

Universitätsklinik für Wiederkäuer¹, Universitätsklinik für Geflügel und Fische², Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, und Institut für Mikrobiologie³, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien

Nachweis von *Streptococcus agalactiae* Sequenztyp 1 in einem österreichischen Milchviehbetrieb – Ein Fallbericht

R. WALD¹, K. LICHTMANNSPERGER¹, V. URBANTKE¹, C. HESS², J. SPERGSER^{3#} und M. BAUMGARTNER^{1#}

Letztautorenschaft zu gleichen Teilen

eingelangt am 18. November 2019
angenommen am 18. April 2020

Schlüsselwörter: *Streptococcus agalactiae*, Mastitis, MHK, MLST, Sequenztyp 1.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, mastitis, MIC, MLST, sequence type 1.

Zusammenfassung

Streptococcus (Sc.) agalactiae gehört zu den klassischen kuhassoziierten Mastitiserregern. In der Humanmedizin gilt *Sc. agalactiae* als Kolonisierer im Verdauungs- und Urogenitaltrakt sowie Oropharynx, der vor allem bei Neugeborenen und immunsupprimierten Personen zu Infektionen mit schwerem klinischen Verlauf führen kann. In epidemiologischen Studien wird die Fragestellung behandelt, ob sich mastitisassoziierte Stämme der Kuh von humanen Stämmen unterscheiden, sowie ob eine horizontale Übertragung zwischen Kuh und Mensch möglich ist. Untersuchungen aus Skandinavien zeigten durch Sequenztypisierung eine enge Verwandtschaft von humanen und bovinen Isolaten. Für Österreich stehen bisher keine Daten zur Verfügung.

Im Herbst 2018 konnte bei insgesamt 14 Kühen eines Milchviehbetriebs (47 Holsteinkühe) im Rahmen einer bakteriologischen Untersuchung von Viertelgemelksproben *Sc. agalactiae* nachgewiesen werden. Die Feldisolate (n = 31) wurden phänotypisch charakterisiert und mittels MALDI-TOF MS bestätigt. Alle Feldisolate waren resistent gegenüber Pirlimycin, Clindamycin, Erythromycin sowie Tetrazyklin und nur 51,5 % (n = 16) konnten als empfindlich gegenüber Kanamycin/Cefalexin eingestuft werden. Alle Isolate zeigten sich empfindlich gegenüber den getesteten β -Laktamen. Die meisten *Sc. agalactiae*-Isolate (n = 30) konnten Laktose nicht fermentieren. Durch Multilokus-Sequenztypisierung wurden vier untersuchte Isolate dem Sequenztyp 1 (ST1) zugeordnet. Die Eintragsquelle von *Sc. agalactiae* in die Herde konnte nicht ermittelt werden. Der Betrieb wurde durch

Summary

Detection of *Streptococcus agalactiae* sequence type 1 in an Austrian dairy farm – A case report

Streptococcus (Sc.) agalactiae has always been considered a major contagious mastitis pathogen that primarily spreads from cow to cow. In humans, *Sc. agalactiae* may cause severe disease in neonates or immunocompromised adults and it colonizes the digestive and urinary tract or the oropharynx. Research in Scandinavia has shown no clear distinction between bovine and human *Sc. agalactiae* isolates. To date, there are no such data in Austria.

In the autumn of 2018, quarter milk samples of 14 cows in a dairy herd (47 Holstein cows) cultured positive for *Sc. agalactiae*. The herd had no history of mammary infections caused by *Sc. agalactiae*. Field isolates (n = 31) were phenotypically characterized and confirmed with MALDI-TOF MS. All isolates were resistant to pirlimycin, clindamycin, erythromycin and tetracyclin and only 16 isolates (51.5 %) were susceptible to kanamycin/cephalexin. All isolates were susceptible to β -lactams and most of them (n = 30) did not ferment lactose. Using multilocus sequence typing for four isolates, sequence type 1 (ST1) was identified. The source of *Sc. agalactiae* entry to the herd could not be detected. Eradication was successful with the implementation of proper milking hygiene, the culling of two cows and three days combined parenteral and intramammary treatment (blitz therapy, 12 cows) with penethamate hydriodide and penicillin.

*E-Mail: martina.baumgartner@vetmeduni.ac.at

strikte Melkhygiene, das Ausscheiden von zwei Tieren sowie durch eine kombiniert parenterale und intramammäre Behandlung aller zwölf therapiewürdigen Kühe (dreitägige Blitztherapie) mit Penethamathydrojodid und Penicillin G erfolgreich saniert.

Dieser Fallbericht beschreibt erstmals in Österreich den Nachweis eines *Sc. agalactiae*-Sequenztyps (ST1) als Ursache boviner Mastitiden, der auch beim Menschen nachgewiesen wurde. Da sowohl Rinder als auch Menschen zu den Wirten dieser Bakterien zählen, kann die Möglichkeit einer Übertragung zwischen Mensch und Tier nicht ausgeschlossen werden.

