiegend in der Trockenstehphase und der peripartalen Phase auf (Hillerton & Berry, 2003), bleiben für längere Zeit subklinisch und verursachen ohne Behandlung ernstzunehmende Verluste in der Milchproduktion (Khan et al., 2003). Im Gegensatz zu anderen Mastitis verursachenden Streptokokken kann *Streptococcus uberis* von der Oberfläche des Euters, von anderen Körperstellen von Kühen und auch aus der Umwelt der Kuh isoliert werden (Khan et al., 2003). Die Übertragung erfolgt also direkt von Kuh zu Kuh oder durch Umweltkontamination des Euters (Phuektes, P. et al., 2001b). Die Epidemiologie von *Streptococcus uberis*-Mastitiden ist nur unvollständig nachvollziehbar (Phuektes, P. et al., 2001b).

Streptococcus dysgalactiae

Streptococcus dysgalactiae bildet auf Aesculin-Blutagar bis zu einen Millimeter große, matt bis glänzende Kolonien, die Aesculin-negativ und hämolytisch sind (Fehlings et al., 2009). *Streptococcus dysgalactiae* verursacht vereinzelt subklinische und seltener auch klinische Mastitiden, die gebietsweise gehäuft auftreten können (Krömker & Bruckmaier, 2007). *Streptococcus dysgalactiae* kann als kontagiöses Pathogen aber auch als umweltassoziiertes Pathogen agieren; dementsprechend

kann das Pathogen aus infizierten Eutern, Stalldung und anderen organischen Materialien isoliert werden (Petersson-Wolfe & Currin, 2012). Über die Epidemiologie von *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ist bisher wenig bekannt (Zadoks et al., 2011b). Stipkovits et al. (2013) fanden in ihrer Studie heraus, dass eine vorherige Euterinfektion mit *Mycoplasma arginini* die Sensitivität für *Streptococcus dysgalactiae*-Mastitis erhöhte. Die Autoren stellten weiterhin fest, dass die *Streptococcus dysgalactiae*-Mastitis mit vorheriger Mykoplasmen-Infektion durch geschwollene, schmerzhafte und warme Euter mit Reduzierung der Milchproduktion, hohem Gehalt an somatischen Zellen und deutlichen Veränderungen des Milchcharakters weitaus kritischer verlief als die *Streptococcus dysgalactiae*-Mastitis ohne vorherige Mykoplasmen-Infektion (Stipkovits et al., 2013). *Streptococcus dysgalactiae* reagiert im Allgemeinen empfindlich auf eine Antibiotikatherapie mit den Wirkstoffen Penicillin, Ampicillin und Amoxycillin/Clavulansäure (McDougall et al., 2013).

Weitere Streptokokken

Das Habitat von *Streptococcus parauberis* ist unbekannt; Devriese et al. (1999) gehen davon aus, dass diese Spezies, die biochemisch schwer von *Streptococcus uberis* zu differenzieren ist, in der Mastitisätiologie keine große Rolle spielt. Im Gegensatz dazu halten andere Autoren *Streptococcus parauberis* für einen wichtigen Mastitiserreger (McDonald et al., 2005).

Streptococcus canis tritt selten als Euterpathogen in Erscheinung, kann aber eine sehr hohe Inzidenz innerhalb einzelner Herden haben (Chaffer et al., 2005). Infektionen mit *Streptococcus canis* haben ernsthafte Auswirkungen auf die Eutergesundheit und Milchqualität (Tikofsky & Zadoks, 2005).

2.2.1.5 *Trueperella pyogenes* (vormals *Arcanobacterium pyogenes*)

Nach einer Studie von Yassin et al. (2011) ist das Bakterium *Arcanobacterium pyogenes* nicht monophyletisch, weshalb das Pathogen in *Trueperella pyogenes* umbenannt wurde (Yassin et al., 2011). *Trueperella pyogenes* sind grampositive, unbewegliche, nicht sporenformende kokkoide Stäbchen, die einzeln, paarweise oder als Gruppe auftreten (Reddy et al., 1982). Wachstum wird unter aeroben und strikt anaeroben Bedingungen auf Blutagar nach 24 Stunden sichtbar; die Kolonien zeigen dabei β -Hämolyse (Reddy et al., 1982).

Infektionen, die durch *Trueperella pyogenes* verursacht werden, sind allgemein in weniger als einem Prozent der Viertel einer Kuhherde präsent (Smith & Hogan, 2008). Quellen für *Trueperella pyogenes* (von den Autoren noch als *Actinomyces pyogenes* angesprochen) sind Wundinfektionen, Zitzenverletzungen, Euterinfektionen, Abszesse und der Genitaltrakt (Hogan & Committee, 1987). Die Übertragung kann durch Kontakt der Zitzen mit der kontaminierten Umwelt erfolgen, jedoch kann *Trueperella pyogenes* auch durch Fliegen übertragen werden (Hogan & Committee, 1987), weshalb auch dieser Keim den umweltassoziierten Pathogenen zuzuordnen ist. *Trueperella pyogenes* verursacht in der Regel eine akute, eitrige Form der Mastitis, in deren Verlauf das betroffene Viertel häufig seine Funktion verliert (Hogan & Committee, 1987). Die Infektionen treten meist bei trockenstehenden Kühen und bei Färsen vor der Geburt auf und sind häufig in feuchtwarmen Gebieten zu beobachten (Hogan & Committee, 1987).

2.2.2 Gramnegative Bakterien

2.2.2.1 *Escherichia coli*

Auf Blutagar erscheinen coliforme Bakterien als graue bis braune Kolonien mit einem Durchmesser von drei bis fünf Millimetern; weniger als 15 % der *Escherichia coli* zeigen Hämolyse (Hogan & Smith, 2003).

Escherichia coli kann als Pathogen bezeichnet werden (Zadoks & Fitzpatrick, 2009) und verhält sich hierbei opportunistisch (Burvenich et al., 2003). *Escherichia coli* ist eine verbreitete Ursache von Euterentzündungen bei Milchkühen; die Infektion geht normalerweise mit klinischen Anzeichen einher (Zadoks et al., 2011b). Meist sind Hochleistungskühe betroffen, da sie um die Geburt herum und während der frühen Laktation sehr sensitiv für *Escherichia coli*-Mastitis sind (Burvenich et al., 2003). Die meisten *Escherichia coli*-Mastitisfälle sind kurzlebig, gravierend und enden mit dem Tod des Wirtes oder des Pathogens (Dogan et al., 2006; Zadoks & Fitzpatrick, 2009; Zadoks et al., 2011b). Gravierende Fälle von Mastitis sind gekennzeichnet durch den plötzlichen Beginn schwerwiegender systemischer Symptome, wie Diarrhoe, Paralyse, Fieber, erhöhter Speichelfluss, hoher Puls und Hemmung der Pansenmotilität (Burvenich et al., 2003). Die Pathogenität von bestimmten *Escherichia coli*-Stämmen wird hauptsächlich von den Virulenzfaktoren, wie

Adhäsinen, Invasinen, Toxinen und Kapseln, festgelegt (Bean et al., 2004). Chronische Fälle von *Escherichia coli*-Mastitis sind eher selten, können jedoch vorkommen (Smith & Hogan, 2008). Die Pathogenese solcher persistierender *Escherichia coli*-Euterinfektionen ist weiterhin ungeklärt, es wird jedoch angenommen, dass es Stämme gibt, die fähig sind, in die Epithelzellen des Euters einzudringen und dort zu überleben, indem sie die Abwehrmechanismen des Wirtes durch noch unbekanntes Mittel umgehen (Dogan et al., 2006).

2.2.2.2 Klebsiellen

Klebsiellen stellen sich auf Blutagar als grau-braune, drei bis fünf Millimeter große Kolonien dar, die keine Hämolyse zeigen (Laub, 2011). Auffallend sind die schleimigen Kolonien und die starke Kapselbildung (Laub, 2011), die vor Phagozytose und der bakteriziden Aktivität des Serums schützt (Struve & Krogfelt, 2004). Klebsiellen sind umweltassoziierte Pathogene und allgemein in Erde, Wassertrögen, Panseninhalt, Fäzes, Einstreu, Durchgängen und Gehegen von Milchviehbetrieben zu finden (Zadoks et al., 2011a). In den letzten Jahren wurde *Klebsiella*-Mastitis zu einem Problem in Herden, in denen Sand als Einstreu benutzt wurde (Zadoks et al., 2011a). Klebsiellen werden oftmals intermittierend mit den Fäzes ausgeschieden (Munoz & Zadoks, 2007), weshalb eine vollständige Erregerelimination nicht möglich ist (Laub, 2011). Die Übertragung erfolgt in der Regel zwischen den Melkzeiten (Laub, 2011). Zu den *Klebsiella*-Spezies, die am häufigsten Rindermastitis verursachen, gehören *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* (Zadoks et al., 2011b). Die Endotoxine von *Klebsiella*-Spezies erzeugen starke Veränderungen der vaskulären Permeabilität und erhöhen die Anzahl der somatischen Zellen im Euter und in der Milch und führen so zu Ödemen, Depression, Blutvergiftung und zu schweren perakuten oder akuten klinischen Anzeichen von Mastitis (Ribeiro et al., 2008). Die Eutersekretion ist wässrig bis serös mit kleinen Flocken und einer stark erhöhten Anzahl an Neutrophilen (Ribeiro et al., 2008). Da *Klebsiella*-Mastitis nur schlecht auf Behandlung anspricht, ist die Prävention von größerer Bedeutung (Munoz et al., 2006). Klebsiellen-Mastitis kann chronisch werden und sogar von einer Laktation bis zur nächsten Laktation persistieren (Smith & Hogan, 2008). Durchschnittlich beträgt die Dauer von *Klebsiella pneumoniae*-Mastitis 21 Tage; die Heilungschance liegt bei 34 – 37 % (Laub, 2011).

2.2.2.3 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens bildet auf Blutagar zwei bis drei Millimeter große, graue bis gelbe Kolonien, die Staphylokokken ähneln (Hogan & Smith, 2003). *Serratia marcescens* sind gramnegative umweltassoziierte Pathogene, die allgemein in Erde und Pflanzen zu finden sind und hauptsächlich zwischen dem Melken übertragen werden, wenn die Zitzen Kontakt zu den Umweltquellen haben (NMC, 1999). Die Infektion erfolgt eher während der Trockenstehphase als während der Laktation (NMC, 1999). *Serratia marcescens* ist nur selten ursächlich für Rindermastitis, Ohnishi et al. (2011) fanden in ihrer Studie in 0,14 % aller untersuchten Mastitisproben *Serratia marcescens*-Stämme (Ohnishi et al., 2011). *Serratia marcescens* verursacht eine relativ milde Mastitis, die häufig chronisch oder subklinisch verläuft (Ohnishi et al., 2011). Infektionen mit *Serratia*-Spezies sprechen nur schlecht auf die antibiotische Therapie an (NMC, 1999). In der Studie von Ohnishi et al. (2011) trat die Mastitis nach Behandlung in 9,1 % aller Fälle wieder auf.

2.2.3 Zellwandlose Bakterien

2.2.3.1 *Mycoplasma bovis*

Für die Anzucht von Mykoplasmen werden komplexe Medien, spezielle Ausstattung und technische Fertigkeiten benötigt; Wachstum ist oft nach 48 Stunden sichtbar, aber insgesamt werden sieben bis zehn Tage Inkubation benötigt, um von einer negativen Probe sprechen zu können (Nicholas, 2011). Verschiedene Spezies von Mykoplasmen haben sich als Ursache von Euterinfektionen bei Milchkühen erwiesen, jedoch ist *Mycoplasma bovis* für die meisten Ausbrüche von Mastitis verantwortlich (Ghazaei, 2006; Gonzalez & Wilson, 2003). *Mycoplasma bovis* wurde erstmalig 1961 aus einem schweren Mastitisfall eines Rindes isoliert und ursprünglich als *Mycoplasma agalactiae* var. *bovis* bezeichnet (Nicholas, 2011). Heutzutage gibt es mit Ausnahme von Norwegen und Neuseeland nur wenige Länder, die frei von *Mycoplasma bovis* sind (Ball & Nicholas, 2010; Nicholas, 2011). Als Risikofaktor für *Mycoplasma*-Mastitis gilt die Größe einer Herde, da die Krankheit nur durch engen und wiederholten Kontakt übertragen wird (Nicholas, 2011). Wenn *Mycoplasma bovis* in einer Herde einmal gegenwärtig ist, kann die Übertragung leicht von infizierten zu nicht infizierten Rindern erfolgen (Nicholas, 2011). Mykoplasmen werden daher wie

Staphylococcus aureus und *Streptococcus agalactiae* zu den kontagiösen Euterpathogenen gerechnet (Fox, L.K. et al., 2005). Mastitis, die durch Mykoplasmen verursacht wird, hat stark variable Symptome, die von milden klinischen Symptomen bis hin zum kompletten Sistieren der Milchproduktion reichen können (Ghazaei, 2006). Milch von betroffenen Kühen mit klinischer Form der Mykoplasmen-Mastitis ist oftmals wässrig, dunkelgelb bis braun und mit flockigem oder sandigem Sediment (Ghazaei, 2006; Gonzalez & Wilson, 2003). *Mycoplasma bovis* ist gut angepasst an die Besiedelung von Schleimhäuten und kann dort persistieren ohne klinische Erkrankungen hervorzurufen (Nicholas, 2011). Nach Nicholas (2011) ist die Pathogenese von *Mycoplasma bovis*-Mastitis wenig bekannt, wahrscheinlich spielen aber Moleküle, die das Anhaften, die Antigenabweichungen, die Invasion, die Immunmodulation, die Biofilmbildung und die Produktion von toxischen Metaboliten bedingen, eine Rolle. Mykoplasmen besitzen keine Zellwand, weshalb β -Laktam-Antibiotika nicht effektiv gegen diese Pathogene wirken; des Weiteren synthetisieren sie keine Folsäure und sind somit intrinsisch resistent gegenüber Sulfonamiden (Nicholas, 2011). Aufgrund dessen und weil Kühe, die eine *Mycoplasma*-Mastitis spontan überwinden, zeitlebens intermittierende subklinische Ausscheider bleiben, ist eine Behandlung von *Mycoplasma*-Mastitis nicht empfehlenswert und betroffene Kühe sollten euthanasiert werden (Nicholas, 2011).

2.2.4 „nicht-bakterielle“ Mastitis-Erreger

2.2.4.1 Hefen

Hefen werden nach 24 – 48 Stunden Inkubation als weiße bis cremefarbene Kolonien von einem bis drei Millimeter Durchmesser und mit glatter oder matter Oberfläche sichtbar (Fehlings et al., 2009). Quellen für Hefen sind Erde, Pflanzen, Wasser, verfaultes organisches Material, Exsudat von Tieren und kontaminierte Behandlungspräparate oder –materialien wie Spritzen und Kanülen (NMC, 1999). Die Übertragung erfolgt vorwiegend durch Euterbehandlungen ohne steriles Vorgehen (NMC, 1999). Hefen sind sehr selten die Ursache für Mastitis (Contreras & Rodriguez, 2011), am häufigsten werden *Candida*-Spezies bei Euterinfektionen von Milchkühen isoliert (Seker, 2010). Es wird angenommen, dass Hefen opportunistisch sind und Mastitis auftritt, wenn viele Mikroorganismen auf der

Zitze vorhanden sind und die Abwehrmechanismen des Euters überwinden (Seker, 2010). Die meisten Infektionen mit Hefen werden spontan innerhalb von zwei Monaten überwunden (NMC, 1999).

2.2.4.2 Prototheken

Prototheken werden auf Blutagar als kleine, graue, matte Kolonien mit unregelmäßiger Oberfläche sichtbar (Janosi et al., 2001). Diese teigigen Kolonien, die sich nach 24- bis 36-stündiger Bebrütung bilden, können leicht mit Hefen oder koagulase-negativen Staphylokokken verwechselt werden (NMC, 1999). Das Genus *Prototheca* wurde 1894 durch Wilhelm Krüger eingeführt und mit insgesamt sechs Spezies anerkannt: *Prototheca moriformis* 1894, *Prototheca stagnora* 1985, *Prototheca ulmea* 1986, *Prototheca wickerhamii* 1959, *Prototheca zopfii* 1894 und *Prototheca blaschkeae* 2006 (Osumi et al., 2008). Andere Autoren sprechen von vier anerkannten Spezies: *Prototheca zopfii*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca wickerhamii* und *Prototheca ulmea* (Moller et al., 2007; Scaccabarozzi et al., 2008). Eine weitere Spezies - *Prototheca cutis* - wurde 2010 von Satoh et al. beschrieben (Satoh et al., 2010). Prototheken sind aerobe, einzellige, farblose Algen (Jagielski & Lagneau, 2007; Lopes et al., 2008), die ubiquitär vorkommen (Kishimoto et al., 2010) und sich asexuell fortpflanzen durch Cytoplasmateilung und Bildung von Tochterzellen (Ricchi et al., 2010). Infektionen bei Menschen und bei Tieren werden durch die Spezies *Prototheca zopfii* und *Prototheca wickerhamii* verursacht (Jagielski & Lagneau, 2007; Moller et al., 2007), aber auch Infektionen mit der Spezies *Prototheca blaschkeae* wurden bereits beschrieben (Ahrholdt & Roesler, 2011). *Prototheca zopfii* verursacht Mastitis, die mit reduzierter Milchproduktion und dünnwässriger, weiße Flocken enthaltender Sekretion einhergeht (Ito et al., 2011). Mastitis, die durch *Prototheca wickerhamii* verursacht wird, ist sehr selten (Marques et al., 2006). Da Prototheken häufig in fließendem und stehendem Wasser, Wasserbecken, Erde und Einstreu gefunden werden, wird davon ausgegangen, dass die Infektion über die Umwelt erfolgt (Contreras & Rodriguez, 2011; Ito et al., 2011; Kishimoto et al., 2010). *Prototheca zopfii* kann in drei unterschiedliche Genotypen unterteilt werden (Aouay et al., 2008; Roesler, 2003). *Prototheca zopfii* Genotyp 2 ist der am häufigsten verbreitete Genotyp in Milch (Ricchi et al., 2010; Zadoks et al., 2011b) und stellte in einer Studie von Ahrholdt et al. (2011) 88,5 % aller *Prototheca*-Isolate (Ahrholdt & Roesler, 2011).

Nach Ahrholdt et al. (2011) spielt *Prototheca zopfii* Genotyp 1 nur eine untergeordnete Rolle, ebenso wie Genotyp 3 (Aouay et al., 2008), während *Prototheca blaschkeae* in der Studie von Ahrholdt in 10 % der *Prototheca*-positiven Mastitisproben zu finden war. Durch *Prototheca zopfii* verursachte Euterinfektionen gehen selten mit klinischen Symptomen einher, dementsprechend kann ihr Nachweis auf ein ernstzunehmendes Vorkommen hinweisen, das eine wesentliche Prozentzahl an Kühen betrifft (Ricchi et al., 2010; Scaccabarozzi et al., 2008). Allerdings sprechen andere Autoren davon, dass Prototheken eine akute bis chronische granulomatöse Mastitis hervorrufen können, die zu einer reduzierten Milchproduktion und Atresie des Euters führt (Lopes et al., 2008; Marques et al., 2006; Roesler & Hensel, 2003). Die Pathogenese von Prototheken-Infektionen ist jedoch unklar (Jagielski & Lagneau, 2007). Prototheken bleiben von konventioneller antimikrobieller Therapie unbeeinflusst; die beste Methode, diese Form der Mastitis zu kontrollieren, ist die frühe Diagnose und die Beseitigung infizierter Kühe (Osumi et al., 2008; Roesler & Hensel, 2003).

2.3 Therapie

Ein wichtiger Zeitpunkt für die Mastitiskontrolle von Milchkühen ist die Trockenstehphase, da viele Euterentzündungen, die während der aktiven Milchproduktion auftreten, über die Trockenstehphase persistent bleiben und nach dem Kalben wieder klinisch in Erscheinung treten (Oliver et al., 2011). Allgemein wird klinische Mastitis meist mit Antibiotika therapiert, jedoch gibt es Bedenken bezüglich der potenziellen Ausbildung von antibiotisch resistenten Stämmen und der möglichen Kontamination von Lebensmitteln mit solchen Stämmen oder mit antibiotischen Rückständen (Sordillo, 2011). Oliver et al. (2011) haben in einer Übersichtsarbeit festgestellt, dass die Antibiotikaresistenzen von tiermedizinisch relevanten Pathogenen durch den routinemäßigen Einsatz in der Milchwirtschaft nicht zugenommen haben. Dennoch warnen viele Autoren vor dem routinemäßigen Einsatz von Antibiotika bei Mastitis und empfehlen eine regelmäßige Kontrolle der Mastitispathogene auf ihre Empfindlichkeit für Antibiotika (Bengtsson et al., 2009; Sawant et al., 2009). Außerdem können umweltassoziierte Pathogene als Mastitiserreger begünstigt werden, wenn kuhassoziierte Pathogene explizit bekämpft werden (Volling & Krömker, 2008).

Für einige Bakterienspezies ist die antibiotische Behandlung nicht notwendigerweise indiziert, vor allem wenn die Infektion von kurzer Dauer ist und die Möglichkeit einer spontanen Heilung besteht (Barlow, 2011). So liegt die Spontanheilungsrate für coliforme Keime laut Smith et al. (1985) bei 55,2 % und für Streptokokken bei 38,5 % (Smith et al., 1985). Van den Borne et al. (2010) ermittelten in ihrer Studie eine Spontanheilungsrate von 61,5 % für *Escherichia coli*, 52,4 % für Streptokokken (nicht *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis*) und 40,3 % für *Streptococcus uberis* (van den Borne et al., 2010). Eine Selbstheilungsrate von 78 % für *Streptococcus uberis* fanden McDougall et al. (2004) in ihrer Studie heraus. Umweltassoziierte Mastitiden lassen sich z.B. durch einen optimalen Hygienestatus eindämmen bzw. vermeiden (Krömker, 2009). In einigen Fällen ist es auch ökonomischer, Kühe zu euthanasieren oder zu schlachten anstatt sie zu therapieren, vor allem wenn sie das volle Produktionspotenzial voraussichtlich nicht wieder erlangen (Gröhn et al., 2004)

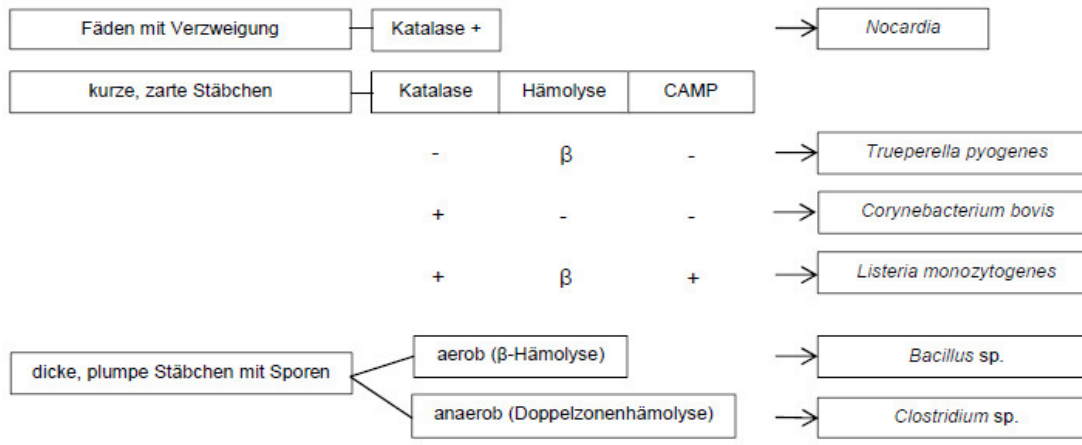
2.4 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung

Die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung gilt in der Mastitisiagnostik bis heute als Goldstandard (Koskinen et al., 2010). Die Kultivierung von mastitisverursachenden Erregern benötigt mindestens 24 bis 48 Stunden, bevor ein Mikroorganismus verlässlich identifiziert werden kann (Keane et al., 2013). Oftmals werden aufgrund dieser langen Wartezeit Breitspektrumantibiotika eingesetzt, die eventuell nicht angemessen sind, da in vielen Fällen der Einsatz von Antibiotika nicht notwendig ist oder Antibiotika mit engem Wirkspektrum geeigneter sind (Keane et al., 2013). Ein erheblicher Anteil des Keimspektrums in Mastitismilch kann mittels Kultivierung nicht angezüchtet werden (Keane et al., 2013), z.B. aufgrund zu geringer Konzentrationen der Bakterien (Koskinen et al., 2010). Mastitiskeime werden in der Regel auf Blutagar bei 37 °C für 24 – 48 Stunden inkubiert und eventuell zusätzlich auf selektiven Nährmedien angezogen (Fehlings et al., 2009). Die Differenzierung der unterschiedlichen Mastitiserreger beruht auf der Koloniemorphologie, der Gram-Färbung, der Ausbildung von Hämolysezonen und weiteren Eigenschaften, die mit einfachen Testverfahren festgestellt werden können (Fehlings et al., 2009). Die Gram-Färbung ermöglicht eine Unterscheidung von Kokken und Stäbchen sowie von grampositiven und gramnegativen Bakterien (Fehlings et al., 2009).

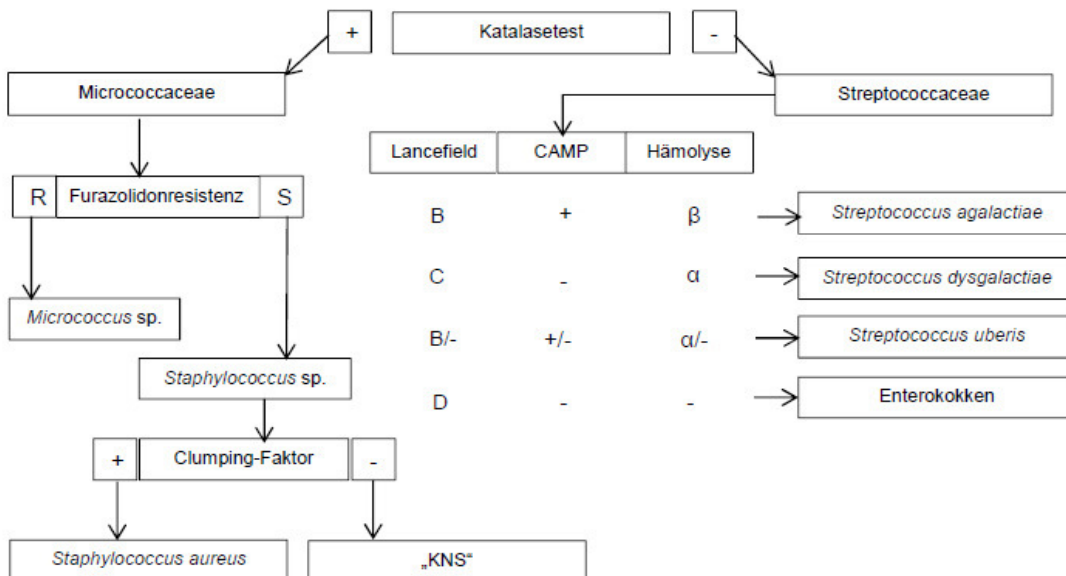
Bei der Hämolyse werden α -, β - und γ -Hämolyse unterschieden: Die α -Hämolyse stellt sich in Form einer grünlich-gefärbten Hämolysezone dar, die auf dem Abbau von Hämoglobin zu Methämoglobin beruht (Selbitz et al., 2013). Bei der β -Hämolyse ist die Hämolysezone klar, da das Hämoglobin vollständig abgebaut wird (Selbitz et al., 2013). Die Bezeichnung „ γ -Hämolyse“ ist widersprüchlich, da keine Hämolyse zu sehen ist (Selbitz et al., 2013).

Zur weiteren Differenzierung von Staphylokokken werden der Koagulase-Test und der Test auf Clumping-Faktor eingesetzt: Bei pathogenen Staphylokokken ist der Koagulase-Test positiv, während der Clumping-Faktor-Test sowohl positiv als auch negativ ausfallen kann, wogegen bei apathogenen Staphylokokken Koagulase-Test sowie Clumping-Faktor-Test negativ ausfallen (Fehlings et al., 2009). Eine Übersicht über die Differenzierungsmöglichkeiten der unterschiedlichen Erreger in der Routinediagnostik ist in der nachfolgenden Abbildung 1 dargestellt (Winter, 2008).

Differenzierung grampositiver Stäbchen [Morphologie (Phasenkontrast, Gramfärbung)]



Differenzierung grampositiver Kokken



Differenzierung gramnegativer aerober Stäbchen

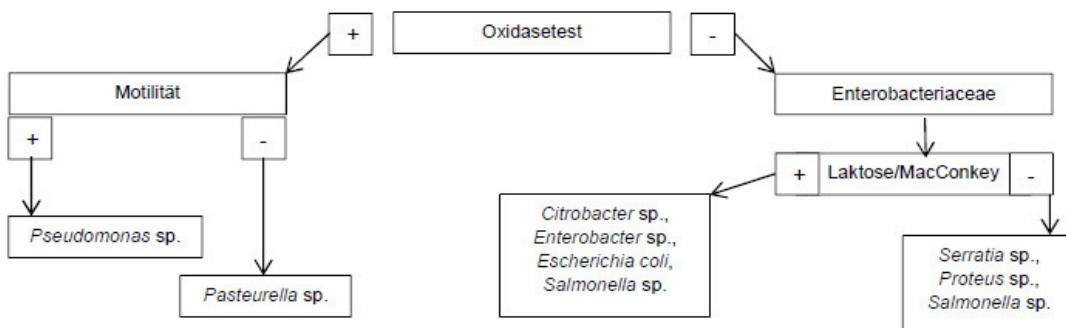


Abbildung 1: Übersicht über Differenzierungsmöglichkeiten unterschiedlicher Mastitiserreger, modifiziert nach Winter, 2008

2.5 MALDI-TOF MS Analytik

2.5.1 Aufbau und Funktionsweise

Die „Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry“ (MALDI-TOF MS) ist eine schnelle, genaue und kostengünstige Methode der mikrobiellen Charakterisierung und Identifizierung (Croxatto et al., 2012). Dabei werden charakteristische Spektren der Proteinmasse generiert, die einzigartig für jeden Mikroorganismus sind und somit eine genaue Identifizierung von Keimen auf Genus- und Speziesebene ermöglichen können (Croxatto et al., 2012). Ein Massenspektrometer besteht aus drei funktionellen Einheiten: einer Ionenquelle, die die Probenmoleküle ionisiert und in eine Gasphase überführt, einem Massen-Analytiker, der die Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) trennt und einem Detektionsgerät, das die abgetrennten Ionen erfasst (Croxatto et al., 2012). Der Aufbau eines Massenspektrometers wurde in Abbildung 2 dargestellt.

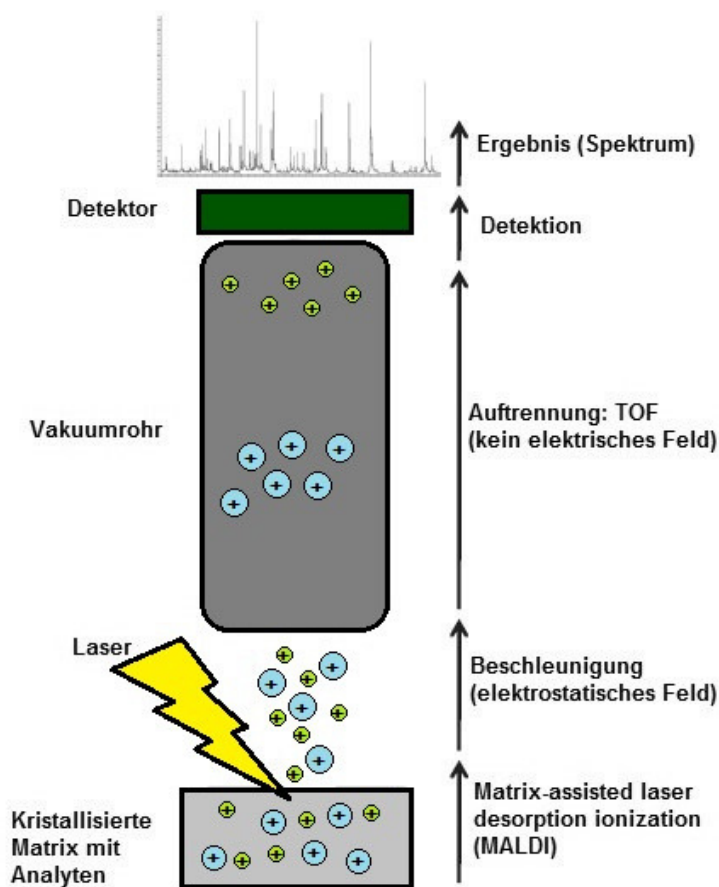


Abbildung 2: Aufbau eines Massenspektrometers, nach Croxatto et al. (2012)

Als Probenmaterial werden möglichst frische Kolonien eingesetzt, die nicht im Kühlschrank gelagert werden, da die ribosomalen Proteine der Bakterien mit zunehmendem Alter ihre Funktion verlieren, wodurch wiederum die MALDI-TOF MS-Spektren schwächer und weniger differenziert ausfallen, was zu schlechteren Differenzierungsergebnissen führt (Schubert, Sören & Wieser, 2011). Das Probenmaterial wird mit einer UV-absorbierenden, organischen, sauren Matrix auf einer leitfähigen Metallplatte vermischt und dadurch kristallisiert (Conway et al., 2001; Croxatto et al., 2012). Die am häufigsten genutzten Matrices sind 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (CHCA), Sinapinsäure (SA), Ferulasäure (FA) und 2,4-Hydroxy-Phenyl-Benzoesäure (Croxatto et al., 2012). Die Metallplatte, auf welche meist zwischen 16 und 384 Proben aufgetragen werden können, wird dann in das Massenspektrometer eingesetzt (Wieser et al., 2012). Anschließend wird die Probe mit kurzen Laserimpulsen beschossen, wodurch die Matrix Energie vom Laser absorbiert und der Bioanalyt (Proteine) verdampft und ionisiert wird (Croxatto et al., 2012; Schubert, S. & Wieser, 2010).

Der ionisierte Bioanalyt wird durch ein elektrisches Feld beschleunigt und die Flugzeit in einem ein bis zwei Meter langen Vakuumrohr wird gemessen (Conway et al., 2001). Die Flugzeit, die benötigt wird, ist abhängig von der Masse (m) und der Ladung (z) des Bioanalyten und ist proportional zur Quadratwurzel vom Masse-zu-Ladung-Verhältnis (Croxatto et al., 2012). Bioanalyten mit unterschiedlichem Masse-zu-Ladung-Verhältnis, die eine komplexe Probe ausmachen, werden entsprechend ihrer Flugzeit getrennt und generieren ein Massenspektrum, das sowohl vom Masse-zu-Ladung-Verhältnis als auch von der Signalintensität – also der Anzahl der Ionen des jeweiligen Masse-zu-Ladung-Verhältnisses, die auf den Detektor treffen – charakterisiert wird (Croxatto et al., 2012). So können die unterschiedlichen Massen der einzelnen Analyten bestimmt und als Gesamtspektrum dargestellt werden (Schubert, S. & Wieser, 2010).

Die Ergebnisse einer Spektrensignatur werden von Spikes gebildet, die für gewöhnlich von 1.000 m/z bis zu 20.000 m/z reichen (Croxatto et al., 2012). Die Computersoftware vergleicht automatisch die gesammelten Spektren mit der Referenzdatenbank und generiert einen Zahlenwert (Score-Value), der auf den

Gemeinsamkeiten der aufgezeichneten und der hinterlegten Datensätze basiert (Welker & Moore, 2011; Wieser et al., 2012). Der Score-Value liefert Informationen über die Validität der Identifizierung: ein Score-Value über 2.0 wird allgemein als gültige Spezieslevel-Identifikation erachtet (Wieser et al., 2012), jedoch unterscheidet die Bruker Corporation nochmals zwischen den Werten 2,0 – 2,2 und 2,3 – 3,0. Bei Werten von 2,0 – 2,2 ist nach Angaben der Bruker Corporation die Genusidentifikation sicher und die Speziesidentifikation wahrscheinlich; ab Werten von 2,3 gelten sowohl die Genus- als auch die Speziesidentifikation als sicher (Bruker Daltonik GmbH, MALDI Biotyper Broschüre 08-2011, 8276480). Werte zwischen 2.0 und 1.7 repräsentieren verlässliche Genuslevel-Identifikationen (Wieser et al., 2012).

2.5.2 Datenbanken

Obwohl mit MALDI-TOF MS in der Literatur ausgezeichnete Ergebnisse für die bakterielle Identifikation aufgezeigt werden konnten, hängen die Genauigkeit und die diagnostische Ausbeute von der Taxonomie und der Qualität der Datenbanken ab (Croxatto et al., 2012). Die Software Biotyper 2.0 enthält zum Mai 2010 eine Sammlung mit 3739 Spezies von Mikroorganismen und Pilzen (Murugaiyan et al., 2012). Eine komplette und repräsentative Datenbank ist essentiell für die genaue Identifizierung von Isolaten mittels MALDI-TOF MS (Croxatto et al., 2012). Die Datenbank mit Referenzspektren kann entweder durch kommerziell erhältliche Software-Updates oder durch interne laboreigene Spektren ergänzt und bearbeitet werden (Wieser et al., 2012).

2.6 PathoProof Mastitis PCR Assay

2.6.1 Überblick

Das PathoProof Mastitis PCR Assay wird von der Firma Finnzymes-Thermo Fisher Scientific hergestellt und vertrieben. Es ermöglicht eine schnelle und genaue Identifizierung von Mastitiserregern aus frischer oder konservierter Milch (Silvenoinen et al., 2010); eine vorherige Kultivierung ist nicht nötig (Koskinen et al., 2009).

So können auch Ergebnisse für Proben gewonnen werden, die in der bakteriologischen Untersuchung negativ ausfallen. Dies ist laut Taponen et al. (2009b) bei 20 – 30 % der Milchproben der Fall, wenn es sich um subklinische Mastitiden handelt, zu geringe Konzentrationen eines Erregers vorliegen oder aber die Erreger in der Probe abgestorben sind. Andere Autoren sprechen von 10 – 40 % der Milchproben, die kein Keimwachstum zeigen (Lam et al., 2009). Das PathoProof Mastitis PCR Assay ist in verschiedenen Größen erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das PathoProof Mastitis Complete-16 Kit verwendet, mit welchem 15 Mastitiserreger und das *blaZ*-Gen – ein bei Staphylokokken verbreitetes β -Laktamase codierendes Gen – nachgewiesen werden können.

2.6.2 Die Polymerase-Kettenreaktion

Eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction – PCR) wird an einer doppelsträngigen DNA Matrize durchgeführt (Kubista et al., 2006). Sie basiert auf der wiederholten Synthese von bestimmten DNA-Abschnitten durch die DNA-Polymerase; dieser Vorgang lässt sich in drei Schritte unterteilen, die wiederholt ablaufen: Denaturierung, Annealing und Extension (Hill & Stewart, 1992). Für die Reaktion werden zwei Oligoneukleotid-Primer, vier Nukleotidtriphosphate (dNTP), eine hitzestabile Polymerase sowie Magnesiumionen im Puffer benötigt (Kubista et al., 2006). Bei der Denaturierung wird durch eine hohe Inkubationstemperatur von 90 – 98 °C die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge getrennt (Hill & Stewart, 1992). Durch ein Absenken der Temperatur auf – primerabhängig - ca. 37 – 65 °C kann das sogenannte Annealing durchgeführt werden; dabei kommt es zu einer spezifischen Anlagerung der Primer am 3'-Ende der DNA (Hill & Stewart, 1992). Bei der Extension wird die Temperatur an das Optimum der DNA-Polymerase angepasst; die DNA-Polymerase beginnt dann am Ende des zuvor angelagerten Primers mit dem Einbau von Nukleotidtriphosphaten (dNTP) entlang des DNA-Stranges (Hill & Stewart, 1992). Die benötigte Denaturierungstemperatur und die Dauer des Schmelzens hängen von der Länge und gelegentlich auch von der Sequenz der Matrize ab, während die Annealing-Temperatur, die für die Bindung der Primer an die Matrize nötig ist, von der Primersequenz selbst abhängt (Kubista et al., 2006). Nach jedem Zyklus wird die Ziel-DNA theoretisch verdoppelt, jedoch fallen auch DNA-Fragmente an, die für das weitere Verfahren ungeeignet sind (Hill & Stewart, 1992).

2.6.3 Real-Time PCR und Ergebnisse

In der letzten Zeit wechseln Labore zunehmend von der konventionellen PCR zur Real-Time PCR, auch quantitative PCR (qPCR) genannt, die es erlaubt, die Amplifikation während der Reaktion anhand von Fluoreszenzemission zu messen (Caraguel et al., 2011; Schubert, Sören & Wieser, 2013). Auf diese Weise wird eine Gelelektrophorese am Ende der Reaktion überflüssig, der Personalzeitaufwand sinkt (Schubert, Sören & Wieser, 2013). Die Real-Time PCR basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und bietet zusätzlich die Möglichkeit, die erhaltene DNA zu quantifizieren (Kubista et al., 2006). Für die Real-Time PCR werden Fluoreszenzreporter benötigt, die an das entstandene PCR-Produkt binden und dessen Vorhandensein durch Fluoreszenz anzeigen (Kubista et al., 2006). Hierbei stehen einige verschiedene Sonden und Farbstoffe zur Verfügung (Kubista et al., 2006). Während der ersten Zyklen ist das Fluoreszenzsignal schwach und kann nicht von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden; mit Zunahme des PCR-Produkts intensiviert sich das Fluoreszenzsignal exponentiell, stabilisiert sich dann und erreicht eine Sättigungsphase (Kubista et al., 2006). Aus der Anzahl der Zyklen, die notwendig sind um den sogenannten Threshold - den Wert, bei dem das Signal der amplifizierten Probe die Hintergrundfluoreszenz der Reagentien übersteigt - zu erreichen, wird der Cycle threshold-value (CT-Wert) ermittelt (Kubista et al., 2006). Der CT-Wert ist abhängig von der Ausgangskonzentration der DNA; je höher die Ausgangskonzentration, umso niedriger ist der CT-Wert (Wong & Medrano, 2005). Die Ergebnisse des PathoProof Mastitis PCR Assay werden in Form dieser CT-Werte angegeben, welche anzeigen, wie viele DNA-Vervielfältigungszyklen notwendig sind, damit das Testsystem positiv wird (Spohr & Breitenwieser, 2012). Nach Empfehlung der Hersteller sollen Ergebnisse bis zu einem CT-Wert von 37 positiv gewertet werden, Werte darüber werden nicht gewertet, da in diesem Bereich die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse hoch ist (Koskinen et al., 2009). Die Autoren beziehen sich dabei auf Bustin, der 2004 ein Handbuch zur quantitativen PCR veröffentlichte und einen 3-Zyklen-Abstand von Ziel-CT-Wert und Negativkontrolle-CT-Wert als allgemein akzeptierte Norm für die Unterscheidung von richtig positiven Ergebnissen und Kontaminationen definierte (Bustin, 2004). Hierfür wird in jedem Real-Time PCR-Lauf eine Negativkontrolle (steriles Wasser) mitgeführt, um Kontaminationen, die durch das Arbeiten im Labor entstanden sind, gegebenenfalls zu detektieren (Koskinen et al., 2009).

