



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft,
Bildung und Forschung WBF

Agroscope

Anwendung einer neuen qPCR Methode zur Sanierung von *Staph. aureus* Genotyp B- positiven Milchviehherden

C. Sartori, H.U. Graber

AFEMA Tagung - Vetsuisse Bern - 10. Februar 2017



Staphylococcus aureus & Milchkuh

- „major“ Mastitispathogen
- chronisch, subklinisch
- verschiedene Genotypen (RS-PCR) (Fournier et al., 2008)
 - ❖ unterschiedliche epidemiologische & klinische Eigenschaften
 - ❖ **GTB**
 - ❖ **GTC, GTOG**
- Milchproduktion & -qualität ↓ (Zellzahlen ↑, Gehalte ↓)
- antibiotische Therapie: unbefriedigende Heilungsrate (30%)
 - Ausmerzungen, Sanierungsprogramme
- Produktion von Enterotoxinen
 - Lebensmittelsicherheit, Image (Rohmilchprodukte)



Relevante Genotypen von *S. aureus*

(Fournier et al., 2008; Heiniger et al., 2014; Boss et al., 2016; Cosandey et al., 2016)

GTB

- t2953, bovines CC8
- **ansteckend**
 - Herdenproblem
 - ≥ 2 Viertel infiziert
- hohe Kosten für die CH Landwirtschaft
- hohe Kuh- & Herdenprävalenz (Alpen!)
- **Sanierungsbedarf**

GTC

- t529, CC705
- nicht ansteckend
 - Einzelkuhinfektion
 - Einzelviertel infiziert
- begrenzte Kosten für die CH Landwirtschaft
- tiefe Kuh- & Herdenprävalenz
- Einzelkuh-Ansatz

Bedürfnis: spezifisches & schnelles Nachweissystem

Verteilung der wichtigsten Genotypen (Europa)



Cosandey et al. (2016)



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Wirtschaft,
Bildung und Forschung WBF

Agroscope

Sanierungsprogramm für *Staph. aureus* GTB

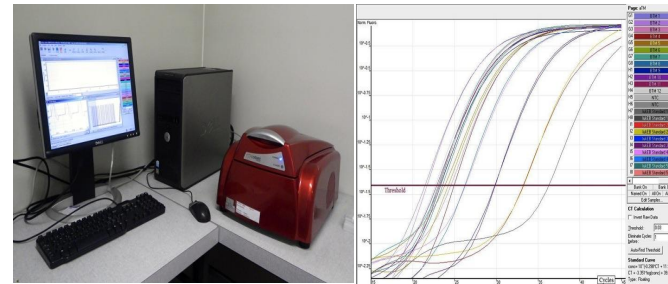


Kollaboration mit Wiederkäuerklinik (UniBe), VPHI, SAKK



Ziel

- Vergleich zweier analytischen Methoden (klassische Bakteriologie vs. qPCR) zur Sanierung von GTB-positiven Milchviehherden
 - Feldstudie
 - Effizienz, praktische Anwendung





Methoden

▪ Sanierungsgruppen

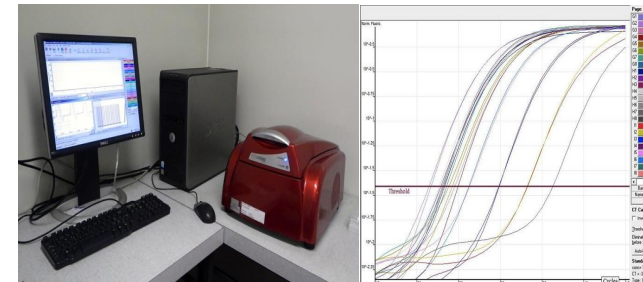
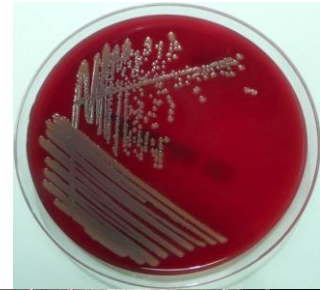
- zufällige Betriebszuteilung zu den Gruppen
- Verteilung: CH

▪ *Unterschiede:*

- ❖ analytische Methode
- ❖ Milchprobentyp (steril vs. sauber)
- ❖ Beprobungsschema