Abkürzungen: ATCC = American Type Culture Collection; BU = Bakteriologische Untersuchung; CAMP = Christie–Atkins–Munch–Peterson; CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute; CMT = California Mastitis Test; EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; GBS = Gruppe-B-Streptokokken; KBE = Koloniebildende Einheiten; LH = links hinten; LV = links vorne; MALDI-TOF MS = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry; MLST = Multilokus-Sequenztypisierung; RH = rechts hinten; RV = rechts vorne; SCC = Somatische Zellzahl/somatic cell count; *Sc.* = *Streptococcus*; ST = Sequenztyp; YOPI = young, old, pregnant, immunosuppressed

■ Einleitung

Streptococcus (Sc.) agalactiae gilt wie *Staphylococcus aureus* als kontagiöser, kuhassoziiertes Mastitiserreger (KEEFE, 2012). *Sc. agalactiae* wird den Lancefield-Gruppe-B-Streptokokken (GBS) oder „Galtstreptokokken“ zugeordnet. GBS verursachen vor allem subklinische Mastitiden und die Übertragung von Kuh zu Kuh erfolgt beim Melken. Es besteht grundsätzlich eine hohe Verbreitungs- und Ansteckungsgefahr (WINTER u. ZEHLE, 2008; BLOWEY u. EDMONDSON, 2010; BOTELHO et al., 2018). In den westlichen Ländern ist jedoch durch die Etablierung gezielter Kontrollprogramme die Anzahl der *Sc. agalactiae*-positiven Kühe in den letzten Jahrzehnten stark gesunken (BLOWEY u. EDMONDSON, 2010; JØRGENSEN et al., 2016; LYHS et al., 2016). Die Eradikation aus den Milchvieherden ist vor allem durch Einführung einer konsequenten Melkhygiene (Melkreihenfolge, Zitzenreinigung mit Einmaltüchern, Zitzendesinfektion nach dem Melken etc.) sowie durch standardisierte Therapiepläne (antibiotisches Trockenstellen, intramammäre Therapie aller infizierten Euterviertel, Ausscheidung chronisch infizierter Tiere) erzielt worden (KEEFE, 2012). So wurden in den letzten fünf Jahren im Milchlabor der Universitätsklinik für Wiederkäuer in Wien lediglich in ca. 0,6 % der bakteriologisch positiven Viertelgemelksproben (n = 27.815) Streptokokken der Lancefield-Gruppe B (n = 177) nachgewiesen.

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass nicht nur das Rindereuter sondern neben anderen Tierarten auch der Mensch als Reservoir für *Sc. agalactiae* fungieren kann: *Sc. agalactiae* gilt als Kolonisierer im menschlichen Verdauungs- und Urogenitaltrakt sowie Oropharynx und kann vor allem bei Risikogruppen („YOPI“ - young, old, pregnant, immunosuppressed) zu Infektionen mit schwerem klinischen Verlauf (Sepsis, Meningitis etc.) führen. Als Hauptansteckungsquelle

The results indicate that dairy herds in Austria can be infected with *Sc. agalactiae* sequence types that have been found in human samples, indicative of possible interspecies transmission.

für Rinder gilt die infizierte Milchdrüse, dennoch könnte die horizontale Übertragung von Mensch auf Kuh (und *vice versa*) ein weiterer möglicher Übertragungsweg sein. Dies wurde in epidemiologischen Untersuchungen unter Anwendung sequenzbasierter Erregertypisierungsverfahren dargestellt (SØRENSEN et al., 2010, 2019; LYHS et al., 2016; MORACH et al., 2018). Der vorliegende Fallbericht beschreibt den Ausbruch einer Galtmastitis in einem österreichischen Milchviehbetrieb, welcher durch einen artübergreifenden Sequenztyp verursacht wurde.

■ Beschreibung des Falls

Anamnese und Herdenstatus

Bei dem hier beschriebenen Bestand handelt es sich um einen konventionellen Nebenerwerbsbetrieb in Salzburg mit 47 Holstein-Kühen sowie 24 Kalbinnen (Ø 8.000 kg Milch/Kuh/Jahr). Im Frühjahr 2018 wurde eine kontinuierliche Erhöhung der Tankmilchzellzahl (geometrisches Mittel) von 119.000 Zellen/ml Milch (Keimzahl: 9.000 Keime/ml Milch Ende Januar) auf 370.000 Zellen im Juli ohne einen Anstieg der Fälle von klinischen Mastitiden beobachtet. Der Betrieb nimmt an keiner Milchleistungsprüfung teil, sodass keine Daten zu Einzeltieren verfügbar waren. Daraufhin wurden aseptisch entnommene Milchproben einer Kuh (Kuh A) in das Milchlabor der Universitätsklinik für Wiederkäuer zur bakteriologischen Untersuchung (BU) eingesandt. Laut Vorbericht war das rechte vordere Viertel klinisch erkrankt und die Zellzahl im California Mastitis Test (CMT) erhöht. Es konnte *Sc. agalactiae* auf zwei Vierteln (rechts vorne (RV) und links hinten (LH)) nachgewiesen werden. Zur Abklärung des Mastitisgeschehens auf Herdenebene wurde zwei Wochen später ein Bestandsbesuch durchgeführt, bei

welchem alle herdenrelevanten Daten inklusive Melk- und Hygienemanagement erhoben und alle laktierenden Kühe beprobt wurden.

Die Bestandserhebung ergab, dass die laktierenden Kühe in einem Boxenlaufstall mit Gussasphaltböden sowie Gummimatten gehalten werden und keinen Weidegang haben. Die Liegeboxen sind mit einer Stroh-Kalk-Mischung eingestreut. Die Trockensteher sind getrennt aufgestellt. Die Kalbinnen werden von Herbst bis Frühling in einem Tretmiststall gehalten. Abgesehen von deren Auftrieb auf eine Gemeinschaftsalm im Sommer, handelt es sich um eine geschlossene Betriebsführung (kein Zukauf oder Tierverkehr).

Der Betrieb führt vor dem Trockenstellen, nach dem Abkalben und während der Laktation bei Auffälligkeiten einen CMT durch, regelmäßige bakteriologische Untersuchungen wurden bisher jedoch nicht veranlasst. Das Trockenstellen erfolgt generell unter antibiotischem Schutz (Euterinjektor mit 100 mg Penethamathydrojodid, 280 mg Benethamin-Penicillin und 100 mg Framycetinsulfat, Benestermycin®).

