

Untersuchungen zum Vorkommen und zur Persistenz koagulase-negativer Staphylokokken bei Milchziegen

Investigations on the occurrence and the persistence of coagulase-negative Staphylococci in goats

K. Aulrich¹ und K. Barth¹

Keywords: animal health, mastitis

Schlagwörter: Tiergesundheit, Mastitis

Abstract:

Intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci (CNS) in goats are increasing during the last few years and play an important role like as in dairy cows. The relevance of these microorganisms as potential udder pathogens are controversial discussed, but it has been proved that CNS plays an important role in the development of persistent subclinical mastitis. The aim of the present study was the investigation of the occurrence and the persistence of main pathogens in the dairy goat herd of the Institute of Organic Farming of the FAL in Trenthorst over three lactations. Therefore PCR methods based on specific 16S-23S ribosomal RNA spacer sequences, developed for detection of pathogens in cow's milk, should be tested for their application in goats. DNA used in PCR was isolated directly from milk without cultivation of the bacteria.

*The investigation shows that the developed primer systems are useful tools for the detection of CNS in goats. The main CNS in the investigated goat herd is *S. epidermidis*, *S. simulans* and *S. xylosum*. *S. epidermidis* and *S. simulans* are persistent over three lactations in some animals but not in all. The reasons for the different behaviour of the bacteria should be investigated in further studies.*

Einleitung und Zielsetzung:

Mastitis spielt bei Kleinwiederkäuern eine ähnlich große Rolle wie bei Milchkühen. Dabei hat der Anteil subklinischer Mastitiden hervorgerufen durch koagulase-negative Staphylokokken (CNS) in den letzten Jahren stark zugenommen (MORONI et al. 2005a), dennoch werden sie kontrovers diskutiert. Bei Milchziegen sind die am häufigsten vorkommenden Spezies nach BERGONIER et al. (2003) *Staphylococcus caprae*, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. chromogenes* und *S. simulans*.

Ziel der vorliegenden Studie ist zum einen die Erfassung und Differenzierung der in der Milchziegenherde des Institutes für ökologischen Landbau vorkommenden CNS und zum anderen die Untersuchung der Persistenz dieser Mastitiserreger über mehrere Laktationen, wobei molekularbiologische Methoden der Erregerdifferenzierung geprüft werden sollten.

Methoden:

Für die Untersuchungen standen 2003/2004 fünfundvierzig Milchziegen und 2005 sechzig Milchziegen der Rasse Bunte Deutsche Edelziege auf der Versuchsstation des Institutes für ökologischen Landbau in Trenthorst zur Verfügung. Die Tiere wurden im vierzehntägigen Abstand über die Laktationsverläufe der Jahre 2003-2005 beprobt,

¹Institut für ökologischen Landbau, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, 23847 Westerau, Trenthorst 32, Deutschland, k.aulrich@fal.de, k.barth@fal.de

wobei jeweils von beiden Euterhälfen sterile Proben der Anfangsgemelke entnommen wurden. Die Proben lagerten bis zur DNA-Analyse bei - 20°C.

Die Isolierung der Bakterien-DNA erfolgte ohne Kultivierung direkt aus der Milch nach Modifikation der Methode von TILSALA-TIMISJARVI et al. (2000). Nach Zentrifugation der Milch und zweimaligem Waschen mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) erfolgte der Aufschluss der Bakterienzellwände enzymatisch mit einer Kombination aus Mutanolysin und Lysostaphin. Anschließend wurde mit Proteinase K inkubiert. Die gewonnene und in PBS resuspendierte DNA wurde direkt in verschiedene PCR Reaktionen zum Nachweis der Mastitiserreger eingesetzt. Hierzu kamen Spacer-Sequenzen des 16S–23S rRNA-Genes zum Einsatz, die spezifisch für die einzelnen Erreger sind (TILSALA-TIMISJARVI et al. 2000). Die Primersequenzen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Primersequenzen zum spezifischen Nachweis von *Staphylococcus*-Spezies.

Spezies	5'-3'-Sequenz	Größe des PCR-Produktes (bp)
<i>S. epidermidis</i>	forward - TCT ACG AAG ATG AGG GAT A reversed - TTT CCA CCA TAT TTT GAA TTG T	240
<i>S. xylosus</i>	forward - CTC ATT GGA GTA TTC AGT GC reversed - CTT ACA GCT CCC CAA AGC AT	350
<i>S. simulans</i>	forward - ATT CGG AAC AGT TTC GCA G reversed - ATT GTG AGT AAT CGT TTG CC	220

Die folgenden PCR-Bedingungen, die mittels Gradientencycler für jede Spezies überprüft wurden, gelten für alle Spezies gleichermaßen: 15 min 95 °C (Verwendung einer Hot-Start-Polymerase) gefolgt von 40 Zyklen 95 °C für 30 s, 55 °C für 30 s, 72 °C für 30 s und einer abschließenden Schlussexension bei 72 °C für 10 min. Die PCR-Produkte wurden in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht, mit einer CCD-Kamera aufgenommen und ihre Größe mittels eines Größenmarkers bestimmt.

Parallel zu den molekularbiologischen Untersuchungen wurden einzelne Proben mikrobiologisch untersucht. Hierzu fand im ersten Schritt eine Kultivierung der Bakterien statt und anschließend die Identifizierung mit Hilfe des Testsystems API Staph (BioMerieux, Frankreich).