2.7 Die 16S rRNA-Gen-Analyse

2.7.1 Überblick

Das 16S rRNA Gen wird auch als 16S rDNA bezeichnet und beide Begriffe werden als Synonym für das jeweils andere genutzt (Clarridge, 2004). Nach Clarridge (2004) ist die aktuell gültige Bezeichnung 16S rRNA Gen. Das 16S rRNA Gen ist in etwa 1,550 Basenpaare lang und besteht aus variablen und festen (hochkonservierten) Regionen (Clarridge, 2004). Die variablen Regionen werden bei den meisten Bakterien von hochkonservierten Regionen flankiert, die die PCR Amplifikation der Zielsequenzen mittels universeller Primer ermöglichen (van de Peer et al., 1996). Allerdings weisen die variablen Regionen verschiedene Grade an Sequenzvielfalt auf; eine Unterscheidung aller Bakterien anhand einer einzelnen variablen Region ist deshalb nicht möglich (Chakravorty et al., 2007). Mit Hilfe von 16S rRNA Sequenzen wurden bereits zahlreiche Bakteriengattungen und Bakterienspezies neu klassifiziert und umbenannt, die Klassifizierung von nicht kultivierbaren Bakterien wurde möglich gemacht, phylogenetische Beziehungen wurden ermittelt und die Entdeckung und Klassifizierung von neuartigen Bakterienspezies wurde erleichtert (Mignard & Flandrois, 2006; Woo et al., 2008). Allgemeine Datenbanken sind dabei nützlich, da sie eine große Anzahl an Sequenzen enthalten und freien Zugang für die Einspeisung von Sequenzen bieten, jedoch können sie nur von erfahrenen Benutzern verwendet werden, die sich bewusst sind, dass nicht alle Daten von derselben Qualität sind (Mignard & Flandrois, 2006). Zu den bekannten Datenbanken für 16S rRNA Gen Sequenzen, die über das World Wide Web abgerufen werden können, gehören GenBank, Ribosomal Database Project (RDP-II), Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory, Smart Gene IDNS und Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (Clarridge, 2004). GenBank, die größte Datenbank für Nukleotidsequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) enthält mehr als 20 Millionen hinterlegte Sequenzen, von denen über 90.000 (Teil-)Sequenzen des 16S rRNA Gens sind (Clarridge, 2004).

2.7.2 Funktionsweise der Sequenzierung mittels Dye-Terminatoren

Zunächst wird in einer ersten PCR die zuvor extrahierte DNA als Matrize genutzt, um eine 500 bis 1.500 Basenpaare enthaltende Gensequenz der 16S rRNA zu erhalten (Clarridge, 2004). Hierfür werden sog. universelle Primer genutzt, die komplementär zu hochkonservierten Regionen sind (Clarridge, 2004). Für eine anschließende Sequenzierung werden die entstandenen PCR-Produkte gereinigt, um überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen; dafür sind zahlreiche kommerzielle Kits erhältlich (Clarridge, 2004). Anschließend werden die gereinigten PCR-Produkte als Matrize für die Sequenzierung verwendet, wobei für jedes PCR-Produkt sowohl eine Reaktion mit Vorwärtsprimer als auch eine Reaktion mit Rückwärtsprimer separat durchgeführt wird (Clarridge, 2004). Indem speziell gekennzeichnete Basen, Dye-Terminatoren genannt, zu den Reaktionen hinzugefügt werden, werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge gewonnen (Clarridge, 2004). Die Dye-Terminatoren unterbrechen die Sequenz, sobald sie zufallsbedingt in diesem zweiten Zyklus in den Strang eingebaut werden (Clarridge, 2004). Da jeder der vier hinzugefügten Dye-Terminatoren einen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff trägt, der bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbiert wird, kann jedes Fragment mittels Fluorometer bestimmt werden (Clarridge, 2004). Zuletzt werden die DNA-Fragmente gereinigt, um ungenutzte Dye-Terminatoren zu entfernen (Clarridge, 2004). Anschließend wird die Länge jedes DNA-Fragments mittels Kapillarelektrophorese oder Gelelektrophorese bestimmt und beide Stränge der DNA separat sequenziert, so dass Vorwärts- und Rückwärtssequenzen erzeugt werden (Clarridge, 2004). Die generierten DNA-Sequenzen werden zusammengefügt, indem die Vorwärts- und Rückwärtssequenzen aneinander ausgerichtet werden; die so entstandene Consensus-Sequenz wird dann in einer Datenbank mittels Analyse-Software mit den vorhandenen Sequenzen verglichen (Clarridge, 2004)

3. Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Ausgangsmaterial waren 132 Milchproben (A) aus der Routinediagnostik des Mastitislabor des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL). Diese Proben stammten zum einen von Kühen, die akut (n = 47), chronisch/ rezidivierend (n = 10) oder subklinisch/ mit erhöhtem Zellgehalt (n = 26) an Mastitis erkrankt waren und zum anderen von Kühen, die nach der Behandlung einer Kontrolluntersuchung (n = 4) oder vor dem Trockenstellen einer bakteriologischen Untersuchung (n = 12) unterzogen werden sollten. Für 33 Milchproben gab es keinen Vorbericht. Zusätzlich wurden 30 Milchproben (B) direkt – also ohne vorherige Anzucht - mittels MALDI-TOF MS-Analytik untersucht und parallel dazu kulturell angezüchtet. Tabelle 2 zeigt die Zahl der Proben bzw. Isolate, die Eingang in die unterschiedlichen Analysen fanden.

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Proben/ Isolate

Probenart	n	Methode
Milchproben A	132	Mikrobiologisch-kulturelle Anzucht und Keimdifferenzierung*
	132	Mikrobiologisch-kulturelle Anzucht, gefolgt von MALDI-TOF MS-Analytik**
Milchproben B	132	PathoProof Mastitis PCR Assay**
	30	direkte MALDI-TOF-MS-Analytik (Sepsityper)** Mikrobiologisch-kulturelle Anzucht, gefolgt von MALDI-TOF MS-Analytik**
Isolate aus Milchproben A	k.A.*	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung*
	228	MALDI-TOF MS-Analytik**
	228	PathoProof Mastitis PCR Assay**
	57	16S rRNA-Gen-Analyse**
Isolate aus Milchproben B	34	MALDI-TOF MS-Analytik**

* Befund des Labors übernommen

** Eigene Untersuchungen durchgeführt am LGL

k.A.: keine Angabe

3.2 Labormaterial und Geräte

3.2.1 Chemikalien und Biochemika

Tabelle 3: Chemikalien und Biochemika

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
Acetonitril, $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe	AE00.1
Ameisensäure, $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe	4724.3
Bruker Bacterial Test Standard	Bruker Daltonik GmbH D- 28359 Bremen	255343
Bruker Matrix HCCA, portioned	Bruker Daltonik GmbH D- 28359 Bremen	255344
Coagulase Plasma	Remel, Thermo Fisher Scientific US- 66215 Lenexa	R21052
DEPC-Treated Water	Invitrogen, Life Technologies US- 92008 Carlsbad	750024
DMSO	Applied Biosystems, Life Technologies US- 92008 Carlsbad	D12345
Ethanol, $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe	9065.4
Grams Kristallviolettlösung	Merck KGaA D- 64293 Darmstadt	1092180500
Grams Safraninlösung	Merck KGaA D- 64293 Darmstadt	109217500
Hi Di Formamide	Applied Biosystems, Life Technologies USA- 92008 Carlsbad	4311320
HotStarTaq Master Mix	QIAGEN GmbH D- 40724 Hilden	203443

Tabelle 3, Fortsetzung

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
Jod-Kaliumjodidlösung nach Lugol	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe	N052.2
Löfflers Methylenblaulösung	Merck KGaA D- 64293 Darmstadt	101287500
Lysozyme from chicken egg white	Sigma Aldrich Chemie GmbH D-89555 STEINHEIM	L6876
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %, steril	AppliChem GmbH D-64291 Darmstadt	A1671,0100
Phosphate buffered saline	Sigma Aldrich Chemie GmbH D-89555 STEINHEIM	P5493
2-Propanol, 99,5 % (Isopropanol)	Sigma Aldrich Chemie GmbH D-89555 STEINHEIM	278475
Proteinase K, recombinant, PCR Grade	Roche Diagnostics Deutschland GmbH D- 68305 Mannheim	03115844001
Ready Reaction Mix, BigDye® Terminator v1.1	Applied Biosystems, Life Technologies US- 92008 Carlsbad	4337450
RNAse A solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH D-89555 STEINHEIM	R6148
RNase-Free Water	QIAGEN GmbH D- 40724 Hilden	129112
5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Life Technologies US- 92008 Carlsbad	4336697
Sodium acetate buffer solution [Natriumacetat]	Sigma Aldrich Chemie GmbH D-89555 STEINHEIM	S7899

3.2.2 Antibiotika und Sulfonamide

Tabelle 4: Antibiotika und Sulfonamide

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
Penicillin G 10 units	Oxid Deutschland GmbH D-46467 Wesel	CT0043

3.2.3 Bakterien-Stämme bzw. Isolate

Referenzstämme aus Stammsammlungen

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig

Tabelle 5: DSM-Stämme

Produkt	Artikelnummer
<i>Bacillus pumilus</i>	27
<i>Corynebacterium bovis</i>	20582
<i>Enterococcus faecalis</i>	20478
<i>Escherichia coli</i>	30083
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	30104
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2898
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	28
<i>Mycoplasma bovis</i>	22781
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	20464
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	30121
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	20231
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2134
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	20662
<i>Streptococcus uberis</i>	20569
<i>Trueperella pyogenes</i>	20630

Tabelle 6: Stämme aus der Stammsammlung der freien Universität Berlin

Bezeichnung
<i>Prototheca blaschkeae</i> RZ-III-3
Prototheca LZ-5 Genotyp 2
Prototheca RZ-I-3 Genotyp 1
<i>Prototheca wickerhamii</i> CBS2

3.2.4 Nährmedien

Tabelle 7: Nährmedien

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
BD Columbia Agar mit 5% Schafsblut	Becton Dickinson GmbH D-69126 Heidelberg	254071
Zusammensetzung		
	Pankreatisch abgebautes Casein	12,0 g
	Peptisch abgebautes Tiergewebe	5,0 g
	Hefeextrakt	3,0 g
	Rindfleischextrakt	3,0 g
	Maisstärke	1,0 g
	Natriumchlorid	5,0 g
	Agar	13,5 g
	Defibriniertes Schafblut	5 %
EDWARDS MEDIUM	Oxoid Deutschland GmbH D-46467 Wesel	CM0027
Zusammensetzung pro Liter		
	`Lab-Lemco' Puder 10,0 g	10,0 g
	Pepton	10,0 g
	Aesculin	1,0 g
	Natriumchlorid	5,0 g
	Kristallviolett	0.0013 g
	Thalliumsulfat	0,33 g
	Agar	15,0 g

Tabelle 7, Fortsetzung

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
Hirn-Herz-Bouillon	Merck KGaA D- 64293 Darmstadt	110493
Zusammensetzung pro Liter		
Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt und Peptone)		27,5 g
D(+)-Glucose		2,0 g
Natriumchlorid		5,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat		2,5 g
RAPID'E.coli 2 Agar	Bio-Rad Laboratories GmbH D-80939 München	356-4024
Zusammensetzung		
Pepton		5,0 g
Gelatine-Pepton		5,0 g
Natriumchlorid		5,0 g
Hefeextrakt		3,0 g
Selektive chromogene Mischung		6,0 g
Agar		13,0 g
Destilliertes Wasser		1000 ml

Tabelle 7, Fortsetzung

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
SP4 Broth with Glucose (<i>Mycoplasma bovis</i>)	Hardy Diagnostics US-93455 Santa Maria	R86
Zusammensetzung pro 690ml destilliertem Wasser		
	Pankreatisch abgebautes Casein	10,0 g
	Pankreatisch abgebaute Gelatine	5,0 g
	PPLO Bouillon ohne CV	3,5 g
	Polymyxin B	50,0 mg
	Amphotericin B	5,0 mg
	Fötales bovines Serum	170 ml
	CMRL 1066 Medium (10X)	50 ml
	Hefeextrakt	35 ml
	Yeastolate	20 ml
	Penicillin	1,000,000 U
Standard I- Nährbouillon	Merck KGaA D- 64293 Darmstadt	1.07882.0500/ 5000
Zusammensetzung pro Liter		
	Pepton	15,0 g
	Hefeextrakt	3,0 g
	Natriumchlorid	6,0 g
	D(+)-Glucose	1,0 g
YGC-Agar	Mast Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH D-23858 Reinfeld	DM702
Zusammensetzung pro Liter Medium		
	Hefeextrakt	5,0 g
	Glukose	20,0 g
	Chloramphenicol	0,1 g
	Agar	11,0 g

3.2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
PBS, 10x Phosphate	Sigma Aldrich Chemie GmbH	P7059
Buffered Saline pH 7,4	D-89555 STEINHEIM	

3.2.6 Sonstige Materialien & Kits

Tabelle 9: Sonstige Materialien und Kits

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
AnaeroGen Anaerobier- Beutel	Oxoid Deutschland GmbH D-46467 Wesel	AN0025A
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH D-72636 Frickenhausen	188271
Disc Dispenser Mk III (90 mm)	Oxoid Deutschland GmbH D-46467 Wesel	ST6090
DNA LoBind Tubes, PCR clean (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg	0030108.051
Gene Spin Kit	Eurofins Gene Scan GmbH D-79108 Freiburg	5224400605
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH D- 68305 Mannheim	11796828001
MALDI-Sepsityper Kit 50	Bruker Daltonik GmbH D- 28359 Bremen	8270170
Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit	Promega Corporation US- 53711 Madison	AS1290
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Life Technologies US- 92008 Carlsbad	4311971
MSP 96 target, polished steel	Bruker Daltonik GmbH D- 28359 Bremen	224989

Tabelle 9, Fortsetzung

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Gerhard Menzel GmbH D-38116 Braunschweig	AA00000112E
Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Life Technologies USA- 92008 Carlsbad	4306737
PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit	Thermo Fisher Scientific / Finnzymes Oy FI- 01620 Vantaa	PF1600S/ PF1600SB
PCR SingleCap 8er- SoftStrips 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH D- 31840 Hessisch Oldendorf	710988
Pipette Eppendorf Reference	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg	4910 000.0
Plate Base, 96-Well	Applied Biosystems, Life Technologies USA- 92008 Carlsbad	4367470
Plate Retainer, 96-Well	Applied Biosystems, Life Technologies USA- 92008 Carlsbad	4334869
Plate Septa, 96-Well	Applied Biosystems, Life Technologies USA- 92008 Carlsbad	4315933
Precision Wipes Tissue Wipers	KIMBERLY-CLARK PROFESSIONAL US-30076 Roswell	75512
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH D-40724 Hilden	28106
Sterile Impföse 1 µl	Greiner Bio-One GmbH D-72636 Frickenhausen	731161

Tabelle 9, Fortsetzung

Produkt	Bezugsquelle	Artikelnummer
Sterile Wattestäbchen	bioMérieux Deutschland GmbH D- 72622 Nürtingen	70610
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega Corporation US- 53711 Madison	A1120

3.2.7 Geräte**Tabelle 10:** Geräte

Produkt	Bezugsquelle
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies D-76337 Waldbronn
Brutschrank INE800	Memmert GmbH & Co. KG D-91126 Schwabach
Bunsenbrenner Fuego basic	WLD-TEC D-37085 Göttingen
Centrifuge 5810	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg
Centrifuge 5430	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg
Centrifuge 5424	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg
Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems, Life Technologies US- 92008 Carlsbad
Mastercycler gradient	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg
Microflex LT20	Bruker Daltonik GmbH D- 28359 Bremen
Mikroskop Leitz SM-Lux	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH D- 35578 Wetzlar
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific US- 3411 Wilmington
Stratagene Mx3005P	Applied Biosystems, Life Technologies US- 92008 Carlsbad
Thermomixer comfort	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg
Trockenzentrifuge Concentrator plus	Eppendorf AG D- 22339 Hamburg
Vortexer Model K550-GE	Bender & Hobein AG CH-Zürich

3.3 Methoden

3.3.1 Überblick

Die Milchproben (A, n = 132) wurden mit den folgenden Methoden untersucht:

- mikrobiologisch kulturelle Untersuchung und Differenzierung
- mikrobiologisch kulturelle Anzucht, gefolgt von MALDI-TOF MS-Analytik
- PathoProof Mastitis PCR Assay

Die Milchproben (A) wurden über Nacht in Standard-I-Bouillon angereichert. Mit dieser Anreicherung wurden zwei Blutnährböden ausplattiert und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Von einem der Blutnährböden („Mischplatten“) wurde mittels Abschaben der Kolonien und der Extraktion mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit DNA gewonnen. Die Bakterienkolonien des zweiten Blutnährbodens wurden subkultiviert, um Reinkulturen zu erhalten. Diese wurden dann nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C mittels MALDI-TOF MS identifiziert und im Anschluss die DNA ebenfalls mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit isoliert; es folgte die Analyse der Reinkulturen mittels PathoProof Mastitis PCR Assay. Als Befunde der mikrobiologisch-kulturellen Diagnostik wurden die Befunde des Labors herangezogen. In Abbildung 3 sind diese Arbeitsabläufe schematisch dargestellt.

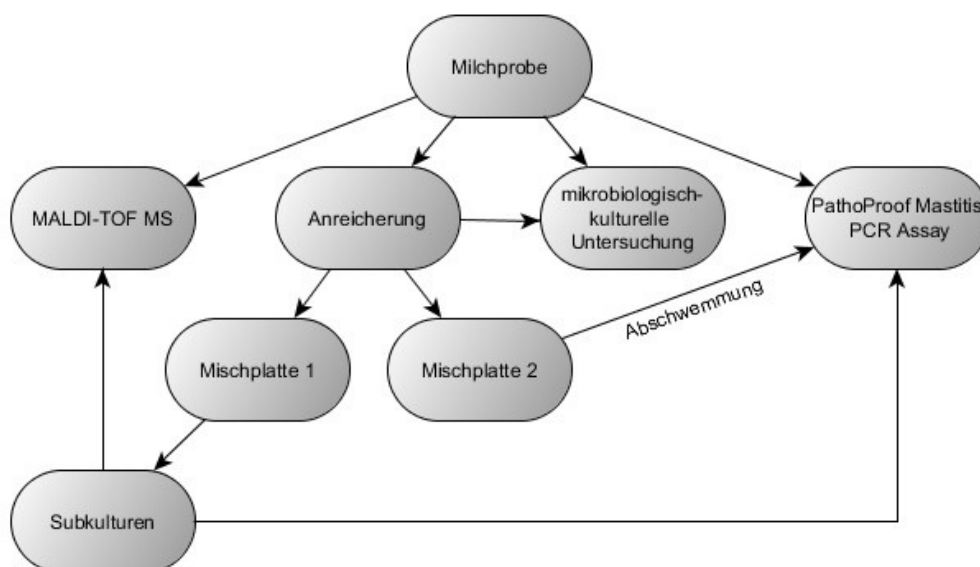


Abbildung 3: Darstellung der Arbeitsabläufe

Zudem wurden 30 Milchproben (B) mittels MALDI-TOF MS-Analytik direkt untersucht (Sepsityper). Ferner wurden zehn Milchproben aus Finnland mit Hilfe des PathoProof Mastitis PCR Assay analysiert und mit den Ergebnissen aus dem finnischen TMO-Labor verglichen.

3.3.2 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung

3.3.2.1 Anzüchten auf festem Nährboden

Von jeder Milchprobe wurde im Labor mit einer sterilen Öse Material entnommen und jeweils auf vier verschiedenen festen Nährmedien (Columbia Blood Agar mit 5 % Schafsblut, EDWARDS-Medium, RAPID'E.coli 2 Agar, YGC-Agar) ausgestrichen und anschließend bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet. Vom Columbia Blood Agar mit 5 % Schafsblut wurden zwei Kulturen angelegt; die eine wurde anaerob und die andere aerob bebrütet. Nach der Inkubationsphase wurden die Ergebnisse ausgelesen.

3.3.2.2 Anzüchten im Anreicherungsmedium

Parallel zu den festen Nährmedien wurden gemäß dem Routineverfahren im Labor von jeder Milchprobe ca. zehn µl in einer Standard-I-Nährbouillon für 24 Stunden bei 37 °C angereichert und anschließend auf Columbia Blood Agar mit 5 % Schafsblut und auf EDWARDS-Medium ausgestrichen, um dann abermals bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet zu werden. Mit dieser Methode konnten Keime trotz geringer Ausgangskonzentration angezogen werden.

3.3.2.3 Clumping-Faktor-Test/ Koagulase-Test

Bei dem Clumping-Faktor-Test wurde ein Tropfen fibrinogenhaltiges Plasma (Coagulase-Plasma, Remel) auf einen Objektträger aufgebracht und anschließend eine Öse der zu untersuchenden Bakterienkolonie darin verrieben. Entstanden beim Verreiben Verklumpungen, so war der Test positiv und es handelte sich um pathogene Staphylokokken.

Der Koagulase-Test wurde angewendet, wenn der Clumping-Faktor-Test negativ war, um falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Dafür wurde eine Kolonie der zu untersuchenden Probe in einer Hirn-Herz-Bouillon bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet. Anschließend wurden 0,1 ml der bebrüteten Bouillon mit 0,3 ml des fibrinogenhaltigen Plasmas (s.o.) gemischt und abermals bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet.

Abgelesen wurde nach 4 Stunden und 24 Stunden. War der Inhalt des Röhrchens zu mehr als $\frac{3}{4}$ des Volumens verklumpt, wurden die Isolate als Koagulase-positiv eingestuft.

3.3.2.4 Gram-Färbung

Mit Hilfe des Gram-Präparates können grampositive und gramnegative Bakterien unterschieden sowie die Morphologie der Bakterienzellen festgestellt werden. Zunächst wurde eine Öse der zu untersuchenden Kolonie in einen Tropfen NaCl-Lösung auf einen Objektträger gerieben. Nachdem das Präparat luftgetrocknet war, wurde es hitzefixiert, indem es dreimal durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen wurde. Danach wurde das Präparat für 1,5 Minuten mit Grams Kristallviolettlösung bedeckt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Dann wurde Jod-Kaliumjodidlösung nach Lugol auf das Präparat getropft und nach drei Minuten abermals mit destilliertem Wasser abgespült. Zum Entfärben wurde das Präparat für maximal zehn Sekunden in 96 %iges Ethanol getaucht. Zuletzt wurde das Präparat für eine Minute mit Grams Safraninlösung bedeckt, wieder mit destilliertem Wasser abgespült und danach luftgetrocknet.

3.3.2.5 Auswertung

Die erste Auswertung erfolgte nach der 24-stündigen Bebrütung der verschiedenen Nährmedien. Auf dem aeroben Columbia Blood Agar mit 5 % Schafsblut wachsen alle Keime, die Sauerstoff für den Stoffwechsel benötigen bzw. nicht durch das Vorhandensein von Sauerstoff beeinträchtigt werden. Auf dem anaeroben Columbia Blood Agar mit 5 % Schafsblut wachsen alle Keime, die keinen Sauerstoff für ihren Stoffwechsel benötigen. Das EDWARDS-Medium dient als Selektivnährboden für Streptokokken (Fehlings et al., 2009). Der kuhassoziierte Mastitiserreger *Streptococcus agalactiae* stellt sich dabei in ein bis zwei Millimeter großen, taubenblauen Kolonien mit leichter β -Hämolyse dar. Auf dem RAPID'E.coli 2 Agar (REC-Agar) wachsen *Escherichia coli*, die sich lila- bis blaufarben darstellen und andere coliforme Keime, die türkisfarben bis grün sind. Salmonellen stellen sich weiß dar und *Serratia* sp. rosa-farben. Der YGC-Agar dient zur Selektion von Hefen und Schimmelpilzen sowie Prototheken.

Zur weiteren Differenzierung wurden die Merkmale Hämolyse, Clumping-Faktor/ Koagulase und Gram-Färbung herangezogen. Bei der Hämolyse wurden die α -, β - und γ -Hämolyse unterschieden. Bei der α -Hämolyse zeigen die Bakterienkolonien eine Vergrünung, die aufgrund des Abbaus des Hämoglobins zu Methämoglobin entsteht. Bei der β -Hämolyse sind die Bakterienkolonien durch den vollständigen Abbau des Hämoglobins von einer klaren Hämolysezone umgeben. Bei der γ -Hämolyse zeigen die Bakterienkolonien keine Hämolyse.

Staphylokokken-verdächtige Kolonien wurden mit dem Koagulase-Test sowie dem Test auf Clumping-Faktor näher charakterisiert. Bei pathogenen Staphylokokken ist der Koagulase-Test positiv, während der Clumping-Faktor-Test sowohl positiv als auch negativ ausfallen kann (Fehlings et al., 2009). Apathogene Staphylokokken führen zu einem negativen Koagulasetest sowie einem negativen Clumping-Faktor-Test.

Mit der Gram-Färbung können grampositive und gramnegative Keime unterschieden werden. Grampositive Keime stellen sich blau gefärbt dar, während gramnegative Keime rot erscheinen. Des Weiteren können die Bakterien in ihrer Morphologie beurteilt werden und somit Stäbchen von Kokken unterschieden werden.

Tabelle 11 fasst die Charakteristika einiger wesentlicher Mastitiserreger zusammen.

Tabelle 11: Differenzierungskriterien wichtiger Mastitiserreger

(überarbeitet aus: Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern, DVG 2009; Produktbeschreibung EDWARDS-Medium, Oxoid Deutschland GmbH und Produktbeschreibung RAPID'E. coli 2 Agar, Bio-Rad Laboratories GmbH)

Keim	Gram-färbung	Hämolyse	Wachstum
Staphylokokken			
<i>Staphylococcus aureus</i> [Koagulase: +, -]	+	β , (α)	Fakultativ anaerob Blutagar: ein bis drei mm große, cremefarbene bis goldgelbe Kolonien
Koagulase-negative Staphylokokken [Koagulase: -]	+	α , β , $\alpha+\beta$, γ	Fakultativ anaerob Blutagar: ein bis drei mm große, weiße Kolonien

Tabelle 11, Fortsetzung

Keim	Gram-färbung	Hämolyse	Wachstum
Streptokokken			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	β	Aerob EDWARDS-Agar: bis zu einem mm große, taubenblaue Kolonien
Vergrünende Streptokokken	+	α	Fakultativ anaerob EDWARDS-Agar: unterschiedlich große, schwarz gefärbte Kolonien
Andere Streptokokken	+	α, β, γ	Fakultativ anaerob EDWARDS-Agar: bis zu einem mm große schwarze Kolonien
Coliforme Keime			
<i>Escherichia coli</i>	-	γ	Fakultativ aerob REC-Agar: drei bis fünf mm große, lila bis blaufarbene Kolonien
<i>Trueperella pyogenes</i>	+	β	Aerotolerante Anaerobier REC-Agar: 0,5 bis ein mm große türkisfarbene bis grüne Kolonien
<i>Klebsiella</i> sp.	-	γ	Fakultativ anaerob REC-Agar: drei bis fünf mm große, schleimige, bläuliche Kolonien
<i>Serratia marcescens</i>	-	γ	Fakultativ anaerob REC-Agar: drei bis fünf mm große, rosafarbene Kolonien
Andere Coliforme Keime	-	β, γ	Fakultativ anaerob REC-Agar: unterschiedlich große, blau bis grüne Kolonien

Tabelle 11, Fortsetzung

Keim	Gram-färbung	Hämolyse	Wachstum
Mikrokokken			
Mikrokokken	+	β , γ	Aerob Blutagar: unterschiedlich große, häufig pigmentierte Kolonien
Corynebakterien			
<i>Corynebacterium bovis</i>	+	γ	Aerob bis fakultativ anaerob Blutagar: 0,5 bis ein mm große, trockene, hellbeige Kolonien mit rauer Oberfläche
Hefen, Pilze und Prototheken			
Hefen	Nicht relevant	γ	Meist fakultativ anaerob YGC-Agar: 0,5 bis ein mm große, wachsige, weiße Kolonien
Schimmelpilze	Nicht relevant		Aerob bis fakultativ anaerob YGC-Agar: unterschiedlich große, erhabene, meist pigmentierte Kolonien
<i>Prototheca</i> sp.	Nicht relevant	γ	Aerob bis mikroaerophil YGC-Agar: ein bis drei mm große, matte, grauweiße Kolonien

Sofern im Ergebnisteil kuhassoziierte Mastitiserreger und umweltassoziierte Mastitiserreger unterschieden werden, beruht diese Unterscheidung auf der Einteilung aus dem Buch „Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind“, herausgegeben von Aart de Kruif, Rolf Mansfeld und Martina Hoedemaker, Enke Verlag, 2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage (De Kruif et al., 2007).

3.3.2.6 Resistenztest

Die Penicillinresistenz ausgewählter *Staphylococcus*-Isolate wurde mittels Agardiffusionstest überprüft. Hierfür wurde eine Kolonie der zu untersuchenden Keime mit einer Öse in einem Milliliter Standard-I-Bouillon suspendiert und anschließend mittels eines sterilen Wattestäbchens über Columbia Blood Agar mit 5 % Schafsblut flächendeckend ausgestrichen. Zum Schluss wurden mit einem

Dispensor die Penicillin-Plättchen auf den Nährboden gebracht. Die Bebrütung der Nährmedien erfolgte bei 37 °C für 24 Stunden. Nach der Bebrütung der Nährmedien wurden die Durchmesser jedes Hemmhofes gemessen und in Millimeter angegeben. War der Durchmesser gleich groß oder größer als die Beurteilungsempfehlung (DIN 58940 für *Staphylococcus* sp.: ≥ 29 mm), wurde der getestete Erreger als sensitiv eingestuft. War der Durchmesser kleiner als diese Beurteilungsempfehlung, wurde der getestete Erreger als resistent eingestuft.

3.3.3 Untersuchung mittels MALDI-TOF MS

3.3.3.1 Untersuchung der Subkulturen mittels MALDI-TOF MS

Die Subkulturen aus den Milchproben wurden mittels MALDI-TOF MS identifiziert. Es wurde ein Doppelansatz für jede Probe nach der sogenannten On-Target-Extraktion durchgeführt. Neben dem Probenmaterial wurde bei jeder Messung auch immer ein Bakterienstandard (BTS – bacterial test standard) mitgeführt, welcher ein sorgfältig hergestelltes Extrakt von *Escherichia coli* DH5 enthält; dieses Extrakt zeigt charakteristische Peptid- und Protein-Profile der MALDI-TOF-Massenspektren und ist mit zwei zusätzlichen Proteinen dotiert, die sich bis an die Obergrenze des Massenbereichs erstrecken. Zunächst wurde eine frische Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt und auf ein Well des Targets gestrichen. Dann wurde jedes belegte Well mit einem μl 70 %iger Ameisensäure überschichtet. Nach dem Trocknen der Ameisensäure wurde jede Probe mit einem μl der Bruker Matrix HCCA überschichtet. Durch das Beschichten des Probenmaterials mit der Matrixlösung wurden vegetative Zellen inaktiviert. Nachdem die Matrixlösung für zwei Minuten luftgetrocknet wurde, wurde das Target in den Microflex LT eingeschleust. Im nächsten Schritt wurde das Gerät anhand des Standards (*Escherichia coli* DH5) mit dem Programm flexControl kalibriert. Die Auswahl der belegten Wells und das Starten der eigentlichen Messung erfolgte mit dem Programm Biotyper Automation Control. Die gewählten Einstellungen wurden in Tabelle 12 dargestellt:

Tabelle 12: Einstellungen Biotyper Automation Control

Einstellung	Wert
ion source 1	20 kV
ion source 2	16,69 kV
extraction delay time	150 ns
laser frequency	20 Hz
laser shots	240

Die Ergebnisse wurden gemäß Herstellerempfehlung nach der folgenden Tabelle bewertet (Tabelle 13):

Tabelle 13: Bewertung der MALDI-TOF MS-Ergebnisse anhand des Score-Wertes (nach Bruker Daltonic GmbH)

Logarithmischer Score-Wert	Bewertung	Angabe
> 2,3	Identifizierung der Art gilt als sicher	Art
2,0 bis 2,3	Identifizierung der Gattung gilt als sicher, die der Art als wahrscheinlich	Art
1,7 bis 2,0	Identifizierung auf Gattungsebene gilt als wahrscheinlich	Gattung
< 1,7	Kein signifikantes Ergebnis, Identifizierung möglich	keine Keine zuverlässige Identifikation

Wenn die Score-Werte zweier Arten sich um weniger als 0,1 unterschieden, konnte keine eindeutige Identifizierung angenommen werden. Die Art wurde dann durch die weitere Untersuchung mittels 16S rRNA-PCR verifiziert (siehe Kapitel 3.4.2.2).

3.3.3.2 Direkte Untersuchung der Milch mittels MALDI-TOF MS (MALDI Sepsityper™ Kit)

Ein modifiziertes Protokoll des MALDI Sepsityper™ Kit nach Barreiro et al. (2012) soll es ermöglichen, Milchproben ohne vorherigen Kultivierungsschritt mit Hilfe von MALDI-TOF MS zu untersuchen. Zunächst wurden hierzu die Milchproben bei 37 °C für vier Stunden inkubiert. Danach wurden 900 µl der Milch mit 200 µl Lysis Buffer gemischt und zwei Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Zu dem so gewonnenen Pellet wurden ein ml destilliertes Wasser und erneut 200 µl Lysis Buffer hinzugegeben und gemischt. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für zwei Minuten bei 13.000 x g. Abermals wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde nun mit einem ml Washing Buffer gemischt und erneut für zwei Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 300 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden 900 µl Ethanol absolut hinzugegeben, um die Bakterien zu inaktivieren und lagerungsfähig zu machen. Danach wurde noch zweimal je zwei Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert und jeweils der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde nun für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurden fünf µl 70 %ige Ameisensäure und fünf µl 100 %iges Acetonitril zu dem Pellet hinzugefügt. Nach zwei-minütigem Zentrifugieren bei 13.000 x g wurde ein µl des klaren Überstandes auf das Target gegeben und luftgetrocknet. Anschließend wurde ein µl der HCCA-Matrixlösung (α -Cyano-4-hydroxymizsäure) auf jedes belegte Well pipettiert. Die Messung erfolgte dann wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben.

Validierung der Untersuchung mittels MALDI Sepsityper™ Kit

Da mit dem MALDI Sepsityper™ Kit Mastitisproben untersucht wurden, deren Keimflora nicht bekannt war, wurde eine Verdünnungsreihe mit DSM-Keimen angelegt, um die Funktionalität des Protokolls nach Barreiro et al. zu überprüfen. Dazu wurden die Keime *Staphylococcus aureus* (DSM 20231), *Enterococcus faecalis* (DSM 20478) und *Escherichia coli* (DSM 30083) flächig auf Columbia Blood Agar mit 5 % Schafsblut angezogen und für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Mit einem sterilen Wattestäbchen wurden die Kolonien von den Nährböden abgenommen und jeweils in einem ml destilliertem Wasser suspendiert.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Abschabung eines Nährbodens mit ca. 75 Kolonien suspendiert in einem ml destilliertem Wasser etwa einer Konzentration von 10^9 cfu/ml entsprach (Mashimo et al., 2004). Dieses Gemisch wurde anschließend in ein 1,5 ml nukleasefreies Reaktionsgefäß pipettiert und für zwei Minuten bei 13.523 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einem ml Milch resuspendiert. Für alle DSM-Stämme wurde pasteurisierte Milch (milfina fettarme H-Milch, ultrahoherhitzt, 1,5 % Fett) verwendet; der *Escherichia coli*-Stamm wurde zusätzlich in unbehandelter Milch einer eutergesunden Kuh resuspendiert. Im Anschluss wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10 angefertigt, bis zu einer angenommenen Konzentration von 10^1 cfu/ml. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 3.3.3.2, Untersuchung der Milch mittels MALDI-TOF MS, beschrieben.

3.3.3.3 Verbesserung der Datenbank für Mastitis-relevante Erreger

Um die Datenbank der Bruker Daltonik GmbH weiter zu verbessern und zu erweitern, wurden Spektren von Typstämmen und - nach vorangegangener Sequenzierung - von Mastitis-relevanten Erregern aufgenommen, die mit MALDI-TOF MS nicht eindeutig erkannt worden waren.

Prototheken

Es wurden die Spektren von drei verschiedenen *Prototheca*-Arten aufgenommen, die von der FU Berlin zur Verfügung gestellt wurden (siehe auch Tabelle 6).

Extraktion der Prototheken

Die Extraktion erfolgte nach 48-stündiger Bebrütung bei 37 °C. Danach wurde eine Kolonie gepickt und in 300 µl Wasser suspendiert. Anschließend wurden 900 µl Ethanol absolut hinzugegeben und die Mischung gevortext. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch für zwei Minuten bei 13.523 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Pellet in einem ml Wasser resuspendiert, abermals für zwei Minuten bei 13.523 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde dann noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl 70 %iger Ameisensäure und 50 µl 100 %igem Acetonitril gelöst und 50 Sekunden auf Eis im Ultraschallbad behandelt. Im nächsten Schritt wurde die Mischung zehn Minuten auf Eis inkubiert und fünf Minuten bei 13.523 x g zentrifugiert. Dann wurden 0,5 µl des klaren Überstands auf ein Well des Targets

gegeben und luftgetrocknet. Zuletzt wurde jedes belegte Well mit 1,5 µl HCCA-Matrixlösung überschichtet.

Messung der *Prototheca*-Spektren

Die Messung der *Prototheca*-Arten erfolgte wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben. Statt der üblichen Doppelbestimmung wurden zehn Wells mit dem Keim belegt und in drei Durchgängen gemessen. So wurden von jedem Keim 30 Spektren gewonnen. Zusätzlich wurde ein Spektrum des Standards (*Escherichia coli* DH5) für die interne Kalibration, aufgenommen. Für die Messung wurden dieselben Einstellungen wie in Kapitel 3.3.3.1 gewählt.

Auswertung der *Prototheca*-Spektren

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Flex Analysis. Nach einer Baseline-Korrektur und dem Smoothing wurden maximal sechs Spektren aussortiert, die zu stark von den anderen Spektren des untersuchten Keims abwichen. Dabei wurde die Beurteilung der Spektren ab einer Größe von 3.000 Da begonnen und bis zu einer Größe von 10.000 Da durchgeführt. Die einzelnen Spektren durften maximal 500 ppm auf der X-Achse und der Y-Achse voneinander abweichen. Spektren, die außerhalb dieser Abweichung lagen, wurden aussortiert. Referenzspektren wurden automatisch von der Software erstellt. Für die Generierung von sogenannten Main Spectra (MSP) wurden die Spektren, die geeignet waren, in die MALDI BioTyper 2.0 SR1 Version geladen. Dabei wurden die in Tabelle 14 dargestellten Software-Einstellungen gewählt:

Tabelle 14: Einstellung MALDI BioTyper 2.0 SR1

Einstellung	Wert
maximal Mass Error of Each Single Spectrum	2000
desired Mass Error for the MSP	200
desired Peak Frequency Minimum (%)	25
maximal desired peak number of the MSP	70

Wiederfindung der *Prototheca*-Spektren

Für die Wiederfindung der *Prototheca*-Spektren wurde die Extraktion wie bereits beschrieben durchgeführt. Danach wurde die Messung wie in Kapitel 3.3.3.1 erläutert, durchgeführt und die Ergebnisse laut Tabelle 13 bewertet.

Mycoplasma bovis

Für die Aufnahme von Spektren des Bakteriums *Mycoplasma bovis* wurde der Keim von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bestellt (DSM 22781), in einem SP4-Medium für fünf Tage bei 37 °C inkubiert und auf zwei Agarplatten angezogen. Da Mykoplasmen fakultativ anaerob leben können, wurde ein Nährboden anaerob bebrütet und einer bei fünf % CO₂.

Extraktion von Mycoplasma bovis/ Ethanol-Extraktion

Die Extraktion erfolgte mit der Ethanol/ Ameisensäure-Methode. Dazu wurden 300 µl destilliertes Wasser in einem sterilen nukleasefreien 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend die Probe suspendiert. Danach wurden 900 µl Ethanol absolut hinzugefügt und das Gemisch gevortext. Im nächsten Schritt wurde für zwei Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurde das Pellet für fünf Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden 20 µl 70 %ige Ameisensäure zum Pellet gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dann wurden 20 µl 100 %iges Acetonitril hinzugefügt und gründlich gevortext. Zuletzt wurde nochmals für zwei Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Dann wurde ein µl des klaren Überstands auf ein Well des Targets pipettiert und luftgetrocknet. Anschließend wurde jedes belegte Well mit einem µl HCCA-Matrixlösung überbeschichtet.

Messung, Auswertung und Wiederfindung der Mycoplasma bovis-Spektren

Die Messung und Auswertung wurde wie bereits für die Prototheken beschrieben durchgeführt. Die Wiederfindung erfolgte nach der Ethanol-Extraktion wie in Kapitel 3.3.3.1 (Untersuchung der Subkulturen mittels MALDI-TOF MS) beschrieben.

3.3.4 Messung von DSM-Stämmen zur Validierung

Mittels MALDI-TOF MS wurden alle in Tabelle 5 enthaltenen DSM-Stämme gemessen. Die Stämme wurden dazu nach Empfehlung des Leibniz-Instituts DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH auf Nährböden angezogen. Anschließend wurden die Keime mittels der Ethanol/ Ameisensäure-Methode extrahiert und wie in Kapitel 3.3.3.1 gemessen.

3.4 Untersuchung mittels PCR

3.4.1 DNA-Isolation

Für die Isolation aus der Milch wurde das PathoProof Mastitis Complete-16 Kit (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnland) verwendet. Alle Plattenabschabungen und Subkulturen wurden mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) isoliert. Die mit unterschiedlichen Isolationsverfahren gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.4.1.1 DNA-Isolation aus Routineproben

Die DNA-Isolation aus Routineproben erfolgte zum einen direkt aus den Milchproben und zum anderen aus den daraus gewonnenen Mischplatten und Subkulturen.

DNA Isolation aus Milch mittels PathoProof Mastitis Complete-16 Kit

Die DNA-Extraktion der Mastitis-Erreger direkt aus der Milch erfolgte mit dem PathoProof Mastitis Complete-16 Kit nach dem zugehörigen Protokoll (PF1600 Thermo Scientific PathoProof Mastitis Complete-16 assay, Version 10/2011/v1). Zuerst wurde eine Mischung aus 7 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 350 µl Lysis Solution 1 pro Probe hergestellt. Nach dem Vortexen wurden 350 µl der Milchprobe in ein nuklease-freies Reaktionsgefäß gegeben und anschließend 350 µl der zuvor hergestellten Mischung aus Proteinase K und Lysis Solution 1 hinzugegeben. Dann wurden die Proben erneut gevortext, für fünf Minuten bei 55 °C im Thermomixer inkubiert und für ebenfalls fünf Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand inklusive dem aufliegenden Fett abpipettiert und das Pellet in 100 µl Lysis Solution 2 resuspendiert. Dann wurde für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Parallel dazu wurde eine Mischung aus 20 µl Proteinase K und 200 µl Buffer AL pro Probe hergestellt. Von dieser Mischung wurden dann 220 µl zu jeder Probe gegeben, für zehn Sekunden gevortext und anschließend für zehn Minuten bei 55 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Ethanol absolut hinzugegeben und abermals für 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei 20.000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in eine QIAamp Mini Spin Column überführt und für eine Minute bei 20.000 x g zentrifugiert. Dann wurde das Filtrat verworfen und die Säule in ein neues Collection Tube gestellt. Im nächsten Schritt wurden 500 µl Buffer AW1 zu jeder Probe

hinzugefügt und abermals für eine Minute bei 20.000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Filtrat erneut verworfen und die Säule in ein neues Collection Tube gestellt. Es wurden 500 µl Buffer AW2 hinzugegeben und für drei Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Nachdem die Säulen in sterile nuklease-freie Reaktionsgefäße gestellt wurden, wurden 100 µl Buffer AE hinzugegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für drei Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert, um die DNA zu eluieren.