Zum Zeitpunkt des Betriebsbesuches wurde die Milch von zwei Kühen aufgrund hoher Zellzahl im CMT nicht an die Molkerei geliefert. Der Betrieb nutzt einen Fischgrätenmelkstand. Vor dem Melken erfolgte die Reinigung der Euter trocken mit Holzwolle (mehrere Kühe/Portion Holzwolle). Die Standards der guten Melkhygiene und –arbeit wurden nur teilweise erfüllt (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2000): Eine Vormelkprüfung und eine Reinigung der Hände der beiden Melker erfolgte nicht. Beim Melken wurden keine Handschuhe getragen, keine Zwischendesinfektion der Melkbecher durchgeführt und auch keine Melkreihenfolge eingehalten. Eine Sitzendesinfektion und -dippen nach dem Melken fanden nicht statt.

Im Rahmen des Bestandsbesuchs wurden von allen zu diesem Zeitpunkt laktierenden Kühen ($n = 43$) Viertelgmelksproben aseptisch entnommen. Mit Ausnahme von einer klinisch erkrankten Kuh (Kuh N: erhöhte innere Körpertemperatur, Milchveränderung) konnten bei den anderen Tieren keine Symptome einer klinischen Eutererkrankung (wie Flocken in der Milch, Euterschwellung oder Fieber) und ein ungestörtes Allgemeinverhalten festgestellt werden.

Untersuchung der Viertelgmelksproben

Die bakteriologische Untersuchung der Milchproben und Erregeridentifizierung wurden nach den standardisierten Methoden des National Mastitis Councils (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017) mit der Modifikation des Sedimentausstrichs (ZECCONI et al., 1997) durchgeführt. Die somatische Zellzahl (SCC) in der Milch wurde mit dem DeLaval Zellzahlmessgerät DCC bestimmt und die bakterielle Ausscheidungsrate (koloniebildende Einheiten – KBE) mit der Plate Drop-Methode erhoben (MILES et al., 1938).

Es konnten bei insgesamt 14 Tieren (Kühe A-N, Tabelle 1) in 31 Vierteln grampositive, katalasenegative, β -hämolyisierende Kokken auf Columbia-Agar mit 5 % Schafblutzusatz kultiviert werden. Alle Isolate waren äskulin-negativ, wurden auf einem Enterokokken-Selektivagar mit Gallezusatz im Wachstum gehemmt, zeigten keine Blaufärbung auf dem modifizierten Rambachagar (WATTS et al., 1993) und wurden positiv auf den Faktor nach Christie–Atkins–Munch–Petersen (CAMP-Test) sowie die Lancefield-Gruppe B getestet. Nur eines (Kuh M/RV) der 31 Isolate konnte Laktose fermentieren (0,5%ige Laktose-Bouillon). Bei zwei Isolaten, die stellvertretend getestet wurden, ergab die biochemische Charakterisierung im API® RAPID ID 32 STREP eine 99,6%ige Übereinstimmung mit *Sc. agalactiae* (Kuh H/LH und Kuh J/LH API® CODE 15023011100). Alle Isolate wurden mittels Matrix assisted laser desorption ionization time of flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS, Details in WALD et al. (2019)) als *Sc. agalactiae* (log score values $\geq 2,0$) bestätigt. In den Milchproben der anderen Tiere der Herde ($n = 29$) wurde kein *Sc. agalactiae* nachgewiesen.

Die bakterielle Ausscheidungsrate von *Sc. agalactiae* betrug im arithmetischen Mittel $3,7 \cdot 10^5$ KBE/ml (Median $1,3 \cdot 10^4$ KBE/ml, Range $8,0 \cdot 10^2$ – $9,3 \cdot 10^6$ KBE/ml). In zwei Proben (Kuh I/RV und Kuh J/LH) konnte der Erreger erst nach einem Anreicherungsschritt (Inkubation von 50 μ l Milch in 2 ml CASO-Bouillon über 24 h und erneuter Ausstrich) nachgewiesen werden. Die SCC aller infizierten Viertel schwankte zwischen 48.000 und 1,8 Mio. Zellen/ml Milch (Mittelwert 436.000 Zellen/ml Milch, Median 327.000 Zellen/ml Milch). In der Milchprobe der Kuh N/RV wurde neben *Sc. agalactiae* auch *Escherichia coli* nachgewiesen, daher wurde diese Probe aus der SCC-Berechnung ausgeschlossen (Tabelle 1).

Die antibiotische Empfindlichkeitsprüfung der *Sc. agalactiae*-Isolate erfolgte für elf Wirkstoffe durch das kommerziell erhältliche Testsystem auf Basis der Bouillon-Mikrodilution „MICRONAUT-S Mastitis 3“ gemäß den Herstellerangaben sowie für sechs weitere Wirkstoffe mittels Agardiffusionstest gemäß CLSI- und EUCAST-Vorgaben (CLSI, 2018; EUCAST, 2019). Das antibiotische Profil aller Feldstämme war mit Ausnahme für die Wirkstoffkombination Kanamycin/Cefalexin identisch. Für GBS stehen im Gegensatz zu anderen mastitisassoziierten grampositiven katalasenegativen Kokken klinische Grenzwerte zur Beurteilung der antibiotischen Empfindlichkeit zur Verfügung (WALD et al., 2018). Alle Feldisolate zeigten sich unempfindlich gegenüber Pirlimycin und Clindamycin (Lincosamide), Erythromycin (Makrolid) sowie Tetrazyklin (Tetrazyklin). Weniger als 50 % ($n = 15$) wurden als sensibel gegenüber Kanamycin/Cefalexin klassifiziert. Eine gute Wirksamkeit wurde gegenüber den getesteten β -Laktam-Antibiotika beobachtet. Detaillierte Ergebnisse sowie die Interpretationskriterien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Informationen zu den infizierten Kühen (n = 14) und *Streptococcus agalactiae*-Isolaten (n = 31) des österreichischen Milchviehbetriebs: Laktationsdaten, Ergebnisse der antibiotischen Empfindlichkeitsprüfung, bakterielle Ausscheidungsrate und somatische Zellzahl der Milchproben / Information on infected cows (n = 14) and *Streptococcus agalactiae* (n = 31) isolated from an Austrian dairy herd: Stage of lactation, antimicrobial susceptibility testing, bacterial shedding and somatic cell count