Ergebnisse und Diskussion:

Die Untersuchung der Milchziegenherde über 3 Jahre hat gezeigt, dass *S. epidermidis*, *S. simulans* und *S. xylosus* die am häufigsten vorkommenden Mastitiserreger sind, beispielhaft dargestellt in Abb. 1. Die Ergebnisse der PCR wurden durch die mikrobiologischen Identifizierungen bestätigt. Es zeigt sich, dass die Spacer-Sequenzen des 16S–23S rRNA-Genes geeignet sind, die Spezies-Identifizierung in Ziegenmilch erfolgreich durchzuführen, wobei die Isolierung der Bakterien-DNA direkt aus Milch erfolgreich war.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen stehen im Gegensatz zu den Aussagen von BERGONIER et al. (2003), der *S. caprae* als den am häufigsten in Milchziegenherden vorkommenden Erreger beschreibt. MORONI et al. (2005b) untersuchten 5 italienische Milchziegenherden und stellten dabei *S. epidermidis* ebenso als den wichtigsten CNS-Erreger fest, der in ihren Untersuchungen mit einer Häufigkeit von 38% auftrat.

Die Untersuchungen im Laktationsjahr 2005 ergaben bei 38% der Tiere einen spezifischen Nachweis von CNS direkt nach der Ablammung, dieses Ergebnis liegt im Mittel der bisher publizierten Daten, die eine Prävalenz von 25-93% beschreiben (MORONI

et al. 2005a,b, BERGONIER et al. 2003). Von den bei 38% der Tiere nachgewiesenen CNS entfielen 52% auf *S. epidermidis*, 48% auf *S. simulans* und 17% auf *S. xylosus*, wobei vier Tiere eine Mischinfektion mit *S. epidermidis* und *S. simulans* aufwiesen. Betrachtet man die gesamte Herde, so bedeutet dies, dass 20% der Tiere mit *S. epidermidis*, 18% mit *S. simulans* und 6,7% mit *S. xylosus* infiziert waren. Dreißig Tage *post partum* wurden bei 25% der Herde CNS nachgewiesen. Dies waren zu 87% *S. epidermidis* und zu 48% *S. simulans*, wobei bei 2 Tieren eine Mischinfektion dieser Erreger nachgewiesen wurde. Wiederum auf die Gesamtherde bezogen, waren 22% der Herde mit *S. epidermidis* und 5% mit *S. simulans* infiziert.

Betrachtet man die Ergebnisse über mehrere Laktationen, so zeigte sich bei einigen Tieren der Herde Persistenz der spezifischen Erreger über alle drei untersuchten Laktationsjahre, dies ist beispielhaft für *S. epidermidis* eines Tieres in Abb. 2 dargestellt. Persistenz wurde bisher nur für *S. epidermidis* und *S. simulans* nachgewiesen, nicht für *S. xylosus*. Die Persistenz der Erreger wurde allerdings nicht bei allen infizierten Tieren festgestellt, er wurde ebenso ein vollständiges Verschwinden der CNS beobachtet, das bis zum Ende der Laktation anhält. Die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Erreger und zwischen den Tieren sind noch nicht endgültig abgeklärt und bedürfen weiterer Auswertungen und Untersuchungen.

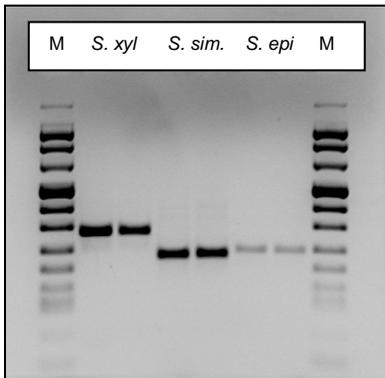


Abb. 1: Haupterreger in der Ziegenherde: *S. xylosus*, *S. simulans* und *S. epidermidis* (M : Marker).

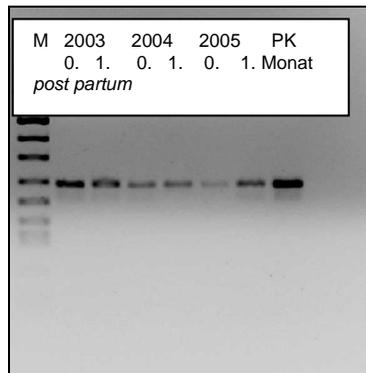


Abb. 2: *S. epidermidis* in Ziegenmilch über 3 Laktationen : 2003-2005 (M : Marker, 0. = direkt nach Ablammung, 1. = 30 Tage *post partum*).

Schlussfolgerungen:

Die häufigsten CNS in der untersuchten Milchziegenherde waren *S. epidermidis*, *S. simulans* und *S. xylosum*. Mit Hilfe der PCR der Spacer-Sequenzen des 16S-23S rRNA Genes ist es relativ einfach möglich, die Identifizierung der CNS auf Spezies-ebene vorzunehmen. Eine vorherige Kultivierung der Mastitiserreger kann durch die direkte Isolation von DNA aus Milch entfallen.

Bei einigen Tieren der Herde wurde Persistenz der spezifischen CNS beobachtet. Die Ursachen dieser bzw. die der vollständigen Heilung müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Danksagung:

Wir danken Dr. Karin Knapstein vom Institut für Hygiene und Produktsicherheit am Standort Kiel der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel für die mikrobiologische Identifizierung der Erreger.

Literatur:

Bergonier D., de Cremoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. (2003): Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* 34:689-716.

Moroni P., Pisoni G., Antonini M., Ruffo G., Carli S., Varisco G., Boettcher P. (2005a): Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *J Dairy Sci* 88:1694-1704.

Moroni P., Pisoni G., Ruffo G., Boettcher P. J. (2005b): Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. *Prev Vet Med* 69:163-173.

Tilsala-Timisjarvi A., Forsman P., Alatosava T. (2000): Bovine mastitis diagnosis from milk by a polymerase chain reaction-based method. *Milchwissenschaft* 55:488-492.

Archived at <http://orgprints.org/9687/>