DNA Isolation von Plattenabschabungen und Subkulturen mittels High Pure Roche Kit

Die Isolation der bakteriellen Subkulturen und der Plattenabschabungen erfolgte mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) nach dem zugehörigen Protokoll (Roche Diagnostics GmbH, Version Dezember 2008). Dazu wurden für die Isolation einer bakteriellen Subkultur mit einer sterilen Öse ein bis zwei Kolonien der zu untersuchenden Reinkulturen abgenommen und in 200 µl 1-fach Phosphatpuffer in nuklease-freie Reaktionsgefäße suspendiert. Für die Plattenabschabung wurde mit einem sterilen Wattetupfer der gesamte Nährboden abgewischt und die so gewonnenen Mischkulturen in 1,5 ml NaCl-Lösung suspendiert. Dieses Gemisch wurde anschließend bei 15.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Das weitere Verfahren war identisch mit dem der Extraktion der Subkulturen. Zunächst wurden die Bakterien durch Zugabe von fünf µl Lysozym (10 mg/ml) und 15-minütige Inkubation bei 37 °C im Thermomixer aufgeschlossen. Anschließend wurden 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 200 µl Binding Buffer zugegeben und zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. In diesem Schritt erfolgte die vollständige Lyse und Inaktivierung der Bakterien sowie das Binden der freigewordenen DNA für die weitere Extraktion. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 100 µl 100 %igem Isopropanol. Die Proben wurden gevortext, die Säulen der High Pure Filter Collection Tubes damit beladen und eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säulen auf neue Collection Tubes umgesetzt. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl Inhibitor Removal Puffer und eine weitere einminütige Zentrifugation bei 8.000 x g. In diesem Schritt wurden mögliche Inhibitoren, die die später durchgeführte PCR stören könnten, entfernt. Abermals wurde das Filtrat verworfen und die Säulen auf neue Collection Tubes umgesetzt.

Daraufhin erfolgte das zweimalige Waschen der Isolate mit jeweils 500 µl Waschpuffer und einminütiger Zentrifugation bei 8.000 x g. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Säulen erneut auf neue Collection Tubes umgesetzt und zehn Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um jegliche Rückstände von Waschpuffer aus dem Filter zu entfernen. Die Säulen wurden auf nuklease-freie 2,0 ml Reaktionsgefäße umgesetzt. Durch Zugabe von 200 µl 70 °C warmen Elutionspuffer und einminütige Zentrifugation bei 8.000 x g wurde die im Filter gebundene DNA eluiert. Bei jeder Isolation wurde ein Extraktionsblindwert, der alle Reagentien bis auf die DNA enthielt, mitgeführt, um Kontaminationen im Extraktionsansatz auszuschließen und somit falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen.

3.4.1.2. Vergleich verschiedener Isolationskits für die DNA-Extraktion aus Milch

In Tabelle 15 wurden die verschiedenen DNA-Isolationskits und die entsprechende Technologie für die Extraktion der DNA aus Milch dargestellt. Es wurden je Extraktionskit zehn Proben für den Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden verwendet. Die eingesetzte Milchmenge variierte, da sie sich nach den Herstellerangaben richtete.

Tabelle 15: Verschiedene DNA-Isolationskits für die direkte Extraktion von DNA aus Milch

Kit	Technologie	Eingesetzte Probenmenge [µl]
PathoProof Mastitis Complete 16-Kit	Silica-Säulen	350
High Pure Roche-Kit	Silica-Säulen	200
GeneSpin-Kit	Silica-Säulen	200
Wizard Genomic DNA Purification-Kit	Silica-Säulen	300
Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit	Magnet-Beats	300

Details zur Extraktion mit dem PathoProof Mastitis Complete-16 Kit und dem High Pure Roche-Kit wurden bereits in Kapitel 3.4.1.1. erläutert. Im Folgenden wird das Verfahren mit dem GeneSpin-Kit, dem Wizard Genomic DNA Purification-Kit und dem Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit besprochen. Die gewonnene DNA diente als Template für die Untersuchung der Mastitisproben mittels PCR und zum Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden.

GENESpin-Kit

Die Isolation der Bakterien aus Milchproben mit dem GENESpin-Kit (Eurofins GeneScan GmbH, Freiburg, Deutschland) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (Eurofins Gene Scan GmbH, V4 01.06.2011). Die Modifikation bestand darin, dass statt 0,2 Gramm Material 200 µl der Mastitisprobe verwendet wurden. 200 µl der Mastitisprobe wurden in ein 2 ml Cup gegeben und 550 µl des auf 65 °C vorgewärmten Lysis-Buffer zugegeben. Nach 15-sekündigem Mischen wurden zehn µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und erneut für zwei bis drei Sekunden gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 65 °C war die Bakterien-Lyse abgeschlossen und die Proben wurden für zehn Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 300 µl vom DNA-haltigen Überstand in ein neues Cup pipettiert und 300 µl Binding-Buffer und 200 µl an 100 %igem Ethanol zugegeben, um die freigewordene DNA für die weitere Extraktion zu binden. Danach wurde die Mischung für 30 Sekunden gevortext. Nachdem für jede Probe eine GeneSpin-Säule in ein neues zwei ml Collection Tube gestellt wurde, wurde die Säule mit 700 µl der Proben-Mischung beladen. Anschließend wurde für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Derselbe Schritt wurde mit dem verbliebenen Rest der Probe wiederholt. Danach wurden 400 µl Washing-Buffer auf die GeneSpin-Säule geladen und für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 700 µl Washing-Buffer und die erneute Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 x g sowie das Verwerfen des Filtrats. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Washing-Buffer auf die GeneSpin-Säule geladen und für zwei Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert und im Anschluss das Filtrat erneut verworfen. Anschließend wurde die GeneSpin-Säule auf ein neues 1,5 ml Zentrifugen-Röhrchen gesetzt und 100 µl, auf 70 °C vorgewärmter Elutions-Buffer wurden mittig auf die Säule pipettiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die gebundene DNA besser zu lösen. Im letzten Schritt wurde für eine Minute bei 16.000 x g zentrifugiert, um die DNA zu eluieren.

Wizard Genomic DNA Purification-Kit

Die Isolation der Bakterien aus der Milch mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, USA) erfolgte nach dem zugehörigen Protokoll (Promega Corporations, Part# TM050, Revised 12/10) mit der Modifikation, dass statt 300 µl Blut dieselbe Menge an Milch verwendet wurde.

Zunächst wurden 900 µl Cell Lysis Solution in ein nuklease-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 300 µl Milch hinzugefügt. Nach 30-sekündigem Mischen erfolgte die Bakterien-Lyse für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 20 Sekunden bei 16.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 300 µl Nuclei Lysis Solution resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 1,5 µl RNase A (4 mg/ml) und die Inkubation der Mischung für 15 Minuten bei 37 °C. Nach Zugabe von 100 µl Protein Precipitation Solution und 20-sekündigem Vortexen wurden die Proben bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der DNA-haltige Überstand in ein nuklease-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 300 µl 100 %igem Isopropanol überführt und gemischt. Danach wurde für eine Minute bei 16.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierte DNA mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte erneut eine einminütige Zentrifugation bei 16.000 x g, um die DNA zu fällen. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur für 15 Minuten luftgetrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 100 µl DNA Rehydration Solution bei 65 °C für eine Stunde gelöst.

Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit

Die Isolation der Bakterien aus der Milch mit dem Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit (Promega Corporation, Madison, USA) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (Promega Corporation, Part# TM333, Revised 06/12). Die Modifikation bestand darin, dass statt 300 µl Blut dieselbe Menge an Milch verwendet wurde.

Zunächst wurden die Milchproben für fünf Minuten bei Raumtemperatur gevortext. Anschließend wurden 300 µl der Milchproben mit 30 µl Proteinase K und 300 µl Lysis Buffer vermennt. Danach wurden die Proben für zehn Sekunden gevortext und im Anschluss für 20 Minuten bei 56 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Kartuschen, die für die Extraktion mit dem Maxwell benötigt wurden, vorbereitet. Dazu wurde die Folie von den gebrauchsfertigen Kartuschen entfernt und ein Stößel im achten Gefäß jeder Kartusche platziert. Die Kartuschen wurden in das Kartuschenmagazin gesteckt. Anschließend wurden leere Elution Tubes in die dafür vorgesehenen Positionen auf dem Kartuschenmagazin gesetzt und mit jeweils 50 µl Elution Buffer befüllt.

Die Proben wurden in das erste Gefäß jeder Kartusche pipettiert und anschließend wurde die Extraktion mit den folgenden Geräteeinstellungen (Tabelle 16) durchgeführt:

Tabelle 16: Einstellungen des Maxwell 16

Einstellung	Wert
Protocol	„Blood“
Hardware configuration	„LEV“
Operational mode setting	„Rsch“

3.4.2 Untersuchung der DNA-Proben mittels PCR

3.4.2.1 PathoProof Mastitis PCR Assay

Zunächst wurden die DNA-Proben sowie die PathoProof Primer Mischungen 1 bis 4 aufgetaut und gevortext. Anschließend wurden der PathoProof Mastermix und die PathoProof Primer Mischungen nach dem folgenden Schema gemischt:
 N (Anzahl der Proben) x 11 µl PathoProof Mastermix und
 N (Anzahl der Proben) x 5,5 µl PathoProof Primer Mischung 1, 2, 3 bzw. 4
 In Tabelle 17 wurden die PCR-Lösungen aufgelistet, die für die Identifikation der verschiedenen Mastitispathogene verantwortlich waren.

Tabelle 17: PCR-Lösungen für die Identifikation der verschiedenen Primer

PCR-Lösung	Für folgende Keime erhaltene Primer
PCR-Lösung 1	<i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR-Lösung 2	<i>blaZ</i> -Gen, <i>Escherichia coli</i> , <i>Mycoplasma</i> sp, <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
PCR-Lösung 3	<i>Prototheca</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i>
PCR-Lösung 4	<i>Arcanobacterium</i> (i.e.: <i>Trueperella</i>) <i>pyogenes</i> / <i>Peptoniphilus</i> <i>indolicus</i> , Hefen, <i>Klebsiella</i> sp., <i>Serratia marcescens</i>

Dann wurde eine 96-Well-Platte vorbereitet, indem jeweils 15 µl der PCR Lösungen 1 bis 4 in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert wurden (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Pipettierschema der PCR-Lösungen für PathoProof Mastitis PCR Assay

PCR-Lösung	Wells
1	1 A - H, 5 A - H, 9 A - H
2	2 A - H, 6 A - H, 10 A - H
3	3 A - H, 7 A - H, 11 A - H
4	4 A - H, 8 A - H, 12 A - H

Danach wurden jeweils fünf µl einer DNA-Probe nach dem folgenden Schema pipettiert: Probe 1 in die Wells A1, A2, A3 und A4, Probe 2 in die Wells B1, B2, B3 und B4, Probe 3 in die Wells C1, C2, C3 und C4 usw. Dieses Pipettierschema ist in Abbildung 4 dargestellt.

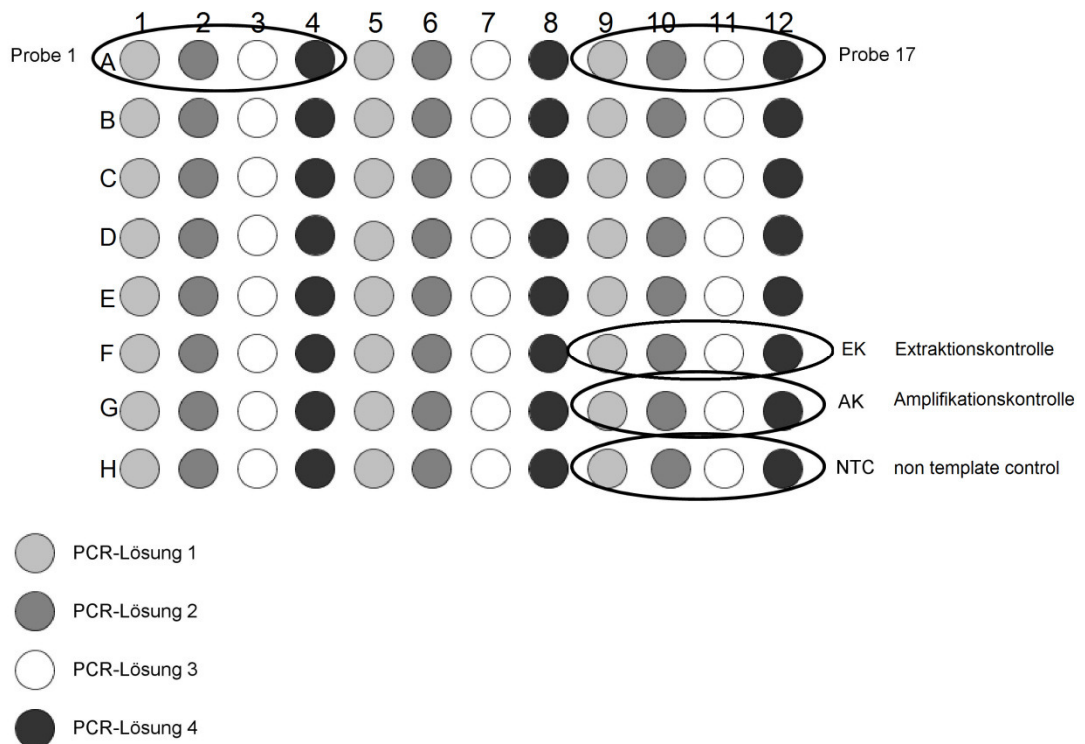


Abbildung 4: Pipettierschema für das PathoProof Mastitis PCR Assay

Zusätzlich zu den DNA-Proben wurden eine Amplifikationskontrolle und eine Negativkontrolle pro 96-Well-Platte mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen oder ein Versagen der Primer auszuschließen. Nach dem Pipettieren wurde die 96-Well-Platte mit einer durchsichtigen Folie verschlossen und für zwei Minuten zentrifugiert. Danach wurden die DNA-Proben mit den folgenden Einstellungen am Stratagene Mx3005P gemessen (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Einstellungen Stratagene Mx3005P

Einstellungen Stratagene Mx3005P		
Grund-Einstellungen („Gain Settings“)	Kanal	Verstärkung
	CY5	1-fach
	ROX	1-fach
	HEX/JOE	2-fach
	FAM	4-fach
	ATTO	4-fach
Thermal profile	Einstellung	Wert
	1. Segment (1 Zyklus)	10 Minuten bei 95 °C
	2. Segment 2 (40 Zyklen)	50 Sekunden bei 95 °C 60 Sekunden bei 60 °C, Endpoint read

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der Software MXPro. Dabei wurde manuell mit den folgenden Threshold-Einstellungen ausgewertet (siehe Tabelle 20):

Tabelle 20: Threshold-Einstellungen für die Auswertung mit MxPro

Kanal	Threshold
CY5	500
ROX	1500
HEX/JOE	500
FAM	1000
ATTO	200

Zunächst wurden alle positiven Signale bis zu einem CT-Wert von 37,00 gewertet, Signale mit einem CT-Wert > 37,00 wurden als Kontamination (bzw. unspezifische Amplifikation) betrachtet (Koskinen et al., 2009). Bei positiven Extraktionskontrollen wurden zudem positive Signale in einem Abstand von 3 CT-Punkten von dem positiven EK-Wert nicht gewertet. Beispielsweise wurden bei einem CT-Wert der Extraktionskontrolle von 35,72 alle positiven Signale dieses Keimes nur bis zu einem CT-Wert von 32,72 gewertet. Des Weiteren wurden alle positiven *Prototheca*-Signale aufgrund einer auf Herstellerseite vorliegenden Kontaminationsproblematik (siehe Kapitel 5.3) nicht gewertet.

Messung der Genauigkeit (Accuracy)

Die Genauigkeit (Accuracy) des Systems wurde anhand der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung als Goldstandard mit Hilfe der folgenden Formel beurteilt:

$$\begin{aligned} & \textit{Accuracy (in \%)} \\ & = 100 \times \frac{\textit{Anzahl richtig positiver Proben} + \textit{Anzahl richtig negativer Proben}}{\textit{Anzahl aller Proben}} \end{aligned}$$

Messung der Spezifität

Für die Messung der Spezifität wurden DSM-Keime verwendet, die in Tabelle 15 dargestellt wurden. Die Keime wurden dazu nach der jeweiligen Empfehlung der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH auf Nährböden angezogen und wie in Kapitel 3.4.1.1 beschrieben, extrahiert. Die Messung sowie die Auswertung erfolgten wie in Kapitel 3.4.2.1 erläutert. Anschließend wurde die Spezifität anhand der Messung der DSM-Stämme und zum Vergleich anhand der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung als Referenzmethode nach der folgenden Formel berechnet:

$$\begin{aligned} & \textit{Spezifität (in \%)} \\ & = 100 \times \frac{\textit{Anzahl richtig negativer Proben}}{\textit{Anzahl falsch positiver Proben} + \textit{Anzahl richtig negativer Proben}} \end{aligned}$$

Messung der Sensitivität

Um die Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay zu beurteilen, wurden DSM-Stämme (Tabelle 15) nach der jeweiligen Empfehlung auf Nährböden angezogen und wie in Kapitel 3.4.1.1 beschrieben extrahiert. Anschließend wurde mittels Nanodrop die Reinheit und Konzentration der DNA ermittelt.

Auch die Sensitivität wurde anhand der Messung der DSM-Stämme sowie der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung als Referenzmethode berechnet:

$$\text{Sensitivität (in \%)} = 100 \times \frac{\text{Anzahl richtig positiver Proben}}{\text{Anzahl richtig positiver Proben} + \text{Anzahl falsch negativer Proben}}$$

Berechnung der Gesamtgenome

Um die Ergebnisse aus der Sensitivitätsmessung näher beurteilen zu können, wurde die Anzahl der Moleküle je Verdünnungsstufe berechnet. Dazu wurden anhand der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) und der Genomes OnLine Database (<http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/Search.cgi>) die mittlere Größe des Gesamtgenoms jedes DSM-Keimes ermittelt. Die Anzahl der Moleküle für die Ausgangslösung wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$6,023 \times 10^{23} [\text{mol}^{-1}] \times \frac{\text{Gewicht der in die PCR eingesetzten DNA [g]}}{\text{Anzahl der Basenpaare des Gesamtgenoms} \times 660 [\text{Da}]}$$

Nanodrop-Messung

Zunächst wurde die Analyseart „Bestimmung von Nukleinsäuren“ ausgewählt. Dann wurden zur Initialisierung des Gerätes 1,5 µl nuklease-freies Wasser mittig auf den unteren Probenhalter pipettiert und die Messung gestartet. Nach der Initialisierungsmessung musste die Einstellung „Sampletype DNA-50“ ausgewählt werden und die Probenhalter mit einem fusselfreien Tuch abgewischt werden. Im Anschluss wurden 1,5 µl des Elutionsmedium der DNA auf den unteren Probenhalter pipettiert und eine Leermessung durchgeführt. Danach wurden die Probenhalter abermals mit einem fusselfreien Tuch gereinigt.

Daraufhin wurden die Reinheit und die Konzentration der Proben gemessen, indem jeweils 1,5 µl der zuvor für zehn Sekunden gevortexten Probe auf den unteren Probensteller pipettiert wurden und die Messung gestartet wurde. Die Konzentration der DNA-Proben wurde in ng/µl angezeigt. Zwischen den einzelnen Probenmessungen wurden die Probensteller mit einem fusselfreien Tuch gereinigt. Zum Schluss wurden die Probensteller mit destilliertem Wasser gereinigt.

Anlegen einer Verdünnungsreihe

Zunächst wurde die Menge an Wasser berechnet, die für die Verdünnung der DNA-Proben benötigt wurde, um die Konzentration von einem ng/µl zu erhalten. Danach wurden sieben nuklease-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 90 µl DEPC-Wasser befüllt. Von der Verdünnungsstufe ein ng/µl wurden schließlich zehn µl entnommen und in das erste 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Von dieser so erhaltenen Verdünnungsstufe 100 pg/µl wurden wiederum zehn µl entnommen und in das nächste 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Diese Vorgehensweise wurde bis zu der Verdünnungsstufe 0,1 fg/µl fortgeführt. Die so erhaltenen Verdünnungsstufen der DNA wurden dann mit jeweils der PCR-Lösung gemessen, die für die Identifikation des Keimes nötig war. Dies wurde bereits anhand der Tabelle 18 dargestellt: Wie in Kapitel 3.4.2.1 wurden 15 µl PCR-Lösung und fünf µl DNA verwendet. Ein spezielles Pipettierschema war hierbei nicht nötig.

Auswertung mit Norden Lab Mastitis Studio (NLMS)

Um sicher zu gehen, dass die manuelle Auswertung der PCR-Läufe nicht zu stark von dem auf das PathoProof Mastitis PCR Assay abgestimmte Programm Norden Lab Mastitis Studio abwichen, wurden beide Auswertungen in den Läufen der Milchproben, Mischkulturen und Subkulturen der Proben MAS 001 – MAS 100 miteinander verglichen. Zunächst musste das NLMS mit dem verwendeten Stratagene Mx3005P-Gerät und dem Mastitis-Complete-16 Kit kalibriert werden. Dazu wurden vier verschiedenen Kalibrier-PCR-Lösungen nach den folgenden Vorgaben hergestellt: 35 µl PathoProof Mastermix, 17,5 µl PathoProof Primer Mix 1, 2, 3 oder 4 und 17,5 µl PathoProof Amplification Standard. Von jeder Kalibrier-PCR-Lösung wurden je 20 µl nach dem folgenden Schema (Tabelle 21) in eine 96-Well-Platte pipettiert:

Tabelle 21: Pipettierschema Kalibrier-PCR-Lösungen

Kalibrier-PCR-Lösung	Wells
1	A1, B1, C1
2	A2, B2, C3
3	A3, B3, C3
4	A4, B4, C4

Die 96-Well-Platte wurde mit einer durchsichtigen Folie verschlossen und für zwei Minuten bei 170 x g zentrifugiert. Die Messung am Stratagene Mx3005P erfolgte dann mit den Einstellungen, die in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben wurden. Anschließend wurde der Kalibrierungslauf gespeichert und in die Software des NLMS geladen. Des Weiteren wurden die Kalibrier-CT-Werte eingespeist.

(http://diagnostics.finnzymes.fi/downloads/Ct_value_file_for_Complete_16.csv).

Danach wurden die Kalibrierungsdaten in der Datenbank gespeichert und die Auswertung der Proben konnte gestartet werden. Für die Auswertung der Proben wurden die jeweiligen Läufe in das Programm geladen und die Ergebnisse automatisch von der Software generiert.

3.4.2.2 Die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung

Mit der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung wurden ausgewählte Subkulturen untersucht, die in der PathoProof Mastitis PCR mehrere unterschiedliche positive Signale hervorriefen oder die mittels MALDI-TOF MS-Analytik mit einem Score-Value < 2,0 identifiziert wurden.

Zur Sequenzierung wurde ein Verfahren auf der Basis des Einbaus von Dye-Terminatoren, gefolgt von Kapillar-Elektrophorese eingesetzt. Hierzu muss zunächst in einem ersten Schritt die DNA mittels PCR amplifiziert werden. Nach Aufreinigung der Amplifikate schließt sich eine zweite PCR (auch: Sequenzierungsreaktion) an, in deren Verlauf durch den Einbau von Dye-Terminatoren Fragmente unterschiedlicher Länge und Fluoreszenzmarkierung entstehen. Diese Fragmente werden anschließend mittels Kapillar-Elektrophorese im Genetic Analyzer (Applied Biochems) detektiert; anhand der Fragmentlänge und Fluoreszenzmarkierung kann so die Basenabfolge bestimmt werden.

Amplifizierung

Für die Amplifizierung wurden die in Tabelle 22 aufgelisteten Primer verwendet:

Tabelle 22: Für die 16S rRNA-Gen-Amplifizierung verwendete Primer

Primer-bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Bindungsposition	Orientierung
27f	AgAgTTTgATCMTggCTCAg	7 - 26	forward
630r	CAKAAAggAggTgATCC	1525 - 1541	reverse

Die Erläuterung der IUPAC-Codes ist in Tabelle 28 am Ende dieses Kapitels aufgeführt.

Die Kombination von 27f und 630r-Primer ermöglicht es, das gesamte 16S rRNA-Gen zu amplifizieren (ca. 1535 bp).

Die DNA der Subkulturen wurde, wie in Kapitel 3.4.1.1 erläutert, mit dem HighPure Roche Kit gewonnen. Für die PCR-Reaktion wurde zunächst der Mastermix für einen 50 µl Ansatz nach den folgenden Angaben (Tabelle 23) hergestellt.

Tabelle 23: Ansatz für die PCR-Reaktion

Komponente	Konzentration Gebrauchslösung	Konzentration PCR-Ansatz	Einheit	Volumen in µl für eine DNA- Probe
H ₂ O PCR grade				15
Quiagen	2x	1x		
HotStarTaq				25
Master Mix				
Primer 27f	10	0,5	µM	2,5
Primer 630r	10	0,5	µM	2,5

Das Volumen der einzelnen Komponenten richtete sich nach der Anzahl der Proben und wurde dementsprechend umgerechnet. Für jede DNA-Probe wurden 45 µl Mastermix in DNasefreie PCR-Strips mit Cups vorgelegt. Danach wurden fünf µl der zu untersuchenden DNA dazu pipettiert. Anschließend wurden die Proben für fünf Sekunden zentrifugiert und im Thermocycler nach dem folgenden Temperatur-Zeit-Programm inkubiert (Tabelle 24):

Tabelle 24: Temperatur-Zeit-Programm für die PCR-Reaktion

Phase	Temperatur	Zeit	Cycler-Programm	Zyklenanzahl
Hold	98 °C	02:00 Minuten	10	1x
Denaturierung	94 °C	00:30 Minuten	32	35x
Annealing	55 °C	00:30 Minuten	32	35x
Extension	72 °C	01:30 Minuten	32	35x
Extension	72 °C	07:00 Minuten	6	1x
Hold	4 °C	Bis Programmende	22	1x

PCR-Produktaufreinigung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach dem modifizierten QIAquick PCR Purification Kit Protokoll (Stand 2006). Statt 250 µl Puffer PBI wurden 125 µl verwendet und statt 50 µl Puffer EB 40 µl. Im ersten Schritt wurden 125 µl Puffer PBI zum PCR-Produkt dazugegeben und anschließend gemischt. Danach wurde für jede Probe eine Säule mit Collection Tube aufgestellt und das Gemisch in diese umpipettiert. Dann wurde eine Minute bei 14.000 x g zentrifugiert, die Säulen auf neue Collection Tubes gesetzt und das Filtrat verworfen. Im darauffolgenden Schritt wurden zu jeder Probe 750 µl Puffer PE hinzugegeben, abermals für eine Minute bei 14.000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Um auch zurückgebliebene Flüssigkeiten zu entfernen, wurden die Säulen wieder auf neue Collection Tubes gesetzt und erneut für eine Minute bei 14.000 x g zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die Säulen auf sterile nukleasefreie 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt, 40 µl Puffer EB hinzugegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute bei 14.000 x g zentrifugiert. Dadurch wurden die aufgereinigten PCR-Produkte eluiert.

Bioanalyzer

Zur Qualitätskontrolle wurden die PCR-Produkte nach der Aufreinigung mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer aufgetrennt und analysiert. So konnten Proben, die zu wenig oder keine DNA enthielten oder Proben aus Mischkulturen bereits vor der zweiten PCR (Sequenzierreaktion) aussortiert werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, in welcher Größe die PCR-Produkte vorlagen und in welcher Menge diese in der Sequenzierreaktion eingesetzt werden mussten. Die nachfolgend genannten Reagentien sind im QIAquick PCR Purification Kit enthalten. Nachdem das DNA Dye Concentrate und die DNA Gel Matrix auf Raumtemperatur gebracht wurden, wurde das DNA Dye Concentrate für zehn Sekunden gevortext und anschließend kurz abzentrifugiert. 25 µl des DNA Dye Concentrate wurden anschließend in ein gebrauchsfertiges Tube mit DNA Gel Matrix pipettiert, gevortext und kurz abzentrifugiert. Zum Schluss wurde das Tube mit dem Gel-Dye Mix in das obere Reservoir des Spin Filters gestellt und für 15 Minuten bei 2240 x g zentrifugiert. Nach der Herstellung des Gel-Dye Mix wurde die Chip Priming Station nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Das nachfolgend erläuterte Pipettierschema kann anhand der Abbildung 5 nachvollzogen werden. Neun µl des Gel-Dye-Mix wurden auf den Boden des Wells „G“ (Abbildung 5: oberhalb des Leitersymbols) pipettiert, die Chip Priming Station geschlossen und der Spritzenkolben für 60 Sekunden eingerastet. Anschließend wurde die Chip Priming Station wieder geöffnet und jeweils neun µl des Gel-Dye-Mix in die Wells „G“ pipettiert. Dann wurden jeweils fünf µl des DNA Markers in jedes der zwölf Sample Wells sowie in das Well mit dem Leitersymbol pipettiert. Zum Schluss wurde jeweils ein µl jeder Probe in die Sample Wells pipettiert, ein µl der DNA Leiter in das Well mit dem Leitersymbol und in jedes nicht benötigte Well wurde ein µl destilliertes Wasser pipettiert. Im Anschluss wurde der beladene DNA Lab Chip für 60 Sekunden gevortext. Für die Analyse mit dem Bioanalyzer wurde unter dem Punkt „Assay Selection“ die Elektrophorese von dsDNA mit der DNA 1000 Series II ausgewählt. Ausgewertet wurden die Größe und Konzentration der DNA-Fragmente.

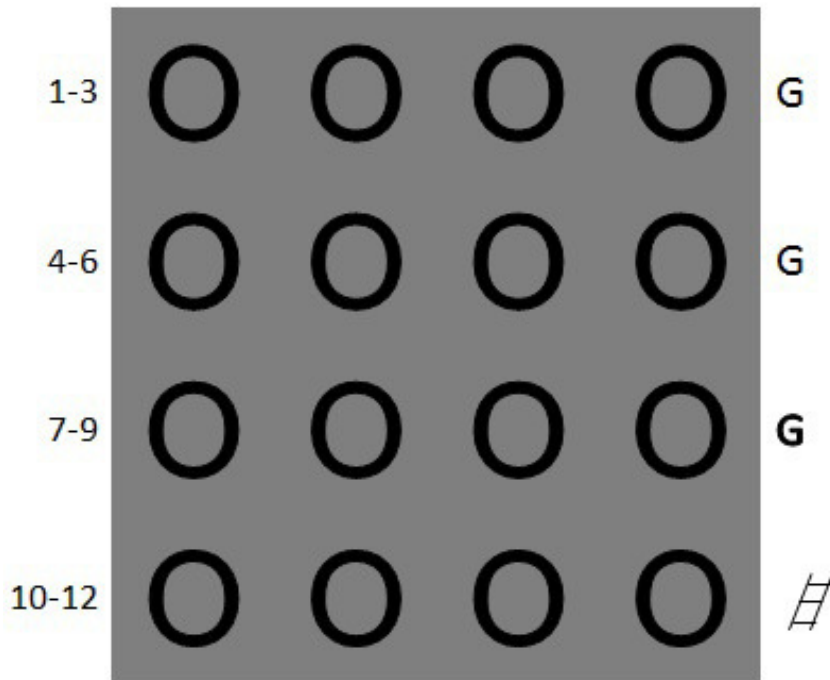


Abbildung 5: Pipettierschema DNA LabChip

Wenn mehr als eine Bande in der Geldarstellung sichtbar wurden, wurde der Keim erneut angezogen, gegebenenfalls subkultiviert und erneut DNA extrahiert und sequenziert. Anhand der

Abbildung 6 kann die Darstellung der Banden auf dem Gel mittels einiger Beispiele nachvollzogen werden.

Assay Class: DNA 1000 Created: 05.12.2012 08:36:00
Data Path: C:\...121205 Mast KSB DNA 1000 DE72901853 2012-12-05 08-36-00.xad Modified: 05.12.2012 09:12:38

Gel Image

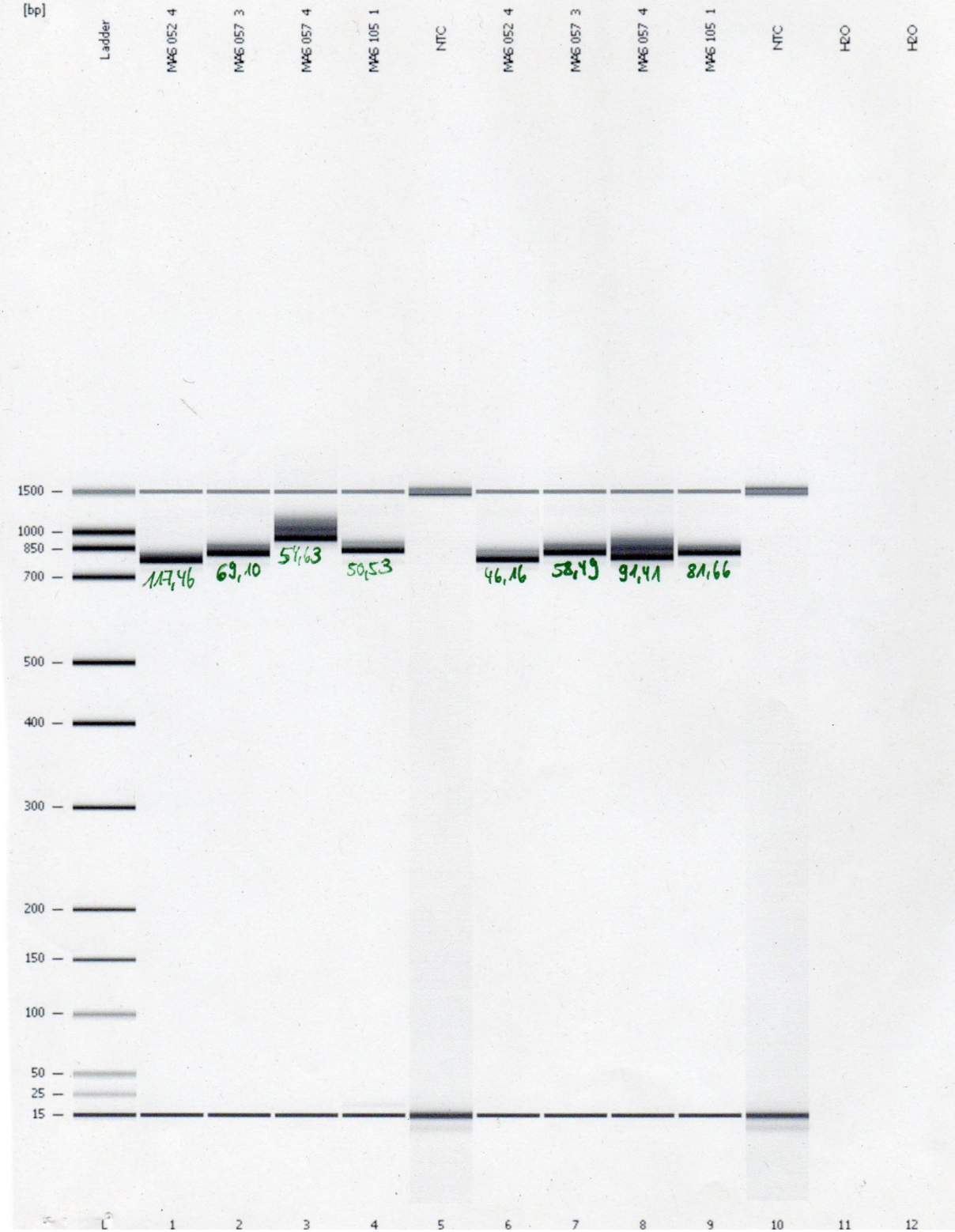


Abbildung 6: Ergebnisdarstellung des Bioanalyzers anhand einiger Beispiele

Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion wurden 20 – 40 ng der DNA-Menge eingesetzt, ausgehend von 1000 – 2000 bp. Der Mastermix wurde nach dem folgenden Ansatz hergestellt (Tabelle 25):

Tabelle 25: Ansatz für die Sequenzier-Reaktion

Komponente	Mastermix (10 µl Endvolumen)
HPLC-Wasser	Variiert (abhängig von eingesetzter Menge an DNA)
Ready Reaction Mix	2 µl
5x Puffer	1 µl
Primer 27f bzw. 630r	1 µl
DMSO	0,25 µl

In Tabelle 25 wurde die Volumenberechnung für eine Probe dargestellt. Das Volumen richtete sich nach der Anzahl der DNA-Proben, die sequenziert wurden. Nachdem die erforderliche Menge an Mastermix in RNase/ DNase-freie 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt wurde, wurde das aufgereinigte PCR-Produkt zupipettiert. Danach wurden die Proben für 30 Sekunden bei 20.000 x g zentrifugiert und im Thermocycler nach dem folgenden Temperatur-Zeit-Programm inkubiert (Tabelle 26):

Tabelle 26: Temperatur-Zeit-Programm für die Sequenzierreaktion

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Hold	96 °C	01:00 Minuten	1x
Denaturierung	96 °C	00:10 Minuten	30x
Annealing	50 °C	00:05 Minuten	30x
Extension	60 °C	04:00 Minuten	30x
Hold	4 °C	Bis Programmende	1x

Natriumacetat-Fällung der Sequenzierprodukte

Im ersten Schritt wurden 16 µl Wasser, vier µl Natriumacetat-Lösung und 50 µl Ethanol absolut vorgelegt und das PCR-Produkt anschließend überführt. Nachdem das Gemisch gevortext wurde, wurde 15 Minuten bei 14.000 x g und 15 °C zentrifugiert, um die DNA auszufällen. Anschließend wurde der Überstand zeitnah

abgenommen ohne das Pellet zu verletzen. Im nächsten Schritt wurden 50 µl 70 %iges Ethanol hinzugefügt ohne die Probe zu mischen. Nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten bei 14.000 x g und 15 °C wurde der Überstand abermals abgenommen. Durch diesen Waschschrift wurden Salze und andere wasserlösliche Substanzen entfernt. Im letzten Schritt wurde die DNA für 40 Minuten bei 50 °C getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser resuspendiert.

Analyse der DNA im Kapillarsequenzier

Im Kapillarsequenzier werden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und wandern dann dementsprechend mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in der Glaskapillare. Ein Argon-Laser regt die Farbstoffe der markierten DNA-Fragmente an, wodurch diese fluoreszieren. In einem Detektionsfenster werden die endständigen fluoreszierenden Basen mittels einer CCD (Charge-coupled Device) Kamera detektiert und die einzelnen Fluoreszenz-Signale im Elektropherogramm hintereinander aufgezeichnet (aus User Manual Genetic Analyzer 3130: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041812.pdf). Die Markierung der Dye-Terminatoren mit je nach Base unterschiedlichen Fluoreszenzfabstoffen ermöglicht die eindeutige Zuordnung von Signal und Base.

Für die Analyse wurden je fünf µl jeder DNA-Probe in je ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden je zehn µl Hi-Di Formamid dazugegeben und die 96-Well-Platte mit einer Septamatte verschlossen. Danach wurde die Platte in ein Probenrack gestellt und mit einer Plattenhalterung fixiert. Das beladene Probenrack wurde in das Autorack des Genetic Analyzers eingesetzt. Nach der Einstellung und Benennung der Proben, wurde das Protokoll Seq_Pop7_36_BDv1.1_Inj12 ausgewählt und der Sequenzer-Lauf gestartet. Das Protokoll beinhaltete folgende Einstellungen (Tabelle 27):

Tabelle 27: Einstellungen des Genetic Analyzers 3130

Einstellung	Wert
Oven_Temperature	60 [°C]
Poly_Fill_Vol	4840 [steps]
Current_Stability	5.0 [uAmps]
PreRun_Voltage	15.0 [kVolts]
Pre_Run_Time	180 [sec]
Injection_Voltage	1.2 [kVolts]
Injection_Time	12 [sec]
Voltage_Number_Of_Steps	30 [nk]
Voltage_Step_Interval	15 [sec]
Data_Delay_Time	120 [sec]
Run_Voltage	8.5 [kVolts]
Run_Time	2780[sec]

Auswertung der Sequenzen über die SmartGene-Datenbank

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der SmartGene-Datenbank für Bakterien (IDNS® version v3_6_10r6(r29270)). Dazu wurden die Sequenzen einer DNA-Probe in die Datenbank geladen und von der Software automatisch aligned. Danach wurden die Sequenzen editiert, indem die vorderen und die hinteren Abschnitte einer Sequenz abgeschnitten wurden sowie einzelne problematische Basen manuell identifiziert wurden bzw. mit einem IUPAC-Code umschrieben wurden (Tabelle 28).

Tabelle 28: IUPAC-Codes für die Auswertung von Sequenzen

Code	Bedeutung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
R	Purin (A oder G)
Y	Pyrimidin (C, T oder U)
M	C oder A
K	T, U oder G
W	T, U oder A
S	C oder G
B	C, T, U oder G (nicht A)
D	A, T, U oder G (nicht C)
H	A, T, U oder C (nicht G)
V	A, C oder G (nicht T, nicht U)
N	A, C, G, T oder U

Anschließend wurde die entstandene Sequenz mit der SmartGene-Datenbank für Bakterien abgeglichen und das Ergebnis mit den geringsten Mismatches und der höchsten Übereinstimmung gewählt. Die Anzahl der Mismatches variierte dabei von 0 bis 23, während die Übereinstimmung zwischen 98,19 % und 100,00 % lag. Bei einer hohen Anzahl an Mismatches wurde zusätzlich die Übereinstimmung der untersuchten Sequenz zur Centroid-Sequenz als Parameter herangezogen. Für Ergebnisse, die auf Speziesebene nicht eindeutig voneinander zu trennen waren bzw. zu nah beieinander lagen, wurde die Gattung als Ergebnis angegeben. Die SmartGene-Datenbank ist ein privat geführtes Unternehmen mit Hauptsitz in der Schweiz, das ihre eigene, urheberrechtlich geschützte Technologie „Integrated Database Network System“ (IDNS) vertreibt (<http://www.smartgene.com/about.html>). Diese Technologie erlaubt es, die Ressourcen von Internet und Datenbanken mit moderner Bioinformatik und bedeutendem genetischem Inhalt zu kombinieren.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der mikrobiologisch-kulturellen

Untersuchung

Mit der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung wurden insgesamt 132 Milchproben untersucht. Dabei wurden in 109 Milchproben (82,6 %) Mastitiserreger identifiziert. Eine Differenzierung von – für die Milchdrüse apathogenen – Umweltkeimen („Begleitflora“) erfolgte nicht, da diese für die Mastitisiagnostik nicht relevant sind. Für 23 Milchproben (17,4 %) konnte kein Befund erstellt werden. Von diesen 23 Milchproben zeigten 10 Proben (7,6 %) kein Wachstum auf festen Nährmedien und bei 13 Proben (9,8 %) wurde eine Begleitflora festgestellt, die eine Auswertung nicht ermöglichte. In 38 Fällen (28,8 %) traten Mischinfektionen auf, es wurden also mehrere potentiell pathogene Keime in einer Milchprobe identifiziert. Bei diesen Mischinfektionen traten die folgenden Paarungen vermehrt auf: Mikrokokken + vergrünende Streptokokken (7), Mikrokokken + Streptokokken (7), *Escherichia coli* + Streptokokken (4), Streptokokken + *Staphylococcus aureus* (5), coliforme Keime + vergrünende Streptokokken (4). Im Folgenden wurde die Verteilung der einzelnen Erreger aus der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung dargestellt (Abbildung 7). Die Prozentangaben wurden dafür gerundet.