Kuh	Laktationsdaten	Positives Viertel	Minimale Hemmkonzentration [μ l/ml]										
			Penicillin G	Ampicillin	Cefazolin	Cefoperazon	Cefquinom	Oxacillin	Amoxicillin/ Clavulansäure 2:1	Kanamycin/ Cefalexin 10:1	Marbofloxacin	Erythromycin	Pirlimycin
A	L.4 Tg.224	RV*	$\leq 0,125$	≤ 4	≤ 4	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 4/2$	16/1,6	2	> 4	> 4
		LH											
B	L.3 Tg.169	RV*											
		LV											
C	L.4 Tg.490	RV											
		RV											
D	L.2 Tg.455	LV											
		LH											
E	L.7 Tg.516	RV											
		RH											
		LV											
F	L.5 Tg.256	LH											
		RV											
		LV											
G	L.3 Tg.95	RV											
		LH											
H	L.3 Tg.283	RV											
		RH											
		LH											
I	L.5 Tg.196	RV											
J	L.8 Tg.154	RH											
		LH											
K	L.2 Tg.246	RV											
		LV											
L	L.5 Tg.471	RV											
		LV											
		LH											
M	L.2 Tg.187	RV*											
		LV											
N	L.3 Tg.1	RV											
		RH*											
MHK₉₀			$\leq 0,125$	≤ 4	≤ 4	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 4/2$	16/1,6	2	> 4	> 4
Angewendeter Grenzwert			$S \leq 0,12^a$	Siehe Penicillin G ($S \leq 0,25$) ^{a,b}	Siehe Penicillin G ^{a,b}	$S \leq 2$ I4 $R \geq 8^c$	Siehe Penicillin G ^b	Siehe Penicillin G ^a	$R \geq 32$ I16 $S \leq 8^d$	$R \geq 1$ I0,5 $S \leq 0,25^a$	$R \geq 4$ $S \leq 2^a$		
Empfindlich [%]			100	100	100	100	100	100	48,39	0	0		
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813			$\leq 0,125$	≤ 4	≤ 4	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 4/2$	$\leq 4/0,4$	1	$\leq 0,125$	≤ 1

Hemmhofdurchmesser [mm]						Viertelgemelk	
Clindamycin 2 µg	Tetrazyklin 30 µg	Penicillin/ Framycetin (10/100 µg)	Ceftiofur 30 µg	Rifampicin 5 µg	Vancomycin 5 µg	Kolonie bildende Einheiten/ml	Zellen/µl
0	10	40	40	30	18	4,4*10 ⁴	147
0	12	44	42	32	18	6,7*10 ⁴	164
0	14	48	40	32	18	3,6*10 ⁴	691
0	10	44	32	32	18	9,3*10 ³	82
0	10	48	38	32	18	4,1*10 ³	589
0	12	46	32	34	20	2,7*10 ⁴	290
0	10	46	42	30	20	7,6*10 ³	875
0	12	46	40	30	20	1,3*10 ⁵	410
0	12	44	42	30	20	8,0*10 ³	48
0	10	44	42	32	18	2,0*10 ³	173
0	8	48	42	34	18	1,3*10 ⁴	222
0	8	46	42	32	18	2,9*10 ³	460
0	8	50	42	32	18	5,5*10 ⁴	457
0	10	48	42	32	18	1,3*10 ⁴	193
0	8	50	44	32	20	5,3*10 ⁵	293
0	10	42	34	32	20	9,3*10 ⁴	182
0	12	50	42	32	18	8,0*10 ²	606
0	10	48	44	30	18	9,3*10 ²	95
0	12	50	38	34	20	8,0*10 ⁴	426
0	12	50	42	32	20	n. b.	268
0	10	42	38	30	18	8,0*10 ⁴	445
0	12	46	40	32	20	n. b.	784
0	6	40	38	30	18	6,7*10 ³	169
0	8	48	42	32	18	9,3*10 ³	205
0	10	50	42	30	18	1,7*10 ⁴	329
0	6	48	38	30	18	9,3*10 ³	535
0	12	50	48	32	20	1,1*10 ⁴	327
0	10	44	40	30	18	1,7*10 ⁴	972
0	12	44	32	32	18	4,0*10 ³	842
0	12	46	40	32	20	5,3*10 ³	3611
0	14	50	40	32	20	9,3*10 ⁶	1797
R≤15 I 16-18 S≥19 ^a	R≤18 I 19-22 S≥23 ^a	R≤18 I 19-20 S≥21 ^e	R≤18 I 19-20 S≥21 ^a	R<15 S≥21 ^b	R<13 S≥13 ^b		
0	0	100	100	100	100		
34	30	42	42	32	20		

Aufgrund des für mastitisassoziierte *Sc. agalactiae* abweichenden Resistenzprofils (BVL, 2017) wurden die Isolate (n = 31) zur weiteren Diagnostik bei -80 °C in einem Stammhaltungssystem kryokonserviert.

Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) ausgewählter Isolate

Am Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität in Wien wurde stellvertretend von vier phänotypisch unterschiedlichen Isolaten von vier Kühen eine MLST nach JONES et al. (2003) durchgeführt. Dabei wurden folgende Auswahlkriterien herangezogen:

I) Kuh A war das erste *Sc. agalactiae*-positive Tier des Bestandes und der Phänotyp des Isolats A/RV entsprach dem der Mehrheit aller Isolate.