▪ *Gemeinsamkeiten:*

- ❖ Sanierungsmassnahmen auf den Betrieben
- ❖ Betreuung der Bauern





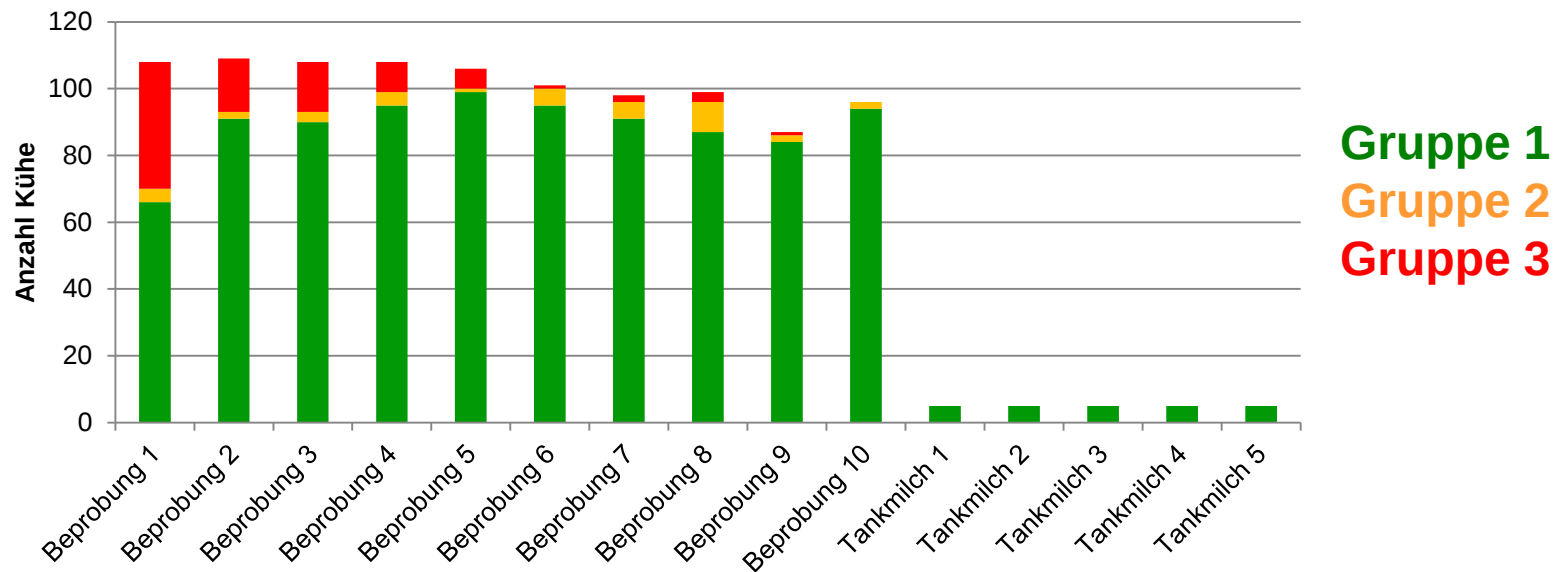
Sanierung

- Dauer: 9-10 Monate (+ Monitoring)
 - ✧ PCR-Gruppe: 1x/Monat
 - ✧ Bakteriologie-Gruppe: 3x (Anfang) + 3x (3-monatige Intervalle)
(Kirchhofer et al., 2011)
- Massnahmen auf den Betrieben
 - Melkreihenfolge (3-Gruppen-System) & -hygiene
 - Zitzentauchen
 - Melksystem: Hygiene & Service
 - freiwillige antibiotische Therapie während Laktation und Trockenstehzeit
 - Rezidive Fälle → Ausmerzungen (Kosten, Neuinfektionen)