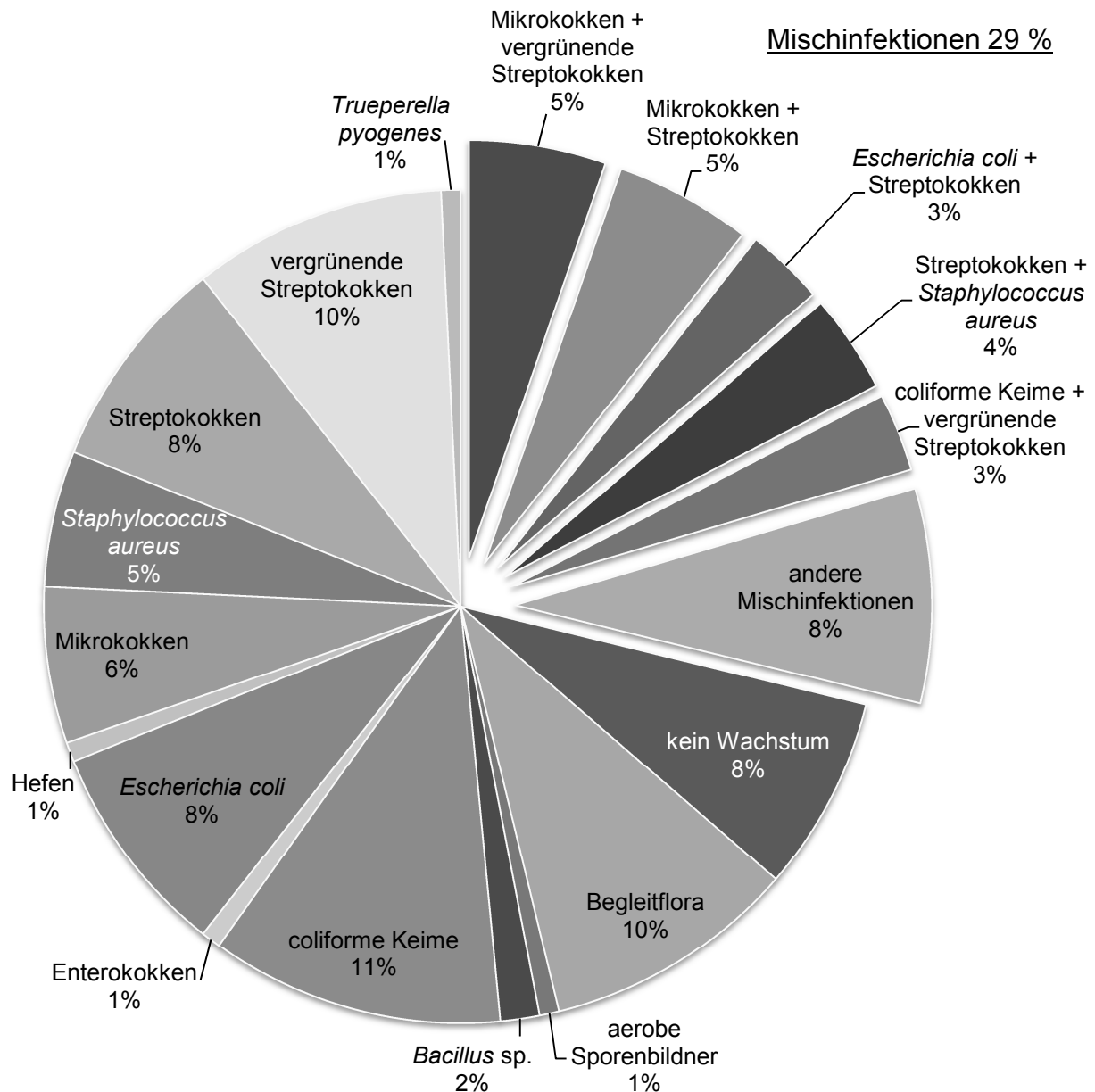


Abbildung 7: Über die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung identifizierte Mastitiserreger (n = 132)

Nach Einbeziehung der Mischinfektionen verteilten sich die Prävalenzen für die einzelnen Mastitispathogene wie folgt: 43,2 % Streptokokken, 18,9 % coliforme Keime, 16,7 % Mikrokokken, 15,2 % *Escherichia coli*, 9,8 % *Staphylococcus aureus*, 3,8 % *Bacillus sp.*, 2,3 % Enterokokken und jeweils 0,8 % bei *Trueperella pyogenes*, Hefen sowie aeroben Sporenbildnern.

Von den 99 Milchproben, für die es einen Vorbericht gab, stammten 83 aus Mastitisfällen: 47 akute Mastitisfälle (47,5 %), 10 chronisch-rezidivierende Mastitisfälle (10,1 %) und 26 subklinische Mastitisfälle (26,3 %). Die übrigen 16 Vorberichte beschrieben Milchproben, die vor dem Trockenstellen der Kuh auf Keime untersucht werden sollten oder anhand derer der Behandlungserfolg einer mastitiskranken Kuh überprüft werden sollte. Die Verteilung der Befunde auf den Verlauf der Mastitis wurde in der folgenden Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Verteilung der Befunde aus der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung anhand von 83 Vorberichten

Erreger	Mastitisfälle und die Anzahl der gefundenen Keime		
	akut (n = 47)	subklinisch (n = 26)	chronisch/rezidivierend (n = 10)
Aerobe	1 (2,1 %)	0	0
Sporenbildner			
<i>Bacillus</i> sp.	5 (10,6 %)	0	0
Coliforme Keime	9 (19,1 %)	4 (15,4 %)	1 (10 %)
<i>Enterococcus</i> sp.	1 (2,1 %)	0	0
<i>Escherichia coli</i>	11 (23,4 %)	1 (3,8 %)	2 (20 %)
Hefe	1 (2,1 %)	0	0
Mikrokokken	4 (8,5 %)	13 (50 %)	2 (20 %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (6,4 %)	4 (15,4 %)	0
Streptokokken	6 (12,8 %)	7 (26,9 %)	3 (30 %)
Vergrünende Streptokokken*	12 (25,5 %)	10 (38,5 %)	2 (20 %)
<i>Trueperella pyogenes</i>	1 (2,1 %)	0	0
Kein Befund	3 (6,4 %)	1 (3,8 %)	2 (20 %)

* vergrünende Streptokokken sind Streptokokken, die auf Blutagar eine α -Hämolyse („Vergrünung“) hervorrufen; sie gehören meist zur physiologischen Schleimhautflora (Reuter, 2004)

4.2 Ergebnisse der MALDI-TOF MS-Analytik

4.2.1 Validierung

4.2.1.1 Messung der DSM-Stämme mit MALDI-TOF MS

Mit MALDI-TOF MS wurden 15 DSM-Stämme (Tabelle 30) gemessen, 14 konnten mit einem Score-Value > 2,0 identifiziert werden und ein Keim (*Mycoplasma bovis*) wurde mit eine Score-Value < 1,7 ermittelt, erbrachte also kein verwertbares Ergebnis. *Mycoplasma bovis* war der einzige DSM-Stamm, der noch nicht in der Datenbank der Bruker Daltonik GmbH hinterlegt war.

Tabelle 30: Mittels MALDI-TOF MS gemessene DSM-Stämme

Keim	DSM-Stamm	Score-Value
<i>Trueperella pyogenes</i>	20630	2.037
<i>Bacillus pumilus</i>	27	2.343
<i>Corynebacterium bovis</i>	20582	2.370
<i>Enterococcus faecalis</i>	20478	2.544
<i>Escherichia coli</i>	30083	2.364
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	30104	2.094
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2898	2.440
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	28	2.319
<i>Mycoplasma bovis</i>	22781	1.521
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	20464	2.102
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	30121	2.281
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	20231	2.553
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2134	2.499
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	20662	2.503
<i>Streptococcus uberis</i>	20569	2.485

4.2.1.2 Verdünnungsreihe mit DSMZ-Stämmen

Um die Funktionalität des Sepsityper-Kits zu überprüfen, wurden mit handelsüblicher Milch und mit unbehandelter Rohmilch einer eutergesunden Kuh Verdünnungsreihen angelegt (Tabelle 31). Die MALDI-TOF MS-Messung erfolgte im Doppelansatz, die Verdünnung im Einfach-Ansatz.

Verdünnungsreihe mit Handelsmilch

Mit handelsüblicher Milch und den DSMZ-Stämmen *Staphylococcus aureus* (DSM 20231), *Escherichia coli* (DSM 30083) und *Enterococcus faecalis* (DSM 20478) wurden dezimale Verdünnungsreihen von 10^9 bis 10^1 cfu/ml hergestellt. *Staphylococcus aureus* konnte in den Konzentrationen von 10^8 cfu/ml bis 10^2 cfu/ml mit einem Score-Value $> 2,0$ nachgewiesen werden, wobei die Auswertung der Konzentrationsstufe von 10^9 cfu/ml aufgrund eines Laborfehlers nicht möglich war. *Escherichia coli* konnte in den Konzentrationen 10^9 cfu/ml bis 10^5 cfu/ml mit einem Score-Value $> 2,0$ nachgewiesen werden. Für 10^4 cfu/ml konnte ein Score-Value von $> 1,7 < 2,0$ ermittelt werden. In den Konzentrationen 10^3 cfu/ml und 10^2 cfu/ml wurde erneut ein Score-Value von $> 2,0$ ermittelt. *Enterococcus faecalis* wurde in der Konzentration 10^9 cfu/ml mit einem Score-Value $> 2,0$ und in den Konzentrationen 10^8 cfu/ml und 10^7 cfu/ml mit einem Score-Value von $> 1,7 < 2,0$ nachgewiesen. In den Konzentrationen 10^6 cfu/ml bis 10^1 cfu/ml konnte der Keim nicht mehr nachgewiesen werden, da der Score-Value $< 1,7$ lag bzw. keine Peaks detektiert wurden.

Verdünnungsreihe mit unbehandelter Rohmilch einer eutergesunden Kuh

Zusätzlich wurde unbehandelte Rohmilch einer eutergesunden Kuh mit *Escherichia coli* (DSM 30083) versetzt und anschließend eine Verdünnungsreihe mit denselben Verdünnungsstufen wie im zuvor beschriebenen Kapitel hergestellt. *Escherichia coli* konnte in den Konzentrationen 10^9 cfu/ml bis 10^7 cfu/ml mit einem Score-Value $> 2,0$ nachgewiesen werden. Für die Verdünnungsstufe 10^6 cfu/ml betrug der Score-Value $> 1,7 < 2,0$ und für die Konzentration 10^5 cfu/ml $> 2,0$. In den Konzentrationen 10^4 cfu/ml bis 10^1 cfu/ml konnte *Escherichia coli* nicht mehr nachgewiesen werden, da der Score-Value $< 1,7$ lag bzw. keine Peaks detektiert wurden.

Die Messung der ungespiketen Handelsmilch und Rohmilch ergab keine Ergebnisse, die Score-Values lagen $< 1,7$.

Tabelle 31: Konzentrationsabhängige Nachweisbarkeit gespikter Milchproben mit MALDI-TOF MS-Analytik

Keim	Score-Value nach Verdünnungsstufe [cfu/ml]								
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
<i>Staphylococcus aureus</i>		2.522	2.539	2.442	2.444	2.342	2.005	2.262	< 0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.528	1.953	1.974	1.505	1.569	1.455	< 0	1.861	< 0
<i>Escherichia coli</i> (Handelsmilch)	2.281	2.443	2.436	2.100	2.035	1.732	2.350	2.076	< 0
<i>Escherichia coli</i> (Rohmilch)	2.144	2.458	2.004	1.888	2.055	1.455	< 0	< 0	< 0

4.2.2 Proben aus der Routinediagnostik

4.2.2.1 Untersuchung der Subkulturen aus der Mastistisdiagnostik

Mittels MALDI-TOF MS wurden 228 Subkulturen aus 129 Milchproben untersucht; aus zwei Milchproben konnten keine Subkulturen gewonnen werden. Es wurden 201 Subkulturen mit einem Score-Value > 2 erkannt, das entsprach 88,2 % aller gemessenen Subkulturen. Durch die Ethanol-Extraktion wurden weitere vier Subkulturen (*Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium confusum*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus succinus*) mit einem Score-Value > 2 gemessen, was weiteren 1,8 % entsprach. Insgesamt wurden also 205 Subkulturen (89,9 %) mit einem Score-Value > 2 identifiziert, davon 130 Subkulturen mit einem Score-Value > 2,3. Zwölf Subkulturen (5,3 %) wurden mit einem Score-Value von 1,7 - 2,0 gemessen und elf Subkulturen (4,8 %) konnten nicht identifiziert werden, der Score-Value betrug < 1,7.

Von den 205 Subkulturen, die mit einem Score-Value > 2 gemessen wurden, konnten neun lediglich der Gattungsebene zugeordnet werden, da sich der Score-Value der ersten beiden Ergebnisse einer Subkultur um weniger als 0,1 Punkte unterschied und eine sichere Spezieszuordnung deshalb nicht erfolgen konnte.

Somit ergab sich die folgende Ergebnisverteilung: 196 Subkulturen, also 86 % wurden auf Speziesebene erkannt, 21 Subkulturen, also 9,2 % wurden auf Genusebene erkannt und 11 Subkulturen (4,8 %) konnten nicht identifiziert werden. In den nachfolgenden Grafiken (Abbildung 8 und Abbildung 9) wurde diese Verteilung der Ergebnisse aus der MALDI-TOF MS-Analytik dargestellt.

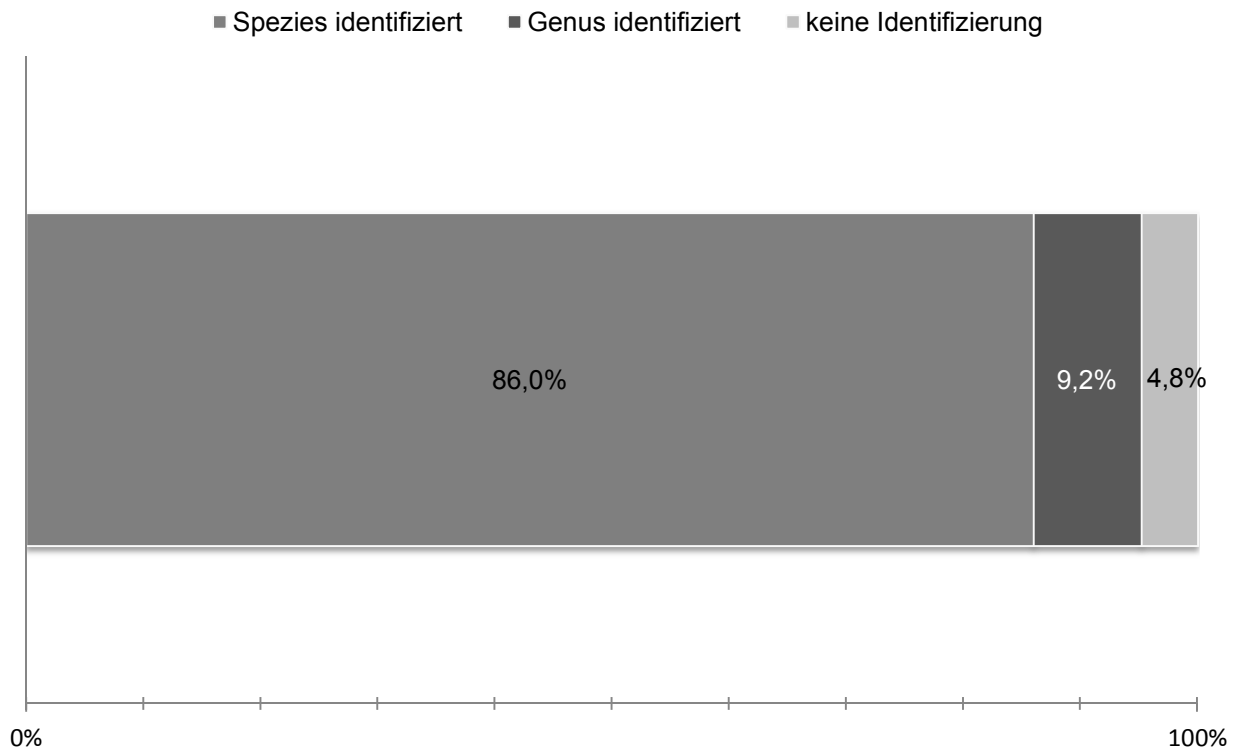


Abbildung 8: Verteilung der Ergebnisse der MALDI-TOF MS-Analytik aus der Routinediagnostik (n = 228 Isolate); siehe auch Abbildung 9

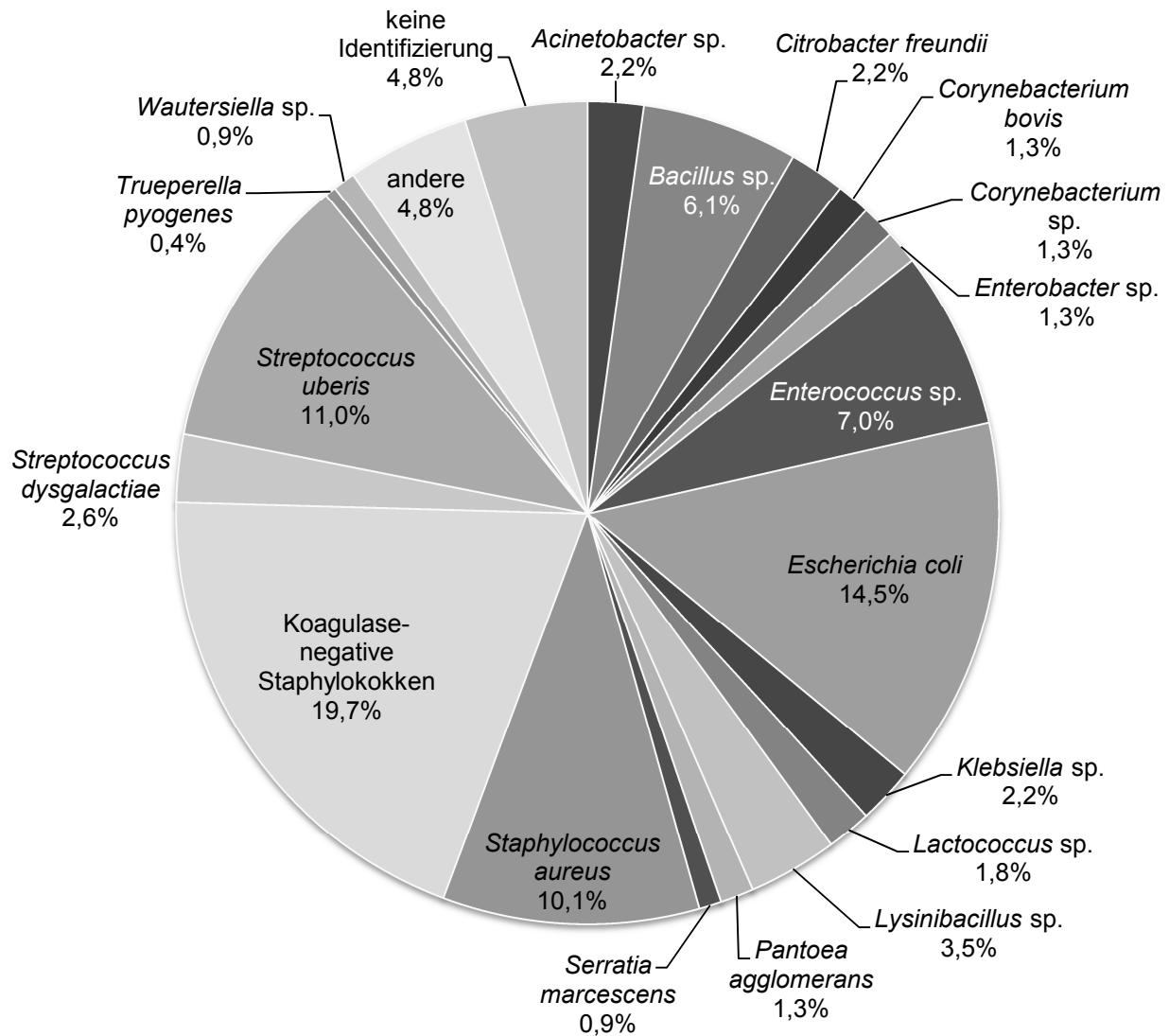


Abbildung 9: Über MALDI-TOF MS ermittelte Keime (n = 228 Isolate)

Da ein Vergleich der Ergebnisse von mikrobiologisch-kultureller Untersuchung und MALDI-TOF MS in dieser Form nicht möglich ist, wurden die Ergebnisse aus der Untersuchung mittels MALDI-TOF MS-Analytik für einige Keime auf Gruppenebene in der nachfolgenden Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: Vergleich der mittels MALDI-TOF MS und mikrobiologisch-kultureller Untersuchung ermittelten Befunde, orientiert an der Einteilung der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung

Keim	MALDI-TOF MS	mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung
Aerobe Sporenbildner	0 %	1 %
<i>Bacillus</i> sp.	0 %	2 %
Coliforme Keime	2 %	11 %
<i>Corynebacterium bovis</i>	2 %	0 %
Enterokokken	2 %	1 %
<i>Escherichia coli</i>	14 %	8 %
Mikrokokken	1 %	6 %
Hefen	0 %	1 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 %	5 %
Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)	9 %	0 %
Streptokokken	3 %	8 %
Vergrünende Streptokokken	9 %	10 %
<i>Trueperella pyogenes</i>	1 %	1 %
Mischinfektionen	21 %	29 %
<i>Bacillus</i> sp. + <i>Escherichia coli</i>	3 %	0 %
<i>Escherichia coli</i> + Streptokokken	0 %	3 %
<i>Staphylococcus aureus</i> + KNS	2 %	0 %
Mikrokokken + vergrünende Streptokokken	0 %	5 %
Mikrokokken + Streptokokken	0 %	5 %
<i>Staphylococcus aureus</i> + Streptokokken	0 %	4 %
<i>Staphylococcus aureus</i> + vergrünende Streptokokken	3 %	0 %
Vergrünende Streptokokken + KNS	2 %	0 %

Tabelle 32, Fortsetzung

Keim	MALDI-TOF MS	mikrobiologisch- kulturelle Untersuchung
Mischinfektionen		
Vergrünende Streptokokken + coliforme Keime	0 %	3 %
andere	11 %	8 %
Keine Identifizierung	1 %	0 %
Kein Wachstum	2 %*	8 %*
Begleitflora	30 %	10 %

* Primärkultur für mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung und MALDI-TOF-MS-Analytik wurden in unterschiedlichen Laboren angelegt

Die elf Subkulturen, die mittels MALDI-TOF MS nicht identifiziert werden konnten (Score-Value < 1,7), konnten anhand der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung ermittelt werden. Die Ergebnisse der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung wurden mit den vorgeschlagenen Ergebnissen der MALDI-TOF MS Analytik in der folgenden Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Ergebnisse der 16S rRNA Gen-Sequenzierung im Vergleich mit den vorgeschlagenen Ergebnissen aus der MALDI-TOF MS Analytik

Probe	Ergebnis 16S rRNA PCR	Ergebnis MALDI-TOF MS (mit Score-Value)	Übereinstimmung
MAS 003_1	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	<i>Streptococcus hyovaginalis</i> (1.586)	Genus
MAS 036_1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (1.645)	Spezies
MAS 046_1	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus condimenti</i> (1.661)	Genus
MAS 071_2	<i>Kurthia gibsonii</i>	<i>Aeromonas molluscorum</i> (1.384)	nein
MAS 072_4	<i>Corynebacterium variabile</i>	<i>Corynebacterium variabile</i> (1.454)	Spezies
MAS 082_1	<i>Kurthia gibsonii</i>	<i>Arthrobacter sulfureus</i> (1.423)	nein
MAS 083_2	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter towneri</i> (1.683)	Genus
MAS 094_2	<i>Corynebacterium variabile</i>	<i>Corynebacterium variabile</i> (1.650)	Spezies
MAS 105_1	<i>Staphylococcus kloosii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> (1.492)	Genus
MAS 128_2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1.356)	nein
MAS 133_3	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> (1.583)	Genus

4.2.2.2 Untersuchung von Milchproben ohne Kultivierungsschritt

Sepsityper-Kit

Mit Hilfe des Sepsityper-Kit (Kapitel 3.3.3.2) wurden 30 Mastitisproben aus der Routinediagnostik direkt – ohne vorangegangene Kultivierung – mit MALDI-TOF MS untersucht. Für keine der 30 Mastitisproben (100 %) konnte ein Score-Value > 1,7 erzielt werden.

Während der Messungen wurden zwar Peaks gefunden, diese konnten aber keiner Gattung oder Spezies zugeordnet werden. Dies wurde in Tabelle 34 dargestellt.

Subkulturen aus den mittels Sepsityper-Kit analysierten Milchproben

Von den 30 Mastitisproben, die direkt mit Hilfe des Sepsityper-Kits untersucht wurden, zeigten 22 Proben Wachstum auf festen Nährmedien. Von den bewachsenen Nährmedien wurden 34 Subkulturen isoliert. Mittels EoT-Verfahren wurden diese 34 Subkulturen identifiziert, 21 (61,8 %) davon mit einem Score-Value > 2,3, zwölf (35,3 %) mit einem Score-Value von 2,0 – 2,3 und eine Subkultur (2,9 %) mit einem Score-Value von 1,7 – 2,0. Keine der Subkulturen erzielte einen Score-Value < 1,7. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Ergebnisse der Messungen von Milchproben mit dem Sepsityper-Kit und den dazugehörigen Subkulturen mittels MALDI-TOF MS-Analytik

Probe	Ergebnis Sepsityper	Score Value	Ergebnis Subkultur	Score Value
C 2866-1	<i>Providencia rettgeri</i>	1.341	<i>Streptococcus sp.</i>	2.283
			<i>Aerococcus viridans</i>	2.362
C 2866-2	<i>Clostridium haemolyticum</i>	1.406	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.318
			<i>Streptococcus canis</i>	2.137
			<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.218
			<i>Corynebacterium confusum</i>	2.505
			<i>Aerococcus viridans</i>	2.365
C 2866-3	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1.424	<i>Staphylococcus equorum</i>	2.290
			<i>Acinetobacter iwoffii</i>	2.480
C 2866-4	Nicht auswertbar	< 0	<i>Aerococcus viridans</i>	2.477
			<i>Acinetobacter iwoffii</i>	2.293
C 2867-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.491	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2.396
			<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2.251
			<i>Aerococcus viridans</i>	2.452
C 2867-2	<i>Halomonas elongata</i>	1.302	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1.934
			<i>Aerococcus viridans</i>	2.336
			<i>Corynebacterium casei</i>	2.084
C 2867-3	<i>Microbacterium saperdae</i>	1.293	Kein Wachstum	

Tabelle 34, Fortsetzung

Probe	Ergebnis Sepsityper	Score Value	Ergebnis Subkultur	Score Value
C 2867-4	Nicht auswertbar	< 0	<i>Aerococcus viridans</i>	2.375
C 2868-1	<i>Escherichia coli</i>	1.620	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2.365
C 2868-2	<i>Rhodococcus ruber</i>	1.331	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2.541
C 2868-3	<i>Candida zeylanoides</i>	1.578	Kein Wachstum	
C 2868-4	Nicht auswertbar	< 0	Kein Wachstum	
C 2869-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.372	<i>Staphylococcus hyicus</i>	2.244
C 2869-2	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.336	Kein Wachstum	
C 2869-3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1.383	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.476
C 2869-4	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	1.288	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2.183
C 2904	<i>Bacillus jeotgali</i>	1.461	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.210
C 2905	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.365	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.383
C 2906-1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1.530	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2.422
C 2906-2	<i>Candida lusitaniae</i>	1.339	Kein Wachstum	
C 2907	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1.476	<i>Enterococcus faecium</i>	2.534
C 2908-1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1.653	Kein Wachstum	
C 2908-2	<i>Filifactor villosus</i>	1.342	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.076
C 2909-1	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.492	Kein Wachstum	
C 2909-2	<i>Candida sorbosa</i>	1.333	Kein Wachstum	
C 3074	<i>Candida sorbosa</i>	1.434	<i>Streptococcus uberis</i>	2.517
C 3075-1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1.350	<i>Streptococcus uberis</i>	2.611

Tabelle 34, Fortsetzung

Probe	Ergebnis Sepsistyper	Score Value	Ergebnis Subkultur	Score Value
C 3075-3	<i>Filifactor villosus</i>	1.306	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.395
			<i>Streptococcus uberis</i>	2.572
C 3076-1	<i>Neisseria meningitidis</i>	1.465	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2.441
C 3076-3	<i>Candida sorbosa</i>	1.520	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2.220

4.2.3 Eingelesene Spektren

Zur Optimierung der MALDI-TOF-Datenbank wurden Spektren bisher nicht enthaltener oder unzureichend identifizierte Keime erstellt (vgl. 3.3.3.3). Aus der Routinediagnostik wurden 21 mastitisrelevante Keime in die lokale Datenbank aufgenommen. Diese Keime wurden in der Routinediagnostik weder durch die EoT-Methode noch durch die EtOH-Extraktion mittels MALDI-TOF MS identifiziert, konnten aber durch die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung verifiziert werden. Vier weitere Erreger (*Prototheca* sp.; *Mycoplasma bovis*) standen als Referenzstämme (FU Berlin / DSM) zur Verfügung. Die Messung, Auswertung und Wiederfindung der dazugehörigen Spektren erfolgte wie in den zuvor beschriebenen Kapiteln. Alle 25 eingelesenen Spektren konnten ausgewertet und in die lokale Datenbank aufgenommen werden (Tabelle 35). Alle Spektren konnten mit einem Score-Value > 2,3 wiedergefunden werden. Da mittels MALDI-TOF MS-Analytik nur Keime identifiziert werden können, die ausreichend in der Datenbank hinterlegt sind, erfolgte der abschließende Vergleich der Methoden in Kapitel 4.4 anhand der so optimierten Datenbank.

Tabelle 35: MALDI-TOF MS-Analytik: In die Datenbank aufgenommene Keime

Keim	Anzahl
<i>Acinetobacter junii</i>	1
<i>Corynebacterium bovis</i>	1
<i>Corynebacterium confusum</i>	1
<i>Corynebacterium variabile</i>	2

Tabelle 35, Fortsetzung

Keim	Anzahl
<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Kurthia gibsonii</i>	3
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	3
<i>Mycoplasma bovis</i> (DSM 22781)	1
<i>Prototheca wickerhamii</i> CBS2 (FU Berlin)	1
<i>Prototheca blaschkeae</i> RZIII-3 (FU Berlin)	1
Prototheca LZ-5 Gent2 (FU Berlin)	1
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1
<i>Staphylococcus kloosii</i>	1
<i>Staphylococcus simulans</i>	1
<i>Staphylococcus succinus</i>	2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	1
gesamt	25

4.3 Ergebnisse des PathoProof Mastitis PCR Assay

4.3.1 Validierung

4.3.1.1 Messung der DSM-Stämme mit PathoProof Mastitis PCR Assay

Neben den Routineproben wurden DSM-Stämme mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay gemessen, um die Spezifität und die Sensitivität dieser Methode zu eruieren.

4.3.1.2 Spezifität des PathoProof Mastitis PCR Assay

Zur Ermittlung der Spezifität wurden 18 DSM-Stämme sowie vier Prototheken-Stämme (zur Verfügung gestellt von der FU Berlin) mit Hilfe des PathoProof Mastitis PCR Assay gemessen.

Von diesen 22 Stämmen waren 16 im Spektrum des PathoProof Mastitis PCR Assay enthalten; die übrigen sechs Stämme wurden zur Validierung der Spezifität mitgeführt. Bei fünf Stämmen (22,7 %) wurden positive Signale detektiert, obwohl diese Stämme nicht im PathoProof Mastitis PCR Assay enthalten waren. Bei sieben Stämmen (31,8 %) wurden neben dem spezifischen Keim weitere unspezifische Keime ausgegeben (Tabelle 36)

Tabelle 36: Mittels PathoProof Mastitis PCR Assay gemessene DSM-Stämme und dazugehörige positive Signale

Keim	DSM-Stamm	Positive Signale (inkl. CT-Wert)	Im Erkennungsspektrum des PathoProof Mastitis PCR Assay enthalten
<i>Bacillus pumilus</i>	27	-	Nein
<i>Corynebacterium bovis</i>	20582	<i>Corynebacterium bovis</i> (16,30)	Ja, <i>Corynebacterium bovis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	20478	<i>Enterococcus sp.</i> (13,36)	Ja, <i>Enterococcus sp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	30083	<i>Escherichia coli</i> (14,46)	Ja, <i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30104	<i>Klebsiella sp.</i> (17,21)	Ja, <i>Klebsiella sp.</i>
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2898	<i>Staphylococcus sp.</i> (26,38)	Nein
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	28	<i>Staphylococcus sp.</i> (25,57)	Nein
<i>Mycoplasma bovis</i>	22781	<i>Mycoplasma bovis</i> (16,14) <i>Mycoplasma sp.</i> (14,92) <i>Staphylococcus sp.</i> (32,46)	Ja, <i>Mycoplasma sp.</i> und <i>Mycoplasma bovis</i>

Tabelle 36, Fortsetzung

Keim	DSM-Stamm	Positive Signale (inkl. CT-Wert)	Im Erkennungsspektrum des PathoProof Mastitis PCR Assay enthalten
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	20464	<i>Enterococcus</i> sp. (28,99) Hefe (31,24) <i>Peptoniphilus indolicus</i> / <i>Arcanobacterium</i> (i.e. <i>Trueperella</i>) <i>pyogenes</i> (16,07)	Ja, keine Differenzierung zwischen <i>Peptoniphilus indolicus</i> und <i>Trueperella pyogenes</i>
<i>Prototheca blaschkeae</i> RZ-III-3		<i>Prototheca</i> sp. (7,53) <i>Staphylococcus aureus</i> (30,19)	Ja, <i>Prototheca</i> sp.
Prototheca LZ-5 Genotyp 2		<i>blaZ</i> -Gen (32,55) <i>Escherichia coli</i> (34,61) <i>Prototheca</i> sp. (7,47) <i>Staphylococcus</i> sp. (33,09)	Ja, <i>Prototheca</i> sp.
Prototheca RZ-I-3 Genotyp 1		<i>Prototheca</i> sp. (13,01) <i>Staphylococcus</i> sp. (34,46)	Ja, <i>Prototheca</i> sp.

Tabelle 36, Fortsetzung

Keim	DSM-Stamm	Positive Signale (inkl. CT-Wert)	Im Erkennungsspektrum des PathoProof Mastitis PCR Assay enthalten
<i>Prototheca wickerhamii</i> CBS2		<i>blaZ</i> -Gen (30,09) <i>Escherichia coli</i> (30,95) <i>Prototheca</i> sp. (13,93) <i>Staphylococcus aureus</i> (34,31) <i>Staphylococcus</i> sp. (31,02)	Ja, <i>Prototheca</i> sp.
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	30121	<i>Serratia marcescens</i> (13,86)	Ja, <i>Serratia marcescens</i>
<i>Shigella boydii</i>	457266	<i>Escherichia coli</i> (15,59)	Nein
<i>Shigella flexneri</i>	4782	<i>Escherichia coli</i> (15,28)	Nein
<i>Shigella sonnei</i>	5570	<i>Escherichia coli</i> (13,11)	Nein
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i>	20231	<i>blaZ</i> -Gen (12,42) <i>Staphylococcus aureus</i> (14,92) <i>Staphylococcus</i> sp. (14,10)	Ja, <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2134	<i>Streptococcus agalactiae</i> (17,61)	Ja, <i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	20662	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (14,57)	Ja, <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Streptococcus uberis</i>	20569	<i>Streptococcus uberis</i> (20,01)	Ja, <i>Streptococcus uberis</i>

Tabelle 36, Fortsetzung

Keim	DSM-Stamm	Positive Signale (inkl. CT-Wert)	Im Erkennungsspektrum des PathoProof Mastitis PCR Assay enthalten
<i>Trueperella pyogenes</i>	20630	<i>Arcanobacterium</i> (i.e. <i>Trueperella</i>) <i>pyogenes</i> / <i>Peptoniphilus indolicus</i> (15,35) <i>Staphylococcus</i> sp. (34,69) <i>Streptococcus uberis</i> (33,90)	Ja, keine Differenzierung zwischen <i>Peptoniphilus indolicus</i> und <i>Trueperella pyogenes</i>

Schon im Vergleich der DSM-Stämme – die im wesentlichen relevante Mastitiserreger, nicht aber „Umweltkeime“ ohne Mastitisrelevanz repräsentieren – zeigt das PathoProof Mastitis PCR Assay insbesondere für den *Staphylococcus*-Nachweis eine geringe Spezifität (61,9 %); auch die Spezifität des *Escherichia coli*-Nachweises beträgt nur 76,2 %. Falsch positive Befunde gab es auch für das *blaZ*-Gen (Spezifität 90,5 %) und den Nachweis von *Enterococcus* sp. sowie *Streptococcus uberis* (Spezifität je 92,2 %). Die Spezifität wurde anhand der Formel aus Kapitel 3.4.2.1 berechnet.

4.3.1.3 Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden zwölf DSM-Stämme und ein Prototheken-Stamm in verschiedenen Verdünnungsstufen mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay gemessen (Tabelle 37). Die Berechnung erfolgte anhand der Formel aus Kapitel 3.4.2.1. Für *Streptococcus uberis* konnten bis zu einer Verdünnung von 1 pg/µl - also rund 3×10^6 Molekülen - positive Signale detektiert werden.

Die Keime *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Mycoplasma bovis*, *Peptoniphilus indolicus*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus agalactiae* wurden bis zu einer Verdünnung von 100 fg/μl ($1-5 \times 10^5$ Moleküle) nachgewiesen. *Escherichia coli* wurde bis zu einer Verdünnung von 10 fg/μl – also bis zu 1×10^4 Molekülen nachgewiesen. *Enterococcus faecalis*, *Prototheca wickerhamii* und *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* konnten auch in einer Verdünnungsstufe von einem fg/μl noch erfasst werden.

Tabelle 37: Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay für verschiedene DSM-Stämme

Keim (DSM-Stamm)	CT-Wert nach Verdünnungsstufe und Anzahl der Moleküle nach Verdünnungsstufe							
	1 ng/µl	100 pg/µl	10 pg/µl	1 pg/µl	100 fg/µl	10 fg/µl	1 fg/µl	0,1 fg/µl
	<i>Corynebacterium bovis</i> (20582)	19,53	23,50	27,22	30,63	33,55	38,18	-
	2×10^9	2×10^8	2×10^7	2×10^6	2×10^5	2×10^4	2×10^3	2×10^2
<i>Enterococcus faecalis</i> (20478)	19,13	22,81	25,98	29,11	31,84	35,39	36,98	-
	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$
<i>Escherichia coli</i> (30083)	20,08	23,99	26,78	29,80	32,58	36,36	39,95	-
	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (30104)	21,71	25,26	28,77	32,60	36,94	-	-	-
	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2
<i>Mycoplasma bovis</i> (22781)	20,73	24,77	28,23	32,14	35,08	-	-	-
	5×10^9	5×10^8	5×10^7	5×10^6	5×10^5	5×10^4	5×10^3	5×10^2

Tabelle 37, Fortsetzung

Keim (DSM-Stamm)	CT-Wert nach Verdünnungsstufe und Anzahl der Moleküle nach Verdünnungsstufe							
	1 ng/µl	100 pg/µl	10 pg/µl	1 pg/µl	100 fg/µl	10 fg/µl	1 fg/µl	0,1 fg/µl
<i>Peptoniphilus indolicus</i> (20464)	22,34	24,91	28,40	32,03	35,27	-	-	-
	2×10^9	2×10^8	2×10^7	2×10^6	2×10^5	2×10^4	2×10^3	2×10^2
<i>Prototheca wickerhamii</i> CBS2	15,95	22,18	25,57	29,64	32,18	35,02	36,49	38,69
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> (30121)	24,37	24,7	26,92	30,39	28,88	32,24	34,73	37,64
	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (20231)	21,67	26,31	29,36	32,50	34,76	39,43	-	-
	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$
<i>Streptococcus agalactiae</i> (2134)	21,71	24,99	28,58	31,77	35,21	38,33	-	-
	2×10^9	2×10^8	2×10^7	2×10^6	2×10^5	2×10^4	2×10^3	2×10^2

Tabelle 37, Fortsetzung

Keim (DSM-Stamm)	CT-Wert nach Verdünnungsstufe und Anzahl der Moleküle nach Verdünnungsstufe							
	1 ng/µl	100 pg/µl	10 pg/µl	1 pg/µl	100 fg/µl	10 fg/µl	1 fg/µl	0,1 fg/µl
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (20662)	19,50	23,07	26,51	29,93	32,95	37,13	38,64	-
	2×10^9	2×10^8	2×10^7	2×10^6	2×10^5	2×10^4	2×10^3	2×10^2
<i>Streptococcus uberis</i> (20569)	25,17	27,39	30,82	34,28	-	-	-	-
	3×10^9	3×10^8	3×10^7	3×10^6	3×10^5	3×10^4	3×10^3	3×10^2
<i>Trueperella pyogenes</i> (20630)	19,32	22,97	26,69	30,36	32,99	-	-	-
	3×10^9	3×10^8	3×10^7	3×10^6	3×10^5	3×10^4	3×10^3	3×10^2

Der Kurvenverlauf für die Fluoreszenzmessung zur Sensitivitätsmessung ist in Abbildung 10 exemplarisch anhand von *Staphylococcus aureus* dargestellt

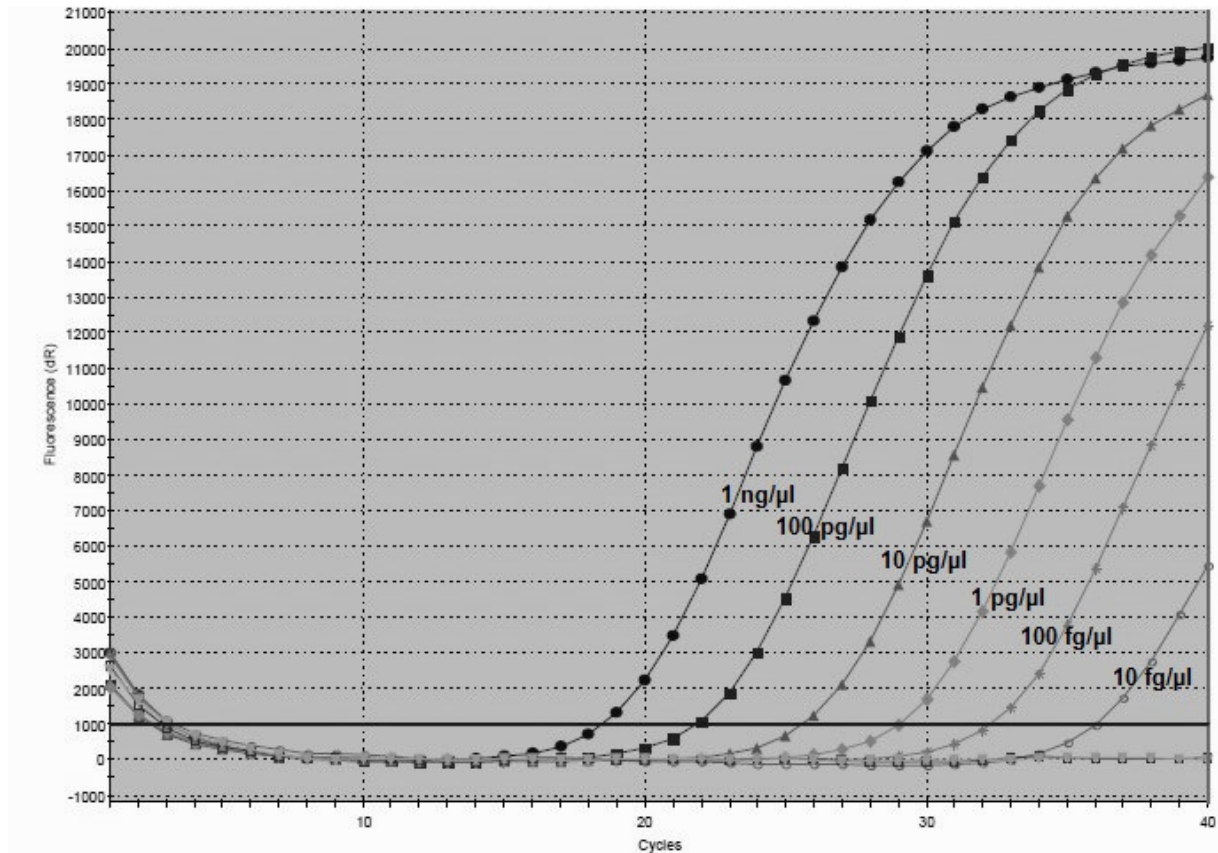


Abbildung 10: Sensitivitätsmessung am Beispiel einer dezimalen Verdünnungsreihe von *Staphylococcus aureus* (DSM 20231)

4.3.1.4 Subkulturen aus der Routinediagnostik

Die 228 Subkulturen, die aus 129 der 132 untersuchten Milchproben gewonnen wurden, wurden neben der MALDI-TOF MS-Analytik auch mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay identifiziert. Die Subkulturen lagen nach visueller Einschätzung als Reinkultur vor. In 20 mittels MALDI-TOF MS identifizierten Subkulturen wurden mittels PathoProof Mastitis PCR Assay keine Signale detektiert. In 120 Subkulturen wurde mittels PathoProof Mastitis PCR Assay ein Keim identifiziert. In 56 Subkulturen wurden jeweils Signale von zwei Keimen gemessen. In 16 Subkulturen waren Signale von drei Keimen und in 16 Subkulturen Signale von vier Keimen oder mehr messbar (siehe Tabelle 38).