II) Das Isolat B/RV wurde stellvertretend für die gegenüber der Wirkstoffkombination Kanamycin/Cefalexin unempfindlichen Isolate sequenziert.

III) Das Isolat M/RV war das einzige, das Laktosefermentation zeigte.

IV) Das Isolat N/RH wurde aus einer klinischen Mastitis am ersten Laktationstag nach dem Trockenstellen angezüchtet.

Bei der MLST wurden Fragmente von sieben Haushaltsgenen (*adhP* (Alkoholdehydrogenase), *pheS* (Phenylalanin-tRNA-Synthetase), *atr* (Aminosäuren-Transporter-Protein), *glnA* (Glutaminsynthetase), *sdhA* (Serin-Dehydratase), *glcK* (Glukose-Kinase) und *tkt* (Transketolase)) mittels PCR vervielfältigt und anschließend sequenziert. Die dabei ermittelten Sequenzen wurden mit Sequenzeinträgen in der öffentlich zugänglichen PubMLST-Datenbank für *Sc. agalactiae* (<https://pubmlst.org/sagalactiae/>, Zugriff: 01.10.2019) verglichen und dabei die entsprechenden Allelnummern bestimmt. Durch Kombination der Allelnummern der sieben Haushaltsgene konnten die untersuchten Isolate schließlich dem Sequenztyp 1 (ST1) zugeordnet werden.

L. = Aktuelle Anzahl der Laktationen; Tg. = Melktage der laufenden Laktation; RV = rechts vorne; RH = rechts hinten; LV = links vorne; LH = links hinten; MHK₉₀ = Minimale Hemmkonzentration, bei der ≥90 % der Isolate im Wachstum gehemmt werden; S = empfindlich; I = intermediär; R = resistent; n. b. = nicht bestimmbar – Isolierung nach Anreicherungs-schritt / L. = number of lactations; Tg. = days in milk; RV = right front; RH = right rear; LV = left front; LH = left rear; MHK₉₀ = concentration of the antimicrobial agent able to inhibit the growth of 90% of the isolates; S = susceptible; I = partially susceptible; R = resistant; n. b. = not detectable – culture from enrichment medium; ^a CLSI (2018); ^b EUCAST (2019); ^c FESSLER et al. (2012); ^d PILLAR et al. (2009); ^e PILLAR et al. (2014); * ST1

Sanierungsmaßnahmen und Therapieverfahren

Die Sanierungsmaßnahmen im Bestand umfassten die sofortige antibiotische Behandlung („Blitztherapie“) aller therapiewürdigen Kühe und die Einführung einer strikten Melkhygiene. Zwei infizierte Tiere (Kuh E und J) wurden aufgrund mehrerer betroffener Euterviertel bei gleichzeitig geringer Milchleistung ausgeschieden. Die Therapie erfolgte kombiniert nach folgendem Schema: Die Kühe wurden über drei Tage systemisch mit Penethamathydrojodid (10.000 I.E./kg alle 24 Stunden i.m., Ingel-Mamyzin®) therapiert. Gleichzeitig wurde über vier Tage Penicillin G (3 Mio. I.E. alle 24 Stunden, VANAPROC) intramammär appliziert. Am ersten Tag erhielten die Tiere zusätzlich Meloxicam (0,5 mg/kg s.c., Metacam®). Eine temporäre räumliche Trennung der Herde in eine infizierte und eine nicht infizierte Gruppe war nicht möglich.

Begleitend zu den therapeutischen Maßnahmen wurde das Melkmanagement modifiziert: Es konnten das Tragen von Handschuhen bei der Melkung, die Verwendung eines Vormelkbeckers, konsequentes Zitzendippen mit einem jodhaltigen Dippmittel (> 2.500 ppm Jod, Non-return-Becher) und eine Melkzeugzwischeninfektion nach jeder Kuh (800 ppm Peressigsäurelösung) eingeführt werden. In der Sanierungsphase wurde auch empfohlen, das Trockenstellen aller Kühe mit der bisher eingesetzten antibiotischen Trockenstellformulierung beizubehalten (VETSUISSE et al., 2019).

Vier Wochen nach beendeter Therapie wurden erneut Viertelgemelksproben aseptisch entnommen und bakteriologisch untersucht. In keinem betroffenen Viertel konnte *Sc. agalactiae* trotz Anreicherungsverfahren erneut kultiviert werden.

Die Tankmilchzellzahl (geometrisches Mittel) sank in den sechs Monaten nach erfolgter Sanierung wieder auf durchschnittlich 106.000 Zellen/ml Milch. Der Betrieb sendet nun vor dem Trockenstellen, nach der Kalbung und bei positiven CMT-Ergebnissen Viertelgemelksproben zur BU ein.

Bezugsquellennachweis

Aeskulin-Blut-Agar, CASO-Bouillon, Columbia-Agar mit 5 % Schafblutzusatz, Galle-Aeskulin-Azid-Agar, Phenolrot-Bouillon mit Laktose, Streptococcal Grouping Kit, Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland; API® RAPID ID 32 STREP, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich; Benestermycin®, Ingel-Mamyzin®, Metacam®, Boehringer Ingelheim-Vetmedica GmbH; Cryobank™, Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland; DeLaval Zellzahlmessgerät DCC, DeLaval GmbH, Glinda, Deutschland; MICRONAUT-S Mastitis 3, Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Deutschland; VANAPROC, Vana GmbH, Wien, Österreich