Sanierung: Resultate I

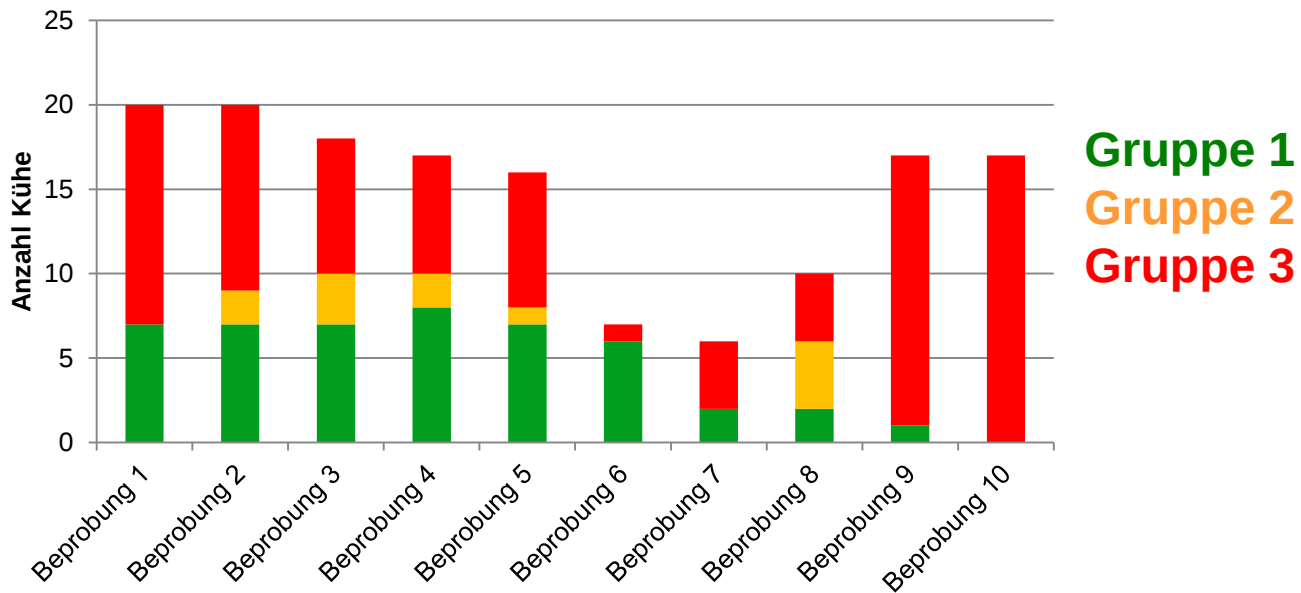
▪ erfolgreiche Sanierung (qPCR)





Sanierung: Resultate II

- **erfolglose Sanierung (qPCR)**
«Negativkontrolle»: keine Mitarbeit vom Bauer





Sanierung: Diskussion

- Vorteile der qPCR:
 - Beprobung («sauber») → Grossbetriebe
 - sehr zuverlässige Gruppeneinteilung
 - keine falsch-negative & -positive Resultate
 - Analyse von Pools möglich
 - effizientes Monitoring (Tankmilch)