Bei 107 Proben (46,9 %) wurde mit beiden Methoden (MALDI-TOF MS und PathoProof Mastitis PCR Assay) dasselbe Ergebnis erzielt, während bei 121 Proben (53,1 %) mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay zusätzlich

unspezifische Signale gemessen wurden, die nicht mit den – adspektorisch als Reinkulturen vorliegenden – Subkulturen vereinbar waren.

Tabelle 38: Anzahl der mittels PathoProof Mastitis PCR Assay in den Subkulturen detektierten Signale

Anzahl der mittels PathoProof Mastitis PCR Assay in Subkulturen detektierten Signale	Anzahl positiver Befunde
Keine Signale	20
Ein Signal	120
Zwei Signale	56
Drei Signale	16
Vier oder mehr Signale	16

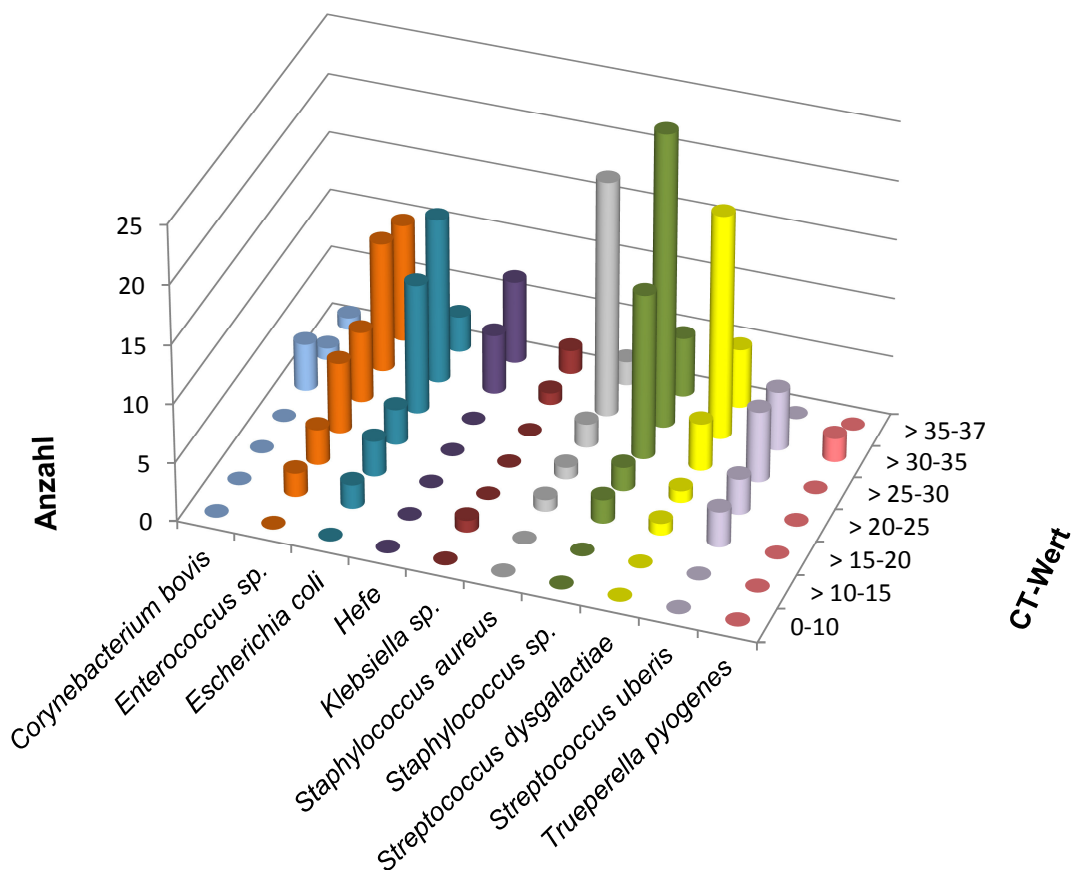


Abbildung 11: Verteilung der zusätzlichen positiven Signale in den Subkulturen auf die unterschiedlichen CT-Werte

Anhand der Grafik (Abbildung 11) wird deutlich, dass – sofern mehr als ein Signal detektiert wurde – die zusätzlichen Signale überwiegend bei CT-Werten > 25 lagen. Nachfolgend wurde dargestellt, in welcher Anzahl die Zusatzbefunde detektiert wurden (Abbildung 12).

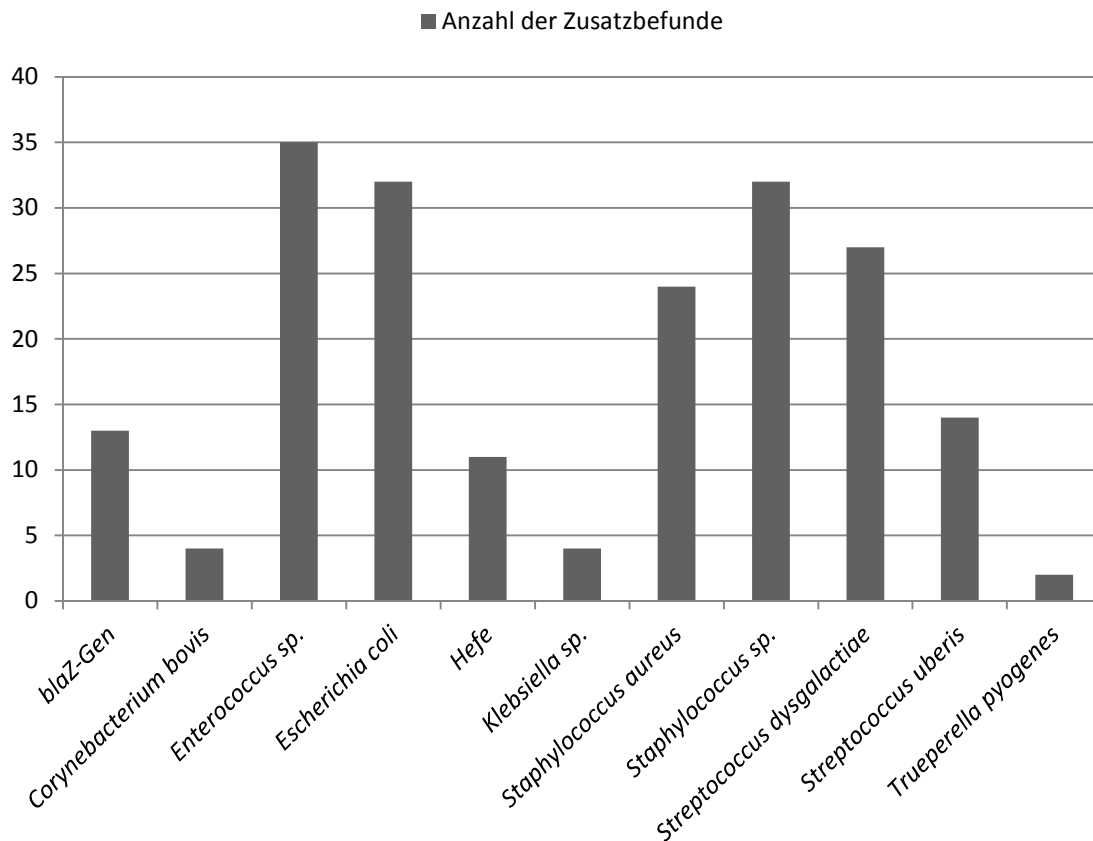


Abbildung 12: Anzahl der Zusatzbefunde mittels PathoProof Mastitis PCR Assay für die Messung von Reinkulturen

4.3.1.5 Vergleich der manuellen Auswertung mit Norden Lab Mastitis Studio

Da die Auswertung des PathoProof Mastitis PCR Assay manuell erfolgte, wurde ein Großteil der Proben (MAS 001 – MAS 100) zusätzlich mit dem Auswertungsprogramm Norden Lab Mastitis Studio bearbeitet, um eventuelle Fehler bei der manuellen Auswertung zu erkennen bzw. auszuschließen. Hierbei konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Der Abstand der CT-Werte von manueller Auswertung und NLMS betrug in den meisten Fällen weniger als 1. In wenigen Fällen wurden Keime detektiert, die mit einer der beiden Auswertungsmethoden nicht gefunden wurden. Allerdings lagen diese positiven Keimsignale außerhalb der Bewertungsgrenze (CT 37,00) und waren somit nicht relevant für die Auswertung.

4.3.1.6 Vergleich der Ergebnisse von TMO-Proben aus Finnland und Proben aus Deutschland

Da bereits frühzeitig unspezifische Ergebnisse im PathoProof Mastitis PCR Assay auftraten, wurden in Zusammenarbeit mit TMO, Thermo Fisher Scientific, zehn Milchproben aus Finnland und zehn Milchproben aus Deutschland (inklusive Subkulturen) vergleichsweise gemessen. Die finnischen Milchproben wurden Bronopol-konserviert geschickt. Die deutschen Milchproben wurden gefroren in 1,5 ml nuklease-freien Reaktionsgefäßen verschickt, außerdem gefrorene DNA der dazugehörigen Subkulturen.

Proben aus Finnland

Bei den finnischen Milchproben waren die Ergebnisse aus beiden Laboren sehr ähnlich, die CT-Werte lagen weniger als 1,0 voneinander entfernt. Bei drei Proben wurde ein positives Signal mit spätem CT-Wert, jedoch innerhalb der Bewertungsgrenzen, detektiert, das von dem jeweils anderen Labor nicht gefunden wurde.

Proben aus Deutschland

Bei den deutschen Milchproben lagen die CT-Werte beider Labore bereits deutlicher auseinander (bis zu 3,8 CT-Punkte). Auch wurden in vielen Milchproben positive Signale detektiert, die entweder von dem einen oder dem anderen Labor nicht gefunden wurden. Hierbei lagen die CT-Werte bis zu 6,6 CT-Punkte auseinander. Neben den Milchproben wurden auch die dazugehörigen Subkulturen vergleichend gemessen. Die Ergebnisse der verschiedenen Labore wurden in Tabelle 45 im Anhang dargestellt. Positive Signale mit einem CT-Wert > 37 wurden nicht gewertet und in der Tabelle grau markiert.

4.3.1.7 Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren für das PathoProof Mastitis PCR Assay

Da es bei Verwendung des PathoProof Mastitis PCR Assay nach Extraktion mit der enthaltenen Extraktionskomponente zum falsch-positiven Nachweis von Prototheken kam, wurden verschiedene kommerziell erhältliche Extraktions-Kits getestet, um eine alternative Extraktionsmethode für DNA aus der Milch zu finden. Positive *Prototheca*-Signale wurden beim Vergleich der Extraktionseffizienz nicht gewertet. CT-Werte > 37 wurden für die Berechnung des durchschnittlichen CT-Wertes ausnahmsweise gewertet.

In der nachfolgenden Abbildung 13 wurden die durchschnittlichen Abweichungen der CT Werte für die verschiedenen Extraktionsmethoden anhand aller detektierten Keime dargestellt.

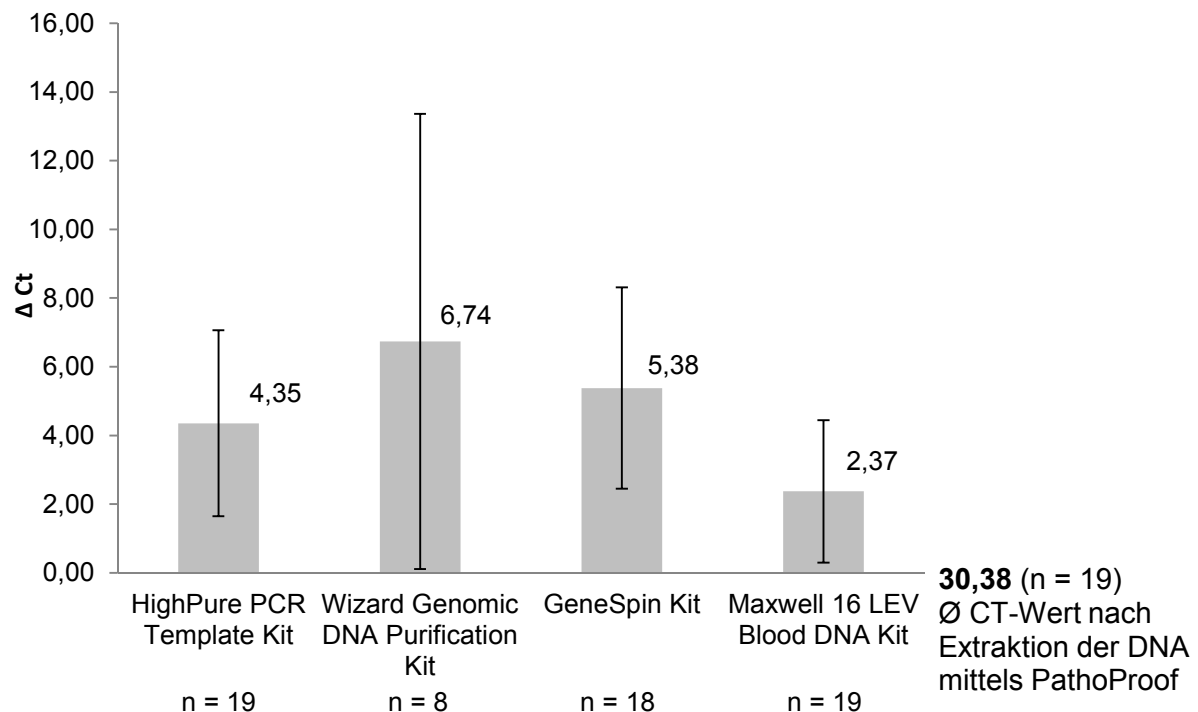


Abbildung 13: Durchschnittliche CT-Abweichungen mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden anhand aller detektierten Keime

Positive *Prototheca*-Signale brachte lediglich die Extraktion mittels PathoProof Mastitis PCR Assay hervor. Da jedoch auch die Hersteller der weiteren Extraktionskits nicht garantieren, dass die Komponenten Prototheken-frei sind, ist dieses Ergebnis nur unter Vorbehalt zu bewerten.

4.3.2 Proben aus der Routinediagnostik

4.3.2.1 Milchproben aus der Routinediagnostik

Mittels des PathoProof Mastitis PCR Assay wurden 132 Milchproben gemessen. In 130 Milchproben wurden mastitisrelevante Keime gefunden. Von diesen 130 Milchproben enthielten 31 Proben jeweils einen Keim. Bei 44 Proben wurden jeweils Signale von 2 Keimen gefunden. In 24 Proben wurden Signale von 3 Keimen und in 31 Proben Signale von 4 oder mehr Keimen detektiert. Dies wurde in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39: Anzahl der Signale, die mittels PathoProof Mastitis PCR Assay in Milchproben aus der Routinediagnostik detektiert wurden

In der Milch detektierte Signale	Anzahl (in Prozent)
Kein Signal	2 (1,5 %)
Ein Signal	31 (23,5 %)
Zwei Signale	44 (33,3 %)
Drei Signale	24 (18,2 %)
Vier oder mehr Signale	31 (23,5 %)

In 108 Proben (81,8 %) von den 132 Milchproben wurden positive *Staphylococcus* sp.-Signale detektiert. *Staphylococcus aureus* wurde in 35 Proben (26,5 %) gefunden. Positive *Escherichia coli*-Signale wurden in 37 Proben gefunden, also bei 28,0 % aller Proben. Acht dieser *Escherichia-coli* positiven Proben waren auch *Enterococcus* sp.-positiv. Enterokokken wurden in 24 Proben (18,2 %) detektiert, Streptokokken wurden in 50 Proben (37,9 %) gefunden: *Streptococcus uberis* fand sich in 41 Proben (31,1 %), *Streptococcus dysgalactiae* in 21 Proben (15,9 %) und *Streptococcus agalactiae* wurde in einer Probe (0,8 %) detektiert. In zwölf Fällen wurden sowohl positive *Streptococcus uberis*-Signale als auch *Streptococcus dysgalactiae*-Signale detektiert. Die Prävalenz für *Trueperella pyogenes* lag bei 9,8 % (13 Proben), für Hefen bei 37,9 % (50 Proben), für *Corynebacterium bovis* bei 32,6 % (43 Proben), für *Klebsiella* sp. bei 6,1 % (acht Proben) und für *Mycoplasma* sp. bei 0,8 % (eine Probe). Die Verteilung der positiven Signale einiger Erreger auf die unterschiedlichen CT-Werte wurde in Abbildung 14 dargestellt.

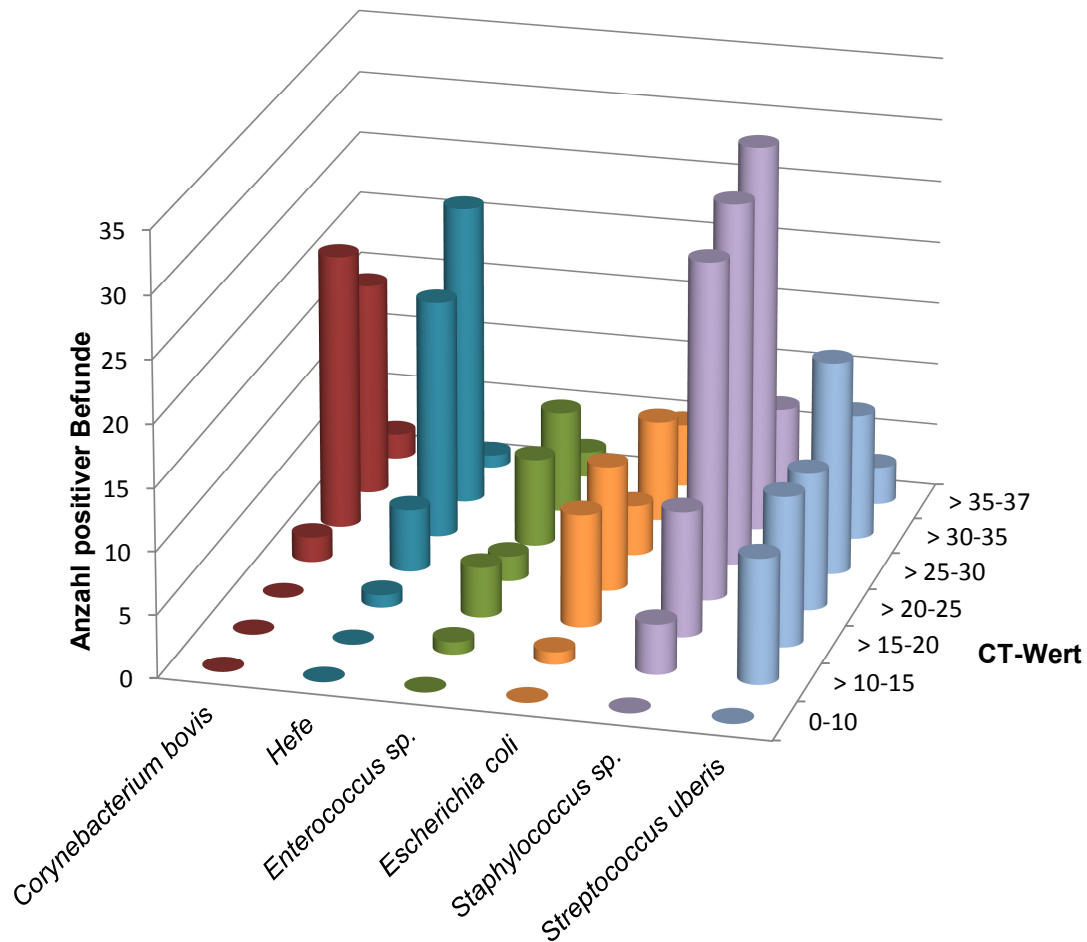


Abbildung 14: Verteilung der verschiedenen positiven Signale aus den Milchproben auf verschiedene CT-Werte

Vergleich der Ergebnisse von Direktextrakten und Mischplatten

Um festzustellen, ob das Ausplattieren den Verlust einzelner Genera nach sich zog oder ob im Gegenteil – etwa durch Kontaminationen – neue Genera hinzukamen, wurden die Ergebnisse der Direktextrakte mit den Ergebnissen der Mischplatten verglichen (Tabelle 40). Bei fünf Proben wurden zwar Keime in der Milchprobe identifiziert, allerdings konnte kein Keimwachstum nach Ausplattieren festgestellt werden. Bei einer Probe wurde Keimwachstum festgestellt und auch ein Keim (*Streptococcus uberis*, CT-Wert 18,04) mittels PathoProof Mastitis PCR Assay detektiert, allerdings fiel die Messung der Milchprobe negativ aus. Bei 23 Proben wurden dieselben Keime in Milchproben und Mischplatten detektiert.

Tabelle 40: Vergleich der Ergebnisse von Direktextrakten und Mischplatten aus der Routinediagnostik

Keim	In Direktextrakten	Auf Mischplatten
<i>blaZ</i> -Gen	55	35
<i>Corynebacterium bovis</i>	43	18
<i>Enterococcus</i> sp.	24	44
<i>Escherichia coli</i>	37	41
Hefe	50	6
<i>Klebsiella</i> sp	8	6
<i>Mycoplasma</i> sp.	1	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	36
Andere Staphylokokken	75	57
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	21	19
<i>Streptococcus uberis</i>	41	41
<i>Trueperella pyogenes</i>	13	5

In 27 Milchproben und 16 Mischplatten wurde jeweils ein zusätzlicher Keim identifiziert. In 21 Direktextrakten wurden im Vergleich zur Mischplatte zwei zusätzliche Keime detektiert und in 33 Direktextrakten wurden im Vergleich zur Mischplatte drei oder mehr zusätzliche Keime detektiert. In 12 Mischplatten wurden im Vergleich zum Direktextrakt zwei zusätzliche Keime detektiert und in 26 Mischplatten im Vergleich zum Direktextrakt drei oder mehr zusätzliche Keime (Abbildung 15).

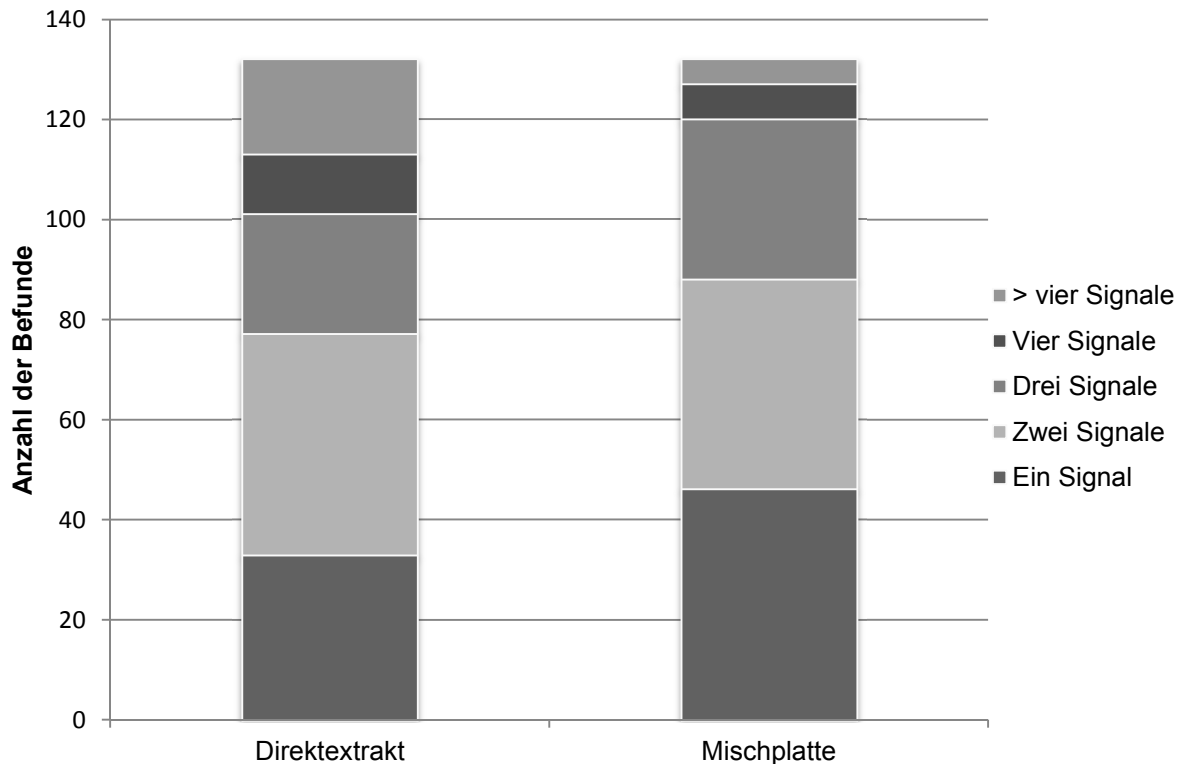


Abbildung 15: Verteilung der positiven Signale von Direktextrakten und Mischplatten aus der Routinediagnostik

4.3.2.2 Vorkommen des *blaZ*-Gens

Das *blaZ*-Gen wurde in 55 (41,7 %) von insgesamt 132 Mastitisproben gefunden. Von 73 Proben, die mittels des PathoProof Mastitis PCR Assay positive *Staphylococcus* sp.-Signale – jedoch keine *Staphylococcus aureus* Signale – enthielten, waren 29 Proben (39,7 %) auch *blaZ*-positiv. 25 Proben (71,4 %) der 35 *Staphylococcus aureus*-positiven PCR-Proben waren ebenfalls *blaZ*-positiv. Eine Probe (1,8 %) war *blaZ*-positiv mit einem CT-Wert von 26,23, enthielt jedoch kein weiteres positives Signal. Um den Zusammenhang zwischen genotypischer und phänotypischer Penicillin-Resistenz zu ermitteln, wurde exemplarisch die Penicillinresistenz von 13 *blaZ*-positiven *Staphylococcus aureus* Isolaten mittels Agardiffusionstest erhoben. Drei (23,1 %) dieser Isolate waren Penicillin-resistent und zehn (76,9 %) waren Penicillin-sensibel. Für zwölf Isolate (92,3 %) wurde eine Übereinstimmung mit der Anwesenheit oder Abwesenheit des *blaZ*-Gens im PathoProof Mastitis PCR Assay gefunden. Ein Isolat (7,7 %) war in der Untersuchung mittels PathoProof Mastitis PCR Assay *blaZ*-positiv, während in der

mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung keine Penicillin-Resistenz festgestellt werden konnte.

4.3.2.3 Berechnung von Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit des PathoProof Mastitis PCR Assay anhand der mikrobiologisch-kulturellen Diagnostik als Goldstandard

Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit wurden ergänzend zu der Berechnung mit DSM-Stämmen anhand der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung als Referenzmethode für das PathoProof Mastitis PCR Assay berechnet. Dies war jedoch nur eingeschränkt möglich, da in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung einige Pathogene in Gruppen zusammengefasst und nicht weiter spezifiziert werden. Die Ergebnisse wurden in der nachfolgenden Tabelle 41 dargestellt.

Tabelle 41: Sensitivität (Se), Spezifität (Sp) und Genauigkeit (Acc) des PathoProof Mastitis PCR Assay (PCR)

(Referenzmethode: mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung, KU; n = 132)

Pathogen	KU pos/ PCR neg	KU pos/ PCR pos	KU neg/ PCR neg	KU neg/ PCR pos	Se [%]	Sp [%]	Acc [%]
<i>Enterococcus</i> sp.	2	1	108	21	33,3	83,7	82,6
<i>Escherichia coli</i>	1	19	95	17	95	93,1	86,4
Hefen	0	1	82	49	100	62,6	62,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	10	97	22	76,9	81,5	81,1
<i>Streptococcus</i> sp	20	37	62	13	64,9	82,6	75
.							
<i>Trueperella pyogenes</i>	0	1	119	12	100	90,8	90,9

Eine niedrige Sensitivität wurde für *Enterococcus* sp. (33,3 %) berechnet, eine mittelmäßige Sensitivität für *Streptococcus* sp. (64,9 %) und *Staphylococcus aureus* (76,9 %) und eine hohe Sensitivität für *Escherichia coli* (95 %), Hefen (100 %) und *Trueperella pyogenes* (100 %).

Die Spezifität lag für Hefen (62,6 %) niedrig, während die Spezifitäten für *Staphylococcus aureus* (81,5 %), *Streptococcus* sp. (82,6 %), *Enterococcus* sp. (83,7 %), *Trueperella pyogenes* (90,8 %) und *Escherichia coli* (93,1 %) höher waren.

Zehn Mastitisproben von insgesamt 132 waren aufgrund fehlenden Wachstums in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung negativ. Für diese zehn Mastitisproben wurden mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay Mastitiskeime detektiert. Dies wurde in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: Mittels PathoProof Mastitis PCR Assay detektierte Keime aus mikrobiologisch-kulturell negativen Proben

Probe	Mittels PathoProof Mastitis PCR Assay detektierte Keime (mit CT-Wert)
MAS 005	<i>Corynebacterium bovis</i> (28,26) <i>Staphylococcus</i> sp. (34,44)
MAS 018	<i>Corynebacterium bovis</i> (35,48)
MAS 053	<i>Staphylococcus</i> sp. (33,82)
MAS 054	<i>Staphylococcus</i> sp. (32,85)
MAS 060	<i>Corynebacterium bovis</i> (30,83) <i>Staphylococcus</i> sp. (33,70)
MAS 066	<i>Staphylococcus</i> sp. (35,14) <i>Streptococcus uberis</i> (32,88)
MAS 073	Hefe (31,17) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (27,02)
MAS 097	<i>Corynebacterium bovis</i> (28,80)
MAS 099	<i>Corynebacterium bovis</i> (26,01) <i>Staphylococcus</i> sp. (32,39)
MAS 129	<i>Enterococcus</i> sp. (30,23) <i>Staphylococcus</i> sp. (29,47)

Von den 132 Mastitisproben war eine Probe in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung positiv, während mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay keine Keime detektiert wurden. Es handelte sich dabei laut mikrobiologisch-kultureller Untersuchung um Streptokokken.

Des Weiteren wurde in einer Probe mittels PathoProof Mastitis PCR Assay lediglich ein positives Signal für das *blaZ*-Gen (CT 26,23) detektiert, während in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung Streptokokken gefunden wurden.

4.4 Vergleich der Ergebnisse von mikrobiologisch-kultureller Untersuchung, PathoProof Mastitis PCR Assay und MALDI-TOF MS-Analytik

In der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung konnte aufgrund von fehlendem Wachstum auf festen Nährmedien für zehn Milchproben (7,6 %) kein Ergebnis gewonnen werden, während das PathoProof Mastitis PCR Assay sowie die MALDI-TOF MS-Analytik jeweils zwei negative Ergebnisse (1,5 %) hervorbrachten. In 71 Proben (53,8 %) mittels mikrobiologisch-kultureller Untersuchung, in 31 Proben (23,5 %) mittels PathoProof Mastitis PCR Assay und in 59 Proben (44,7 %) mittels MALDI-TOF MS-Analytik wurde jeweils ein Keim gefunden. Zwei Keime waren in 36 Proben (27,3 %) mit der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung, während es mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay und der MALDI-TOF MS-Analytik jeweils 44 Proben (33,3 %) waren. Mehr als drei Keime wurden mit der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung in 15 Proben (11,4 %), mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay in 55 Proben (41,7 %) und mit der MALDI-TOF MS-Analytik in 27 Proben (20,4 %) gefunden. Dies wurde anhand der nachfolgenden Abbildung 16 dargestellt.

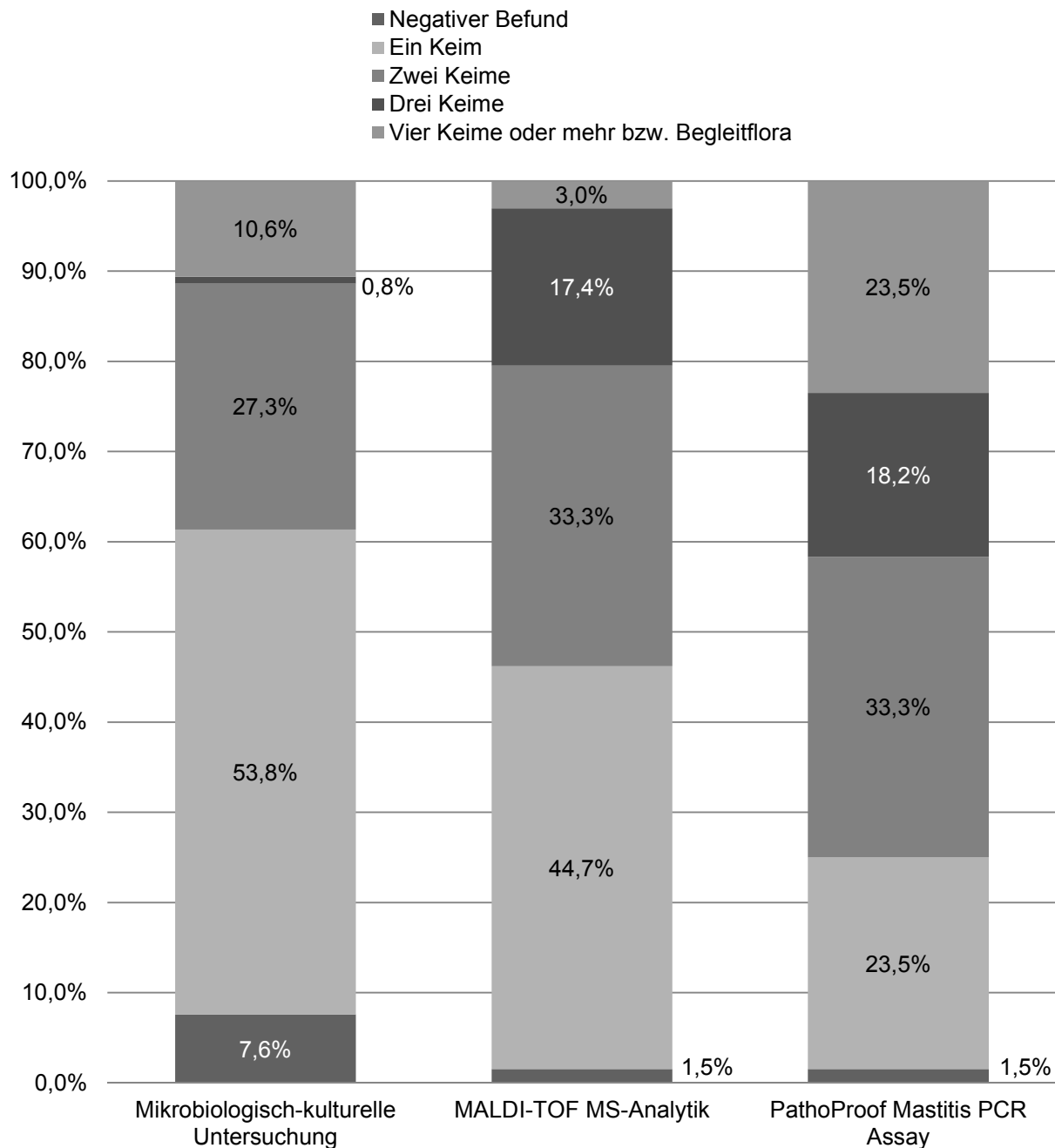


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Einfach- und Mehrfachbefunde mit verschiedenen Detektionsmethoden

Im Vergleich mit der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung, wurden für die MALDI-TOF MS-Analytik 7 Übereinstimmungen (3,07 %) festgestellt. Im Vergleich von MALDI-TOF MS-Analytik und PathoProof Mastitis PCR Assay gab es 102 Übereinstimmungen (44,74 %). Beim Vergleich von PathoProof Mastitis PCR Assay und mikrobiologisch-kultureller Untersuchung wurden 11 Übereinstimmungen (4,82 %) festgestellt.

Für alle drei Methoden gab es 73 Übereinstimmungen (32,02 %) mit 40 Zusatzbefunden, 27 davon mittels PathoProof Mastitis PCR Assay und 13 mittels mikrobiologisch-kultureller Untersuchung. Die Übereinstimmungen der Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden wurden in der nachfolgenden Abbildung 17 dargestellt.

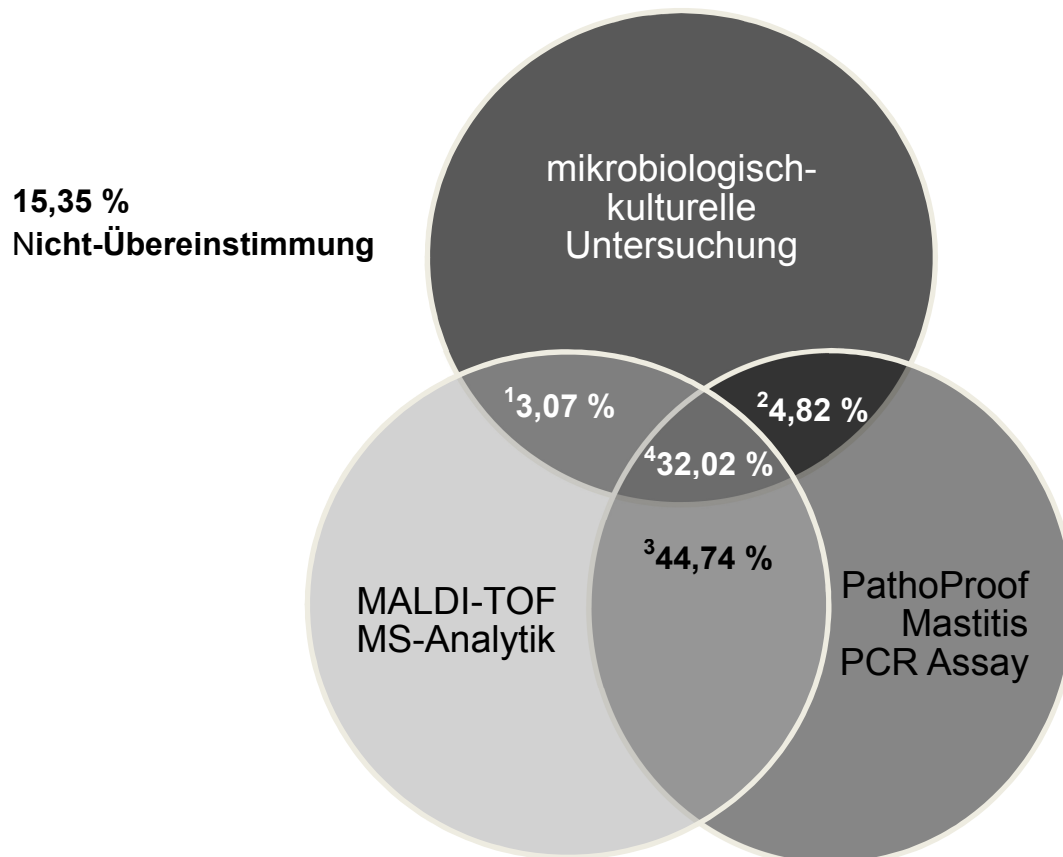


Abbildung 17: Übereinstimmung der Ergebnisse verschiedener Analysemethoden

1 Zusatzbefunde in der mikrobiologisch kulturellen Untersuchung: n = 3

2 Zusatzbefunde in der mikrobiologisch kulturellen Untersuchung: n = 3, im PathoProof Mastitis PCR Assay: n = 3

3 Zusatzbefunde im PathoProof Mastitis PCR Assay: n = 33

4 Zusatzbefunde in der mikrobiologisch kulturellen Untersuchung: n = 13, im PathoProof Mastitis PCR Assay:
n = 27

4.4.1 Auffälligkeiten beim Vergleich von mikrobiologisch-kultureller Untersuchung und MALDI-TOF MS Analytik

Acht Keime, die mit der MALDI-TOF MS Analytik als *Escherichia coli* identifiziert wurden, waren in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung als coliforme Keime eingeordnet, aber nicht weiter spezifiziert worden. Drei Keime, die mittels MALDI-TOF MS als Enterokokken erkannt wurden, wurden in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung den vergrünenden Streptokokken zugeordnet. Des Weiteren wurden mit der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung 23 Mikrokokken identifiziert, die in der MALDI-TOF MS-Analytik zum einen als koagulasenegative Staphylokokken (n = 14) und zum anderen als *Staphylococcus aureus* (n = 9) ausgegeben wurden.

4.4.2 Auffälligkeiten beim Vergleich von MALDI-TOF MS Analytik und PathoProof Mastitis PCR Assay

Fünf Keime, die mittels MALDI-TOF MS-Analytik als *Lysinibacillus fusiformis* identifiziert wurden und drei Keime, die als *Lysinibacillus* sp. identifiziert wurden, wurden mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay als Staphylokokken (CT-Werte 27,3 bis 30,9) identifiziert. Sechs Keime, die mit der MALDI-TOF MS-Analytik als koagulase-negative Staphylokokken erkannt wurden, riefen im PathoProof Mastitis PCR Assay ein positives *Staphylococcus aureus*-Signal (CT-Werte 29,8 bis 34,8) hervor. Für sechs Proben, die mittels MALDI-TOF MS als *Escherichia coli* identifiziert wurden, wurden im PathoProof Mastitis PCR Assay positive Signale von *Escherichia coli* (CT-Werte 12,4 bis 19,2) und *Enterococcus* sp. (CT-Werte 20,3 bis 35,9) detektiert.

4.5 Ergebnisse der 16S rRNA Gen-Analyse

Mittels der 16S rRNA Gen-Analyse wurden 57 Keime untersucht, die mittels MALDI-TOF MS-Analytik nicht auf Speziesebene erkannt wurden oder auffällige Unterschiede zwischen den Ergebnissen von MALDI-TOF MS-Analytik, PathoProof Mastitis PCR Assay und mikrobiologisch-kultureller Untersuchung zeigten. Davon erreichten 34 Keime mittels MALDI-TOF MS-Analytik einen Score > 2, 12 Keime einen Score von 1,7 – 2,0 und 11 Keime einen Score von < 1,7. Bei 44 dieser Keime

wurden mittels PathoProof Mastitis PCR Assay Zusatzbefunde erstellt, während bei 13 Keimen das PCR-Ergebnis eindeutig war. 31 Keime (54,4 %) konnten mittels 16S rRNA-Gen-Sequenzierung eindeutig auf Speziesebene identifiziert werden; davon zeigten 15 Keime (26,3 %) 100 % Sequenzübereinstimmung und 16 Keime (28,1 %) 98 - 99 % Sequenzübereinstimmung. 20 Keime (35,1 %) wurden auf Gattungsebene erkannt und für zwei Keime (3,5 %) konnte kein Ergebnis festgestellt werden. Bei vier Keimen wurde ein uneindeutiges Ergebnis erhoben (> 98 % Sequenzhomologie mit mehr als einer Gattung).