■ Diskussion

In den letzten Jahren wurde in Skandinavien wieder ein vermehrtes Auftreten von *Sc. agalactiae*-Mastitiden in Milchviehherden beschrieben, wobei die bovinen Isolate eine Verwandtschaft mit humanen Stämmen aufwiesen (LYHS et al., 2016; PERSSON-WALLER et al., 2016; VETSUISSE et al., 2019). In Finnland und Schweden gehörten 54 % der untersuchten humanen und bovinen *Sc. agalactiae*-Isolate zu den Sequenztypen ST1, 8, 12, 23 und 196, die sowohl Mensch (Nachweis in beispielsweise Blut, Harn, Hirn, Rachen, Rektum, Vagina) als auch Rind (Nachweis in der Milch) zugeordnet werden konnten. Gemeinsame Sequenztypen können auf eine Übertragung zwischen verschiedenen Wirtsspezies (wie zwischen Mensch und Rind, Hund und Kaninchen) hinweisen, aber auch mit einer gemeinsamen Infektionsquelle oder Übertrag mit Adaption und Verbreitung im neuen Wirt zu erklären sein (LYHS et al., 2016; MORACH et al., 2018; COBO-ANGEL et al., 2019; PubMLST, Zugriff: 07.01.2020). Andere Autoren kommen wiederum zu dem Ergebnis, dass bestimmte genetische *Sc. agalactiae*-Linien (z.B. ST17 und ST19 bei Menschen, ST103 bei Rindern) spezifischen Wirten zugehörig sind (SUKHNANAND et al., 2005; SØRENSEN et al., 2010; KEEFE, 2012; DA CUNHA et al., 2014; LYHS et al., 2016). Auf dem hier beschriebenen Betrieb konnte jener Sequenztyp (ST1), der am häufigsten mit Übertragung zwischen Kuh und Mensch assoziiert wird, erstmalig auch in Österreich in Milchproben von Kühen nachgewiesen werden. Dieser Sequenztyp wurde seit 1992 in Europa, Japan, Kanada, Australien und Afrika in der Humanmedizin überwiegend in asymptomatischen Trägern, aber auch in Zusammenhang mit Bakteriämien sowie Erkrankungen der unteren Atemwege isoliert (PubMLST, Zugriff: 07.01.2020). Eine Studie aus Dänemark nennt den Menschen (Oropharynx, Rektum, Vagina) als ein mögliches Reservoir und Infektionsquelle für Rinder, und konnte für *Sc. agalactiae* keine Wirtsspezifität feststellen, sodass in Milchviehherden das Reservoir „Mensch“ in Sanierungs- und Hygienekonzepten mitberücksichtigt werden sollte (SØRENSEN et al., 2019). Ebenfalls sollte bei einer geteilten Pathogenpopulation auch das Potential einer Übertragung bedacht werden (LYHS et al., 2016; MORACH et al., 2018).

Auch wenn Stammvergleichsuntersuchungen mit molekularen Methoden für epidemiologische Fragestellungen Mittel der Wahl sind, wurden bestimmte phänotypische Merkmale human- bzw. kuhassoziierten Stämmen zugeordnet. So gelten mastitisassoziierte *Sc. agalactiae* von Kühen grundsätzlich als sehr empfindlich gegenüber Antibiotika (BLOWEY u. EDMONDSON, 2010). Im vorliegenden Fall waren Tetrazyklin-, Erythromycin und Clindamycin-Resistenz sowie eine verminderte Sensibilität gegenüber Kanamycin/Cefalexin ungewöhnlich (MERL et al.,

2003; DOGAN et al., 2005; MANEKE et al., 2011; DA CUNHA et al., 2014; BOTELHO et al., 2018). Es wurde beschrieben, dass die Mehrheit der Rinder-Isolate im Gegensatz zu den humanen Isolaten Laktose fermentieren konnten, was auf eine Adaption an das Euter zurückgeführt wurde (SØRENSEN et al., 2010; LYHS et al., 2016). Die in dieser Untersuchung isolierten *Sc. agalactiae*-Stämme zeigen für humane Stämme beschriebene Charakteristiken, sodass in Kombination mit dem Nachweis von ST1 in Österreich zumindest von einer artübergreifenden Wirtspopulation ausgegangen werden kann.

Obwohl das Euter als Hauptreservoir gilt, ist *Sc. agalactiae* eingeschränkt in der Umwelt überlebensfähig: So kann er über die Melkerhände und Kleidung mehrere Tage lang übertragen werden (BLOWEY u. EDMONDSON, 2010). Weiterhin wurde er in infizierten Herden auch im Stall, im Trinkwasser oder in Rektaltupfern der Kühe nachgewiesen, sodass das Paradigma eines obligat intramammären Pathogens überdacht und neben der Übertragung via Melkmaschine auch die extramammären Reservoirs bzw. die Übertragung über die Umwelt zu erwägen sind (JØRGENSEN et al., 2016; COBO-ÁNGEL et al., 2018). Stammvergleichsuntersuchungen können das Wissen über die Übertragung zwischen verschiedenen Wirten erweitern. In unserem Fall konnte die Eintragsquelle in die Herde nicht identifiziert werden, es kann jedoch aufgrund des Stammpfiles nicht ausgeschlossen werden, dass der Erreger humanen Ursprungs ist. Wegen des kontagiösen Charakters von *Sc. agalactiae* wird in einer infizierten Herde von epidemiologisch verwandten Stämmen ausgegangen (MERL et al., 2003). Daher ist anzunehmen, dass die Verbreitung in der Herde über die Melkmaschine erfolgte. Aus diesem Grund sei abschließend nochmals betont, dass das Einhalten

einer konsequenten Melkhygiene und die rasche ätiologische Abklärung von Mastitisproblemen wichtige Maßnahmen zur Sicherung der Eutergesundheit darstellen (ZADOKS et al., 2011; LYHS et al., 2016).