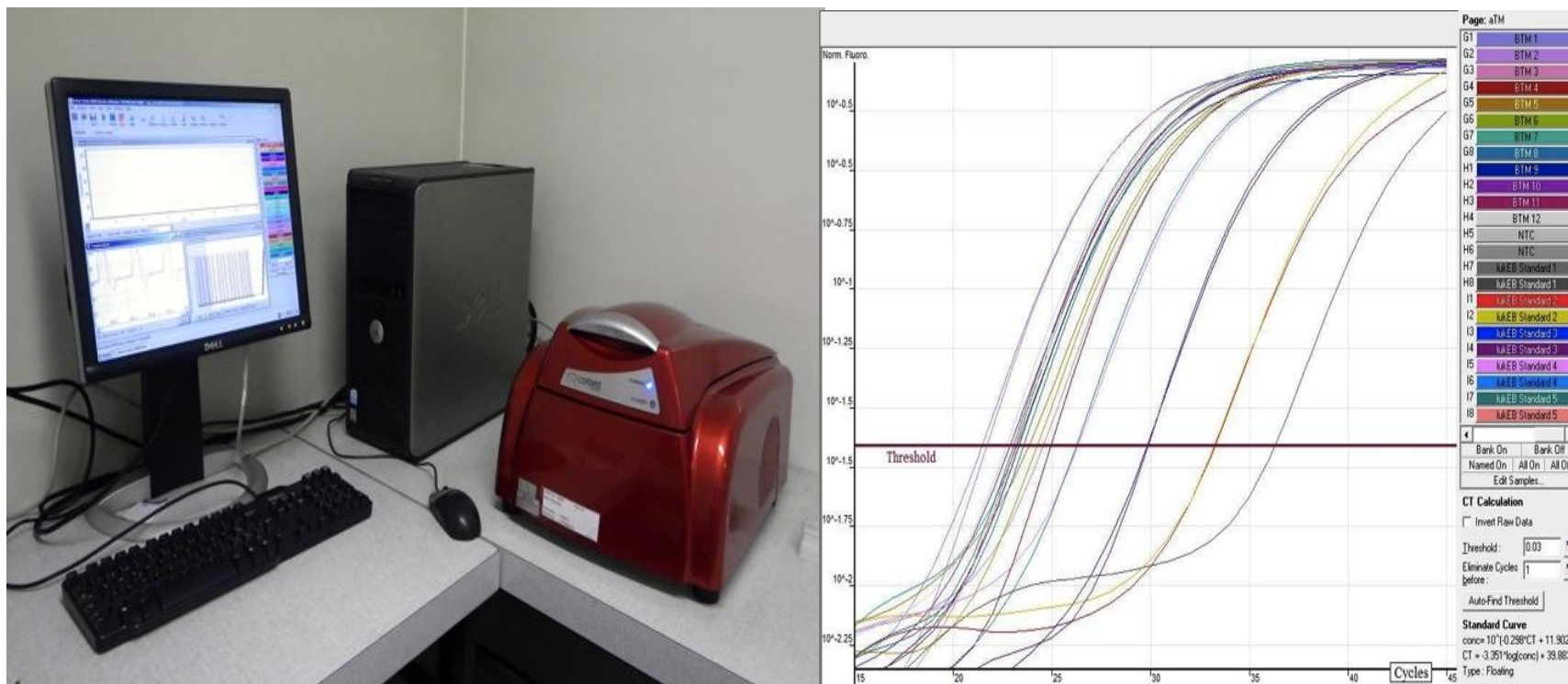


→ **Sanierung wird massiv vereinfacht & schneller**

- Bakteriologie nur möglich für Kleinbetriebe (bis 30 Kühen)
 - Beprobung und Analysen sehr zeitaufwendig



Neuer qPCR Ansatz für den Nachweis von *Staph. aureus* GTB in Kuhmilch





Ziel

Vereinfachung der GTB-Diagnostik

- nur **1 Targetgen** (1 Reaktion) → Resultat
- high-throughput, automatisierbar, Kosteneffizienz
- Sanierung auf regionaler Ebene (Tessiner Projekt)



Methoden

- 1) Suche nach einem **neuen Target** für GTB
 - Genomvergleiche in silico (Bioinformatik)
 - Analyse von 50 *S. aureus* Genome

- 2) **Validierung** von einem neuen qPCR Ansatz für GTB
 - in vitro & in vivo



Neuer Target: Resultate I

- 10 GTB Stämme vollsequenziert: SCCgtb (Staphylococcal Cassette Chromosome) immer vorhanden
- neues Targetgen gefunden innerhalb der GTB-spezifischen chromosomalen Kasette:

➤ ***adlb***

- Adhesion-Like Bovine protein, Oberflächenprotein
- sehr spezifisch für *Staph. aureus* GTB
- sehr spezifisch für die GTB-Kasette (bisher: nie vorgekommen in GenBank)
- Lokalisation: 5'-Ende von SCCgtb



Neuer qPCR Ansatz: Resultate II

- Validierung nach OIE Richtlinien (2014):
Development and optimisation of nucleic acid detection assays
 - OIE: World Organisation for Animal Health
- analytische Sensitivität (n = 99 GTB-Stämme)
 - **97%** (3 falsch-negativ)
- analytische Spezifität (n = 62 non-GTB-Stämme)
 - 24 GTC + 24 GTOG + 14 non-*S. aureus*
 - **98.4%** (1 falsch-positiv): GTN (sehr ähnlich zu GTB)
- spiking-Experimente
 - keinen Einfluss von NSA auf die analytische Sens. & Spez.



Neuer qPCR Ansatz: Resultate III

- Nachweisgrenze nach Anreicherung
 - **235 SCE/mL Kultur** (30 cfu/mL, Faktor 7)
- gute Wiederholbarkeit (*inter*- und *intra*-assay)
- gute diagnostische Sensitivität und Spezifität (Feldstudie)
 - n = 241 Einzelkuh-Milchproben
 - diagnostische Sensitivität: **99.2%** (n = 125), 1 falsch-negativ
 - diagnostische Spezifität: **100%** (n = 116)



Diskussion & Schlussfolgerung

- neuer Ansatz: befriedigt die Bedürfnisse!
 - sehr spezifisch und sensitiv für *S. aureus* GTB
 - tiefe Nachweisgrenze
 - ausgezeichnete Feldeigenschaften (diagnostische Sens. & Spez.)
- ganze Prozedur völlig automatisierbar
- verglichen mit dem gegenwärtigen GTB-Ansatz: einfacher, schneller, billiger, höhere diagnostische Sensitivität
- area-wide approach



Fragen?

Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!