Fünf Keime der Gattung *Bacillus* sowie vier Keime der Gattung *Lysinibacillus* konnten nur auf Gattungsebene identifiziert werden, eine Speziesidentifikation war nicht möglich. Weitere Keime, die lediglich auf Gattungsebene identifiziert werden konnten, waren *Citrobacter* (n = 2), *Acinetobacter* (n = 2), *Enterobacter* (n = 2) und *Vagococcus* (n = 1). Vier Isolate, die mittels 16S rRNA-PCR untersucht wurden, konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da eine Differenzierung zwischen *Escherichia coli* und *Shigella* sp. nicht möglich war.

Ein Vergleich der Ergebnisse von Sequenzierung, mikrobiologisch-kultureller Untersuchung, MALDI-TOF MS Analytik und PathoProof Mastitis PCR Assay wurde detailliert in Tabelle 46, Anhang, dargestellt. Einen Überblick gibt Abbildung 18.

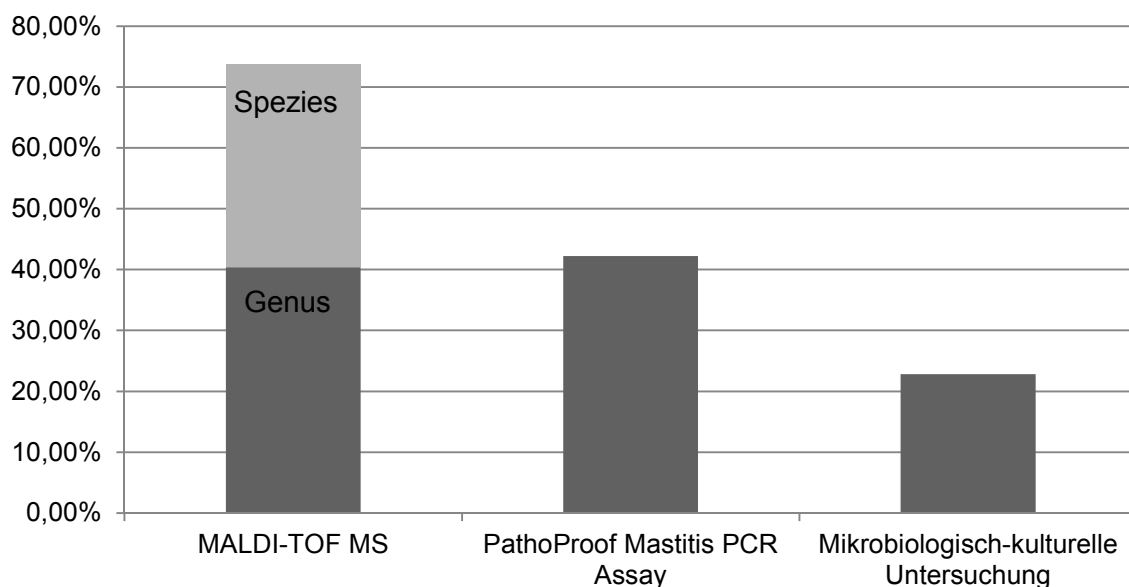


Abbildung 18: Übereinstimmung der verschiedenen Methoden mit den Ergebnissen der 16S rRNA-Gen-Analyse

Beim Vergleich der Ergebnisse von Sequenzierung und MALDI-TOF MS-Analytik wurde für 42 Proben (73,7 %) eine Übereinstimmung festgestellt, davon 23 (40,4 %) auf Speziesebene und 19 (33,3 %) auf Genusebene. Keinerlei Übereinstimmung zeigte sich bei zwei Proben (3,5 %). Für elf Proben (19,3 %) wurde kein Ergebnis mittels MALDI-TOF MS-Analytik generiert und für zwei Proben (3,5 %) konnte mittels Sequenzierung kein Ergebnis gewonnen werden.

Für die Auswertung der Übereinstimmung von Sequenzierung und PathoProof Mastitis PCR Assay wurden die zahlreichen Zusatzbefunde, die mittels PathoProof Mastitis PCR Assay ermittelt wurden, nicht gewertet. Im Vergleich der Ergebnisse von Sequenzierung und PathoProof Mastitis PCR Assay wurde ohne diese Zusatzbefunde eine Übereinstimmung von 24 Proben (42,1 %) festgestellt, während für eine Probe (1,8 %) mittels PathoProof Mastitis PCR Assay und für 2 Proben (3,5 %) mittels Sequenzierung kein Ergebnis generiert wurde. Die übrigen 30 (52,6 %) der sequenzierten Proben waren nicht im Identifikationsspektrum des PathoProof Mastitis PCR Assay enthalten; 6 dieser Proben wurden im PathoProof Mastitis PCR Assay korrekt als negativ für Erreger aus dem Identifikationsspektrum ausgegeben, 24 (42,1 %) generierten aber ein falsch positives Ergebnis.

Beim Vergleich der Ergebnisse von Sequenzierung und mikrobiologisch-kultureller Untersuchung zeigte sich eine Übereinstimmung bei 13 Proben, also 22,8 %. Keinerlei Übereinstimmung wurde bei 32 Proben (56,1 %) gefunden. Für zehn Proben (17,5 %) wurde in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung aufgrund von Begleitflora kein Ergebnis generiert und für zwei Proben (3,5 %) wurde mit der Sequenzierung kein Ergebnis ermittelt.

5. Diskussion

Auch heute noch stellt Mastitis eine Krankheit dar, die einen großen ökonomischen Einfluss ausübt und tiefgreifende Folgen für den Tierschutz und das Veterinär-Gesundheitswesen hat (Contreras & Rodriguez, 2011). Klinische Mastitisfälle stellen nur die Spitze des Eisberges dar, da subklinische Fälle aufgrund mangelnder klinischer Symptome oftmals gar nicht erst erkannt werden (Leigh, 1999) und daher häufig unterschätzt werden (O'Grady & Doherty, 2009). Es wird davon ausgegangen, dass auf einen klinischen Mastitisfall 15 - 40 subklinische Mastitisfälle kommen (Crist et al., 1998). Deshalb ist es wichtig, die Diagnosemöglichkeiten für Mastitis weiter zu entwickeln und zu verbessern. Mit einer optimalen Mastitisiagnostik können betroffene Tiere schnell und gezielt behandelt werden und der Einsatz von Antibiotika kann auf ein notwendiges Minimum reduziert werden. In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Ansätze für die Mastitisiagnostik getestet und miteinander verglichen.

5.1 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung

Mit Mastitis werden meist Bakterien der Spezies *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae* und *Corynebacteriaceae* assoziiert (Barlow, 2011). Staphylokokken, gefolgt von Streptokokken und *Escherichia coli*, sind am häufigsten für Mastitis verantwortlich; weniger häufig sind andere grampositive Bakterien, wie *Actinomyces* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Clostridium* sp. oder aber gramnegative Bakterien, wie *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Pasteurella* sp., *Mannheimia haemolytica* und *Mycoplasma* sp. die Ursache für Mastitis (Contreras & Rodriguez, 2011). Selten dagegen sind Mastitisfälle durch Schimmelpilze oder Hefen (Contreras & Rodriguez, 2011). Im Rahmen dieser Doktorarbeit machten die Streptokokken (35,6 %) den überwiegenden Teil der kulturell identifizierten Mastitiserreger aus, gefolgt von coliformen Keimen (15,6 %), Mikrokokken (15 %), *Escherichia coli* (12,5 %) und *Staphylococcus aureus* (8,1 %).

Es wurden nur wenige Keime der Gattung *Bacillus* sp. (3,1 %) und *Enterococcus* sp. (1,9 %) identifiziert. *Trueperella pyogenes* (0,6 %), Hefen (0,6 %) und aerobe Sporenbildner (0,6 %) machten den geringsten Teil der identifizierten Mastitiserreger aus. *Corynebacterium bovis* oder KNS wurden mittels mikrobiologisch-kultureller Untersuchung nicht identifiziert. In einer Prävalenzstudie in Norddeutschland, die zwischen 2001 und 2002 auf 80 Milchviehbetrieben mit jeweils 32 klinisch unauffälligen Kühen, durchgeführt wurde, wurden vorwiegend KNS (9,1 %) und *Corynebacterium bovis* (7,3 %) isoliert (Tenhagen et al., 2006). Zu einem vergleichbaren Ergebnis von 5,3 % KNS und 18,8 % coryneformen Bakterien kommt eine Studie, die zwischen 2010 und 2011 auf vier Milchviehbetrieben in Norddeutschland mit jeweils 40 klinisch unauffälligen Kühen, durchgeführt wurde (Spittel & Hoedemaker, 2012). Vorherrschendes kontagiöses Pathogen in Deutschland war in den Studien von Tenhagen et al. (2006) und Spittel et al. (2012) *Staphylococcus aureus* mit 5,7 % bzw 5 %. In dieser Studie wurde *Staphylococcus aureus* in 8,1 % der Fälle isoliert.

Weitere kontagiöse Mastitiserreger wie Mykoplasmen, Corynebakterien oder *Streptococcus agalactiae* konnten in dieser Studie mittels kultureller Verfahren nicht isoliert werden. Spittel et al. (2012) konnten *Streptococcus agalactiae* ebenfalls nicht isolieren, während Tenhagen et al. (2006) in ihrer Studie aus 0,7 % der Fälle *Streptococcus agalactiae* isolierten und Pitkälä in ihrer Studie aus 0,02 % der Fälle. Die umweltassoziierten Mastitiserreger machten in dieser Studie mit 85,6 % den größten Teil der identifizierten Pathogene aus. Ein Grund dafür ist, dass die energische Bekämpfung kuhassoziierter Mastitiserreger zu einer Begünstigung umweltassoziierter Erreger führt und umgekehrt (Volling & Krömker, 2008). Die Prävalenz der klassischen kontagiösen Bakterien *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* hat sich verringert (Pitkälä et al., 2004). Im Fall von *Streptococcus agalactiae* ist dies durch den sachgemäßen Einsatz von Penicillin-basierten Antibiotika bedingt (Hillerton & Berry, 2005).

Eine flächendeckende Erhebung in Finnland mit 3282 Kühen von 216 zufällig ausgewählten Milchviehbetrieben aus dem Jahr 2001 brachte hervor, dass KNS (16,6 %) und coryneforme Bakterien (11,5 %) in Milchproben dominieren und *Staphylococcus aureus* (3,4 %) als kontagiöses Pathogen zwar vorherrschend ist,

aber weniger häufig als die sog. umweltassoziierten Pathogene zu finden ist (Pitkälä et al., 2004).

In der Studie von Pitkälä et al. (2004) wurde für 3,7 % aller positiven Mastitisproben das Wachstum von zwei Bakterienspezies festgestellt. Dieser Anteil an Mischinfektionen mit zwei Keimen war in dieser Arbeit wesentlich höher und betraf 29,5 % aller positiven Mastitisproben. In der Studie von Pitkälä et al. (2004) waren koagulase-negative Staphylokokken in 71,6 % der Mischinfektionen involviert und *Staphylococcus aureus* in 22,6 % der Mischinfektionen. In der vorliegenden Arbeit waren vor allem Streptokokken (86,1 %) und Mikrokokken (41,6 %) an Mischinfektionen beteiligt. Bei Pitkälä et al. (2004) war die Kombination von KNS und *Corynebacterium bovis* (36,8 %) am häufigsten, gefolgt von KNS und *Staphylococcus aureus* (9,7 %), KNS und *Enterococcus* sp. (9,7 %) und KNS mit *Aerococcus viridans* (9,0 %). (Pitkälä et al., 2004). In dieser Arbeit waren die Kombinationen Mikrokokken und Streptokokken (19,4 %) sowie Mikrokokken und vergrünende Streptokokken (19,4 %) am häufigsten, gefolgt von *Staphylococcus aureus* und Streptokokken (13,9 %), *Escherichia coli* und Streptokokken (11,1 %) und coliformen Keimen mit vergrünenden Streptokokken (11,1 %). Während bei Pitkälä et al. (2004) vor allem die koagulase-negativen Staphylokokken dominierten, waren es in dieser Arbeit die Streptokokken.

Auf Viertelebene zeigen laut Lam et al. (2009) 10 – 40 % der Milchproben aus klinischen Mastitisfällen kein Keimwachstum auf festen Nährmedien (Lam et al., 2009). Nach Angaben von Taponen et al. (2009b) sind es 20 – 30 % der Milchproben, die kein Keimwachstum auf festen Nährmedien zeigen (Taponen et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnten 7,6 % der Milchproben nicht auf festen Nährmedien angezogen werden.

Die bakteriologische Kultivierung wird routinemäßig in der Mastitisiagnostik angewandt (Reksen et al., 2006) und gilt seit langer Zeit als Goldstandard (Riffon et al., 2001). Da eine Probe als kontaminiert gilt, wenn Kolonien von drei oder mehr Spezies auf dem Ausstrich sichtbar werden (Koskinen et al., 2010), wurden in der Vergangenheit Mastitisproben mit mehr als zwei Spezies in der Regel von der mikrobiologisch-kulturellen Identifizierung ausgeschlossen und als „ohne Befund“ deklariert.

5.2 MALDI-TOF MS

Die MALDI-TOF MS-Analytik gilt mittlerweile als vielversprechende Alternative zu konventionellen mikrobiologischen Identifikationsmethoden. Experimente von van Veen et al. (2010) haben deutlich gemacht, dass Kulturmedium, Inkubationstemperatur, Inkubationsbedingungen oder die Dauer der Inkubation die Genauigkeit der MALDI-TOF MS Identifizierungen nicht beeinflussen (van Veen et al., 2010). Dagegen gehen Parisi et al. (2008) davon aus, dass Parameter wie Inkubationsdauer, Kulturmedium, pH-Wert und Inkubationstemperatur die Proteinform und damit auch die Spektren beeinflussen können (Parisi et al., 2008). Da MALDI-TOF MS eine relativ sensitive Technik ist, reicht bereits eine kleine Menge an mikrobieller Biomasse für die Analyse aus (10^4 bis 10^6 cfu) (Wieser et al., 2012). Die Verwendung von zu viel Probenmaterial resultiert in einer reduzierten Qualität der Ergebnisse (Bizzini et al., 2010a). Eine Herausforderung ist die direkte Analyse von Probenmaterial ohne vorherigen Kultivierungsschritt, da das Probenmaterial oftmals reich an Proteinen und Normalflora ist, welche das Massenspektrum des Pathogens überlagern (Wieser et al., 2012).

Ein Großteil der Mikroorganismen aus der Routinediagnostik kann ohne Probleme identifiziert werden (Cherkaoui et al., 2010), entsprechend wurden in dieser Arbeit 89,9 % aller gemessenen Subkulturen mit einem Score-Value $> 2,0$ erkannt, 5,3 % aller gemessenen Subkulturen konnten mit einem Score-Value von 1,7 bis 2,0 identifiziert werden. Insgesamt konnten also 95,2 % aller Subkulturen mittels MALDI-TOF MS auf Spezies- oder Genusebene identifiziert werden. Dies stimmt überein mit einer Studie von Seng et al. (2009), die 95,4 % aller Isolate auf Spezies- und Genusebene identifizierten (Seng et al., 2009). Eine Identifizierung war bei 4,4 % aller gemessenen Subkulturen nicht möglich. Für 0,9 % dieser Keime waren keine Spektren in der Datenbank hinterlegt. Mittels 16S rRNA-PCR wurden diese Isolate als *Kurthia gibsonii* identifiziert und in die Datenbank eingespeist. Im Anschluss war eine Identifizierung dieser Isolate auf Genusebene mit einem Score-Value $> 1,7 < 2,0$ ohne Probleme möglich.

Ein übereinstimmendes Ergebnis von mikrobiologisch-kultureller Untersuchung und MALDI-TOF MS Analytik wurde in 80, d.h. 35,09 % der Fälle erhalten.

MALDI-TOF MS kann Mikroorganismen, die aufgrund ihrer phenotypischen Eigenschaften einer Gruppe (z.B. KNS) zugeordnet werden, diese nicht als solche identifizieren (Welker & Moore, 2011). Da Erreger mit ähnlichen klinischen Infektionsverläufen oder mikrobiologischen Eigenschaften historisch oft zusammengefasst werden, werden einige Keime in der kulturellen Diagnostik nicht weiter spezifiziert, sondern Gruppen zugeordnet. Da *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* vormals als *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus faecium* geführt wurden (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984), lässt sich auch erklären, dass die mit MALDI-TOF MS identifizierten Enterokokken in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung den Streptokokken zugeordnet wurden. Früher wurden sowohl die Mikrokokken als auch die Staphylokokken der Familie der *Micrococcaceae* zugeordnet; heute werden nur noch die Mikrokokken zu der Familie der *Micrococcaceae* gezählt und die Staphylokokken zu der Familie der *Staphylococcaceae* (Krömker & Bruckmaier, 2007).

Aufgrund der Tatsache, dass die Datenbanken erst noch weiter ausgebaut und verbessert werden müssen, um verlässliche Resultate zu erhalten, sollten Ergebnisse der MALDI-TOF MS-Analytik mit Vorsicht behandelt werden (Croxatto et al., 2012). Von den DSM-Stämmen, die mittels MALDI-TOF MS gemessen wurden, konnte jedoch lediglich der Keim *Mycoplasma bovis* nicht identifiziert werden. Aus der Routinediagnostik konnten 4,8 % aller gemessenen Subkulturen nicht mittels MALDI-TOF MS-Analytik identifiziert werden, davon 0,9 % Mastitiserreger. Es sind also nahezu alle wichtigen Mastitiserreger in den Datenbanken hinterlegt und können somit identifiziert werden.

Croxatto et al. (2012) haben eine Liste der Probleme, die bei der Identifizierung von Routineproben durch MALDI-TOF MS auftreten, zusammengestellt. Das erste Problem, das der Autor nannte, war, dass *Shigella* sp. mittels MALDI-TOF MS als *Escherichia coli* identifiziert werden. Da Shigellen nicht als mastitisverursachende Bakterien bekannt sind, bereitete diese Tatsache in der vorliegenden Arbeit keine Probleme. Bei jedem *Escherichia coli*-Befund wurde jedoch ein Hinweis auf die bestehende Problematik eingeblendet.

Ein weiteres Problem stellen nach Croxatto et al. (2012) die Keime *Propionibacterium acnes* und *Bacillus cereus* dar, da zu wenige Spektren in der Datenbank hinterlegt sind, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen. *Bacillus* sp. können im Einzelfall Mastitis verursachen und sind daher für die Mastitisiagnostik von gewisser Bedeutung. In dieser Arbeit wurden einige *Bacillus* sp. mittels MALDI-TOF MS identifiziert, der Großteil mit einem Score-Value > 2,0. Grund dafür ist vermutlich die Verwendung einer eigenen internen Datenbank, in der ausreichend *Bacillus* sp. hinterlegt sind. Jedoch konnten diese Befunde nicht auf Speziesebene mittels 16S rRNA Sequenzierung verifiziert werden, da sich Bacillen mit dieser Methode nur schwer voneinander differenzieren lassen und ihre Sequenzen teilweise sogar identisch sind (Ash et al., 1991; Fox, G.E. et al., 1992). Ebenfalls ein Problem sind Hefen, da sie erst nach einem Extraktionsschritt korrekt identifiziert werden können. In der vorliegenden Arbeit enthielt lediglich eine Probe Hefen. Die Messung mittels MALDI-TOF MS erfolgte ohne vorherigen Extraktionsschritt und erzielte ein ScoreValue > 2,0. Auch *Klebsiella pneumoniae*-Keime sind nach Croxatto et al. (2012) problematisch, da sie eine Kapsel besitzen, die eine effiziente Lyse verhindert und so eine schlechte Qualität der Spektren hervorruft. Mittels MALDI-TOF MS wurden in dieser Arbeit fünf *Klebsiella* sp. identifiziert, darunter zwei *Klebsiella pneumoniae*-Stämme. Diese wurden ohne vorherigen Extraktionsschritt und mit einem Score-Value > 2,0 gemessen. Eine schlechte Qualität der Spektren kann somit nicht bestätigt werden.

Weitere Einschränkungen sind die Unmöglichkeit der Analyse von nicht kultivierbaren Mikroorganismen, die Analyse von Mischkulturen und die Differenzierung von nah verwandten Taxa (Welker & Moore, 2011). Eine wesentliche derzeitige Begrenzung des MALDI-TOF MS ist zudem die Unfähigkeit, Pathogene direkt aus Patientenmaterial zu detektieren, mit der Ausnahme von Urin oder Blutkulturen (Bizzini & Greub, 2010). Es werden zahlreiche Versuche unternommen, um Patientenmaterial aus anderen Quellen, wie Cerebrospinalflüssigkeit oder Blut zu analysieren (Wieser et al., 2012). Mit Milch als Probenmaterial wurden bereits einige Versuchsreihen unternommen. Nicolaou et al. (2012) stellten in ihrer Studie fest, dass MALDI-TOF MS eine sensitive Technik im Hinblick auf die Entdeckung von mikrobiellem Verderb in Milch und Fleisch ist.

Allerdings konnte kein einzelner Peak genutzt werden, den bakteriellen Verderb genau zu bewerten (Nicolaou et al., 2012).

In einer weiteren Studie von Nicolaou et al. (2011) wurden MALDI Spektren genutzt, um die Proteinkomponenten verschiedener Milcharten zu bestimmen und zu quantifizieren. Dazu wurden die verschiedenen Peaks identifiziert und spezifischen Proteinen zugeordnet, gestützt auf bereits veröffentlichte Proteinmolekularmasse-Daten (Nicolaou et al., 2011).

Die Identifizierung von drei ausgewählten Bakterienarten aus Milch ohne vorherigen Kultivierungsschritt gelang Barreiro et al. (2012) mit experimentell kontaminierter pasteurisierter Vollmilch. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Identifikation von *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus* aus Vollmilch ohne Kultivierung und Isolation der Bakterien möglich ist, wenn die Konzentration der Bakterien in der Milch bei mindestens 10^7 cfu/ml liegt (Barreiro et al., 2012). Die Autoren fanden heraus, dass für den Nachweis von *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus* eine Konzentration von 10^6 cfu/ml in der Milch und von *Escherichia coli* eine Konzentration von 10^7 cfu/ml in der Milch nötig war.

Dieser Versuchsaufbau wurde im Rahmen der Doktorarbeit erfolgreich wiederholt. Mit einem Score-Value $> 2,0$ konnte *Escherichia coli* in fettarmer H-Milch in einer Konzentration von 10^9 bis 10^5 cfu/ml nachgewiesen werden, *Enterococcus faecalis* in einer Konzentration von 10^9 cfu/ml und *Staphylococcus aureus* in einer Konzentration von 10^8 bis 10^2 cfu/ml. Eine Verdünnungsreihe von *Escherichia coli* wurde mit unbehandelter Rohmilch einer eutergesunden Kuh wiederholt und der Nachweis gelang für die Konzentrationsstufen 10^9 bis 10^7 cfu/ml. Es war jedoch nicht möglich, Mastitiseime ohne vorherigen Kultivierungsschritt direkt aus der Mastitisprobe zu identifizieren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Milch von Kühen, die an Mastitis erkrankt sind, viele Entzündungszellen enthält (Kirst, 2008), die die Analyse mittels MALDI-TOF MS stören. Ursächlich für das Misslingen der direkten Untersuchung kann teils auch die Tatsache sein, dass sich in einigen Milchproben mehr als ein Mikroorganismus befand: Aus 7 der 30 direkt untersuchten Milchproben wurden mindestens zwei (bis zu fünf) Mikroorganismen kultiviert.

Nach den Erfahrungswerten von Bizzini et al. (2010a) werden für bakterielle Mischkulturen entweder keine zuverlässigen Ergebnisse (Score-Value < 1.7) gewonnen oder es wird nur eines der Pathogene, die in der Probe präsent sind, detektiert. Gegenwärtig werden weitere Anwendungsmöglichkeiten für MALDI-TOF MS entwickelt. Von großem Interesse ist dabei die Möglichkeit, antimikrobielle Resistenzmechanismen zu detektieren (Wieser et al., 2012). Es wird für wahrscheinlich gehalten, dass durch weitere Datenbankverbesserungen von MALDI-TOF MS die schnelle Identifizierung von Antibiotikaresistenzen möglich sein wird, abhängig von der Produktion spezifischer Proteine oder Peptide (Steensels et al., 2011). Ein vielversprechender Ansatz für die Identifikation von *blaZ*-exprimierenden Stämmen wurde laut Wieser et al. (2012) bereits mit der Entdeckung von Spaltprodukten der jeweiligen Verbindungen gemacht. Nach Angaben der Autoren werden diese Produkte bei der Hydrolyse von β -Laktam-Ringen durch die bakteriellen Enzyme gewonnen; im Fall von Ampicillin, einem β -Lactam-Antibiotikum, wird das Molekül nach Zugabe von Wasser decarboxyliert. Diese chemischen Modifikationen verändern die Masse der antibiotischen Verbindung, welche dann mit dem Massenspektrometer detektiert werden können, womit die Anwesenheit des *blaZ*-Gens belegt werden kann (Wieser et al., 2012).

Die MALDI-TOF MS-basierte Identifizierung ist schneller und günstiger als die PCR-basierte Identifizierung (Murugaiyan et al., 2012). Sie ist geeignet für eine hohe Durchlaufleistung und schnelle mikrobielle Identifizierung mit niedrigen Kosten und stellt somit eine Alternative für konventionelle biochemische und molekulare Labordiagnostik dar (Croxatto et al., 2012). Die Kosten für MALDI-TOF MS Instrumente sind vergleichbar mit den Kosten für andere moderne Laborgerätschaften wie automatisierte Kultivierung und Sequenziergeräte (Cherkaoui et al., 2010). Des Weiteren sind die Kosten erheblich geringer als die der konventionellen Identifikationsmethoden (Cherkaoui et al., 2010; Steensels et al., 2011). Ein klassisches MALDI-TOF MS System für die Routinediagnostik kostet zwischen 180.000 und 200.000 US \$ und enthält die Analyseapparatur, Computer, relevante Software und integrierte Datenbanken (Wieser et al., 2012). Die Kosten für Reagenzien liegen laut Dhiman et al. (2011) bei 0.50 \$ und die durchschnittliche Arbeitszeit bei 5.1 Minuten pro Isolat (Dhiman et al., 2011).

Auf ein ähnliches Ergebnis kommen Cherkaoui et al. (2010) mit Reagenzienkosten von weniger als 0.50 \$ und einer Arbeitszeit von weniger als fünf Minuten pro Isolat (Cherkaoui et al., 2010).

Seng et al. (2009) berechneten Kosten von 1,43 € und eine durchschnittliche Arbeitszeit von 6.0 – 8.5 Minuten pro Isolat (Seng et al., 2009). Nach Tan et al. (2012) lagen die Kosten für die Reagenzien in einer Doppelbestimmung bei nicht-extrahierten Isolaten bei 0.35 \$ und für Ameisensäure-extrahierte Isolate bei 0.79 \$ (Tan et al., 2012).

Croxatto et al. (2012) kommen zu dem Ergebnis, dass MALDI-TOF eine ansprechende neue Technologie für die mikrobielle Identifizierung ist, die effizient, schnell, günstig und benutzerfreundlich arbeitet. Nach Bizzini et al. (2010a) hat MALDI-TOF MS das Potenzial, konventionelle Identifikationsmethoden für die Mehrheit der Routineisolate zu ersetzen, da die Technik selbst schnell, verlässlich und einfach zu handhaben ist (Bizzini et al., 2010a).

Die meisten Autoren kommen zu dem Schluss, dass die MALDI-TOF MS-Analytik das Potenzial hat, konventionelle Identifikationsmethoden zu ersetzen, aber sie sind sich auch einig, dass es noch einiger Forschung bedarf, um verlässliche Ergebnisse mittels MALDI-TOF MS zu erhalten (Bizzini et al., 2010a; Cherkaoui et al., 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass mittels MALDI-TOF MS-Analytik viele Keime bereits auf Speziesebene identifiziert werden können; dennoch konnte mit Hilfe der 16S rRNA-Gen-Amplifizierung ein *Staphylococcus hyicus* mit Score-Value > 2,0 als *Staphylococcus agnetis* identifiziert werden. Weiterhin konnten vermeintlich ausreichend in der Datenbank hinterlegte Keime, wie *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus simulans* und *Streptococcus pluranimalium*, in einigen Fällen nicht mittels MALDI-TOF MS-Analytik identifiziert werden.

5.3 PathoProof Mastitis PCR Assay

Die Prävalenzen der Mastitispathogene, die mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay bestimmt wurden, waren allgemein höher als die Prävalenzen aus der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung, mit Ausnahme der Streptokokken. Als Beispiele sind zu nennen: 26,5 % gegenüber 9,8 % für *Staphylococcus aureus*,

28 % gegenüber 15,2 % für *Escherichia coli*, 18,2 % gegenüber 2,3 % bei Enterokokken, 9,8 % gegenüber 0,8 % für *Trueperella pyogenes* oder aber 37,9 % gegenüber 0,8 % bei den Hefen.

In dieser Studie waren 129 Milchproben mittels PathoProof Mastitis PCR Assay positiv: in 29,5 % wurde eine Spezies detektiert, in 31,8 % wurden zwei Spezies gefunden und in 38 % wurden drei oder mehr Spezies gefunden. Diese Befunde wurden im Vergleich mit anderen Studien in der nachfolgenden Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: Prävalenz PCR-positiver Milchproben und Verteilung der Ein- und Mehrfachbefunde in verschiedenen Studien zum PathoProof Mastitis PCR Assay

Befund	Studie			
	Eigene Untersuchung (2012)	Spittel et al. (2012)	Koskinen et al. (2010)	Keane et al. (2013)
Anzahl PCR-positiver Milchproben/ Anzahl untersuchter Milchproben	129/133 (97,0 %)	481/681 (70,6 %)	770/958 (80,4 %)	130/141 (92,9 %)
Eine Spezies	29,5 %	56,3 %	48,7 %	68,5 %
Zwei Spezies	31,8 %	34,3 %	32,7 %	29,2 %
Drei oder mehr Spezies	38,0 %	9,3 %	18,6 %	2,3 %

Im Vergleich dazu waren in der vorliegenden Arbeit mittels der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung 109 Milchproben positiv: in 65,1 % der Fälle wurde eine Spezies gefunden, in 33 % der Fälle wurden zwei Spezies detektiert und in 13,8 % der Fälle waren es drei oder mehr Spezies. Die korrespondierenden mikrobiologisch-kulturellen Befunde zum Probenmaterial der genannten Studien zum PathoProof Mastitis PCR Assay wurden vergleichend in der nachfolgenden Tabelle 44 dargestellt.

Tabelle 44: Ergebnisse der mikrobiologisch-kulturellen Diagnostik in verschiedenen Studien (vgl. Tabelle 43) zum PathoProof Mastitis PCR Assay

Befund	Studie			
	Eigene Untersuchung (2012)	Spittel et al. (2012)	Koskinen et al. (2010)	Keane et al. (2013)
Anzahl positiver Kulturen aus Milchproben/ Anzahl untersuchter Milchproben	109/133 (82,0 %)	219/681 (32,2 %)	660/958 (68,9 %)	98/141 (63,1 %)
Eine Spezies	65,1 %	94,5 %	80,6 %	95,9 %
Zwei Spezies	33,0 %	5,0 %	10,3 %	4,1 %
Drei oder mehr Spezies	13,8 %	0,5 %	9,1 %	0 %

Die geringe Anzahl an Mehrfachbefunden in der Studie von Spittel et al. (2012) lässt sich damit erklären, dass Milchproben klinisch unauffälliger Kühe verwendet wurden, während in dieser Studie und in der Studie von Koskinen et al. (2010) ausschließlich Milchproben von klinisch erkrankten Tieren verwendet wurden. Die geringe Anzahl an Mehrfachbefunden in der Studie von Keane et al. (2013) lässt sich damit nicht erklären, da auch in diesem Fall Milchproben von klinisch an Mastitis erkrankten Tieren verwendet wurden. Mehrfachbefunde mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay stellen insofern ein Problem dar, da mit ihnen nicht verfahren werden kann wie in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung. Proben, die in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung mehr als zwei Keime enthalten werden in der Regel als kontaminiert deklariert und nicht weiter untersucht. Ein solches Verfahren würde – aufgrund der hohen Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay – zum Ausschluss der Mehrzahl der Proben führen. Die in der vorliegenden Studie mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay erhobenen Mehrfachbefunde sind insofern von fraglicher Plausibilität, als in der vorliegenden Arbeit zusätzliche positive Signale von Keimen detektiert wurden, die in der Regel auf festen Nährmedien wachsen sollten und zudem nicht anspruchsvoll sind.

Daher erscheint unwahrscheinlich, dass die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung zu einem erheblichen Prozentsatz falsch negativer Ergebnisse aufgrund der Anwesenheit grundsätzlich nicht kultivierbarer Keime gelangte. Vielmehr muss beachtet werden, dass mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay auch tote und wachstums-inhibierte Keime detektiert werden, was zu Befunden von fraglicher klinischer Relevanz führt.

Koskinen et al. (2010) schlagen als Modifikation für das PathoProof Mastitis PCR Assay vor, weniger Milch für die DNA-Extraktion zu verwenden oder den PCR CT-Wert-Cut-Off zu senken. Eine Reduzierung der CT-Grenzwerte würde die Problematik der Mehrfachbefunde deutlich senken, gleichzeitig jedoch auch die Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay reduzieren (Koskinen et al., 2010; Spohr & Breitenwieser, 2012). Die hohe Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay wird von den Autoren Koskinen et al. (2010) und Spohr & Breitenwieser (2012) als großer Vorteil gesehen, jedoch weisen die Autoren darauf hin, die Ergebnisse kritisch zu betrachten und zu hinterfragen, da die damit verbundenen Mehrfachbefunde die Diagnostik unnötig erschweren können. Dies äußert sich laut Spohr & Breitenwieser (2012) darin, dass es bei Mehrfachbefunden kaum möglich ist, den Keim herauszukristallisieren, der für die Mastitis verantwortlich ist, da dieser nicht automatisch den niedrigsten CT-Wert und somit die höchste Anzahl in der Milchprobe haben muss. Des Weiteren können hohe PCR CT-Wert-Cut-Offs zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn nicht-lebensfähige Bakterien in niedrigen Konzentrationen in der Milchprobe vorkommen (Cederlöf et al., 2012). Anhand des Vergleichs der Ergebnisse von Milchproben und Mischplatten, die mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay gemessen wurden, wurde deutlich, dass sich die Zahl der Mehrfachbefunde durch das Ausplattieren von Proben reduziert. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass nicht lebensfähige Keime durch das PathoProof Mastitis PCR Assay in der Milch detektiert werden, diese aber auf festem Nährboden kein Wachstum zeigen. Jedoch können auch Keime durch dieses Prozedere der Diagnostik entgehen, wenn sie sich nur schwer auf festen Nährmedien anziehen lassen.

In der vorliegenden Studie waren alle Milchproben, die in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung kein Wachstum zeigten (n = 10), mittels PathoProof Mastitis PCR Assay positiv.

Keane et al (2013), detektierten in 79 % der kulturell negativen Milchproben mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay Keime. Bei Koskinen et al. (2010) waren es 76 % der kulturell negativen Milchproben. In der Studie von Spittel et al. (2012) waren 60 % der kulturell negativen Milchproben PCR-positiv und in der Studie von Spohr & Breitenwieser (2012) waren es 90 %. In der vorliegenden Studie wurden vor allem Staphylokokken (ungleich *Staphylococcus aureus*) und *Corynebacterium bovis* mittels PathoProof Mastitis PCR Assay in Milchproben ohne Wachstum auf festen Nährmedien detektiert. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Spittel et al. (2012) sowie Koskinen et al. (2010) dokumentiert, die hauptsächlich koagulase-negative Staphylokokken und *Corynebacterium bovis* in den kulturell-negativen Milchproben mittels PCR fanden. Im Gegensatz dazu fanden Keane et al. (2013) mittels PathoProof Mastitis PCR Assay vorwiegend *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* und *Streptococcus dysgalactiae* in kulturell negativen Milchproben. Keane et al. (2013) vermuteten, dass das größere Volumen (350 µl), das die Autoren für das PathoProof Mastitis PCR Assay im Vergleich zur bakteriellen Kultivierung (1 µl) einsetzten, die Detektion von Mastitispathogenen erhöht. Koskinen et al. (2010) gingen davon aus, dass Milchproben, die kulturell negativ, aber PCR-positiv, waren, in der kulturellen Untersuchung falsch negative Ergebnisse hervorriefen. Weitere Gründe für das fehlende Wachstum bakterieller Kulturen können vorangegangene Antibiotikatherapien, die Anwesenheit von konkurrierenden Bakterien, die das Wachstum verhindern oder aber eine unsachgemäße Probenbehandlung sein, die zu einer verringerten Lebensfähigkeit des Organismus führt (Spittel & Hoedemaker, 2012).

Die Sensitivität und die Spezifität des PathoProof Mastitis PCR Assay liegen laut einer Validierungsstudie mit Bakterienisolaten aus der Milch aus Europa und Nordamerika bei jeweils 100 % (Koskinen et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Werte nicht bestätigt werden.

In dieser Arbeit zeigte sich anhand der Verdünnungsreihe mit DSM-Keimen, dass das PathoProof Mastitis PCR Assay für die Keime *Enterococcus faecalis* ($1,5 \times 10^3$ Moleküle), *Prototheca wickerhamii* und *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* (1×10^3 Moleküle) eine vergleichsweise hohe Sensitivität aufweist, da bereits bei einer Konzentration von einem fg DNA/µl positive Signale detektiert wurden.

Bei einer Konzentration von zehn fg DNA/ μ l wurden positive Signale von *Escherichia coli* (1×10^4 Moleküle) detektiert. Bis auf *Streptococcus uberis*, für den erst ab einer Konzentration von einem pg DNA/ μ l (3×10^6 Moleküle) positive Signale detektiert wurden, konnten für alle übrigen DSM-Keime ab einer Konzentration von 100 fg DNA/ μ l positive Signale detektiert werden (Bereich 1×10^5 bis 3×10^5 Moleküle, *Mycoplasma bovis*: 5×10^5 Moleküle). Somit kann gegenüber den üblichen Nachweisgrenzen der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung nicht generell von einer höheren Sensitivität der PCR gesprochen werden. Beim PathoProof Mastitis PCR Assay handelt es sich um eine Multiplex-PCR-Methode, also den simultanen Nachweis mehrerer Gene im selben PCR-Ansatz unter identischen Amplifikationsbedingungen. Diese Amplifikationsbedingungen können nicht für alle nachzuweisenden Primer-Target-Kombinationen optimal sein, sondern stellen Kompromisslösungen dar; somit muss die Multiplex-PCR zugunsten der Quantität gleichzeitig nachweisbarer Targets beinahe zwangsläufig an Sensitivität einbüßen. Dies zeigen auch experimentelle Daten. So konnte in einer Studie von Azzari et al. (2010) gezeigt werden, dass die Realtime-PCR bei der Identifizierung von klinischen Proben sensitiver ist als die Multiplex-PCR (Azzari et al., 2010).

Im Vergleich zu der Extraktion von Verdünnungsreihen mit DSM-Stämmen wurde die Sensitivität zusätzlich für die DNA-Extraktion aus Milchproben (Feldproben) anhand der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung als Referenzmethode berechnet. Eine niedrige Sensitivität wurde auf diese Weise in der vorliegenden Arbeit für *Enterococcus* sp. (33,3 %) berechnet, eine höhere Sensitivität für *Streptococcus* sp. (64,9 %) und *Staphylococcus aureus* (76,9 %) und eine hohe Sensitivität für *Escherichia coli* (95 %), Hefen (100 %) und *Trueperella pyogenes* (100 %). Die so ermittelte niedrige Sensitivität für *Enterococcus faecalis* – die allerdings nur anhand von drei mikrobiologisch-kulturell positiven Proben abgeschätzt werden konnte – steht in einem gewissen Widerspruch zu der anhand der DSM-Reinkulturen ermittelten Sensitivität für diesen Keim. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die in Tabelle 39 angegebene Sensitivität nur für Keimsuspensionen in destilliertem Wasser erhoben wurden, Matrix-Effekte also nicht berücksichtigt wurden. Matrix-Effekte der Milch könnten somit die Sensitivität des PCR-Nachweises verringert haben.

Zudem kann die Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens – aufgrund der Voranreicherung – als $< 10^3$ angenommen werden und liegt somit unter der Nachweisgrenze des PathoProof Mastitis PCR Assay. Im Vergleich zu den Berechnungen der vorliegenden Arbeit ermittelten Spittel et al. (2012) ebenfalls eine geringe Sensitivität für *Enterococcus* sp. (9,1 %). Die Sensitivität für *Streptococcus dysgalactiae* lag in der Studie von Spittel et al. (2012) bei 100 % und die von *Streptococcus uberis* bei 76,9 %. Eine vergleichbar hohe Sensitivität wurde von den Autoren für *Staphylococcus aureus* (79,4 %) und für *Trueperella pyogenes* (100 %) aufgezeigt. Berechnet man die Daten aus der Studie von Koskinen et al. (2010) anhand der bakteriellen Kultur als Goldstandard, erhält man Ergebnisse, die mit der vorliegenden Arbeit und der Studie von Spittel et al. (2012) im Einklang stehen. Für *Enterococcus* sp. wurde von Koskinen et al. (2010) eine niedrige Sensitivität mit 42,9 % festgestellt, für *Streptococcus agalactiae* eine hohe Sensitivität von 100 %, für *Streptococcus dysgalactiae* von 89 %, für *Streptococcus uberis* von 87,7 %. Die Autoren stellten für *Staphylococcus aureus* eine Sensitivität von 87,2 %, für *Escherichia coli* von 84,4 % und für *Trueperella pyogenes* von 92,3 % fest. Die geringe Sensitivität für *Enterococcus* sp. wurde in allen drei genannten Studien festgestellt ebenso wie die relativ hohe Sensitivität für die übrigen Mastitispathogene. Cederlöf et al. (2012) konnten Zusammenhänge zwischen der Sensitivität bzw. der Spezifität und dem CT-Wert-Cut-Off aufzeigen. Demnach hatte das PathoProof Mastitis PCR Assay eine niedrigere Sensitivität und eine höhere Spezifität als die bakteriologisch-kulturelle Untersuchung bei niedrigen PCR CT-Wert-Cut-Offs, bei höheren PCR CT-Wert-Cut-Offs verhielt es sich jedoch umgekehrt. Zu demselben Ergebnis gelangten auch Mweu et al. (2012) in einer Evaluation des PathoProof Mastitis PCR Assay. Sensitivität und Spezifität der bakteriologisch-kulturellen Untersuchung wurden also von der Wahl des PCR CT-Wert-Cut-Offs beeinflusst (Cederlöf et al., 2012; Mweu et al., 2012). Cederlöf et al. (2012) kamen deshalb zu dem Schluss, dass weder die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung noch das PathoProof Mastitis PCR Assay eine perfekte Methode für die Detektion von Mastitispathogenen ist.

Ein Indiz für falsch-positive Ergebnisse (als Resultat einer niedrigen Spezifität) waren die Messungen der Subkulturen mittels des PathoProof Mastitis PCR Assay. In diesem Fall wurden für 89 Subkulturen (39 %), die nach visueller Beurteilung Reinkulturen waren, mittels der PCR zwei oder mehr Keime identifiziert.