Die Resultate dieser Arbeit verdeutlichen, dass ein koordiniertes Sanierungskonzept unter Zusammenarbeit von Tierhalter, Haustierarzt und Untersuchungslabor bei Galtstreptokokken essentiell und bei konsequenter Umsetzung erfolgsversprechend ist. Der Heilungserfolg bei einer kombiniert intramammären und parenteralen Therapie mit Penicillinen aller infizierter Tiere gleichzeitig ist als gut bis sehr gut (>90 %) einzustufen. Für die Beurteilung der Therapiewürdigkeit sind neben der Anzahl der betroffenen Viertel auch die Mastitishistorie und der Wert des Einzeltieres sowie die Betriebsstruktur heranzuziehen: Der Tierhalter muss die Erregerverschleppung durch entsprechende Maßnahmen wie Einhalten einer Melkreihenfolge (gesunde vor verdächtigen vor infizierten Kühen) oder separates Melkzeug für erkrankte Tiere verhindern. Nach einem Therapieversuch sollten alle wiederholt positiven Tiere ausgeschieden werden. Voraussetzung zum Erhalt der Eutergesundheit sind ein gutes Melk- und Hygienemanagement, das auch nach der Sanierungsphase beibehalten wird, sowie die Überwachung der Eutergesundheit durch Milchprobenuntersuchungen (WINTER u. ZEHLE, 2008; BLOWEY u. EDMONDSON, 2010; ZADOKS et al., 2011; KEEFE, 2012).

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Dr. Christoph Prettschuh, dem Team der Rinderpraxis Thalgau sowie den Tierbesitzern für die Unterstützung.

Fazit für die Praxis:

Die Eutergesundheit eines Bestandes ist ein dynamisches Geschehen, das regelmäßige bakteriologische Kontrollen zur Überwachung und Reevaluierung erfordert. Bei steigenden Zellzahlen auf Herdenebene sollte auch an *Streptococcus agalactiae* als Ursache gedacht werden. *Streptococcus agalactiae* oder Gruppe-B-Streptokokken können mit einem gezielten Therapiekonzept und strikten Hygienemaßnahmen in der Regel erfolgreich aus einer Herde eradiziert werden. Zu den Sequenztypen in österreichischen Herden besteht noch Forschungsbedarf.

Literatur

- BLOWEY, R., EDMONDSON, P. (2010): The Mastitis Organism. In: BLOWEY, R., EDMONDSON, P. (eds): Mastitis Control in Dairy Herds. 2nd ed., CABI, Wallingford, Oxfordshire, 34–59.
- BOTELHO, A.C.N., FERREIRA, A.F.M., FRACALANZZA, S.E.L., TEIXEIRA, L.M., PINTO, T.C.A. (2018): A perspective on the potential zoonotic role of *Streptococcus agalactiae*: Searching for a missing link in alternative transmission routes. Front Microbiol 9, 608. doi:10.3389/fmicb.2018.00608
- BVL - Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2017): Berichte zu den Resistenzmonitoringstudien 2014 und 2015 - Resistenzsituation bei klinisch wichtigen tierpathogenen Bakterien. Report 11.5, Berlin.
- CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2018): VET08 - Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 54–66.
- COBO-ÁNGEL, C., JARAMILLO-JARAMILLO, A.S., LASSO-ROJAS, L.M., AGUILAR-MARIN, S.B., SANCHEZ, J., RODRIGUEZ-