Die Spezifität des PathoProof Mastitis PCR Assay, die anhand der Messungen mit DMS-Keimen errechnet wurde, war für den Nachweis von *Staphylococcus* sp. und *Escherichia coli* mit 61,9 % bzw. 76,2 % gering. Eine Spezifität von 90,5 % wurde für das *blaZ*-Gen festgestellt. Für den Nachweis von *Enterococcus* sp. und *Streptococcus uberis* zeigte das PathoProof Mastitis PCR Assay eine Spezifität von 92,2 %. Dem gegenüber steht eine Studie von Koskinen et al. (2009), in der 454 Mastitisproben mittels PathoProof Mastitis PCR Assay gemessen wurden und in deren Folge eine Spezifität von 100 % für alle 15 Keimnachweise und den *blaZ*-Gen-Nachweis ermittelt wurde. Die Keime für die Studie von Koskinen et al. (2009) stammten aus kommerziellen und nicht-kommerziellen Stammsammlungen und waren bereits auf Speziesebene oder als Speziesgruppe identifiziert. Der Keim *Peptoniphilus indolicus*, für den in der vorliegenden Arbeit bei der Messung der DSM-Stämme zusätzliche positive Signale detektiert wurden (*Enterococcus* sp., Hefe), war jedoch in der Studie von Koskinen et al. (2009) nicht enthalten.

Die Spezifität, die mittels der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung ermittelt wurde, lag für Hefen (62,6 %) niedrig, während die Spezifitäten für *Staphylococcus aureus* (81,5 %), *Streptococcus* sp. (82,6 %), *Enterococcus* sp. (83,7 %), *Trueperella pyogenes* (90,8 %) und *Escherichia coli* (93,1 %) höher waren. Die ebenfalls mit dieser Methode von Spittel et al. (2012) ermittelten Spezifitäten lagen für *Staphylococcus aureus* bei 94,1 %, für *Streptococcus dysgalactiae* bei 98,7 %, für *Streptococcus uberis* bei 94,3 %, für *Enterococcus* sp. bei 99,6 % und für *Trueperella pyogenes* bei 93,1 %. Die Spezifitäten, die aus den Daten der Studie von Koskinen et al. (2010) ermittelt wurden, lagen für *Staphylococcus aureus* bei 92,3 %, für *Streptococcus agalactiae* bei 99,6 %, für *Streptococcus dysgalactiae* bei 90,5 %, für *Streptococcus uberis* bei 80,3 %, für *Enterococcus* sp. bei 95,7 %, für *Trueperella pyogenes* bei 93,5 % und für *Escherichia coli* bei 90,5 %.

In der vorliegenden Studie wurde mittels PathoProof Mastitis PCR Assay das *blaZ*-Gen (ein bei Staphylokokken verbreitet vorkommendes Penicillinresistenz-Gen) in 71,4 % der *Staphylococcus aureus*-positiven Proben und in 39,7 % derjenigen Proben, in denen andere Staphylokokken (ungleich *Staphylococcus aureus*) detektiert worden waren, gefunden. Spittel et al. (2012) fanden das *blaZ*-Gen in 37 % der Proben, die koagulase-negative Staphylokokken beinhalten und in 27,7 % der *Staphylococcus aureus*-positiven Proben.

In einer Studie von Turutoglu et al. (2006) wurden 239 Staphylokokken-Stämme aus Mastitisfällen in der Türkei auf Resistenzen untersucht. Dabei wurden 68 *Staphylococcus aureus*-Isolate von insgesamt 103 mittels Nitrocefin-sticks auf β -Laktamase-Produktion getestet. 38 Isolate (55,9 %) waren β -Laktamase-positiv (Turutoglu et al., 2006).

Ergänzend wurden in der vorliegenden Studie 13 *Staphylococcus aureus*-Isolate auf Resistenzen untersucht. Ein Isolat (7,7 %) war in der Untersuchung mittels PathoProof Mastitis PCR Assay *blaZ*-positiv, während in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung keine Penicillin-Resistenz festgestellt werden konnte, während für die übrigen 12 Isolate (92,3 %) übereinstimmende Befunde in der phänotypischen und genotypischen Untersuchung erhoben wurden. In der Studie von Keane et al. (2013) stimmten die Ergebnisse von 93 % der untersuchten 42 Isolate überein. Zwei (4,8 %) der Isolate, die in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung Penicillin-sensibel waren, waren mittels PathoProof Mastitis PCR Assay *blaZ*-positiv und ein (2,4 %) Isolat war in der PCR *blaZ*-negativ, aber in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung Penicillin-resistent (Keane et al., 2013). Die Beschränkung auf das *blaZ*-Gen ist insofern von Nachteil, weil verschiedene Untersuchungen der Resistenzsituation bei Mastitiserregern ein hohes Vorkommen verschiedenster nicht *blaZ*-kodierter Resistenzen in unterschiedlichen Spezies zeigt (Pitkälä et al., 2004 und Bengtsson et al., 2009).

Proben, die zum Vergleich in zwei unterschiedlichen Laboren mittels des PathoProof Mastitis PCR Assay untersucht wurden, brachten teilweise unterschiedliche Ergebnisse hervor. Im Vergleich der Ergebnisse der Milchproben fielen diese Unterschiede noch gering aus. Bei den Subkulturen wurden aber in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zum TMO Labor meist ein bis zwei Keime zusätzlich detektiert. Da eine Vergleichsuntersuchung der manuellen Auswertung und der Auswertung mit NLMS gemacht wurde, konnte ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Auswertungsmethoden beider Labore ursächlich für die Ergebnisunterschiede waren. Da die Subkulturen bereits in Form von DNA an das Labor in Finnland geschickt wurden, konnten auch Kontaminationen, die während den Isolationsschritten auftreten können, ausgeschlossen werden. Es bleibt also fraglich, weshalb es in der Untersuchung identischer Proben zu unterschiedlichen Ergebnissen kam.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden Kontaminationen der im PathoProof Extraktionskit enthaltenen Silica-Säulen detektiert, welche vom Hersteller bis zum Ende der Arbeit nicht behoben werden konnten. Daher wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet und mit den Ergebnissen des PathoProof Mastitis PCR Assay verglichen. Die Problematik der Prototheken-Kontamination konnte mit allen Extraktionsverfahren vermieden werden. Das High Pure PCR Template Kit und das Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit stellen sich als geeignete Alternativ-Verfahren zum PathoProof Mastitis PCR Assay dar, da für diese Methoden die geringsten Erhöhungen des CT-Wertes gegenüber dem durchschnittlichen mittels PathoProof Mastitis PCR Assay ermittelten CT-Wertes festgestellt wurden. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Verfahren für die Isolation von DNA aus Milch zu validieren, da z.B. das High Pure PCR Template Kit nur für die Isolation von DNA aus Vollblut, angezüchteten Zellen und Gewebeproben entwickelt wurde (Protokoll Roche Diagnostics GmbH, Version Dezember 2008). Für die vorliegende Arbeit wurde daher weiterhin das im PathoProof Mastitis PCR Assay enthaltene Extraktionsverfahren verwendet, jedoch wurden positive *Prototheca*-Signale nicht gewertet.

Als Vorteile der PCR-Mastitisdiagnostik mittels PathoProof Mastitis PCR Assay werden die kurze Analysezeit von drei bis fünf Stunden, die Möglichkeit einer objektiven und nutzerunabhängigen Interpretation der Ergebnisse sowie die Fähigkeit tote oder Wachstums-inhibierte Erreger zu detektieren, genannt (Koskinen et al., 2009; Koskinen et al., 2010). Des Weiteren liegen die Sensitivität und die Spezifität des PathoProof Mastitis PCR Assay laut einer Validierungsstudie mit 454 Bakterienisolaten aus Milch aus Europa und Nordamerika bei jeweils 100 % (Koskinen et al., 2009). Nachteile sind die hohen Kosten von 15 bis 20 € pro Probe und die begrenzte Resistenzbestimmung, die lediglich den Nachweis des *blaZ*-Gens beinhaltet (Spohr & Breitenwieser, 2012).

Koskinen et al. (2010) halten fest, dass das PathoProof Mastitis PCR Assay einige Vorteile gegenüber der kulturell-bakteriologischen Untersuchung hat, wie die kurze Analysezeit, die objektive und automatisierte Interpretation der Ergebnisse sowie die erhöhte Sensitivität. Die Autoren merken aber auch an, dass weitere Studien folgen müssen, um die hohe Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay nutzen zu

können, ohne die gleichzeitigen Nachteile der hohen Anzahl an Mehrfachbefunden und der eventuell falsch-positiven Ergebnisse.

Bexiga et al. (2011) sehen im PathoProof Mastitis PCR Assay eine Möglichkeit, Mastitispathogene zu detektieren, die in der Kultivierung negativ ausfallen. Da das PathoProof Mastitis PCR Assay mit gefrorenen oder Bronopol-konservierten Milchproben funktioniert, schlagen die Autoren vor, diese Methode zu nutzen, wenn die mikrobiologische Untersuchung nicht aussagekräftig ist (Bexiga et al., 2011). Katholm et al. (2012) verwendeten das PathoProof Mastitis PCR Assay für die Untersuchung von Tankmilch und kamen zu dem Ergebnis, dass die PCR im gleichen Ausmaß wie die bakterielle Kultur zur Überwachung von Tankmilchproben verwendet werden kann, besonders für Bakterien mit niedriger Prävalenz (Katholm et al., 2012).

5.4 Weitere PCR-Verfahren

Alternative Real-Time-PCR-Verfahren für die Mastitisdiagnostik sind bereits in der Entwicklung, es wurde jedoch noch keine Methode entwickelt mit der 15 Mastitiserreger identifiziert werden können, wie es beim PathoProof Mastitis PCR Assay der Fall ist. Gillespie et al. (2005) entwickelten eine multiplex Real-Time PCR für den gleichzeitigen Nachweis von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus uberis* direkt aus Milch. Durch einen Anreicherungsschritt über Nacht lag die minimale Nachweisgrenze für alle drei Keime bei 10^0 cfu/ml in der Ausgangsprobe (Gillespie & Oliver, 2005). Nach Angaben der Autoren wurden mit dieser multiplex Real-Time PCR 96,4 % aller Viertelgemelksproben korrekt identifiziert. Weiterhin wurden 91,7 % aller *Staphylococcus aureus*, 98,0 % aller *Streptococcus agalactiae* und 100 % aller *Streptococcus uberis* korrekt identifiziert. Gillespie et al. (2005) ermittelten eine Sensitivität von 95,5 % und eine Spezifität von 99,6 % für die korrekte Identifizierung der oben genannten Keime direkt aus der Milch. Phuektes et al. (2003) entwickelten ebenfalls eine multiplex PCR für den Nachweis von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* und zusätzlich *Streptococcus dysgalactiae*.

Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die reguläre Analyse von Tankmilch mittels PCR ein nützliches Instrument ist für die Ermittlung des Herdenstatus in Bezug auf *Streptococcus agalactiae*, jedoch für die Überwachung von Mastitisfällen, die durch *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis* verursacht werden, wenig geeignet ist (Phuektes, Patchara et al., 2003). In einer vorangegangenen Studie waren die Autoren noch zu dem Ergebnis gelangt, dass diese multiplex-PCR als schnelle Diagnostikmethode verwendet werden kann, um *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* und *Streptococcus dysgalactiae* in Milchproben zu detektieren (Phuektes, P. et al., 2001a). Sachse et al. (2010) entwickelten eine neuartige Real-Time PCR für den Nachweis von *Mycoplasma bovis*. Die Nachweisgrenzen lagen für den PCR-Nachweis aus kultivierten Erregern bei einer Genomkopie und für die Milch bei 10^0 cfu/ml (Sachse et al., 2010).

Für die Mastitisdiagnostik wurden mittlerweile zahlreiche auf der PCR basierende Methoden entwickelt, um Mastitiseime zu detektieren und differenzieren. Riffon et al. (2001) entwickelten eine PCR-basierte Untersuchung, die ohne vorherigen Kultivierungsschritt, direkt aus der Milchprobe durchgeführt wird und spezifisch ist für *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis* und *Streptococcus uberis*. Die Autoren verwendeten dafür Primer, die aus den 16S- und 23S-rRNA-Sequenzen, die in GenBank erhältlich sind, entwickelt wurden (Riffon et al., 2001). Nach Angaben der Autoren kann die Untersuchung sowohl mit als auch ohne vorherigen enzymatischen Lyse-Schritt der Bakterienzellen durchgeführt werden. Higuchi et al. (2011) entwickelten eine vereinfachte PCR-Untersuchung für den Nachweis von *Mycoplasma sp.*, die helfen soll Ausbrüche von *Mycoplasma*-Mastitis zu kontrollieren und zu verhindern (Higuchi et al., 2011). Baird et al. (1999) entwickelten ebenfalls eine PCR für den Nachweis von Mykoplasmen aus Mastitisproben. Die Vervielfältigung von *Mycoplasma bovis* aus Milch von infizierten Kühen, Chloroform-extrahierter Milch, 24-Stunden-Anreicherungsbouillon und Verdünnungsstufen der Anreicherungsbouillon zeigte, dass die Verdünnung der 24-Stunden-Anreicherungsbouillon am besten als PCR-Matrize geeignet war (Baird et al., 1999).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die PCR im Vergleich mit der Kultur eine Sensitivität von 96,2 % und eine Spezifität von 99,1 % hatte (Baird et al., 1999). Martineau et al. (2001) entwickelten auf Basis des *tuf*-Gens eine Staphylokokken-spezifische PCR, mit der 27 Staphylokokken-Spezies detektiert werden können, unter anderem die klinisch relevanten Spezies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans* und *Staphylococcus warneri*. Basierend auf Tests mit einer Vielfalt an Bakterienspezies, zeigten die Autoren, dass ihre PCR-Untersuchung für alle 27 Staphylokokken-Spezies spezifisch und sensitiv ist (Martineau et al., 2001). PCR Methoden sind allerdings gegenwärtig noch sehr arbeitsaufwendig und teuer, wenn für jedes mögliche Mastitispathogen ein separater PCR-Test durchgeführt wird (Lam et al., 2009). Des Weiteren kann die PCR keine Information zur antimikrobiellen Empfindlichkeit geben, die nötig wäre, um Medikamente für die Behandlung der klinischen Mastitisfälle auszuwählen (Phuektes, P. et al., 2001a). Zu den größeren Nachteilen der PCR-Methoden gehört zudem die überhöhte Sensitivität, da kleinere Verunreinigungen – z.B. bei der Extraktion von Proben - zu Fehldiagnosen führen können (Phuektes, P. et al., 2001a).

5.5 Die 16S rRNA-Gen-Analyse

Die 16S rRNA-Gen-Analyse gilt als Standardmethode für die Detektion von einer Vielzahl an Pathogenen und Biomarkern aus dem Bereich der Veterinärmedizin (Caraguel et al., 2011). Die 16S rRNA-PCR wird ferner häufig angewandt, wenn Stämme in kein biochemisches Profil passen oder das Ergebnis anderer Identifizierungsmethoden wenig wahrscheinlich ist (Janda & Abbott, 2007). Mignard et al. (2006) analysierten während eines Zeitraums von zwei Jahren 683 Isolate, davon 592 Stäbchen und 91 Kokken. Die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung ermöglichte es, dass 568 Isolate (83,1 %) auf Speziesebene und 108 Isolate (15,6 %) auf Genusebene identifiziert wurden, jedoch blieben 7 Isolate (1 %) unidentifiziert (Mignard & Flandrois, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten 31 Keime (54,4 %) auf Speziesebene identifiziert werden.

20 Keime (35,1 %) wurden auf Gattungsebene erkannt, vier Keime (7,0 %) konnten nicht von anderen Gattungen differenziert werden und für zwei Keime (3,5 %) konnte kein Ergebnis festgestellt werden. Schwierigkeiten, die bei der Identifikation auf Genus- und Spezieslevel auftreten können, beinhalten die Anerkennung neuer Taxa, zu wenige Sequenzen, die in der Datenbank enthalten sind oder Probleme bei der Nomenklatur (Janda & Abbott, 2007). Des Weiteren können verschiedene Spezies sich in ihren variablen Sequenzen so ähnlich sein, dass eine genaue Differenzierung kaum möglich ist (Fox, G.E. et al., 1992; Woo et al., 2008).

Fünf Keime der Gattung *Bacillus* sowie vier Keime der Gattung *Lysinibacillus* konnten nur auf Gattungsebene identifiziert werden, eine Speziesidentifikation war nicht möglich. *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* und *Bacillus cereus* wurden in Studien in Milchproben nachgewiesen und gehören somit zu den Umweltkeimen, die Mastitis verursachen können (Nieminen et al., 2007). In mehreren Studien wurde herausgefunden, dass *Bacillus* Spezies sich mittels der 16S rRNA-Abschnitte nur schwer voneinander differenzieren lassen und ihre Sequenzen teilweise sogar identisch sind (Ash et al., 1991; Fox, G.E. et al., 1992). Weitere Keime, die lediglich auf Gattungsebene identifiziert werden konnten, waren *Citrobacter* sp. (n = 2), *Acinetobacter* sp. (n = 2), *Enterobacter* sp. (n = 2) und *Vagococcus* sp. (n = 1). Auch Drancourt et al. (2000) konnten in ihrer Studie *Enterobacter*-Isolate maßgeblich nicht identifizieren. Vier Isolate, die mittels 16S rRNA-PCR untersucht wurden, konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da eine Differenzierung zwischen *Escherichia coli* und *Shigella* sp. nicht möglich war. Eine Unterscheidung von *Escherichia coli* und *Shigella* sp. ist taxonomisch nur schwer möglich, da die Homologie der 16S rRNA-Sequenzen bei nahezu 100 % liegt (Weber, 2010). So konnten Widjoatmodjo et al. (1995) in ihrer Studie *Escherichia coli* und *Shigella* sp. mittels 16S rRNA ebenfalls nicht differenzieren (Widjoatmodjo et al., 1995).

Clarridge (2004) hat festgestellt, dass 16S rRNA-Gen-Sequenzierungen teurer sind als die meisten konventionellen Identifizierungsmethoden. Diese Kosten relativieren sich jedoch, wenn Organismen mit einer Vielzahl konventioneller Methoden identifiziert werden müssen (Clarridge, 2004). 16S rRNA-Gen-Sequenzierungen und ähnliche molekulare Identifikationsmethoden haben den zusätzlichen Vorteil, dass die Zeit, die für die Identifizierung von langsam wachsenden Bakterien, wie z.B. Mykobakterien, nötig ist, reduziert wird (Woo et al., 2008).

Die Anschaffung der Geräte nicht einberechnet, liegen die Kosten für die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung pro Isolat bei 44 \$, davon 20 \$ Materialkosten und 24 \$ Laborkosten (Clarridge, 2004). Werden Isolate nicht hausintern sequenziert, sondern in Labore geschickt, können die Kosten zwischen 30 \$ und 50 \$ betragen bei 500 Basenpaaren; die Kosten sinken auf 12 \$ bis 18 \$, wenn die DNA so bereitgestellt wird, dass sie nur noch in den Analyzer gestellt werden muss (Clarridge, 2004). Justesen et al. (2010) berechneten in ihrer Studie zur Routineidentifikation von anaeroben Bakterien mittels 16S rRNA-Sequenzierung durchschnittliche Materialkosten von 35 – 40 \$ (Justesen et al., 2010). Die Identifikation von Bakterien mittels 16S rRNA-Gen-Sequenzierung hängt von den erheblichen Unterschieden zwischen den Spezies und von den geringen Unterschieden der 16S rRNA-Sequenzen innerhalb einer Spezies ab (Woo et al., 2008). Somit ist eine der größeren Limitationen der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung, dass verschiedene Bakterienspezies nicht differenziert werden können, wenn sie das nahezu identische 16S rRNA-Gen teilen (Woo et al., 2008).

Derzeit ist eine komplette Automatisierung der 16S rRNA-Gen-Sequenzierung nicht möglich, deshalb müssen die meisten Schritte - DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation, Reinigung der PCR-Produkte, DNA-Sequenzierung und Sequenzbearbeitung - manuell durchgeführt werden (Woo et al., 2008).

5.6 Vergleich der Methoden

Im Vergleich der Methoden miteinander wurde für die MALDI-TOF MS-Analytik und das PathoProof Mastitis PCR Assay mit 76,76 % die größte Übereinstimmung gefunden. Die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung und die MALDI-TOF MS-Analytik stimmten in 35,09 % der Fälle überein. Die Übereinstimmung von mikrobiologisch-kultureller Untersuchung und PathoProof Mastitis PCR Assay lag bei 36,84 %, keinerlei Übereinstimmung wurde in 15,35 % der Fälle festgestellt. Gemessen an der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung die in der Mastitisdiagnostik als Goldstandard fungiert, konnten mit der MALDI-TOF MS-Analytik und dem PathoProof Mastitis PCR Assay vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Hier muss allerdings auch erwähnt werden, dass die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung in der vorliegenden Studie nicht nach den DVG-Richtlinien verlief, sondern nur an diese angelehnt ist. Es handelt sich um eine in-house-Methode, die vom gastgebenden Labor entwickelt wurde, um eine schnelle und günstige Mastitisdiagnostik zu gewährleisten.

Die MALDI-TOF MS-Analytik ist geeignet für die Diagnose von Mastitiserregern. Zeitlich gesehen hat die MALDI-TOF MS Analytik gegenüber biochemischen Methoden einen Vorteil und ist auch kostentechnisch gesehen überlegen. Jedoch benötigt auch die MALDI-TOF MS Analytik Kulturen als Ausgangsprobe, weshalb die Anzucht auf Nährböden noch nicht umgangen werden kann. Insofern stellt die MALDI-TOF MS-Analytik eine sinnvolle Ergänzung der kulturellen Diagnostik dar, da insbesondere für eine Beurteilung der Antibiotika-Resistenzsituation die Kenntnis der Spezies unabdingbar ist. Allerdings besteht die Chance, dass in naher Zukunft mittels MALDI-TOF MS Keime direkt aus der Milch identifiziert werden können und so eine rasche Diagnose möglich ist. Dennoch wird die Form der MALDI-TOF MS-Analytik die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung vorerst nicht vollständig ersetzen können, da die Bestimmung der Antibiotikaresistenzen in der Mastitisdiagnostik Priorität hat.

Das PathoProof Mastitis PCR Assay ist eine schnelle Methode zur Detektion wichtiger Mastitiserreger und hat zeitlich gesehen einen deutlichen Vorteil gegenüber der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung. Kostentechnisch gesehen ist die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung dem PathoProof Mastitis PCR Assay bisher überlegen, weshalb der flächendeckende Einsatz der PCR eher unwahrscheinlich ist. Jedoch kann die PCR aufgrund ihrer hohen Sensitivität für Mastitisproben eingesetzt werden, die in der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung negativ sind. Für die Bestimmung von Antibiotikaresistenzen ist das PathoProof Mastitis PCR Assay im Gegensatz zur mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung insofern im Nachteil, dass nur die Detektion des *blaZ*-Gens möglich ist, was für die Mastitisdiagnostik nicht ausreichend ist. Beide Methoden sind gut geeignet für zusätzliche Untersuchungen, dennoch kann die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung nach den DVG-Richtlinien zu diesem Zeitpunkt noch nicht durch eine dieser Methoden ersetzt werden. Es bleibt abzuwarten, wie die Methoden weiterentwickelt werden und ob eine zuverlässige Identifikation von Mastitiserregern ohne Kultivierungsschritt in Zukunft möglich sein wird.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Methoden für die Identifizierung von Mastitiserregern getestet. Dazu wurden die Ergebnisse von 132 Mastitisproben verglichen, die mit mikrobiologisch-kultureller Untersuchung, MALDI-TOF MS-Analytik sowie einem kommerziell erhältlichen Real-Time PCR-Kit (PathoProof Mastitis PCR Assay) untersucht wurden.

Die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung ist seit langer Zeit Goldstandard in der Mastitisiagnostik, hat aber den Nachteil, dass einige Keime lediglich auf Gruppenebene oder Genusebene identifiziert werden und nicht auf Speziesebene. Des Weiteren ist diese Methode arbeitsaufwendig und zeitintensiv und führt oftmals zu negativen Ergebnissen. Die MALDI-TOF MS-Analytik hat sich erst vor einigen Jahren etabliert und wird mittlerweile in vielen Laboren für die Routinediagnostik von Bakterien, Pilzen und Hefen angewandt. Es handelt sich dabei um eine zeitsparende Methode mit übersichtlichem Arbeitsaufwand. Dennoch ist die Methode bisher auf Kulturen angewiesen und kann nur in wenigen Ausnahmefällen Keime direkt aus Probenmaterial detektieren. Das PathoProof Mastitis PCR Assay ist ein kommerziell erhältliches Kit, mit welchem Keime aus Milch extrahiert und mittels einer Real-Time PCR identifiziert werden können. Diese Methode führt im Vergleich der hier beleuchteten Methoden in der kürzesten Zeit zum Ergebnis und benötigt keine Kultivierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die größte Übereinstimmung von Ergebnissen für die MALDI-TOF MS-Analytik und das PathoProof Mastitis PCR Assay gefunden. Verglichen mit dem PCR-Nachweis zeigte die MALDI-TOF MS-Analytik eine vergleichbare Übereinstimmung mit der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung. Die Adaption einer Untersuchungsmethode für künstlich kontaminierte Milch auf die Untersuchung von Mastitismilch gelang nicht, möglicherweise aufgrund der hohen Konzentration von Entzündungsproteinen. Die Übereinstimmung des PathoProof Mastitis PCR Assay mit der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung war gering, da die PCR eine hohe Zahl von Mehrfachbefunden ausgab. Dies lag nur zum Teil an der höheren Sensitivität, beträchtlich aber auch in der unzureichenden Spezifität der Methode begründet, wie die Untersuchung von DSM-Stämmen ergab. Als vollständiger Ersatz für die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung war dementsprechend keine der beiden Methoden geeignet.

Dennoch können beide Methoden die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung ergänzen, da mittels MALDI-TOF MS-Analytik mehr Keime auf Speziesebene bestimmt werden können und mittels PathoProof Mastitis PCR Assay, bedingt durch die hohe Sensitivität, auch in kulturell negativen Proben Keime identifiziert werden können.

7. Summary

Possibilities and limits of mastitis diagnostics by MALDI-TOF MS and molecular biology

In the present thesis different methods for the identification of mastitis-pathogens were tested. For this purpose 132 mastitis samples were analysed by cultural methods, MALDI-TOF MS and a commercial Real-Time PCR kit (PathoProof Mastitis PCR Assay). The results of these different methods were compared.

Bacterial culture has been the reference method for the diagnosis of mastitis for a long time, but disadvantageously some pathogens can only be identified to group-level or genus-level, not to species-level. Furthermore this method is labor-intensive and time-consuming and often leads to negative results. MALDI-TOF MS has been established as an additional tool in diagnostics only some years ago. Meanwhile it is used for routine diagnosis of bacteria, fungi and yeasts in many laboratories. It is a time-saving method with manageable amount of work. Nevertheless this method depends on culture and most often lacks the ability to identify pathogens directly from sample-matrix. PathoProof Mastitis PCR Assay is a commercially available kit for extraction of pathogens out of milk and their identification by Real-Time PCR. Compared to the other methods there is no need for bacterial culturing and results are obtained in a very short time.

In the present thesis the results of MALDI-TOF MS and PathoProof Mastitis PCR Assay agreed best. In comparison to the PCR assay, MALDI-TOF MS showed comparable consensus with bacterial culture. A protocol for direct MALDI-TOF-analysis in (artificially contaminated) milk did not work with mastitis milk, maybe due to a high concentration of inflammatory proteins. PathoProof Mastitis PCR Assay poorly agreed with bacterial culture, since much more pathogens were detected by PCR. This was partly due to the high sensitivity, but also due to insufficient specificity of the method as shown by the investigation of DSM reference strains. According to this, none of both methods was qualified to completely replace bacterial culture. However both methods are able to complement bacterial culture: MALDI-TOF MS was able to identify more pathogens on species-level and PathoProof Mastitis PCR Assay can identify pathogens even in culture-negative samples because of its high sensitivity.

8. Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc	accuracy (Genauigkeit)
AK	Amplifikationskontrolle
BK	bakterielle Kultur
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
CAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cfu	colony forming unit (koloniebildende Einheit)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	threshold cycle
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
EK	Extraktionskontrolle
EoT	Extraction on Target
EtOH	Ethanol
fg	Femtogramm

g	rcf, relative centrifugal force (Relative Zentrifugalbeschleunigung)
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HCCA	α -Cyano-4-hydroxycimtsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
KNS	koagulase-negative Staphylokokken
kV	Kilovolt
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption/ ionization – time of flight mass spectrometry
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
m	Masse
mcg	Mikrogramm
mm	Millimeter
MSP	main spectral projection
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NLMS	Norden Lab Mastitis Studio
ns	Nanosekunde

NTC	non template control
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii (lat.: Stärke des Wasserstoffs)
ppm	parts per million
qPCR	quantitative PCR
REC	rapid E. coli
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Se	Sensitivität
sec	Sekunden
sog.	so genannt
Sp	Spezifität
sp.	Spezies
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
Taq	thermus aquaticus
TMO	Thermo Fisher Scientific
u.a.	unter anderem
YGC	yeast glucose chloramphenicol (Hefe Glukose Chloramphenicol)
z	Ladung

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über Differenzierungsmöglichkeiten unterschiedlicher Mastitiserreger	21
Abbildung 2: Aufbau eines Massenspektrometers	22
Abbildung 3: Darstellung der Arbeitsabläufe	40
Abbildung 4: Pipettierschema für das PathoProof Mastitis PCR Assay	58
Abbildung 5: DNA LabChip	67
Abbildung 6: Ergebnisdarstellung des Bioanalyzers anhand einiger Beispiele	68
Abbildung 7: Über die mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung identifizierte Mastitiserreger	74
Abbildung 8: Verteilung der Ergebnisse der MALDI-TOF MS-Analytik aus der Routinediagnostik	79
Abbildung 9: Über MALDI-TOF MS ermittelte Keime	80
Abbildung 10: Sensitivitätsmessung am Beispiel einer dezimalen Verdünnungsreihe von <i>Staphylococcus aureus</i>	96
Abbildung 11: Verteilung der zusätzlichen positiven Signale in den Subkulturen auf die unterschiedlichen CT-Werte	97
Abbildung 12: Anzahl der Zusatzbefunde mittels PathoProof Mastitis PCR Assay für die Messung von Reinkulturen	98
Abbildung 13: Durchschnittliche CT-Abweichungen mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden anhand aller detektierten Keime	100
Abbildung 14: Verteilung der verschiedenen positiven Signale aus den Milchproben auf verschiedene CT-Werte	102
Abbildung 15: Verteilung der positiven Signale von Direktextrakten und Mischplatten aus der Routinediagnostik	104
Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Einfach- und Mehrfachbefunde mit verschiedenen Detektionsmethoden	108
Abbildung 17: Übereinstimmung der Ergebnisse verschiedener Analysemethoden	109
Abbildung 18: Übereinstimmung der verschiedenen Methoden mit den Ergebnissen der 16S rRNA-Gen-Analyse	111

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mastitis-Diagnostik anhand zytologisch-mikrobiologischer Befunde	5
Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Proben/ Isolate.....	29
Tabelle 3: Chemikalien und Biochemika	30
Tabelle 4: Antibiotika und Sulfonamide	32
Tabelle 5: DSM-Stämme.....	32
Tabelle 6: Stämme aus der Stammsammlung der freien Universität Berlin	33
Tabelle 7: Nährmedien.....	33
Tabelle 8: Puffer und Lösungen	36
Tabelle 9: Sonstige Materialien und Kits.....	36
Tabelle 10: Geräte	39
Tabelle 11: Differenzierungskriterien wichtiger Mastitiserreger.....	43
Tabelle 12: Einstellungen Biotyper Automation Control	47
Tabelle 13: Bewertung der MALDI-TOF MS-Ergebnisse anhand des Score-Wertes	47
Tabelle 14: Einstellung MALDI BioTyper 2.0 SR1.....	50
Tabelle 15: Verschiedene DNA-Isolationskits für die direkte Extraktion von DNA aus Milch	54
Tabelle 16: Einstellungen des Maxwell 16	57
Tabelle 17: PCR-Lösungen für die Identifikation der verschiedenen Primer	57
Tabelle 18: Pipettierschema der PCR-Lösungen für PathoProof Mastitis PCR Assay	58
Tabelle 19: Einstellungen Stratagene Mx3005P	59
Tabelle 20: Threshold-Einstellungen für die Auswertung mit MxPro.....	59
Tabelle 21: Pipettierschema Kalibrier-PCR-Lösungen.....	63
Tabelle 22: Für die 16S rRNA-Gen-Amplifizierung verwendete Primer.....	64
Tabelle 23: Ansatz für die PCR-Reaktion.....	64
Tabelle 24: Temperatur-Zeit-Programm für die PCR-Reaktion	65
Tabelle 25: Ansatz für die Sequenzier-Reaktion	69
Tabelle 26: Temperatur-Zeit-Programm für die Sequenzierreaktion	69
Tabelle 27: Einstellungen des Genetic Analyzers 3130	71
Tabelle 28: IUPAC-Codes für die Auswertung von Sequenzen	72
Tabelle 29: Verteilung der Befunde aus der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung anhand von 83 Vorberichten.....	75

Tabelle 30: Mittels MALDI-TOF MS gemessene DSM-Stämme	76
Tabelle 31: Konzentrationsabhängige Nachweisbarkeit gespikter Milchproben mit MALDI-TOF MS-Analytik	78
Tabelle 32: Vergleich der mittels MALDI-TOF MS und mikrobiologisch-kultureller Untersuchung ermittelten Befunde, orientiert an der Einteilung der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchung	81
Tabelle 33: Ergebnisse der 16S rRNA Gen-Sequenzierung im Vergleich mit den vorgeschlagenen Ergebnissen aus der MALDI-TOF MS Analytik	83
Tabelle 34: Ergebnisse der Messungen von Milchproben mit dem Sepsityper-Kit und den dazugehörigen Subkulturen mittels MALDI-TOF MS-Analytik	84
Tabelle 35: MALDI-TOF MS-Analytik: In die Datenbank aufgenommene Keime	86
Tabelle 36: Mittels PathoProof Mastitis PCR Assay gemessene DSM-Stämme und dazugehörige positive Signale	88
Tabelle 37: Sensitivität des PathoProof Mastitis PCR Assay für verschiedene DSM-Stämme	93
Tabelle 38: Anzahl der mittels PathoProof Mastitis PCR Assay in den Subkulturen detektierten Signale	97
Tabelle 39: Anzahl der Signale, die mittels PathoProof Mastitis PCR Assay in Milchproben aus der Routinediagnostik detektiert wurden	101
Tabelle 40: Vergleich der Ergebnisse von Direktextrakten und Mischplatten aus der Routinediagnostik	103
Tabelle 41: Sensitivität (Se), Spezifität (Sp) und Genauigkeit (Acc) des PathoProof Mastitis PCR Assay (PCR)	105
Tabelle 42: Mittels PathoProof Mastitis PCR Assay detektierte Keime aus mikrobiologisch-kulturell negativen Proben	106
Tabelle 43: Prävalenz PCR-positiver Milchproben und Verteilung der Ein- und Mehrfachbefunde in verschiedenen Studien zum PathoProof Mastitis PCR Assay	122
Tabelle 44: Ergebnisse der mikrobiologisch-kulturellen Diagnostik in verschiedenen Studien (vgl. Tabelle 43) zum PathoProof Mastitis PCR Assay	123
Tabelle 45: Vergleich der PathoProof Mastitis PCR Assay-Ergebnisse unterschiedlicher Labore zu identischen Proben	165
Tabelle 46: Ergebnisse der Sequenzierung im Vergleich mit anderen Detektionsmethoden	172

8.4 Literaturverzeichnis

Ahrholdt, J., & Roesler, U. (2011). Genotypische Differenzierung von *Prototheca*-Isolaten aus Milchproben mastitiskranker Rinder in Deutschland. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 124(3/4), 108-113. doi: 10.2376/0005-9366-124-108

Aitken, S. L., Corl, C. M., & Sordillo, L. M. (2011). Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 291-304. doi: 10.1007/s10911-011-9230-4

Akers, R. M., & Nickerson, S. C. (2011). Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 275-289. doi: 10.1007/s10911-011-9231-3

Annemüller, C., Lämmler, C., & Zschök, M. (1999). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 69, 217-224.

Aouay, A., Coppée, F., Cloet, S., Cuvelier, P., Belayew, A., Lagneau, P. E., & Mullender, C. (2008). Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 18(4), 224-227. doi: 10.1016/j.mycmed.2008.10.002

Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Collins, M. D. (1991). Comparative Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and Related Species on the Basis of Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. *Intern J Syst Bacteriol*, 41(3), 343-346.

Azzari, C., Moriondo, M., Indolfi, G., Cortimiglia, M., Canessa, C., Becciolini, L. et al. (2010). Realtime PCR Is More Sensitive than Multiplex PCR for Diagnosis and Serotyping in Children with Culture Negative Pneumococcal Invasive Disease *PLoS One*, 5(2), e9282. doi: doi:10.1371/journal.pone.0009282

Baird, S. C., Carman, J., Dinsmore, R. P., Walker, R. L., & Collins, J. K. (1999). Detection and Identification of *Mycoplasma* from Bovine Mastitis Infections Using a Nested Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(5), 432-435. doi: 10.1177/104063879901100507

- Ball, H. J., & Nicholas, R. A. J.** (2010). *Mycoplasma bovis*-associated disease: Here, there and everywhere. *J Vet*, 186, 280 - 281. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.02.00210.1016/j.tvjl.2009.10.008
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N.** (2006). Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J Dairy Sci*, 89, 1877 - 1895.
- Barlow, J.** (2011). Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 383-407. doi: 10.1007/s10911-011-9235-z
- Barreiro, J. R., Braga, P. A. C., Ferreira, C. R., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B. et al.** (2012). Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. *Proteomics*, 12(17), 2739-2745. doi: 10.1002/pmic.201200053
- Bean, A., Williamson, J., & Cursons, R. T.** (2004). Virulence Genes of Escherichia coli Strains Isolated from Mastitic Milk.pdf>. *J Vet Med B*, 51, 285 - 287.
- Bengtsson, B., Unnerstad, H. E., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M., & Waller, K. P.** (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol*, 136(1-2), 142-149. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.024
- Bes, M., Guerin-Fauble, V., Mugnier, H., Etienne, J., & Freney, J.** (2000). Improvement of the identification of *staphylococci* isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet Microbiol*, 71, 287-294.
- Bexiga, R., Koskinen, M. T., Holopainen, J., Carneiro, C., Pereira, H., Ellis, K. A., & Vilela, C. L.** (2011). Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *J Dairy Res*, 78(1), 49-55. doi: 10.1017/S0022029910000725
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., & Prod'hom, G.** (2010a). Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory *J Clin Microbiol*, 48(5), 1549-1554. doi: 10.1128/JCM.01794-09

Bizzini, A., & Greub, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*, 16, 1614 - 1619.

Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: an Evolving Disease. *Vet J*, 164, 116-128.

Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., & Duchateau, L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res*, 34(5), 521-564. doi: 10.1051/vetres:2003023

Bustin, S. A. (2004). *Quantification of nucleic acids by PCR*. A-Z Manual of Quantitative PCR.

Capurro, A., Aspan, A., Ericsson Unnerstad, H., Persson Waller, K., & Artursson, K. (2010). Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *J Dairy Sci*, 93(1), 180-191. doi: 10.3168/jds.2009-2471

Caraguel, C. G., Stryhn, H., Gagne, N., Dohoo, I. R., & Hammell, K. L. (2011). Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest*, 23(1), 2-15. doi: 10.1177/104063871102300102

Cederlöf, S. E., Toft, N., Aalbaek, B., & Klaas, I. C. (2012). Latent class analysis of the diagnostic characteristic of PCR and conventional bacteriological culture in diagnosing intramammary infections caused by *Staphylococcus aureus* in dairy cows at dry off. *Acta Vet Scand*, 54(65).

Chaffer, M., Friedman, S., Saran, A., & Younis, A. (2005). An outbreak of *Streptococcus canis* mastitis in a dairy herd in Israel. *N Z Vet J*, 53(4), 261-264. doi: 10.1080/00480169.2005.36557

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 69(2), 330-339. doi: 10.1016/j.mimet.2007.02.005

Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., & Schrenzel, J. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*, 48(4), 1169-1175. doi: 10.1128/JCM.01881-09

Clarridge, J. E., 3rd. (2004). Impact of 16S rRNA Gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17(4), 840-862, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

Contreras, G. A., & Rodriguez, J. M. (2011). Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 339-356. doi: 10.1007/s10911-011-9234-0

Conway, G. C., Smole, S. C., Sarracino, D. A., Arbeit, R. D., & Leopold, P. E. (2001). Phyloproteomics - species identification of Enterobacteriaceae using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol*.

Crist, W. L., Harmon, R. J., O'Leary, J., & McAllister, A. J. (1998). Mastitis and its control. Retrieved 28.01.2013, from <http://www2.ca.uky.edu/agc/pubs/asc/asc140/asc140.pdf>

Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 36(2), 380-407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x

De Kruif, A., Mansfeld, R., & Hoedemaker, M. (2007). Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind: *Enke*.

De Vliegher, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H. W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci*, 95(3), 1025-1040. doi: 10.3168/jds.2010-4074

Dhiman, N., Hall, L., Wohlfel, S. L., Buckwalter, S. P., & Wengenack, N. L. (2011). Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol*, 49(4), 1614-1616. doi: 10.1128/JCM.02381-10

Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R. A., Oliver, S. P., Simpson, K., & Schukken, Y. H. (2006). Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 116(4), 270-282. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.023

DVG e. V, & Fachgruppe "Milchhygiene" Sachverständigenausschuss "Subklinische Mastitis". (1994). Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Retrieved 18.12.2012, from DVG e. V

Edmondson, P. (2010). Blitz therapy and *Streptococcus agalactiae*. *Vet Rec*, 166(11), 342. doi: 10.1136/vr.c1397

Fehlings, K., Zschöck, M., Baumgärtner, B., Geringer, M., Hamann, J., Knappstein, K., & DVG e. V, F. M. S. S. M. (2009). Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern (Vol. 2.). Gießen: DVG e. V.

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., & Jurtshuk, P. (1992). How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *Intern J Syst Bacteriol*, 42(1), 166-170.

Fox, L. K., Kirk, J. H., & Britten, A. (2005). *Mycoplasma* Mastitis - a Review of Transmission and Control. *J Vet Med B*, 52, 153 - 160.

Ghazaei, C. (2006). Mycoplasmal mastitis in dairy cows in the Moghan region of Ardabil State, Iran. *Tydskr S Afr vet Ver*, 77(4), 222 - 223.

Gillespie, B. E., Headrick, S. I., Boonyayatra, S., & Oliver, S. P. (2009). Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet Microbiol*, 134(1-2), 65-72. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.007

Gillespie, B. E., & Oliver, S. P. (2005). Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Dairy Sci*, 88, 3510 - 3518.

Gonzalez, R. N., & Wilson, D. J. (2003). Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 19, 199-221.

Gröhn, Y. T., Wilson, D. J., Gonzalez, R. N., Hertl, J. A., Schulte, H., Bennett, G., & Schukken, Y. H. (2004). Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 87, 3358 - 3374.

Higuchi, H., Iwano, H., Kawai, K., Ohta, T., Obayashi, T., Hirose, K. et al. (2011). A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. *J Vet Sci*, 12(2), 191-193. doi: 10.4142/jvs.2011.12.2.191

Hill, P. J., & Stewart, G. S. A. B. (1992). The Polymerase Chain reaction in Molecular and Micro-Biology. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 10, 343 - 377.

Hillerton, J. E., & Berry, E. A. (2003). The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim*, 19, 157-169.

Hillerton, J. E., & Berry, E. A. (2005). Treating mastitis in the cow--a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol*, 98(6), 1250-1255. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02649.x

Hogan, J., & Committee, N. R. (1987). Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis: 1987: *National Mastitis Council*.