- LECOMPTE, J.C., CEBALLOS-MÁRQUEZ, A., ZADOKS, R.N. (2018): *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces, and environment in Colombian dairy herds. *PLoS One* **13**, e0208990. doi:10.1371/journal.pone.0208990
- COBO-ANGEL, C.G., JARAMILLO-JARAMILLO, A.S., PALACIO-AGUILERA, M., JURADO-VARGAS, L., CALVO-VILLEGAS, E.A., OSPINA-LOAIZA, D.A., RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C., SANCHEZ, J., ZADOKS, R., CEBALLOS-MARQUEZ, A. (2019): Potential group B *Streptococcus* interspecies transmission between cattle and people in Colombian dairy farms. *Sci Rep* **9**, 14025. doi:10.1038/s41598-019-50225-w
- DA CUNHA, V., DAVIES, M.R., DOUARRE, P.E., ROSINSKI-CHUPIN, I., MARGARIT, I., SPINALI, S., PERKINS, T., LECHAT, P., DMYTRUK, N., SAUVAGE, E., MA, L., ROMI, B., TICHIT, M., LOPEZ-SANCHEZ, M.J., DESCORPS-DECLERE, S., SOUCHE, E., BUCHRIESER, C., TRIEU-CUOT, P., MOSZER, I., CLERMONT, D., MAIONE, D., BOUCHIER, C., MCMILLAN, D.J., PARKHILL, J., TELFORD, J.L., DOUGAN, G., WALKER, M.J., DEVANI CONSORTIUM, HOLDEN, M.T.G., POYART, C., GLASER, P. (2014): *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nat Commun* **5**, 4544. doi:10.1038/ncomms5544
- DOGAN, B., SCHUKKEN, Y.H., SANTISTEBAN, C., BOOR, K.J. (2005): Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J Clin Microbiol* **43**, 5899–5906.
- EUCAST - EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (2019): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 34–48.
- FESSLER, A.T., KASPAR, H., LINDEMAN, C.J., STEGEMANN, M.R., PETERS, T., MANKERTZ, J., WATTS, J.L., SCHWARZ, S. (2012): A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. *Vet Microbiol* **157**, 226–231.
- JONES, N., BOHNSACK, J.F., TAKAHASHI, S., OLIVER, K.A., CHAN, M.S., KUNST, F., GLASER, P., RUSNIOK, C., CROOK, D.W., HARDING, R.M., BISHARAT, N., SPRATT, B.G. (2003): Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *J Clin Microbiol* **41**, 2530–2536.
- JØRGENSEN, H.J., NORDSTOGA, A.B., SVILAND, S., ZADOKS, R.N., SØLVERØD, L., KVITLÉ, B., MØRK, T. (2016): *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds - rewriting the textbooks? *Vet Microbiol* **184**, 64–72.
- KEEFE, G. (2012): Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* **28**, 203–216.
- LYHS, U., KULKAS, L., KATHOLM, J., WALLER, K.P., SAHA, K., TOMUSK, R.J., ZADOKS, R.N. (2016): *Streptococcus agalactiae* serotype IV in humans and cattle, Northern Europe. *Emerg Infect Dis* **22**, 2097–2103.
- MANEKE, E., PRIDMORE, A., GOBY, L., LANG, I. (2011): Kill rate of mastitis pathogens by a combination of cefalexin and kanamycin. *J Appl Microbiol* **110**, 184–190.
- MERL, K., ABDULMAWJOOD, A., LÄMMLER, C., ZSCHÖCK, M. (2003): Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 87–92.
- MILES, A.A., MISRA, S.S., IRWIN, J.O. (1938): The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)* **38**, 732–749.
- MORACH, M., STEPHAN, R., SCHMITT, S., EWERS, C., ZSCHÖCK, M., REYES-VELEZ, J., GILLI, U., PILAR CRESPO-ORTIZ, M. DEL, CRUMLISH, M., GUNTURU, R., DAUBENBERGER, C.A., IP, M., REGLI, W., JOHLER, S. (2018): Population structure and virulence gene profiles of *Streptococcus agalactiae* collected from different hosts worldwide. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **37**, 527–536.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL (2000): NMC recommended mastitis control program. <https://manitowoc.extension.wisc.edu/files/2011/10/NMC-Mastitis-Control-Program1.pdf>; letzter Zugriff: 11.3.2020.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL (2017): Laboratory handbook on bovine mastitis. 3rd ed., National Mastitis Council, Verona, WI.
- PERSSON-WALLER, K., HOLMES, M.A., FASTH, C., ZADOKS, R.N. (2016): What drives the re-emergence of *Streptococcus agalactiae* as cause of bovine mastitis? 6th IDF International Mastitis Conference, 7.–9. September 2017, Nantes, Frankreich, 68.
- PILLAR, C.M., GOBY, L., DRAGHI, D., GROVER, P., THORNSBERRY, C. (2009): Evaluating the in vitro susceptibility of bovine mastitis pathogens to a combination of kanamycin and cefalexin: Recommendations for a disk diffusion test. *J Dairy Sci* **92**, 6217–6227.
- PILLAR, C.M., STONEBURNER, A., SHINABARGER, D.L., ABBELOOS, E., GOBY, L., BRADLEY, A.J. (2014): In vitro susceptibility of bovine mastitis pathogens to a combination of penicillin and framycetin: Development of interpretive criteria for testing by broth microdilution and disk diffusion. *J Dairy Sci* **97**, 6594–6607.
- PubMLST. *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*, GBS) locus/sequence definitions database. https://pubmlst.org/bigsd-b?db=pubmlst_sagalactiae_seqdef; letzter Zugriff: 11.3.2020.
- SØRENSEN, U.B.S., POULSEN, K., GHEZZO, C., MARGARIT, I., KILIAN, M. (2010): Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *mBio* **1**, e00178-10. doi:10.1128/mBio.00178-10
- SØRENSEN, U.B.S., KLAAS, I.C., BOES, J., FARRE, M. (2019): The distribution of clones of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) among herdspersons and dairy cows demonstrates lack of host specificity for some lineages. *Vet Microbiol* **235**, 71–79.
- SUKHNANAND, S., DOGAN, B., AYODELE, M.O., ZADOKS, R.N., CRAVER, M.P.J., DUMAS, N.B., SCHUKKEN, Y.H., BOOR, K.J., WIEDMANN, M. (2005): Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *J Clin Microbiol* **43**, 1177–1186.
- VETSUISSE, GESELLSCHAFT SCHWEIZER TIERÄRZTINNEN UND TIERÄRZTE, BUNDESAMT FÜR LEBENSMITTELSICHERHEIT UND VETERINÄRWESEN (2019): Umsichtiger Einsatz von Antibiotika bei Rindern und Schweinen – Therapieleitfaden. <https://www.blv.admin.ch/dam/blv/de/dokumente/tiere/tierkrankheiten-und-arzneimittel/tierarzneimittel/therapieleitfaden.pdf.download.pdf/therapieleitfaden-de.pdf>; letzter Zugriff: 11.3.2020.
- WALD, R., HEDERER, C., STESSL, B., WITTEK, T., BAUMGARTNER, M. (2018): *In vitro*-Empfindlichkeit von mastitissoziierten katalase-negativen äskulinpositiven Kokken gegenüber veterinärmedizinisch relevanten antimikrobiellen Wirkstoffen in Österreich. *Wien Tierärztl Monat - Vet Med Austria* **105**, 163–174.
- WALD, R., HESS, C., URBANTKE, V., WITTEK, T., BAUMGARTNER, M. (2019): Characterization of *Staphylococcus* species isolated from bovine quarter milk samples. *Animals* **9**, 200. doi:10.3390/ani905200

- WATTS, J.L., SALMON, S.A., YANCEY, R.J. (1993): Use of modified Rambach agar to differentiate *Streptococcus uberis* from other mastitis streptococci. *J Dairy Sci* **76**, 1740–1743.
- WINTER, P., ZEHLE, H.-H. (2008): Therapieschemata und Herdenkonzepte. In: WINTER, P. (Hrsg.): *Praktischer Leitfaden Mastitis: Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand*. 1. Aufl., Parey, Stuttgart, 211–217.
- ZADOKS, R.N., MIDDLETON, J.R., MCDUGALL, S., KATHOLM, J., SCHUKKEN, Y.H. (2011): Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**, 357–372.
- ZECCONI, A., PICCININI, R., ZEPPONI, A., RUFFO, G. (1997): Recovery of *Staphylococcus aureus* from centrifuged quarter milk samples. *J Dairy Sci* **80**, 3058–3063.