Hogan, J., & Smith, L. K. (2003). Coliform mastitis. *Vet Res*, 34(5), 507-519. doi: 10.1051/vetres:2003022

Hogeveen, H., Huijps, K., & Lam, T. J. (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. *N Z Vet J*, 59(1), 16-23. doi: 10.1080/00480169.2011.547165

Huijps, K., Lam, T. J., & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res*, 75(1), 113-120. doi: 10.1017/S0022029907002932

Ito, T., Kano, R., Sobukawa, H., Ogawa, J., Honda, Y., Hosoi, Y. et al. (2011). Experimental Infection of Bovine Mammary Gland with *Prototheca zopfii* Genotype 1. *J Vet Med Sci*, 73(1), 117 - 119.

Jagielski, T., & Lagneau, P. E. (2007). Protothecosis. A pseudofungal infection. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 17(4), 261-270. doi: 10.1016/j.mycmed.2007.08.003

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45(9), 2761-2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07

Janosi, S., Ratz, F., Szigeti, G., Kulcsar, M., Kerenyi, J., Lauko, T. et al. (2001). Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet Q*, 23(2), 58-61. doi: 10.1080/01652176.2001.9695082

Justesen, U. S., Skov, M. N., Knudsen, E., Holt, H. M., Sogaard, P., & Justesen, T. (2010). 16S rRNA Gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol*, 48(3), 946-948. doi: 10.1128/JCM.02075-09

Katholm, J., Bennedsgaard, T. W., Koskinen, M. T., & Rattenborg, E. (2012). Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 95(10), 5702-5708. doi: 10.3168/jds.2011-5307

Keane, O. M., Budd, K. E., Flynn, J., & McCoy, F. (2013). Increased detection of mastitis pathogens by Real-Time PCR compared to bacterial culture. *Vet Rec*, 173(11), 268. doi: 10.1136/vr.101598

Keefe, G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Can Vet J*, 38, 429-437.

Khan, I. U., Hassan, A. A., Abdulmawjood, A., Lämmler, C., Wolter, W., & Zschök, M. (2003). Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J Vet Sci*, 4(3), 213-223.

Kirst, E. (2008). Mastitiden rechtzeitig sanieren. *Prakt Tierarzt*, 89(7), 582-592.

Kishimoto, Y., Kano, R., Maruyama, H., Onozaki, M., Makimura, K., Ito, T. et al. (2010). 26S rDNA-Based Phylogenetic Investigation of Japanese Cattle-Associated *Prototheca-zopfii* Isolates. *J Vet Med Sci*, 72(1), 123 - 126.

Koskinen, M. T., Holopainen, J., Pyorala, S., Bredbacka, P., Pitkala, A., Barkema, H. W. et al. (2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 92(3), 952-959. doi: 10.3168/jds.2008-1549

Koskinen, M. T., Wellenberg, G. J., Sampimon, O. C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L. et al. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci*, 93(12), 5707-5715. doi: 10.3168/jds.2010-3167

Krömker, V. (2009). Klinische Mastitiden als Bestandsproblem - nichttherapeutische Maßnahmen. *Prakt Tierarzt*, 90(9), 865 - 871.

Krömker, V., & Bruckmaier, R. M. (2007). Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene: *Parey*.

Krömker, V., & Friedrich, J. (2011). Empfehlungen zum diagnostischen Aufwand im Rahmen der Mastitisbekämpfung auf Bestandsebene. *Prakt Tierarzt*, 92(6), 516 - 524.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K. et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 95-125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007

Lam, T. J. G. M., Olde Riekerink, R. G. M., Sampimon, O. C., & Smith, H. (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Ir Vet J*, 62 Supplement, 34 - 39.

Laub, B. (2011). Untersuchung zur Häufigkeit von *Klebsiella* spp.-Mastitiden bei Kühen in Schleswig-Holstein und Niedersachsen. *Prakt Tierarzt*, 92(5), 426 - 429.

Leigh, J. A. (1999). *Streptococcus uberis* - a permanent barrier to the control of bovine mastitis. *Vet J*, 157, 225-238.

Lopes, M. M., Ribeiro, R., Carvalho, D., & Freitas, G. (2008). In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 18(4), 205-209. doi: 10.1016/j.mycmed.2008.09.001

- Marques, S., Silva, E., Carnevalheira, J., & Thompson, G.** (2006). In Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* Isolated from Bovine Mastitis. *J Dairy Sci*, 89, 4202 - 4204.
- Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G.** (2001). Development of a PCR assay for identification of *staphylococci* at genus and species levels. *J Clin Microbiol*, 39(7), 2541-2547. doi: 10.1128/JCM.39.7.2541-2547.2001
- Mashimo, K., Nagata, Y., Kawata, M., Iwasaki, H., & Yamamoto, K.** (2004). Role of the RuvAB protein in avoiding spontaneous formation of deletion mutations in the *Escherichia coli* K-12 endogenous tonB gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(1), 197-203. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.078
- McDonald, W. L., Fry, B. N., & Deighton, M. A.** (2005). Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Vet Microbiol*, 111(3-4), 241-246. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.012
- McDougall, S., Hussein, H., & Petrovski, K.** (2013). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *N Z Vet J*, 1-9. doi: 10.1080/00480169.2013.843135
- McDougall, S., Parkinson, T. J., Leyland, M., Anniss, F. M., & Fenwick, S. G.** (2004). Duration of infection and Strain Variation in *Streptococcus uberis* isolated from Cows' milk. *J Dairy Sci*, 87, 2062 - 2072.
- Mignard, S., & Flandrois, J. P.** (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods*, 67(3), 574-581. doi: 10.1016/j.mimet.2006.05.009
- Moller, A., Truyen, U., & Roesler, U.** (2007). *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet Microbiol*, 120(3-4), 370-374. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.10.039
- Munoz, M. A., Ahlström, C., Rauch, B. J., & Zadoks, R. N.** (2006). Fecal Shedding of *Klebsiella pneumoniae* by Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 89, 3425 - 3430.
- Munoz, M. A., & Zadoks, R. N.** (2007). Short Communication: Patterns of Fecal Shedding of *Klebsiella* by Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 90, 1220 - 1224.

Murugaiyan, J., Ahrholdt, J., Kowbel, V., & Roesler, U. (2012). Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. *Clin Microbiol Infect*, 18, 461 - 467.

Mweu, M. M., Toft, N., Katholm, J., & Nielsen, S. S. (2012). Evaluation of two herd-level diagnostic tests for *Streptococcus agalactiae* using a latent class approach. *Vet Microbiol*, 159(1-2), 181-186. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.037

Nicholas, R. A. (2011). Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Vet Rec*, 168(17), 459-462. doi: 10.1136/vr.d2468

Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2011). MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Anal Bioanal Chem*, 399(10), 3491-3502. doi: 10.1007/s00216-011-4728-6

Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2012). Detection and quantification of bacterial spoilage in milk and pork meat using MALDI-TOF-MS and multivariate analysis. *Anal Chem*, 84(14), 5951-5958. doi: 10.1021/ac300582d

Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A. M., Ali-Vehmas, T., Seppala, A. et al. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet Microbiol*, 124(3-4), 329-339. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.05.015

NMC. (1999). Laboratory handbook on bovine mastitis: *National Mastitis Council*.

NMC. (2004). Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality (4 ed.): *National Mastitis Council*.

O'Grady, L., & Doherty, M. (2009). Focus on Bovine Mastitis: Knowledge into Practice. *Ir Vet J*, 62(4), 258.

Ohnishi, M., Sawada, T., Hirose, K., Sato, R., Hayashimoto, M., Hata, E. et al. (2011). Antimicrobial susceptibilities and bacteriological characteristics of bovine *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates from mastitis. *Vet Microbiol*, 154(1-2), 202-207. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.023

- Oliver, S. P., Murinda, S. E., & Jayarao, B. M.** (2011). Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog Dis*, 8(3), 337-355. doi: 10.1089/fpd.2010.0730
- Osumi, T., Kishimoto, Y., Kano, R., Maruyama, H., Onozaki, M., Makimura, K. et al.** (2008). Prototheca zopfii genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet Microbiol*, 131(3-4), 419-423. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.012
- Parisi, D., Magliulo, M., Nanni, P., Casale, M., Forina, M., & Roda, A.** (2008). Analysis and classification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and a chemometric approach. *Anal Bioanal Chem*, 391(6), 2127-2134. doi: 10.1007/s00216-008-2161-2
- Petersson-Wolfe, C. S., Adams, S., Wolf, S. L., & Hogan, J. S.** (2008). Genomic typing of enterococci isolated from bovine mammary glands and environmental sources. *J Dairy Sci*, 91(2), 615-619. doi: 10.3168/jds.2007-0253
- Petersson-Wolfe, C. S., & Currin, J.** (2012). *Streptococcus dysgalactiae*: A practical Summary for Controlling Mastitis. Retrieved 08.02.2013, from http://www.pubs.ext.vt.edu/DASC/DASC-5P/DASC-5P_pdf.pdf
- Petersson-Wolfe, C. S., Wolf, S. L., & Hogan, J. S.** (2009). Experimental challenge of bovine mammary glands with *Enterococcus faecium* during early and late lactation. *J Dairy Sci*, 92(7), 3158-3164. doi: 10.3168/jds.2008-1755
- Phuektes, P., Browning, G. F., Anderson, G., & Mansell, P. D.** (2003). Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *Journal of Dairy Research*, 70(2), 149-155. doi: 10.1017/s0022029903006010
- Phuektes, P., Mansell, P. D., & Browning, G. F.** (2001a). Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci*, 84, 1140 - 1148.
- Phuektes, P., Mansell, P. D., Dyson, R. S., Hooper, N. D., Dick, J. S., & Browning, G. F.** (2001b). Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Isolates from Dairy Cows with Mastitis. *J Clin Microbiol*, 39(4), 1460-1466.

Piepers, S., De Meulemeester, L., de Kruif, A., Opsomer, G., Barkema, H. W., & De Vliegheer, S. (2007). Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res*, 74(4), 478-483. doi: 10.1017/S0022029907002841

Piepers, S., Opsomer, G., Barkema, H. W., de Kruif, A., & De Vliegheer, S. (2010). Heifers infected with coagulase-negative *staphylococci* in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than noninfected heifers. *J Dairy Sci*, 93(5), 2014-2024. doi: 10.3168/jds.2009-2897

Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supre, K., Braem, G., Van Nuffel, A. et al. (2011). Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J Dairy Sci*, 94(6), 2933-2944. doi: 10.3168/jds.2010-3956

Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine Mastitis in Finland 2001 - Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *J Dairy Sci*, 87, 2433 - 2441.

Pyorala, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*, 34(5), 565-578. doi: 10.1051/vetres:2003026

Pyorala, S. (2008). Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 43 Suppl 2, 252-259. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01170.x

Pyorala, S., & Taponen, S. (2009). Coagulase-negative *staphylococci*-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*, 134(1-2), 3-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.015

Reddy, C. A., Cornell, C. P., & Fraga, A. M. (1982). Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the Genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 32(4), 419-429.

Reksen, O., Solverod, L., Branscum, A. J., & Osteras, O. (2006). Relationships Between Milk Culture Results and Treatment for Clinical Mastitis or Culling in Norwegian Dairy Cattle. *J Dairy Sci*, 89, 2928 - 2937.

Reuter, P. (2004). Springer Lexikon Medizin (Vol. 1. (10.03.2004)): Springer.

Ribeiro, M. G., Motta, R. G., Paes, A. C., Allendorf, S. D., Salerno, T., Siqueira, A. K. et al. (2008). Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 60(2), 485 - 488.

Ricchi, M., Goretti, M., Branda, E., Cammi, G., Garbarino, C. A., Turchetti, B. et al. (2010). Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. *J Dairy Sci*, 93(10), 4625-4631. doi: 10.3168/jds.2010-3178

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., & Lagace, J. (2001). Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol*, 39(7), 2584-2589. doi: 10.1128/JCM.39.7.2584-2589.2001

Roberson, J. R. (1999). The Epidemiology of *Staphylococcus Aureus* on Dairy Farms. *NMC Annual Meeting Proceedings*, 38.

Roesler, U. (2003). Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(4), 1195-1199. doi: 10.1099/ijls.0.02556-0

Roesler, U., & Hensel, A. (2003). Longitudinal Analysis of *Prototheca zopfii*-specific Immune Responses: Correlation with Disease Progression and Carriage in Dairy Cows. *J Clin Microbiol*, 41(3), 1181-1186.

Ruegg, P. L. (2003). Investigation of mastitis problems on farms. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19(1), 47-73. doi: 10.1016/s0749-0720(02)00078-6

Rysanek, D., Zouharova, M., & Babak, V. (2009). Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. *J Dairy Res*, 76(1), 117-123. doi: 10.1017/S0022029908003816

Sachse, K., Salam, H. S., Diller, R., Schubert, E., Hoffmann, B., & Hotzel, H. (2010). Use of a novel Real-Time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet J*, 186(3), 299-303. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.008

Satoh, K., Ooe, K., Nagayama, H., & Makimura, K. (2010). *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 5), 1236-1240. doi: 10.1099/ijms.0.016402-0

Sawant, A. A., Gillespie, B. E., & Oliver, S. P. (2009). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet Microbiol*, 134(1-2), 73-81. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.006

Scaccabarozzi, L., Turchetti, B., Buzzini, P., Pisoni, G., Bertocchi, L., Arrigoni, N. et al. (2008). Short communication: isolation of *Prototheca* species strains from environmental sources in dairy herds. *J Dairy Sci*, 91(9), 3474-3477. doi: 10.3168/jds.2008-1115

Schleifer, K. H., & Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 34(1), 31-34.

Schubert, S., & Wieser, A. (2010). MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum*, 16(7), 760 - 762.

Schubert, S., & Wieser, A. (2011). Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik/Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiological routine diagnostics. *LaboratoriumsMedizin*, 35(4), 195-203. doi: 10.1515/jlm.2011.031

Schubert, S., & Wieser, A. (2013). Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum*, 19(7), 743-747. doi: 10.1007/s12268-013-0386-x

Sears, P. M., & McCarthy, K. K. (2003a). Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19(1), 93-108. doi: 10.1016/s0749-0720(02)00074-9

Sears, P. M., & McCarthy, K. K. (2003b). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 19(1), 171-185. doi: 10.1016/s0749-0720(02)00079-8

Seker, E. (2010). Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia*, 169(4), 303-308. doi: 10.1007/s11046-009-9255-z

Selbitz, H. J., Truyen, U., & Valentin-Weigand, P. (2013). Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre: *Enke*.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49(4), 543-551. doi: 10.1086/600885

Silvenoinen, M., Holopainen, J., & Koskinen, M. T. (2010). PathoProof Mastitis PCR Assay and Sensitivity Validation of a New Test Kit for rapid Identification of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Mycoplasma bovis* from bovine milk. *NMC Annual Meeting Proceedings*, 240-241.

Smith, K. L., Hillerton, J. E., & Harmon, R. J. (2001). Guidelines on normal and abnormal raw milk based on somatic cell counts and signs of clinical Mastitis: *National Mastitis Council*.

Smith, K. L., & Hogan, J. S. (2008). Environmental Mastitis: Know your Opponent. *NMC Regional Meeting Proceedings*, 1 - 7.

Smith, K. L., Todhunter, D. A., & Schoenberger, P. S. (1985). Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention. *J Dairy Sci*, 68(6), 1531 - 1553.

Sol, J., Sampimon, O. C., Barkema, H. W., & Schukken, Y. H. (2000). Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci*, 83, 278-284.

Sordillo, L. M. (2011). New concepts in the causes and control of mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 271-273. doi: 10.1007/s10911-011-9239-8

Spittel, S., & Hoedemaker, M. (2012). Mastitis diagnosis in dairy cows using PathoProof real-time polymerase chain reaction assay in comparison with conventional bacterial culture in a Northern German field study. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 125(11/12), 494-502. doi: 10.2376/0005-9366-125-494

- Spohr, M., & Breitenwieser, F.** (2012). Vergleichende Untersuchungen zur Mastitisdiagnostik mittels Real-time-PCR und klassischer Bakteriologie. *Prakt Tierarzt*, 93(4), 342 - 350.
- Steensels, D., Verhaegen, J., & Lagrou, K.** (2011). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacteria and Yeasts in a Clinical Microbiological Laboratory: A Review. *Acta Clinica Belgica*, 66(4), 267-273. doi: 10.2143/acb.66.4.2062567
- Stipkovits, L., Somogyi, M., Asvanyi, B., Toth, A., & Szathmary, S.** (2013). Short communication: Role of *Mycoplasma arginini* in mastitis caused by *Streptococcus dysgalactiae*. *J Dairy Sci*, 96(3), 1661-1667.
- Struve, C., & Krogfelt, K. A.** (2004). Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ Microbiol*, 6(6), 584-590. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x
- Tan, K. E., Ellis, B. C., Lee, R., Stamper, P. D., Zhang, S. X., & Carroll, K. C.** (2012). Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol*, 50(10), 3301-3308. doi: 10.1128/JCM.01405-12
- Taponen, S., Bjorkroth, J., & Pyorala, S.** (2008). Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *J Dairy Res*, 75(4), 422-429. doi: 10.1017/S0022029908003312
- Taponen, S., & Pyorala, S.** (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol*, 134(1-2), 29-36. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.011
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., & Pyorala, S.** (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci*, 92(6), 2610-2617. doi: 10.3168/jds.2008-1729

Tenhagen, B.-A., Köster, G., Wallmann, J., & Heuwieser, W. (2006). Prevalence of Mastitis Pathogens and their Resistance against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci*, *89*, 2542 - 2551.

Tikofsky, L. L., & Zadoks, R. N. (2005). Cross-Infection Between Cats and Cows - Origin and Control of *Streptococcus canis* Mastitis in a Dairy Herd. *J Dairy Sci*, *88*, 2707 - 2713.

Turutoglu, H., Ercelik, S., & Ozturk, D. (2006). Antibiotic resistance of *staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy*, *50*, 41-45.

van de Peer, Y., Chapelle, S., & de Wachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*, *24*(17), 3381-3391.

van den Borne, B. H., van Schaik, G., Lam, T. J., & Nielen, M. (2010). Therapeutic effects of antimicrobial treatment during lactation of recently acquired bovine subclinical mastitis: two linked randomized field trials. *J Dairy Sci*, *93*(1), 218-233. doi: 10.3168/jds.2009-2567

van Veen, S. Q., Claas, E. C. J., & Kuijper, E. J. (2010). High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories *J Clin Microbiol*, *48*(3), 900-907. doi: 10.1128/JCM.02071-09

Volling, O., & Krömker, V. (2008). Managementmaßnahmen zur Senkung der bovinen Mastitisinzidenzrate im milcherzeugenden Betrieb. *Dtsch Tierärztl Wschr*, *115*(11), 410-420. doi: 10.2376/0341-6593-115-410

Waller, K. P., Aspan, A., Nyman, A., Persson, Y., & Andersson, U. G. (2011). CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet Microbiol*, *152*(1-2), 112-116. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.006

Weber, P. D. H. (2010). Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 1: Grundlagen: *Behr*.

Welker, M., & Moore, E. R. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol*, *34*(1), 2-11. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.013

Werner, G., Fleige, C., Fessler, A. T., Timke, M., Kostrzewa, M., Zischka, M. et al. (2012). Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D *streptococci* from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Vet Microbiol*, 160(1-2), 162-169. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.019

Whitman, W. B., Parte, A., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E. et al. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer.

Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A. C., & Verhoef, J. (1995). Molecular Identification of Bacteria by Fluorescence-Based PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene. *J Clin Microbiol*, 33(10), 2601-2606.

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(3), 965-974. doi: 10.1007/s00253-011-3783-4

Winter, P. (2008). *Praktischer Leitfaden Mastitis: Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand*. Parey.

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-Time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75 - 85.

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K.-Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 14, 908 - 934.

Yassin, A. F., Hupfer, H., Siering, C., & Schumann, P. (2011). Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnert et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(Pt 6), 1265-1274. doi: 10.1099/ijs.0.020032-0

Zadoks, R. N., & Fitzpatrick, J. L. (2009). Changing trends in mastitis. *Ir Vet J*, 62 Supplement, 59 - 70.

Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Oliver, S. P., & Schukken, Y. H. (2003). Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiology and Infection*, 130(2), 335-349. doi: 10.1017/s0950268802008221

Zadoks, R. N., Griffiths, H. M., Munoz, M. A., Ahlstrom, C., Bennett, G. J., Thomas, E., & Schukken, Y. H. (2011a). Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J Dairy Sci*, 94(2), 1045-1051. doi: 10.3168/jds.2010-3603

Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., & Schukken, Y. H. (2011b). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 357-372. doi: 10.1007/s10911-011-9236-y

Zuang, S., & Maddox, C. W. (2000). Cytotoxic activity of coagulase-negative *staphylococci* in bovine mastitis. *Infect Immun*, 68(3), 1102-1108.

9. Anhang

Tabelle 45: Vergleich der PathoProof Mastitis PCR Assay-Ergebnisse unterschiedlicher Labore zu identischen Proben

Probe (Form)	Detektierte Keime (mit CT-Wert)	
	TMO	Externes Labor
MAS 014 (Milch)	<i>Staphylococcus</i> sp. (16,5) <i>Staphylococcus aureus</i> (39,9) Hefe (37,7)	<i>Enterococcus</i> sp. (35,6) <i>Prototheca</i> sp. (30,9) <i>Staphylococcus</i> sp. (15,8) <i>blaZ</i> -Gen (38,9) Hefe (39,6)
MAS 014_1 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (34,8)	<i>Staphylococcus</i> sp. (29,8)
MAS 014_2 (Subkultur)	-	-
MAS 014_3 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (20,7)	<i>Staphylococcus</i> sp. (17,3) <i>Trueperella pyogenes</i> (37,8) <i>Staphylococcus aureus</i> (37,3)

Tabelle 45, Fortsetzung

Probe (Form)	Detektierte Keime (mit CT-Wert)	
	TMO	Externes Labor
MAS 027 (Milch)	<i>blaZ</i> -Gen (28,5) <i>Corynebacterium bovis</i> (28,7) <i>Enterococcus</i> sp. (39,2) Hefe (36,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (27,7) <i>Prototheca</i> sp. (36,3)	<i>blaZ</i> -Gen (30,6) <i>Corynebacterium bovis</i> (26,6) <i>Enterococcus</i> sp. (30,2) Hefe (31,3) <i>Staphylococcus aureus</i> (33,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (26,2)
MAS 027_1 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (29,2)	<i>Staphylococcus</i> sp. (25,6) <i>Streptococcus uberis</i> (34,9) <i>blaZ</i> -Gen (39,9) <i>Corynebacterium bovis</i> (37,5)
MAS 027_2 (Subkultur)	<i>Escherichia coli</i> (36,2) <i>Staphylococcus aureus</i> (20,3) <i>Staphylococcus</i> sp. (19,3)	<i>Enterococcus</i> sp. (35,8) <i>Escherichia coli</i> (29,7) <i>Staphylococcus aureus</i> (16,6) <i>Staphylococcus</i> sp. (15,8) <i>Streptococcus uberis</i> (32,7)

Tabelle 45, Fortsetzung

Probe (Form)	Detektierte Keime (mit CT-Wert)	
	TMO	Externes Labor
MAS 027_3 (Subkultur)	<i>Staphylococcus aureus</i> (32,2) <i>Staphylococcus</i> sp. (30,8) <i>Streptococcus uberis</i> (38,5) <i>Corynebacterium bovis</i> (37,3)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (27,1) <i>Streptococcus uberis</i> (31,9) <i>Enterococcus</i> sp. (38,5)
MAS 028 (Milch)	<i>blaZ</i> -Gen (28,1) <i>Staphylococcus</i> sp. (27,7)	<i>blaZ</i> -Gen (29,6) Hefe (33,0) <i>Staphylococcus</i> sp. (29,0)
MAS 028_1 (Subkultur)	<i>blaZ</i> -Gen (20,8) <i>Staphylococcus</i> sp. (20,6)	<i>blaZ</i> -Gen (17,9) <i>Staphylococcus aureus</i> (34,3) <i>Staphylococcus</i> sp. (17,5)
MAS 028_2 (Subkultur)	<i>blaZ</i> -Gen (20,9) <i>Staphylococcus</i> sp. (20,8)	<i>blaZ</i> -Gen (17,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (17,6) <i>Corynebacterium bovis</i> (37,7)

Tabelle 45, Fortsetzung

Probe (Form)	Detektierte Keime (mit CT-Wert)	
	TMO	Externes Labor
MAS 030 (Milch)	<i>blaZ</i> -Gen (32,1) Hefe (35,8) <i>Staphylococcus</i> sp. (26,6) <i>Corynebacterium bovis</i> (39,6)	<i>blaZ</i> -Gen (31,9) Hefe (38,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (25,7) <i>Trueperella pyogenes</i> (38,9) <i>Corynebacterium bovis</i> (37,5)
MAS 030_1 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (21,3) <i>blaZ</i> -Gen (39,0) <i>Corynebacterium bovis</i> (39,8)	<i>Staphylococcus</i> sp. (17,3) <i>Staphylococcus aureus</i> (38,3)
MAS 030_2 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (18,3) <i>blaZ</i> -Gen (39,8)	<i>Staphylococcus</i> sp. (14,9) <i>blaZ</i> -Gen (37,7) <i>Staphylococcus aureus</i> (38,5)
MAS 031 (Milch)	Hefe (38,5) <i>Staphylococcus</i> sp. (35,5) <i>Streptococcus uberis</i> (28,5)	 <i>Streptococcus uberis</i> (27,0)

Tabelle 45, Fortsetzung

Probe (Form)	Detektierte Keime (mit CT-Wert)	
	TMO	Externes Labor
MAS 031_1 (Subkultur)	<i>Escherichia coli</i> (32,5) <i>Staphylococcus aureus</i> (37,8) <i>Staphylococcus sp.</i> (36,6) <i>Streptococcus uberis</i> (22,8)	<i>Enterococcus sp.</i> (36,7) <i>Escherichia coli</i> (27,6) <i>Staphylococcus aureus</i> (33,2) <i>Staphylococcus sp.</i> (33,0) <i>Streptococcus uberis</i> (17,8)
MAS 033 (Milch)	<i>Escherichia coli</i> (16,1) <i>Corynebacterium bovis</i> (37,7)	<i>Escherichia coli</i> (14,9)
MAS 033_1 (Subkultur)	<i>Escherichia coli</i> (18,9)	<i>Escherichia coli</i> (14,1) <i>Staphylococcus aureus</i> (37,6)
MAS 034 (Milch)	<i>blaZ</i> -Gen (28,6) <i>Corynebacterium bovis</i> (32,5) Hefe (32,8) <i>Staphylococcus aureus</i> (34,0) <i>Staphylococcus sp.</i> (27,0) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (20,4) <i>Streptococcus uberis</i> (28,9)	<i>blaZ</i> -Gen (28,1) <i>Corynebacterium bovis</i> (29,0) Hefe (30,5) <i>Staphylococcus aureus</i> (32,5) <i>Staphylococcus sp.</i> (26,2) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (19,4) <i>Streptococcus uberis</i> (27,0) <i>Trueperella pyogenes</i> (38,6)

Tabelle 45, Fortsetzung

Probe (Form)	Detektierte Keime (mit CT-Wert)	
	TMO	Externes Labor
MAS 034_1 (Subkultur)	<i>Escherichia coli</i> (18,5) <i>Streptococcus uberis</i> (29,9)	<i>Escherichia coli</i> (13,5) <i>Streptococcus uberis</i> (24,9)
MAS 034_2 (Subkultur)	<i>Corynebacterium bovis</i> (37,2) <i>Staphylococcus</i> sp. (36,8) <i>Staphylococcus aureus</i> (39,7)	<i>blaZ</i> -Gen (34,5) <i>Corynebacterium bovis</i> (29,0)
MAS 051 (Milch)	<i>blaZ</i> -Gen (33,8) <i>Staphylococcus</i> sp. (33,4)	<i>blaZ</i> -Gen (31,2) <i>Staphylococcus</i> sp. (30,4)
MAS 051_1 (Subkultur)	<i>blaZ</i> -Gen (17,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (18,9)	<i>blaZ</i> -Gen (14,1) <i>Staphylococcus</i> sp. (15,6)
MAS 051_2 (Subkultur)	-	<i>Staphylococcus</i> sp. (36,4) Hefe (37,4)
MAS 052 (Milch)	<i>blaZ</i> -Gen (38,0) Hefe (37,9) <i>Staphylococcus</i> sp. (32,7) <i>Streptococcus uberis</i> (36,4)	<i>blaZ</i> -Gen (35,0) Hefe (35,2) <i>Staphylococcus</i> sp. (33,5)

Tabelle 45, Fortsetzung

Probe (Form)	Detektierte Keime (mit CT-Wert)	
	TMO	Externes Labor
MAS 052_1 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (18,3)	Hefe (36,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (14,5)
MAS 052_2 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (20,2)	Hefe (36,0) <i>Staphylococcus</i> sp. (16,9)
MAS 052_4 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (31,0)	<i>Staphylococcus</i> sp. (28,0) <i>Klebsiella</i> spp. (39,0)
MAS 057 (Milch)	<i>blaZ</i> -Gen (36,7) <i>Staphylococcus aureus</i> (27,9) <i>Staphylococcus</i> sp. (27,2)	<i>blaZ</i> -Gen (32,9) <i>Staphylococcus aureus</i> (26,3) <i>Staphylococcus</i> sp. (25,5)
MAS 057_1 (Subkultur)	<i>Staphylococcus</i> sp. (34,4)	<i>Staphylococcus</i> sp. (29,3)
MAS 057_2 (Subkultur)	<i>Staphylococcus aureus</i> (19,1) <i>Staphylococcus</i> sp. (18,1)	<i>blaZ</i> -Gen (34,5) <i>Staphylococcus aureus</i> (15,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (14,8)
MAS 057_3 (Subkultur)	<i>Staphylococcus aureus</i> (18,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (17,9)	<i>Staphylococcus aureus</i> (14,3) <i>Staphylococcus</i> sp. (14,2)
MAS 057_4 (Subkultur)	-	<i>Staphylococcus</i> sp. (38,4)

Tabelle 46: Ergebnisse der Sequenzierung im Vergleich mit anderen Detektionsmethoden

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 001_1	<i>Bacillus pumilus</i> 98,54 %	Mikrokokken + Streptokokken	<i>Bacillus pumilus</i> (2.232)	<i>Staphylococcus</i> sp. (26,0)
MAS 003_1	<i>Streptococcus pluranimalium</i> 99,72 %	Vergrünende Streptokokken	<i>Streptococcus hyovaginalis</i> (1.586)	<i>Corynebacterium bovis</i> (29,9)
MAS 005_1	<i>Corynebacterium bovis</i> 100 %	Kein Befund (kein Wachstum)	<i>Corynebacterium bovis</i> (2.338)	Ungenügend Material
MAS 013_1	<i>Citrobacter</i> sp. 100 %	Coliforme Keime	<i>Citrobacter freundii</i> (2.589)	Kein Befund
MAS 013_2	<i>Lysinibacillus</i> sp. 100 %	Coliforme Keime	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2.138)	<i>Enterococcus</i> sp. (30,0) <i>Escherichia coli</i> (23,8) <i>Staphylococcus</i> sp. (30,6)
MAS 014_1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> 100 %	Coliforme Keime	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2.016)	<i>Staphylococcus</i> sp. (29,8)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 014_2	<i>Citrobacter</i> sp. 100 %	Coliforme Keime	<i>Citrobacter freundii</i> (2.547)	Kein Befund
MAS 015_1	<i>Lysinibacillus</i> sp. 100 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (1.958)	<i>Escherichia coli</i> (34,5) <i>Staphylococcus</i> sp. (28,3)
MAS 016_3	<i>Staphylococcus aureus</i> 100 %	Vergrünende Streptokokken	<i>Staphylococcus aureus</i> (2.259)	Hefe (35,8) <i>Staphylococcus aureus</i> (17,0) <i>Staphylococcus</i> sp. (15,9) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (20,7) <i>Streptococcus uberis</i> (26,9)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 017_2	<i>Staphylococcus chromogenes</i> 99,87 %	Coliforme Keime	<i>Staphylococcus chromogenes</i> (2.359)	Hefe (33,6) <i>Escherichia coli</i> (23,7) <i>Staphylococcus sp.</i> (15,9)
MAS 020_1	<i>Escherichia coli</i> / <i>Shigella sp.</i> 100 %	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (2.432)	<i>Enterococcus sp.</i> (22,5) <i>Escherichia coli</i> (12,4)
MAS 021_1	<i>Escherichia coli</i> / <i>Shigella sp.</i> 100 %	<i>Escherichia coli</i> + Streptokokken	<i>Escherichia coli</i> (2.489)	<i>Enterococcus sp.</i> (26,9) <i>Escherichia coli</i> (13,4)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 024_1	<i>Escherichia coli</i> / <i>Shigella</i> sp. 100 %	<i>Escherichia coli</i> + Streptokokken	<i>Escherichia coli</i> (2.390)	<i>Enterococcus</i> sp. (20,3) <i>Escherichia coli</i> (13,1)
MAS 026_1	<i>Staphylococcus</i> sp. 100 %	Mikrokokken	<i>Staphylococcus xylosus</i> (2.242)	<i>blaZ</i> -Gen (20,5) <i>Staphylococcus</i> sp. (13,8)
MAS 027_1	<i>Macrocooccus caseolyticus</i> 100 %	Mikrokokken + vergrünende Streptokokken	<i>Macrocooccus caseolyticus</i> (1.951)	<i>Staphylococcus</i> sp. (25,6) <i>Streptococcus uberis</i> . (35,0)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 028_1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 100 %	Mikrokokken + vergrünende Streptokokken	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2.162)	<i>blaZ</i> -Gen (18,0) <i>Escherichia coli</i> (36,5) <i>Staphylococcus aureus</i> (34,4) <i>Staphylococcus sp.</i> (17,6)
MAS 029_1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 100 %	Mikrokokken	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2.309)	<i>blaZ</i> -Gen (16,0) <i>Staphylococcus sp.</i> (16,5)
MAS 030_1	<i>Staphylococcus simulans</i> 100 %	Mikrokokken	<i>Staphylococcus simulans</i> (2.267)	<i>Staphylococcus sp.</i> (18,0)
MAS 030_2	<i>Staphylococcus sciuri</i> 100 %	Mikrokokken	<i>Staphylococcus sciuri</i> (2.184)	<i>Staphylococcus sp.</i> (14,9)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 031_1	<i>Streptococcus uberis</i> 100 %	Streptokokken	<i>Streptococcus uberis</i> (2.433)	<i>Enterococcus</i> sp. (36,7) <i>Escherichia coli</i> (27,6) <i>Staphylococcus aureus</i> (33,2) <i>Staphylococcus</i> sp. (33,0) <i>Streptococcus uberis</i> (17,8)
MAS 034_1	<i>Escherichia coli</i> / <i>Shigella</i> sp. 100 %	<i>Escherichia coli</i> + vergrünende Streptokokken	<i>Escherichia coli</i> (2.443)	<i>Escherichia coli</i> (13,5) <i>Streptococcus uberis</i> (24,9)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 034_2	<i>Corynebacterium confusum</i> 99,66 %	<i>Escherichia coli</i> + vergrünende Streptokokken	<i>Corynebacterium confusum</i> (1.739)	<i>blaZ</i> -Gen (34,5) <i>Corynebacterium bovis</i> (29,0) <i>Staphylococcus</i> sp. (34,7)
MAS 036_1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> 100 %	Aerobe Sporenbildner	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (1.645)	<i>Staphylococcus</i> sp. (27,9)
MAS 040_2	<i>Staphylococcus succinus</i> 100 %	Vergrünende Streptokokken	<i>Staphylococcus succinus</i> (1.821)	<i>Staphylococcus</i> sp. (15,8) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (32,9) <i>Streptococcus uberis</i> (22,9)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 040_3	<i>Streptococcus uberis</i> 99,87 %	Vergrünende Streptokokken	<i>Streptococcus uberis</i> (2.652)	<i>Escherichia coli</i> (28,1) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (30,2) <i>Streptococcus uberis</i> (18,2)
MAS 042_1	<i>Staphylococcus aureus</i> 100 %	Mikrokokken + vergrünende Streptokokken	<i>Staphylococcus aureus</i> (2.519)	<i>Escherichia coli</i> (30,0) <i>Staphylococcus aureus</i> (13,7) <i>Staphylococcus sp.</i> (12,7) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (28,6)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 043_1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 100 %	Bacillen + coliforme Keime + <i>Escherichia coli</i> + Streptokokken	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2.561)	<i>Escherichia coli</i> (20,9) <i>Klebsiella</i> sp. (12,7) <i>Staphylococcus</i> sp. (32,3) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (30,5)
MAS 043_2	Kein Ergebnis	Bacillen + coliforme Keime + <i>Escherichia coli</i> + Streptokokken	<i>Bacillus cereus</i> (2.166)	<i>Enterococcus</i> sp. (24,5) <i>Escherichia coli</i> (14,7) <i>Klebsiella</i> sp. (11,1) <i>Streptococcus uberis</i> (25,7)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 044_1	Kein Ergebnis	Bacillen + coliforme Keime	<i>Staphylococcus sciuri</i> (2.169)	<i>Escherichia coli</i> (30,5) <i>Staphylococcus sp.</i> (15,5)
MAS 044_2	<i>Acinetobacter sp.</i> 100 %	Bacillen + coliforme Keime	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (2.366)	Hefe (32,6)
MAS 044_3	<i>Bacillus sp.</i> 100 %	Bacillen + coliforme Keime	<i>Bacillus thuringiensis</i> (1.940)	<i>Staphylococcus aureus</i> (34,8) <i>Staphylococcus sp.</i> (25,0) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (32,2)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 046_1	<i>Staphylococcus simulans</i> 99,32 %	Bacillen	<i>Staphylococcus condimenti</i> (1.661)	<i>Enterococcus</i> sp. (28,2) <i>Escherichia coli</i> (28,5) <i>Klebsiella</i> sp. (35,7) <i>Staphylococcus aureus</i> (32,9) <i>Staphylococcus</i> sp. (15,6) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (30,0)
MAS 046_3	<i>Bacillus</i> sp. 100 %	Bacillen	<i>Bacillus mycoides</i> (2.225)	<i>Enterococcus</i> sp. (26,8)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 048_2	<i>Staphylococcus sciuri</i> 100 %	Coliforme Keime	<i>Staphylococcus sciuri</i> (2.175)	<i>Escherichia coli</i> (30,2) <i>Staphylococcus aureus</i> (32,6) <i>Staphylococcus sp.</i> (16,9) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (30,6)
MAS 056_1	<i>Enterobacter sp.</i> 99,93 %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter cowanii</i> (1.932)	<i>blaZ-Gen</i> (35,3) <i>Staphylococcus sp.</i> (31,3)
MAS 056_2	<i>Lysinibacillus sp.</i> 100 %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (1.917)	<i>Staphylococcus sp.</i> (28,8)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 057_1	<i>Lysinibacillus</i> sp. 100 %	Coliforme Keime + Mikrokokken	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2.083)	<i>blaZ</i> -Gen (36,8) <i>Staphylococcus</i> sp. (29,3)
MAS 058_1	<i>Staphylococcus agnetis</i> 100 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Staphylococcus hyicus</i> (2.338)	<i>Staphylococcus</i> sp. (15,3)
MAS 071_2	<i>Kurthia gibsonii</i> 99,93 %	Coliforme Keime + vergrünende Streptokokken	<i>Aeromonas molluscorum</i> (1.384)	<i>Escherichia coli</i> (26,8)
MAS 072_1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> 100 %	Coliforme Keime	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (1.873)	<i>Escherichia coli</i> (28,8) <i>Staphylococcus</i> sp. (27,3)
MAS 072_4	<i>Corynebacterium variabile</i> 98,53 %	Coliforme Keime	<i>Corynebacterium variabile</i> (1.454)	Kein Befund

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 078_1	<i>Acinetobacter junii</i> 99,85 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Acinetobacter towneri</i> (1.981)	<i>Enterococcus</i> sp. (33,5) <i>Staphylococcus</i> sp. (32,1)
MAS 079_1	<i>Acinetobacter gernerii</i> 99,93 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Acinetobacter gernerii</i> (2.319)	Kein Befund
MAS 080_2	<i>Staphylococcus equorum</i> 100 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Staphylococcus equorum</i> (2.203)	<i>Enterococcus</i> sp. (32,4) <i>Staphylococcus</i> sp. (13,7)
MAS 080_3	<i>Enterococcus faecium</i> 99,93 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Wautersiella falsenii</i> (1.987)	<i>Enterococcus</i> sp. (18,4) <i>Staphylococcus</i> sp. (34,1)
MAS 081_1	<i>Vagococcus</i> sp 99,86 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Wautersiella falsenii</i> (1.773)	<i>Staphylococcus</i> sp. (36,2)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 081_2	<i>Enterobacter</i> sp. 100 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Enterobacter nimipressuralis</i> (2.109)	<i>Staphylococcus</i> sp. (34,6)
MAS 082_1	<i>Kurthia gibsonii</i> 99,66 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Arthrobacter sulfureus</i> (1.423)	<i>Enterococcus</i> sp. (36,0)
MAS 083_2	<i>Acinetobacter</i> sp. 98,39 %	Kein Befund (Begleitflora)	<i>Acinetobacter towneri</i> (1.683)	<i>Enterococcus</i> sp. (36,3) <i>Escherichia coli</i> (29,1)
MAS 094_2	<i>Corynebacterium variabile</i> 98,19 %	Streptokokken	<i>Corynebacterium variabile</i> (1.607)	Kein Befund
MAS 097_1	<i>Corynebacterium bovis</i> 99,85 %	Kein Befund (kein Wachstum)	<i>Corynebacterium bovis</i> (2.489)	<i>Corynebacterium bovis</i> (17,1)
MAS 099_1	<i>Corynebacterium stationis</i> 99,72 %	Kein Befund (kein Wachstum)	<i>Corynebacterium stationis</i> (2.195)	<i>Corynebacterium bovis</i> (29,2)

Tabelle 46, Fortsetzung

Probe	Ergebnisse			
	Sequenzierung	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchung	MALDI-TOF MS-Analytik	PathoProof Mastitis PCR Assay
MAS 105_1	<i>Staphylococcus kloosii</i> 100 %	<i>Staphylococcus aureus</i> + Streptokokken	<i>Staphylococcus xylosus</i> (1.492)	<i>blaZ</i> -Gen (32,8) <i>Staphylococcus aureus</i> (31,6) <i>Staphylococcus</i> sp. (14,8) <i>Streptococcus uberis</i> (26,2)
MAS 128_2	<i>Bacillus</i> sp. 99,93 %	Coliforme Keime	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1.356)	Kein Befund
MAS 130_2	<i>Enterococcus faecalis</i> 99,93 %	Coliforme Keime	<i>Enterococcus faecalis</i> (2.479)	<i>Enterococcus</i> sp. (14,5)
MAS 131_2.1	<i>Bacillus</i> sp. 100 %	Coliforme Keime	<i>Bacillus cereus</i> (1.744)	<i>Enterococcus</i> sp. (36,2)
MAS 133_3	<i>Bacillus</i> sp. 99,44 %	<i>Staphylococcus aureus</i> + Streptokokken	Kein Befund	Kein Befund

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die stetige Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Mein spezieller Dank geht an Frau Dr. Christina Hölzel, die durch fachliche Anregungen, Verbesserungsvorschläge und die sorgfältige Durchsicht maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Den Mitarbeitern des LGL danke ich für die Bereitstellung und Überlassung der Milchproben. Ein herzliches Dankeschön geht hier vor allem an Fr. Karola Grünwald und Fr. Barbara Wagner, die mir bei Fragen und Problemen stets weitergeholfen haben.

Weiterhin danken möchte ich meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte für mich hatten. Ganz besonderer Dank geht an Anne Mewes, Roman Meyer, Karolin Krüger, Cornelia Plötz, Sandra Maurer und Susanne Hensel.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, meinen Schwestern Heike und Lisa und meinem Freund Björn für die jahrelange Unterstützung, Motivation und Geduld danken.